Revista Argentina de Transfusión

Vol. XXXVI
2010

N° 2-3

Asociación Argentina
de Hemoterapia
e Inmunohematología

Lavalleja 1214 (C1414DTZ) Ciudad Autónoma de Buenos Aires Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4771-2501 - Líneas rotativas - E-mail: aahi@aahi.org.ar

Sumario

117 Editorial
Despedida
del Pozo, Ana Emilia

119 Recambio Plasmático Terapéutico en enfermedades neurológicas pediátricas.
Pugliese, A.M.; Bethencourt M.C.; Nocetti, G.; Kuperman S.; Cilurzo, P.; del Pozo, A.

125 Alelos *RHD* nulos en pacientes RhD negativo de una población hospitalaria de la ciudad de Rosario.
Brajovich, Melina Luján; Trucco Boggione, Carolina; Nogués, Núria; Racca, Amelia; Muñiz-Díaz, Eduardo; Cotorruelo, Carlos

131 Análisis del Producto no conforme en el Banco de Sangre del Hospital Dr. Max Peralta, Enero-Abril, 2009: Importancia en la toma de decisiones.
Dr. Cerdas-Quesada, César

135 Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional. Programa Consulta al Experto. Producción de Factor VIII antihemofílico plasmático.
Coordinadora: Dra. León de González, Graciela; Profesoras invitadas: Mgter. Massa, Catalina; Mgter. Zucchi, Corina; Dra. Ahumada, Amelia; Lic. Moya, Cristian; Mgter. Vitali, Susana

143 Reacciones adversas en donadores del Banco de Sangre del Hospital Dr. Max Peralta: Análisis del grado de las reacciones de los donadores de enero a abril, 2009.
Dr. Cerdas-Quesada, César

147 Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional. Programa Consulta al Experto. Prueba cruzada positiva.
Coordinadora: Dra. León de González, Graciela; Profesor invitado: Dr. González, Carlos Alberto

155 Planta fraccionadora de derivados plasmáticos.
Barrios, Eva

161 Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional. Programa Consulta al Experto. Autotransfusión
Coordinadora: Dra. León de González, Graciela; Profesor invitado: Dr. Tejerina, Mario Luis

167 Reseña histórica
Historia de los antibióticos.
Belloso, Waldo H.

Contents

117 Editorial
Farewell
del Pozo, Ana Emilia

119 Therapeutic plasma exchange in pediatric neurological diseases.
Pugliese, A.M.; Bethencourt M.C.; Nocetti, G.; Kuperman S.; Cilurzo, P.; del Pozo, A.

125 *RHD* null alleles in RhD negative patients from a hospital of Rosario.
Brajovich, Melina Luján; Trucco Boggione, Carolina; Nogués, Núria; Racca, Amelia; Muñiz-Díaz, Eduardo; Cotorruelo, Carlos

131 Nonconforming product analysis at the Dr. Max Peralta Hospital Blood Bank, January-April, 2009.
Dr. Cerdas-Quesada, César

135 Ibero-American Cooperative Group on transfusional medicine: Consulting the Expert. Production of plasmatic antihemophilic VIII factor.
Mgter. Massa, Catalina; Mgter. Zucchi, Corina; Dra. Ahumada, Amelia; Lic. Moya, Cristian; Mgter. Vitali, Susana

143 Adverse reactions to allogenic whole blood donations at the Max Peralta Hospital, Costa Rica: January-April, 2009.
Dr. Cerdas-Quesada, César

147 Ibero-American Cooperative Group on transfusional medicine: Consulting the Expert. Reactive crossing tests.
Dr. González, Carlos Alberto

155 Plasmatic fractioning derivatives plant.
Barrios, Eva

161 Ibero-American Cooperative Group on transfusional medicine: Consulting the Expert. Autologous transfusion.
Dr. Tejerina, Mario Luis

167 Historical account
The antibiotics history.
Belloso, Waldo H.

Vol. XXXVI / Nº 2-3 / 2010
Págs. 113 / 114
Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología

179 Opinión y debate
Evaluación sobre el conocimiento de la medicina transfusional y sus indicaciones entre médicos del Hospital Gobernador Centeno. General Pico, La Pampa, Argentina.
Dr. Marquesoni, Nicolás

181 Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional. Programa Consulta al Experto. Células madre: Potenciales usos clínicos.
Coordinadora: Dra. León de González, Graciela; Profesor invitado: Cardier Montalvo, José MD, PhD

179 Opinion and debate
Assesment of Knowledge of Transfusional Medicine among medical staff from Gobernador Centeno Hospital; Gral. Pico, La Pampa, Argentina.
Dr. Marquesoni, Nicolás

181 Ibero-American Cooperative Group on transfusional medicine: Consulting the Expert. Mother cells: Potential clinical applications.
Cardier Montalvo, José MD, PhD

AAHI - Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Cdad. Aut. de Bs. As. - Argentina
Tel/Fax: (54-11)4771-2501 - L.Rot.
E-mail: aahi@aahi.org.ar

Vol. XXXVI / Nº 2-3 / 2010
Págs. 113 /114

Staff

Secretario de Publicaciones: Dr. Marcos Andrés Bujas

Comité de Redacción: Dra. Silvina Kuperman, Dra. Mirta Remesar, Dr. Horacio J. Salamone y Dra. Gloria Góngora Falero.

Corresponsales Nacionales: Salvador S. Minoldo *(Prov. de Córdoba)*, Juan C. Balbi *(Prov. de Corrientes)*, Nancy Dahne *(Prov. de Chaco)*, Guillermo Oscar Manera *(Prov. de Chubut)*, Pedro Negri Aranguren *(Prov. de Entre Ríos)*, Ida Severich *(Prov. de Jujuy)*, Nicolás Marquesoni *(Prov. de La Pampa)*, Ana María Pozzi *(La Plata, Prov. de Bs. As.)*, Martha Romero Ríos *(Prov. de Mendoza)*, Richard Malan *(Prov. de Misiones)* Ricardo Niborski *(Prov. de Río Negro)*, Martín de la Arena *(Prov. de Salta)*, María del Rosario Rocca *(Prov. de San Juan)*, Elsie Mitchell *(Prov. de Santa Fe)*, Néstor Bouzón *(Prov. de Santiago del Estero)*.

Corresponsales Extranjeros: F. Weinauer *(Alemania)*, Romeu Ibrahim de Carvalho *(Brasil)*, Cristina Martínez *(Chile)*, Marcela García Gutiérrez *(Colombia)*, Alfonso Duran Forn *(Costa Rica)*, José M. Ballester Santovenia *(Cuba)*, María Dolores Nieto Gallegos *(Ecuador)*, Eduardo Muñiz y Elena Franco *(España)*, Benjamín Lichtiger *(Estados Unidos)*, Marcela Contreras *(Gran Bretaña)*, Claudio Velati *(Italia)*, Juan-Claude Faber *(Luxemburgo)*, Antonio Marín López *(México)*, Andrés Bico Uribe *(Uruguay)*.

Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología

Personería Jurídica IGPJ N° 256 - Miembro Institucional de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB). Miembro Institucional de la Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea (SITS).

Comisión Directiva - Año 2010: *Presidenta:* Dra. Ana Emilia del Pozo - *Vicepresidente:* Vacante por renuncia - *Secretario General:* Dr. Abraham Isaías Kohan - *Tesorero:* Dr. Ewald Schmee - *Protesorera:* Dra. Ana M. Pozzi - *Secretaria Científica:* Dra. Silvina Kuperman - *Secretario de Actas:* Dr. Ricardo Benzadón - *Secretario de Asuntos Internacionales:* Vacante por renuncia - *Secretaria de Asuntos Profesionales:* Dra. Patricia Epstein - *Secretario de Prensa y Relaciones Públicas:* Dr. Fabián Romano - *Secretario de Publicaciones:* Dr. Marcos Andrés Bujas - *Vocales Titulares:* Dr. Martín Cerda, Dra. Susana Porrino - *Vocales Titulares por el Interior:* Dr. Pedro Negri Aranguren, Dra. Elsie Mitchell - *Vocales Suplentes:* Dra. Gloria Góngora Falero, Dra. Alicia Verme.

Comité de Ética: Dra. Ana Emilia del Pozo, Dr. Miguel de Tezanos Pinto, Dra. María Cristina Bethencourt, Dra. María Florencia Ralli.

Asesora Legal: Dra. María Florencia Ralli.

Organo de Fiscalización: *Titulares:* Dra. Elvira Pastorino Aubry, Dra. María Cristina Bethencourt - *Suplente:* Dra. Liliana Carzoglio.

Publicación oficial de la Asociación Argentina
de Hemoterapia e Inmunohematología

La Revista Argentina de Transfusión se distribuye
gratuitamente a los Miembros de la AAHI.

Imprimió: Artes Gráficas Andi

AAHI - Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Cdad. Aut. de Bs. As. - Argentina
Tel/Fax: (54-11)4771-2501 - L.Rot.
E-mail: aahi@aahi.org.ar

Editorial: Despedida

del Pozo, Ana Emilia

Esta editorial es mi gran oportunidad para agradecer a mis maestros, nuestros socios, educandos y todos aquellos, desde los representantes de los programas de sangre nacional y provinciales, las organizaciones supranacionales como OPS/OMS, los representantes de la industria que apoyan el desarrollo de nuestros programas educativos, así como para despedirme como presidenta de la AAHI, de todos los lectores de la Revista Argentina de Transfusión.

He pasado en esta organización muchas horas de mi vida en forma interrumpida durante varios años. He estado trabajando y persiguiendo sueños vinculados con aquellos que amasara durante mi primera incursión en la medicina, sueños que fueron transformándose de acuerdo al contexto histórico, social y personal, y que, en función de esa realidad, que muchas veces fue adversa, sufrieron necesarios desvíos de los que fueron los que aquella residente de hematología de la sala 18 del Hospital Ramos Mejía tenía en los años setentas.

Agradezco que la sensatez de mis maestros me otorgara la sabiduría de resignar metas y tomar otras, para volver a ellas cada vez que pudiera. Fui afortunada, por haber sido formada no sólo en la hematología clínica, sino también en el laboratorio del estudio de las anemias, de la hemostasia, de la Inmunohematología, de la preparación de componentes de la sangre, en el único lugar en que a la sazón, esto ocurría. Mis maestros de entonces fueron, entre otros, el Dr. Gregorio Bomchil, la Dra. Beatriz Iparraguirre, la Dra. Lucía Kordich; la medicina basada en hechos, en datos de la ciencia fue algo que caló hondo en muchos de los que tuvimos la suerte de ser sus educandos. Habría sido pecaminoso darle a Lucía un resultado sin haber realizado los controles normales correspondientes o ejecutar una prueba de laboratorio sin haber sido evaluado para ese desempeño antes para hacerlo.

Más tarde, en otras geografías y circunstancias, tuve también el sino de encontrar extraordinarios maestros, el Dr. Jesús Linares, primero, y el Dr. Benjamín Lichtiger después, increíble dominó. Todas esas oportunidades fueron las fichas necesarias para que yo adquiriera un sentido del deber que a veces superó mis posibilidades.

La suma algebraica de todo ello fueron las circunstancias que me llevaron a trabajar en esta asociación, y aquí conocí a muchos líderes de nuestra especialidad como el Dr. Juan Marletta y el querido editorialista Dr. Antonio Pérez Prado, quien también fuera cumpliendo su destino más profundo en la literatura.

La dupla que formamos a finales de los ochentas con el Dr. Luis Carreras Vescio hizo posible, con el apoyo incondicional de la comisión directiva de la época, liderada por el Dr. Ewald Schmee, iniciar el curso para la formación de especialistas en Hemoterapia e Inmunohematología, impulsar el programa de educación continua, congresos y simposios, con ayuda de un incomparable comité científico integrado entre otros por la Dra. Ana María Pozzi, el Dr. Marcos A. Bujas, el Dr. Horacio Salamone y por los luego incorporados Dra. Silvia Delfino y la Dra. Mabel Maschio.

La activa labor societaria desarrollada permitió que la AAHI ingresara en el terreno internacional, siendo de ese modo activos promotores y socios fundadores del GCIAMT, participantes de las reuniones de MERCOSUR relacionadas con el establecimiento de los estándares para bancos de sangre; ser traductores autorizados de los libros de la AABB —hemos traducido y editado en total tres ediciones del Manual Técnico de esa asociación— actividad que ha beneficiado a muchos profesionales de todos los países de habla hispana; desarrollamos tareas en conjunto con la OPS/OMS, como por ejemplo el inicio de la distribución de los paneles de evaluación externa del desempeño de los laboratorios que analizan marcadores de infecciones transmisibles por transfusión en la Argentina hasta el año 2003; la traducción al español del Manual de Educación a Distancia en Sangre y Componentes de la Sangre Seguros de la OMS, que la AAHI solventó como aporte a los programas educativos permitió que tanto en nuestro país como en el resto de Iberoamérica se contara con ese valiosísimo material, que fue puntapié inicial de una educación en seguridad sanguínea en todo nuestro país, alcanzando a 3400 alumnos aproximadamente. Para llevar adelante esa meta fue indispensable para mí contar con el apoyo de la Dra. Mabel Maschio y, desde luego, de la CD de ese momento presidida por el Dr. Alberto Slepoy. Tener el material traducido y los docentes potenciales

Vol. XXXVI / Nº 2-3 / 2010
Págs. 117 / 118
Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunohematología

nos permitió conseguir un subsidio para llevar adelante el programa. Logramos el subsidio que fue otorgado por el Ministerio de Salud para extender el programa educativo a todo el país, ya que el programa LUSIDA tenía entre sus metas eliminar la transmisión transfusional de VIH. Es destacable que en esa gestión de colaboración internacional de la AAHI hemos también recibido médicos de varios países de la región, becados por la OPS/OMS o autofinanciados para realizar nuestros cursos de formación de especialistas, sólo para nombrar algunas mas de las innumerables actividades efectuadas en pro *de la seguridad sanguínea, no solo en nuestro país sino también en nuestra región.*

Ese aprendizaje en nuestra asociación me permitió, gracias a la confianza y apoyo de muchos de nuestros socios, acceder a la máxima posición en la conducción de nuestra AAHI, lo cual hice de la mano de otro de los maestros de la Hemoterapia e Inmunohematología en la Argentina, el Dr. Abraham I. Kohan, quien con toda la fuerza de un hombre de principios había sostenido la necesidad de mantener la Revista Argentina de Transfusión en su edición impresa, en los momentos de la gran crisis financiera, cuando muchos dudamos de la sustentabilidad de ese propósito; y a quien, desde su última gestión como presidente y la actual como Secretario General, le debemos la denodada defensa de nuestra especialidad como HEMOTERAPIA E INMUNOHEMATOLOGÍA, la que había sido puesta en tela de juicio por una resolución trasnochada de un ministro mal informado; y hoy, cuando ustedes reciban este número de la Revista Argentina de Transfusión, en el "Simposio Luis Agote de Medicina Transfusional del Bicentenario", también recibirán el libro sobre Luis Agote, libro del cual, nuestro querido Dr. Kohan fue exclusivo promotor.

La figura de Agote es conocida y mencionada por todos nosotros, pero es la primera vez, que de resultas de la propuesta del Dr. Kohan realizamos todo un evento en su honor, y a la vez editamos un libro dedicado a la figura de un hombre completo y ejemplar como éste, el hombre que en los albores del siglo XX, no solo descubrió las propiedades del citrato de sodio para los fines transfusionales sino que fue el gestor de nuestro primer instituto de investigaciones médicas en la Argentina. El INSTITUTO MODELO DE CLÍNICA MÉDICA localizado en el Hospital Rawson, que fue el primer instituto de investigaciones clínicas en la Argentina, y que en 1978 fue fríamente desmantelado sin reemplazarlo por ninguna institución similar. Este cierre de la "casa del Agote científico" fue descripto por Ulises de Santis como "el injusto cierre del Hospital Rawson que fue dispuesto por algunos funcionarios de la Secretaría de Salud Pública de la ex Municipalidad de Buenos Aires, movidos por el capricho y la ignorancia".

No es casual que durante este bicentenario algo nos mueva a todos a realizar cosas por el colectivo que queremos ser, la AATHI por ejemplo, realiza también su congreso de la especialidad. "¿Será que la evocación de hechos sucedidos hace dos siglos, un relato más ligado a lo emotivo que al registro intelectual de aquel entresijo histórico, pueda tener la virtualidad de actuar como disparador para el inicio de una recomposición positiva de las convicciones colectivas?" tomo estas palabras del periodista Oscar R. González, porque me pregunto como él, si tal vez la conmemoración emotiva nos mueva a renovar lo grande que hay en nosotros como seres humanos, como profesionales comprometidos de este campo de la salud, como científicos, como constructores de lo que más se merecen los habitantes de este país, en el campo en el que nos toca desarrollar nuestro trabajo.

Finalmente, me permito dar algunas sentidas recomendaciones a los que sigan con la conducción de la AAHI referidas al deseo de mantenimiento de valores que considero esenciales en las funciones que representan el interés de numerosos socios pero también afectan indirectamente a toda la sociedad en que vivimos:

- *Focalicen su actividad en los derechos y necesidades de los pacientes y los donantes.*
- *Basen su práctica en las regulaciones establecidas y lo recomienden fuertemente a nuestros socios.*
- *Promuevan la investigación clínica y científica siguiendo estrictamente las normas nacionales y respetando la Declaración de Helsinski en lo que hace al respeto del individuo como sujeto de investigación.*
- *Promuevan los principios básicos de la seguridad transfusional centrada en el paciente, entendiendo que para lograrlo es necesario que las transfusiones se hagan con una indicación médica apropiada, a partir de sangre de donantes completamente altruistas, tamizada para todos los marcadores potencialmente transmisibles por transfusión y procesada bajo estrictos programas de garantía de calidad.*
- *Realicen su actividad en forma transparente y comuniquen sus decisiones en forma continua.*
- *Defiendan la integridad de la AAHI.*

Los mejores y más sinceros deseos para todos y todas los que forman parte de nuestra comunidad

del Pozo, Ana Emilia
Presidenta de la Asociación Argentina
de Hemoterapia e Inmunohematología

Recambio Plasmático Terapéutico en enfermedades neurológicas pediátricas

Pugliese, A.M.*; Bethencourt M.C.*;
Nocetti, G.*; Kuperman S.*;
Cilurzo,P.*; del Pozo, A.*

Resumen

El recambio plasmático terapéutico (RPT) es un procedimiento utilizado en el tratamiento de distintas patologías, especialmente las de etiología autoinmune. La base fisiopatológica del RPT consiste en la eliminación de mediadores inflamatorios a través de la extracción de un volumen variable de plasma del paciente y su sustitución por una solución de reposición, usualmente albúmina al 5%; utilizando separadores celulares. Objetivo: Analizar la experiencia de nuestra institución en el tratamiento con RPT de pacientes con enfermedades neurológicas. Material y métodos: Estudio retrospectivo, descriptivo sobre una población de 43 pacientes con enfermedad neurológica (Miastenia Gravis, Guillain Barré, Enfermedad de Devic, Encefalomielitis diseminada aguda, Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica y Encefalitis de Rasmussen), tratados con una serie de RPT entre Junio 1994 y Junio 2009. Resultados: Se pudieron evaluar 38 pacientes, por falta de información sobre los 5 restantes, observándose alguna mejoría del cuadro clínico en el 79% de los mismos. En 68% de los RPT se observó una o más complicaciones (hipocalcemia, hipotensión, parestesias). Conclusiones: En nuestra experiencia el recambio plasmático terapéutico constituye un tratamiento efectivo para las enfermedades neurológicas en las que fenómenos autoinmunes juegan un rol importante en la patogénesis, incluso en aquellas con un bajo nivel de evidencia clínica según la categorización de indicaciones de la ASFA.

Palabras Clave: Recambio plasmático terapéutico - Enfermedades neurológicas pediátricas - Autoinmunidad.

Summary

Therapeutic plasma exchange (TPE) is a procedure used for the treatment of different diseases, especially those of autoimmune etiology. The pathophysiological basis of the TPE is the removal of inflammatory mediators through the extraction of a variable volume of patient plasma and its replacement by a solution, usually albumin 5%, using cell separators. Objective: To analyze our institution's experience in the TPE treatment of patients with neurological diseases. Material and Methods: A retrospective, descriptive study of a population of 43 patients with neurological disease (Myasthenia Gravis, Guillain Barre syndrome, Devic's disease, acute disseminated encephalomyelitis, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, Rasmussen´s encephalitis) treated with a series of TPE between June 1994 and June 2009. Results: 38 patients were able to assess, for lack of information on the remaining 5. We observed some clinical improvement in 79% of them. In 68% of the TPE one or more complications (hypocalcemia, hypotension, paresthesias) were observed. Conclusions: In our experience the therapeutic plasma exchange is an effective treatment for neurological diseases in which autoimmune phenomena play an important role in pathogenesis, even in those with low levels of clinical evidence according to the categorization of indications of the ASFA.

Key Words: Therapeutic plasma exchange - Pediatric neurological diseases - Autoimmunity.

*Servicio de Hemoterapia del Hospital de Pediatría Prof. Dr. J. P. Garrahan. adelpozo@garrahan.gov.ar

Introducción

El recambio plasmático terapéutico (RPT) es un procedimiento que desde sus inicios en la década de los 50's ha ido cobrando importancia hasta utilizarse en la actualidad en una amplia variedad de enfermedades[1]. El RPT ha sido usado para eliminar de la sangre mediadores inflamatorios, incluyendo autoanticuerpos, componentes del complemento y citoquinas, para el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas en las que la autoinmunidad juega un rol importante[2-9].

En este trabajo examinamos retrospectivamente las historias clínicas de los procedimientos de RPT realizados a pacientes con enfermedad neurológica en nuestra institución.

Objetivo

Analizar la experiencia y analizar los resultados de nuestra institución en el tratamiento con RPT de pacientes con diversas enfermedades neurológicas como patología de base.

Material y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo, descriptivo, mediante la revisión de 270 historias clínicas de los procedimientos de RPT (40% sobre 665 RPT en general) efectuados en 43 pacientes con enfermedad neurológica de base que representan el 54% de un total de 79 pacientes por los que fue consultado el servicio de hemoterapia de nuestra institución entre junio de 1994 y junio de 2009. (Gráficos 1 y 2). Las enfermedades neurológicas incluyeron: Miastenia Gravis (MG) (categoría I) 17 pacientes, 2 de ellos en recaída; Guillain Barré (GB) (cat.I) 11 pacientes; Enfermedad de Devic (cat.III) 7 pacientes, 4 de ellos en recaída; Encefalomielitis diseminada aguda (ADEM) (cat.III) 5 pacientes; Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) (cat.I) 2 pacientes y encefalitis de Rasmussen(ER) (cat.II) 1 paciente. Se analizaron características demográficas (sexo y edad), las indicaciones según diagnóstico, el número de procedimientos, requerimiento de desvío de la solución fisiológica de cebado, la presencia y el tipo de complicaciones y resultados obtenidos. Para la respuesta clínica al RPT se consideraron dos posibilidades: mejoría o sin cambios (según parámetros clínicos).

Se utilizaron separadores celulares de flujo continuo (COBE Spectra, Gambro[R]). Se recambió una plasmemia día por medio, y el porcentaje de la volemia procesada fue en promedio de 140% por procedimiento.

Resultados

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1. Se analizaron 270 procedimientos efectuados en 43 pacientes. La distribución por sexo fue de 26 mujeres y 17 varones, con una mediana de edad de 12 años (intervalo 1-18a) (Gráficos 3 y 4).

Aplicando métodos estadísticos paramétricos y no paramétricos según corresponda observamos que la distribución por edad y por patología son variables independientes del sexo (Gráficos 5 y 6).

La distribución por patología en orden de frecuencia fue la siguiente: 39.5% Miastenia Gravis (MG), 26% Guillain Barré (GB), 16% E. de Devic, 12% ADEM, 5%

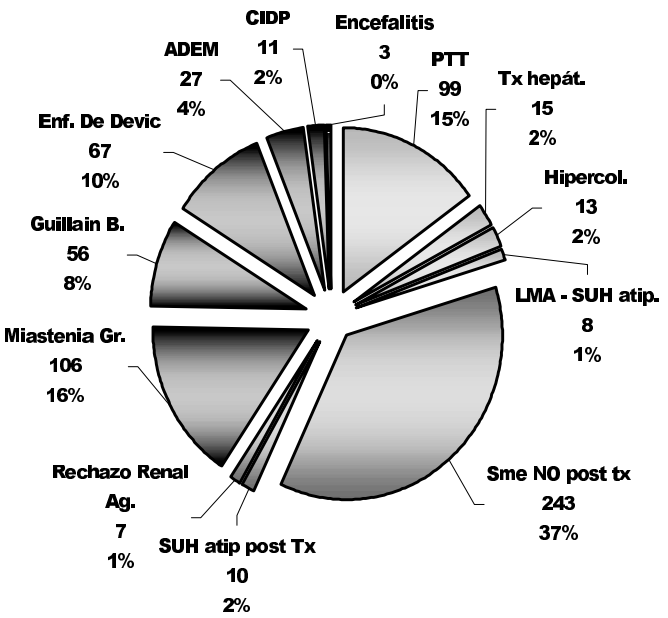


Gráfico 1. Nº de procedimientos según patología de base

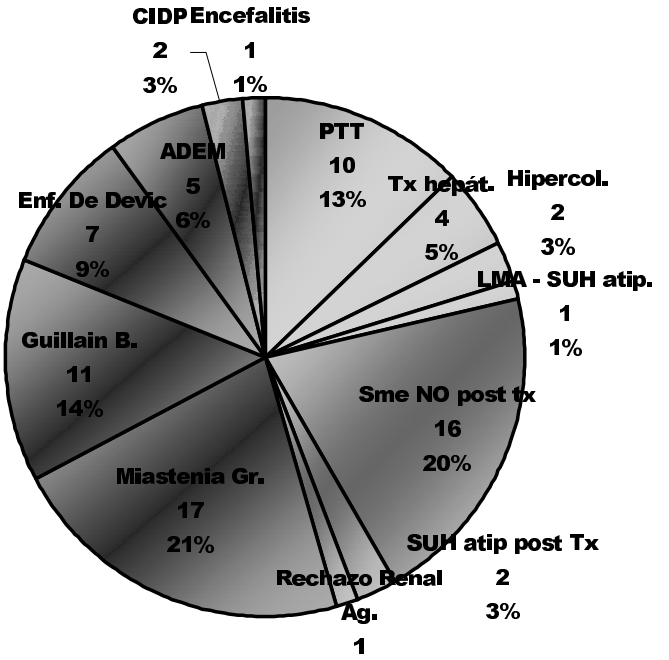


Gráfico 2. Nº de pacientes según patología de base

AAHI - Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Cdad. Aut. de Bs. As. - Argentina
Tel/Fax: (54-11)4771-2501 - L.Rot.
E-mail: aahi@aahi.org.ar
Vol. XXXVI / Nº 2-3 / 2010
Págs. 119 / 124

Tabla 1: Distribución por patología, características y respuesta de cada grupo de pacientes.

Diag.	Nº de pac	Media edad (Rango)	Sexo (F/M)	Nº de proc (Rango)	Desvío de SF	Complic.	Resp. M/SC/SR*
MG	17	14a (8-20)	12/5	5 (2-20)	0	14	14/2/1
GB	11	9a (2-17)	5/6	5 (3-8)	2	7	6/2/3
E. De Devic	7	10a (6-15)	5/2	6 (3-7)	0	4	5/1/1
ADEM	5	7a (1-12)	1/4	5 (2-7)	2	3	3/2/0
CIDP	2	16.5a (15-18)	2/0	5.5 (4-7)	0	2	1/1/0
ER	1	4a	1/0	3	0	SR	1/0/0

***M: Mejoría / SC: sin cambios / SR: sin registros.**

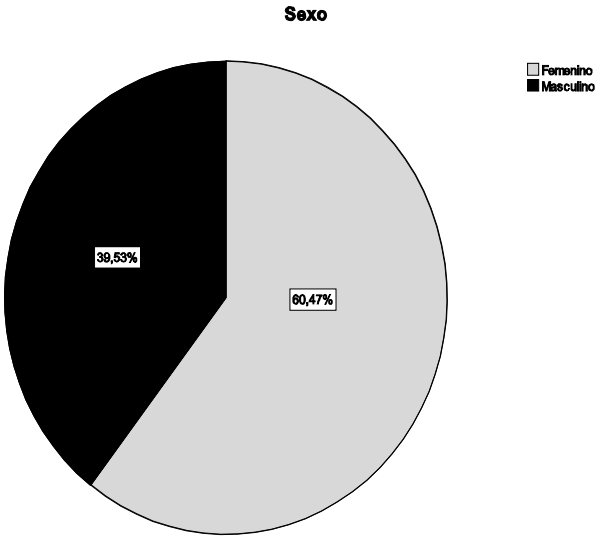


Gráfico 3. Distribución por sexo

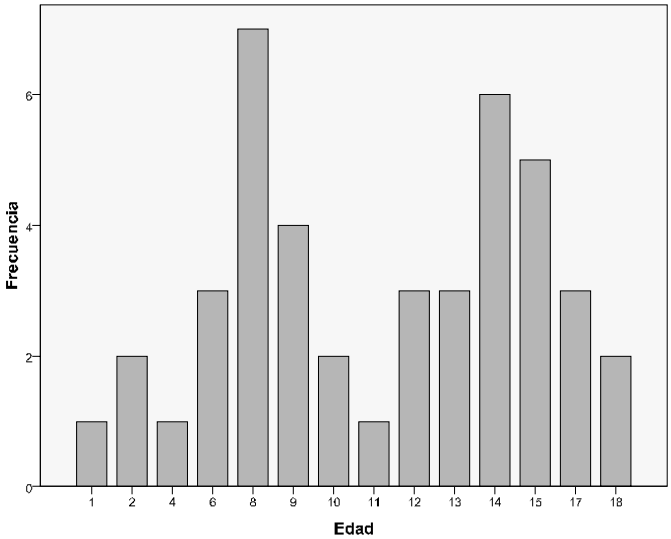


Gráfico 4. Distribución por edad

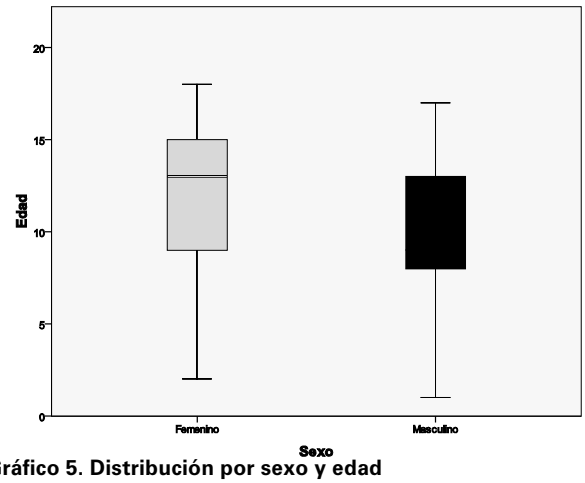


Gráfico 5. Distribución por sexo y edad

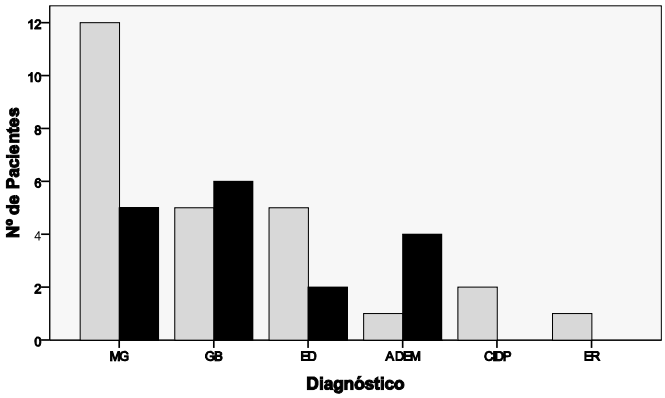


Gráfico 6. Distribución por sexo y patología

CIDP y 2% encefalitis de Rasmussen (ER) (Gráfico 7).

Cabe destacar que 2 de los 17 pacientes con MG recibieron 2 ciclos de RPT por haber presentado una recaída, así como 4 de los pacientes con enfermedad de Devic, uno de los cuales recibió 3 ciclos de tratamiento en distintos tiempos (2ª recaída). En la tabla 2 puede observarse una leve modificación de los porcentajes al considerar por separado los pacientes en recaída.

La mediana del número de procedimientos por paciente fue de 5 con un intervalo de 2 a 20. Se requirió desvío de solución fisiológica de cebado en el 12% de los procedimientos.

Se presentó una o más complicaciones en el 68% de los RPT observándose hipocalcemia en 18%, hipotensión en 23%, parestesias en 12% y una combinación de las anteriores en 16%, otras complicaciones menos frecuentes fueron epigastralgia y la infección del catéter (Gráficos 8 y 9).

Sólo se pudo evaluar la respuesta en 38 de los 43 pacientes (88%) debido a falta de información sobre los 5 restantes. Se observó mejoría del cuadro clínico en el 79% de los pacientes evaluados.

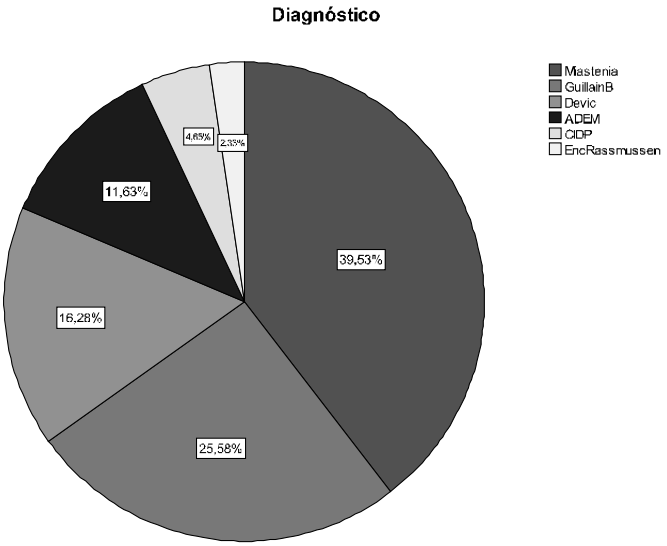


Gráfico 7. Distribución porcentual por patología

Tabla 2: Distribución por patología.

Diagnóstico	Frecuencia	Porcentaje
MG	17	34%
GB	11	22%
E de Devic	7	14%
ADEM	5	10%
Devic Rec	5	10%
Miastenia Rec	2	4%
CIDP	2	4%
ER	1	2%
Total	50	100%

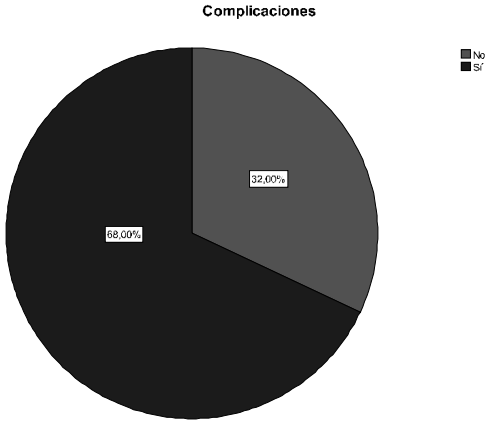


Gráfico 8. Presencia de Complicaciones

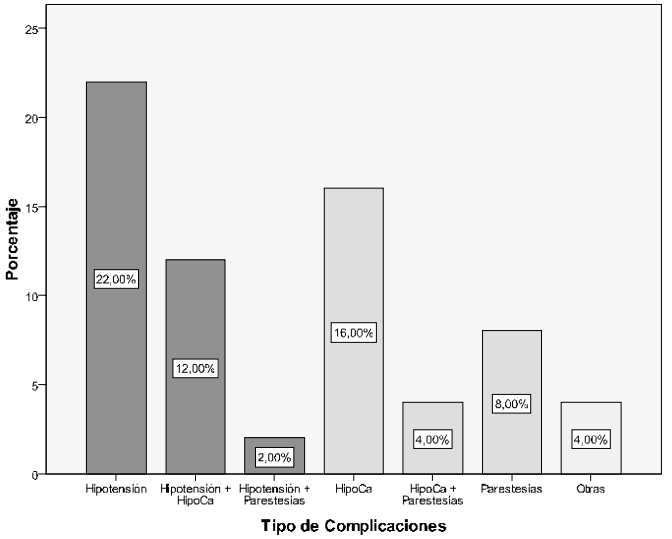


Gráfico 9. Tipo de Complicaciones

Si analizamos la respuesta por patología los resultados son los siguientes: en MG evolucionaron favorablemente 87.5%, en GB 75%, en E. de Devic 83%, en ADEM 60%, 1 de los 2 pacientes con CIDP mejoró al igual que el único paciente con ER.

Luego del análisis estadístico (Test de Students para relacionar edad y sexo, y para edad y complicaciones; Chi^2, coeficiente Phi y V de Cramer, para diagnóstico y sexo, para diagnóstico y tipo de complicaciones, y para número de procedimientos y diagnóstico) no se observó asociación entre ninguna de las variables analizadas, tratándose en consecuencia de variables independientes.

Discusión

El recambio plasmático terapéutico ha sido utilizado para el tratamiento de una amplia variedad de patologías en adultos y niños. Sin embargo, mientras que para la población adulta las indicaciones, tipos y características de los procedimientos, reacciones adversas

y respuestas están bien caracterizadas, los trabajos publicados sobre población pediátrica son limitados[10].

La ASFA (Sociedad Americana de Aféresis) estableció categorías de las indicaciones de aféresis terapéutica en las distintas enfermedades, que se van actualizando constantemente. La tabla 3 resume la categorización de las patologías mencionadas en el presente trabajo.

La práctica de la aféresis y en particular del RPT ha ido cambiando en las últimas décadas y sus aplicaciones se han ido incrementando drásticamente.

La mayoría de los datos son inferidos de la población adulta y tanto los aspectos técnicos como las indicaciones son extrapolados de la experiencia existente en este grupo[10-12].

Tabla 3: Categorización de Indicaciones de RPT en enfermedades neurológicas mencionadas. ASFA

Enfermedad	Categoría ASFA
Sme de Guillain Barré	I
CIDP	I
Miastenia Gravis	I
Enf. de Devic	III
ADEM	III
Encefalitis de Rasmussen	II

J Clin Apher 2007; 22:96-105.

Categoría I: Terapéutica estándar y aceptable.
Categoría II: Terapéutica adyuvante. La evidencia disponible sugiere eficacia.
Categoría III: Evidencia disponible no concluyente.
Categoría IV: Terapéutica no efectiva.

Existe limitada información sobre el riesgo y tipo de complicaciones en los niños, quienes debido a su corta edad, bajo peso, pequeña volemia, dificultades para obtener su cooperación durante el procedimiento, accesos vasculares inadecuados para el procedimiento y mayor riesgo de toxicidad por el citrato constituyen un grupo que merece una atención especial[13-15].

En este trabajo analizamos las diferentes variables relacionadas al RPT indicado para el tratamiento de enfermedades neurológicas en la población pediátrica.

Al observar la distribución por patología a lo largo de los años (Tabla 4) surge un primer dato importante que es una clara diferencia en la frecuencia de indicación de RPT en los primeros 10 años respecto a los últimos 5. Patologías como la MG y el GB que eran las tratadas en la primera década fueron dando paso, posteriormente, a nuevas patologías. En el año 2001 se establecieron en nuestra institución guías basadas en las evidencias clínicas publicadas, para la discusión de las prescripciones de RPT en pediatría, una de ellas trata sobre el uso de la gammaglobulina, la cual está indicada en primer lugar respecto al RPT en las siguientes patologías: Síndrome de Guillain Barré (GB), Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) y Miastenia Gravis (MG) (nivel de evidencia I/grado de recomendación A); es por esta razón que a partir de ese año disminuyó notablemente el tratamiento de estas enfermedades con RPT.

Cuando se analiza el número de pacientes por año se observa un incremento gradual en la primera década, que disminuye al ponerse en práctica las guías mencionadas. Posteriormente se produjo un nuevo incremento que se mantuvo constante, coincidente con el aumento de la incidencia institucional de otras enfermedades neurológicas con indicación de RPT, esto puede deberse a una mejor estrategia diagnóstica en

Tabla 4: Distribución de patologías por año.

Año	MG	GB	E de Devic	ADEM	CIDP	ER
1994	-	-	-	-	-	-
1995	1	-	-	-	-	-
1996	3	1	-	-	-	-
1997	2 (1 recaída)	-	-	-	-	-
1998	3	-	-	-	-	-
1999	1	2	-	-	-	1
2000	2	4	-	-	-	-
2001	4 (1 recaída)	2	-	-	-	-
2002	-	1	-	-	-	-
2003	-	-	1	-	-	-
2004	-	-	-	-	1	-
2005	1	-	1	-	-	-
2006	1	-	-	1	1	-
2007	-	-	3 (1 recaída)	2	-	-
2008	-	1	6 (4 recaídas)	1	-	-
2009	1	-	1	1	-	-

los niveles primarios de atención, sumado a la oportuna derivación a un centro especializado de alta complejidad (Gráfico 10).

No se observó una diferencia significativa (p: 0,054) al comparar la distribución por edad según el sexo, no obstante se observa una mayor frecuencia en el sexo femenino respecto al masculino, coincidente con la mayor frecuencia de patologías de etiología autoinmune en este grupo.

Pese a la variabilidad en las patologías incluidas el número de procedimientos promedio fue de 5, no observándose mejores resultados en aquellos pacientes sometidos a mayor número de procedimientos.

Sólo fue necesario efectuar desvío de solución fisiológica de cebado en aquellos pacientes con muy baja volemia, en los que el volumen extracorpóreo superaba ampliamente el 12 % de la misma.

La frecuencia de complicaciones en nuestro grupo de pacientes resultó más elevada que lo publicado en la literatura sobre población adulta (68% contra 12-40%), aunque comparable a las pocas comunicaciones publicadas sobre población pediátrica. La mayoría de las complicaciones fueron leves y transitorias, destacándose en este grupo de pacientes, la hipotensión con o sin asociación a hipocalcemia[10].

Del análisis de la respuesta obtenida luego del tratamiento en las distintas enfermedades surge que esta terapéutica resulta efectiva. No obstante se debe tener en cuenta que algunas de las enfermedades incluidas en el análisis están representadas por un bajo número de casos.

Otro punto débil a considerar es que para evaluar la respuesta sólo se han podido considerar 2 posibilidades (mejoría/sin cambios) dado que las valoraciones clínicas fueron efectuadas de manera subjetiva por distintos operadores. Sería útil poder establecer una manera objetiva de medir respuesta y evolución, que nos permita establecer niveles de respuesta y analizar las distintas variables en cada caso mediante un estudio prospectivo.

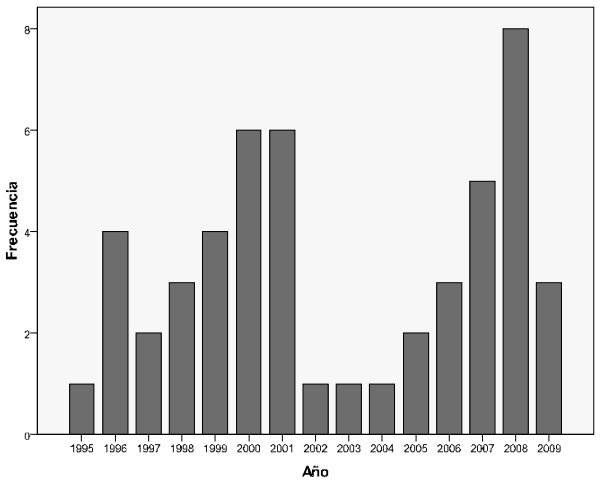


Gráfico 10. Distribución de pacientes por año

Es necesario ampliar la experiencia para poder arribar a conclusiones con un mayor nivel de evidencia.

En coincidencia con otras publicaciones la respuesta al tratamiento fue favorable en las enfermedades neurológicas mencionadas incluso en aquellas con un bajo nivel de evidencia clínica según la categorización de indicaciones de la ASFA (Sociedad Americana de Aféresis). El recambio plasmático terapéutico en enfermedades neurológicas en pediatría debe ser realizado en centros especializados con protocolos específicos de tratamiento ajustados a las características de esta población. Consideramos necesaria la creación de un registro internacional pediátrico que permita compartir experiencias y ampliar la evidencia clínica en este grupo de pacientes.

Referencias

1. Zbigniew M; Szczepiorkowski, I; Shaz, BH; Bandarenko, N; Winters J. The New Approach to Assignment of ASFA. Categories—Introduction to the Fourth Special Issue: Clinical Applications of Therapeutic Apheresis. Journal of Clinical Apheresis 2007; 22:96–105.
2. Weinstein R. Therapeutic apheresis in neurological disorders. J Clin Apher 2000: 74-128.
3. Mc Leod B Therapeutic plasma exchange in neurologic disorders In: McLeod BC, Price TH, Weinstein R, editors. Apheresis: principles and practice. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2003.
4. Yücesan C, Arslan Ö, Arat M, Yücemen N, Ayyildiz E, Ilhan O, Mutluer N. Therapeutic plasma exchange in the treatment of neuroinmunological disorders: Review of 50 cases. Transfusion and Apheresis Science. 2007; 36: 103-107.
5. Lehmann HC, Hartung HP, Hetzel G, Stüve O, Kieseier B. Plasma exchange in neuroinmunological disorders. Part 1. Arch Neurol 2006; 63: 930-935.
6. Lehmann HC, Hartung HP, Hetzel G, Stüve O, Kieseier B. Plasma exchange in neuroinmunological disorders. Part 2. Arch Neurol 2006; 63: 1066-1071.
7. Ruprecht K; Klinker, E; Dintelmann, T; Rieckmann, P; Gold, R. Plasma exchange for severe optic neuritis. Treatment of 10 patients. Neurology 2004; 63:1081-1083.
8. Balestri P; Grosso S; Acquaviva A; Bernini M. Plasmapheresis in a child affected by acute disseminated encephalomyelitis. Brain & Development 2000; 22:123-126.
9. Lin CH; Jeng JS; Yip PK. Plasmapheresis in Acute Disseminated Encephalomyelitis. Journal of Clinical Apheresis 2004; 19:154–159.
10. Michon B, Moghrabi A, Winikoff R, Barrette S, Bernstein ML, Champagne J, et al. Complications of apheresis in children. Transfusion 2007; 47:1837-1842.
11. Sutton DM, Nair RC, Rock G. Complications of plasma exchange. Transfusion 1989;29:124-7.
12. Gorlin JB. Therapeutic plasma exchange and cytapheresis. In: Nathan DG, Oski FA, editors. Hematology of infancy and childhood. Philadelphia: Saunders; 1998. p. 1827-38.
13. Rogers RL. Cooling L. Therapeutic Apheresis in Pediatric patients. In: McLeod BC, Price TH, Weinstein R, editors. Apheresis: principles and practice. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2003.
14. Galacki DM. An overview of therapeutic apheresis in pediatrics. J Clin Apher 1997;12:1-3.
15. Kasprisin DO. Techniques, indications, and toxicity of therapeutic hemapheresis in children. J Clin Apher 1989;5: 21-4.

Alelos *RHD* nulos en pacientes RhD negativo de una población hospitalaria de la ciudad de Rosario

Brajovich, Melina Luján*; Trucco
Boggione, Carolina*; Nogués, Núria*;
Racca, Amelia*; Muñiz-Díaz, Eduardo**;
Cotorruelo, Carlos*.

Resumen

El fenotipo RhD negativo en la población caucásica es causado por una deleción completa del gen *RHD.* Sin embargo, han sido reportadas regiones específicas de este gen en individuos RhD negativo de diferentes grupos étnicos. El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de alelos *RHD* nulos en pacientes RhD negativo que concurrieron al Hospital Provincial del Centenario. Se tipificaron 12672 individuos y se seleccionaron las muestras RhD negativo halladas. Se determinó el fenotipo Rh completo y posteriormente se investigó la presencia del gen *RHD* utilizando una estrategia de PCR multiplex. En las muestras que presentaron fragmentos *RHD* específicos se realizaron reacciones de PCR alelo específicas para determinar el origen de los exones. Se encontraron 653 (5.15%) muestras RhD negativo. Cincuenta y cinco (8.42%) presentaban al menos el antígeno RhC o RhE. Los estudios moleculares permitieron detectar 7 alelos *RHDψ*, 5 alelos híbridos *RHD-CE(3-7)-D*, 2 alelos híbridos *RHD-CE(3-9)-D* y 1 alelo nuevo *RHD (46 T>C)*. La frecuencia de individuos RhD negativo en la población estudiada fue significativamente menor a la reportada en caucásicos. Los resultados moleculares obtenidos indican que 2.30% (15/653) de los individuos que no expresan el antígeno D son portadores de alelos *RHD* nulos. Los alelos *RHD-CE(3-7)-D*, *RHD-CE(3-9)-D* y *RHD (46 T>C)* están presentes únicamente en individuos RhD negativo que expresan los antígenos RhC y/o RhE con una frecuencia del 14.50% (8/55). Por otro lado, el alelo *RHDψ* está asociado exclusivamente al fenotipo dccee, siendo el 1.17% (7/598) de estos individuos portadores del pseudogen *RHDψ*. Estos hallazgos señalan la importancia del estudio del polimorfismo molecular del locus *RH* para el desarrollo de estrategias de tipificación de ADN confiables, que permitan realizar la genotipificación *RHD* prenatal y optimizar la selección de unidades a transfundir en los Bancos de Sangre.

Palabras clave; Fenotipo RhD negativo – Alelos *RHD* nulos – Genotipificación *RHD*

Summary

The RhD negative phenotype in Caucasians is mainly caused by a complete deletion of the *RHD* gene. However, specific regions of the *RHD* gene in RhD negative individuals have been reported in different ethnic groups. The purpose of this study was to analyse the presence of silent *RHD* alleles in RhD negative patients concurring to the Hospital Provincial del Centenario. Blood samples from 12672 individuals were studied and the RhD negative phenotypes were selected. Initially, the complete Rh phenotype was determined and DNA samples were screened using a multiplex PCR strategy to detect the presence of an *RHD* allele. Samples carrying *RHD* specific fragments were further studied by *RHD* exon scanning with allele specific PCR. 653 samples out of the 12672 (5.15%) were found RhD negative. Within this group, 8.42 % were either RhC positive or RhE positive. Molecular studies detected 7 *RHDψ* alleles, 5 *RHD-CE(3-7)*-D hybrid alleles, 2 *RHD-CE(3-9)-D* hybrid alleles and 1 *RHD (46 T>C)* novel allele.The frequency of RhD negative

*Laboratorio de Inmunohematología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531, (2000) Rosario, Argentina. ccotorru@hotmail.com - ccotorru@fbioyf.unr.edu.ar
**Laboratorio de Inmunohematología, Banc de Sang i Teixits. Barcelona. España.

individuals observed in the population studied was lower than that reported for Caucasians. Molecular analysis showed that 2.30% (15/653) of the individuals with no expression of the D antigen carry *RHD* null alleles. *RHD-CE(3-7)-D*, *RHD-CE(3-9)-D* and *RHD (46 T>C)* alleles are present only in individuals expressing either RhC or RhE with a frequency of 14.55% (8/55). The *RHDψ* is associated with the dccee phenotype and 1.17% (7/598) of these individuals carries the *RHDψ* pseudogen. These findings highlight the importance of studying the molecular polymorphism of the *RH* locus so as to develop reliable DNA typing strategies.

Key words: RhD negative phenotype – *RHD* null alleles – *RHD* genotyping

Introducción

El sistema Rh es el grupo sanguíneo más complejo y polimórfico de la membrana del glóbulo rojo (GR). Actualmente se considera que está formado por más de 50 antígenos identificados con anticuerpos específicos y aproximadamente 170 alelos definidos por biología molecular. Aunque el elevado polimorfismo Rh ha sido analizado exhaustivamente, sus bases moleculares no han sido aún totalmente establecidas. El locus *RH* posee dos genes homólogos, *RHD* y *RHCE*, dispuestos en tandem y enfrentados por sus extremos 3' que codifican los polipéptidos transmembranales RhD y RhCE, respectivamente. Los genes *RH* están compuestos por 10 exones cada uno y segregan como haplotipos con frecuencias que varían en los distintos grupos étnicos. El gen *RHD* codifica la proteína RhD que expresa los epitopes del antígeno D, mientras que el gen *RHCE,* cuyas formas alélicas más frecuentes son *RHCe*, *RHce*, *RHcE* y *RHCE*, determina la expresión combinada de los antígenos RhCe, Rhce, RhcE y RhCE en la proteína RhCE[1-4].

Los individuos caucásicos RhD positivo poseen uno o dos genes *RHD* por célula, mientras que el fenotipo RhD negativo resulta de la ausencia de este gen[5-7]. El gen *RHD* está flanqueado por secuencias de ADN altamente homólogas denominadas cajas Rhesus 5' y 3' que contienen una región de identidad de 1463 pb completamente iguales. La deleción del gen *RHD* responsable del fenotipo negativo fue, probablemente, el resultado de un entrecruzamiento desigual entre las regiones de identidad 5' y 3' con la formación de una caja Rhesus híbrida[8]. Se ha observado en individuos RhD negativo, generalmente pertenecientes a poblaciones no caucásicas, la presencia de secuencias específicas del gen *RHD* en el locus *RH*. La variante alélica *RHDψ*, también llamada pseudogen *RHD*, se caracteriza por una duplicación de 37 pb en la región comprendida entre el extremo 3' del intrón 3 y el comienzo del exón 4, un codón stop en el exón 6 y múltiples mutaciones con cambio de sentido. En algunas poblaciones africanas, esta variante alélica presenta una frecuencia similar a la deleción del gen *RHD* en los individuos caucásicos RhD negativo[9]. También se han reportado recombinaciones entre los genes *RH* que originan formas aberrantes de la proteína RhD que no expresan epitopes D[10]. El alelo denominado *d(C)e*^{s}, cuya estructura molecular se caracteriza por la presencia de un segmento *RHCE* específico en un alelo *RHD, RHD-CE(3-7)-D*, es la tercera causa más frecuente del fenotipo RhD negativo en africanos[11-12].

Los antígenos Rh son detectados en el laboratorio inmunohematológico por técnicas de hemaglutinación utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales con alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, los métodos serológicos presentan limitaciones y en algunas situaciones no pueden ser utilizados para determinar el fenotipo Rh correctamente[13]. Por lo tanto, la identificación a nivel del ADN de las diferentes variantes alélicas, permitirá resolver los problemas planteados por las técnicas clásicas.

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de alelos *RHD* nulos en individuos que no expresan el antígeno D, para diseñar estrategias de genotipificación adecuadas a la población en estudio.

Materiales y métodos

Se tipificaron 12672 pacientes que concurrieron al Hospital Provincial del Centenario y se seleccionaron las 653 muestras RhD negativo halladas. Todas las muestras fueron extraídas con el consentimiento previo de los individuos y respetando las normas establecidas en la convención de Helsinki, previa aprobación de los protocolos de trabajo por el Comité de Bioética de nuestra Facultad.

Determinación de los fenotipos del sistema Rh

Los fenotipos Rh se analizaron por la técnica de hemaglutinación. Para la tipificación RhD, se utilizaron 2 anticuerpos monoclonales anti-D, uno IgM y otro IgM+IgG. Se seleccionaron los fenotipos RhD negativo y se tipificaron los antígenos RhC, Rhc, RhE, Rhe con anticuerpos monoclonales específicos[13]. Estas muestras RhD negativo fueron estudiadas posteriormente por los siguientes métodos moleculares.

Estudios moleculares
PCR multiplex

Se obtuvo el ADN genómico de las muestras RhD negativo por el método de salting-out [14]. Se determinó la presencia del gen *RHD* mediante un sistema de PCR multiplex con primers que amplifican el intrón 4 de los genes *RHD* y *RHCE* y una secuencia específica de la región 3' no codificante del gen *RHD* (ver Figura 1). Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio[15-16].

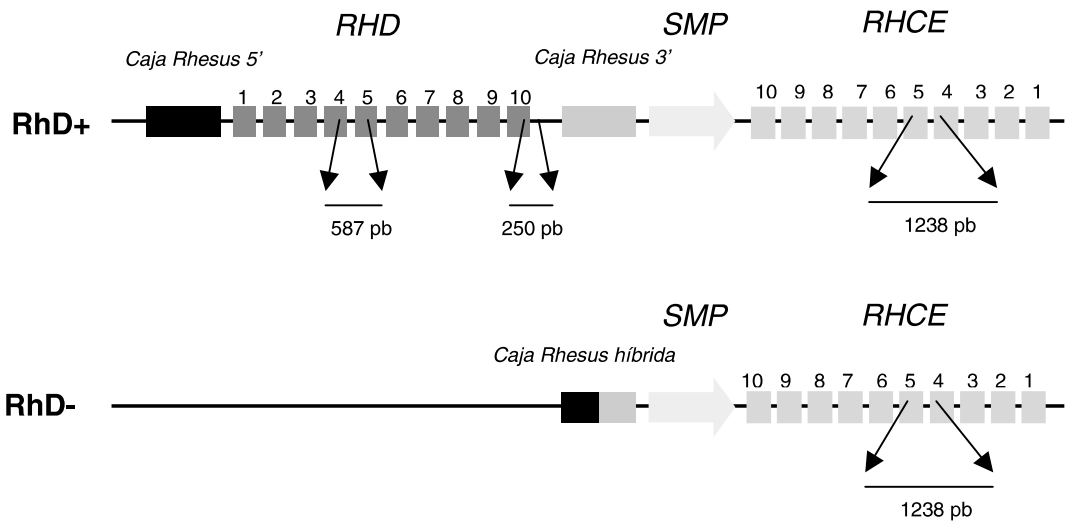


Figura 1. Estrategia de PCR multiplex. Esta estrategia permite el análisis simultáneo de dos regiones diferentes del gen *RHD* en base al polimorfismo de longitud del intrón 4 y a la presencia de una secuencia específica en la región 3' no codificante del gen *RHD*. El intrón 4 del gen *RHD* posee una deleción de 651 pb que permite diferenciarlo del intrón 4 del gen *RHCE* al generar por PCR un producto de menor peso molecular, utilizando cebadores complementarios a secuencias nucleotídicas consenso presentes en los exones 4 y 5 de ambos genes. La región 3' no codificante del gen *RHD* contiene una secuencia nucleotídica de aproximadamente 1500 pb ausente en el gen *RHCE*. La utilización de un oligonucleótido cebador reverso complementario a una secuencia específica de esta región permite la obtención de un producto de PCR únicamente en individuos portadores del gen *RHD*. El intrón 4 y la región 3' no codificante se encuentran distantes dentro del gen *RHD* permitiendo analizar la posible presencia genes híbridos *RHD-CE-D*.

Exon-scanning

Se realizaron reacciones de PCR alelo específicas para analizar el origen de cada uno de los exones en aquellas muestras RhD negativo en las que se detectó la presencia de fragmentos *RHD* específicos (intrón 4 y/o secuencia de la región 3' no codificante) con la estrategia de PCR multiplex. Se utilizaron primers que reconocen polimorfismos nucleotídicos específicos en los exones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10 del gen *RHD*[17] y se diseñaron primers intrónicos *RHD* específicos para detectar los exones 1 y 8.

Estudios de secuenciación

Los alelos *RHD* nulos que no pudieron ser caracterizados por las estrategias anteriores fueron secuenciados. Se amplificaron cada uno de los 10 exones, a partir de ADN genómico utilizando primers intrónicos. Posteriormente fueron secuenciados con cebadores internos[18].

Resultados

La tipificación RhD realizada en los 12672 pacientes permitió identificar 653 (5.15%) muestras RhD negativo. Cincuenta y cinco (8.42%) de estas 653 muestras presentaron al menos el antígeno RhC o RhE (ver Tabla I).

Tabla I. Fenotipo Rh completo de las muestras RhD negativas

Fenotipos	Ccee	ccEe	CcEe	ccEE	ccee
RhD negativo	33	15	6	1	598

Los estudios moleculares mostraron los siguientes hallazgos:

- En 7 muestras con fenotipo dccee se encontraron los fragmentos *RHD* específicos correspondientes al intrón 4 y a la región no codificante del extremo 3'. A través del exon-scanning se detectaron todos los exones del alelo *RHD*. Posteriormente, se evaluó la presencia del pseudogen *RHDψ*. Se realizaron reacciones de PCR utilizando un primer sentido que aparea en el intrón 3 y uno antisentido *RHD* específico para el intrón 4. Estos cebadores permiten diferenciar el alelo *RHD* del *RHDψ* por diferencias en la longitud de los productos de amplificación (duplicación de 37 pb en el alelo *RHDψ*)[9]. Los resultados obtenidos en esta reacción de PCR confirmaron la presencia del alelo *RHDψ* en las 7 muestras analizadas. La estructura molecular del alelo *RHDψ* se muestra en la Figura 2.

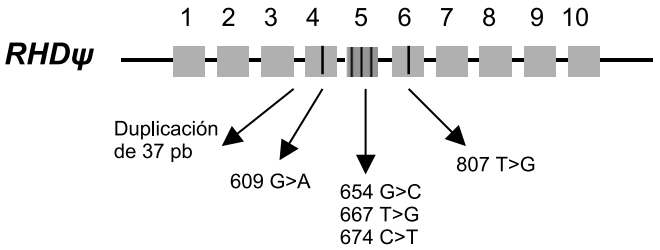


Figura 2. Estructura molecular del alelo *RHDy*. Las líneas verticales negras indican mutaciones puntuales.

- En 5 muestras con fenotipo dCcee se observó solo el fragmento correspondiente a la región específica no codificante del extremo 3' del gen *RHD.* El análisis por exon-scanning permitió determinar en estas muestras la presencia de un alelo híbrido compuesto por los exones 1, 2, 8, 9 y 10 del alelo *RHD* y por los exones 3, 4, 5, 6 y 7 del alelo *RHCE* denominado *RHD-CE(3-7)-D*. Posteriormente, se caracterizó la estructura molecular de los exones 3 y 5 de estos alelos híbridos para analizar si correspondían al alelo *d(C)e*^{s} (*r's*) reportado en la etnia negra[11]. El exón 3 fue estudiado mediante una PCR con un primer 5' *RHD* específico y un primer 3' *RHCE* específico. El exón 5 fue analizado por PCR con un primer sentido complementario a una secuencia específica del intrón 4 del gen *RHCE* (ausente en el intrón 4 del gen *RHD*) y un primer reverso con especificidad en el extremo 3' para el nucleótido G de la posición 733 del alelo *RHD*[18]. El análisis de estas muestras demostró la presencia de un exón 3 híbrido (5'*RHD*-3'*RHCE*) y de una mutación puntual en el exón 5 (733 C>G) que origina la sustitución de la leucina 245 por una valina, confirmando la presencia del alelo *d(C)e*^{s} (Figura 3).

- En otras 2 muestras con fenotipo dCcee, se observó también el fragmento correspondiente a la región específica no codificante del extremo 3' del gen *RHD.* El análisis de los 10 exones permitió identificar el alelo *RHD-CE(3-9)-D* en estas muestras (Figura 4).

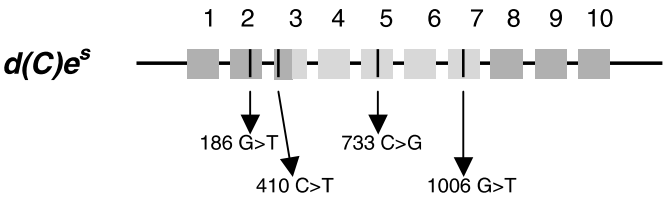


Figura 3: Estructura molecular del alelo *RHD-CE(3-7)-D* (también llamado *r's* ó *d(C)e*^{s}. En gris oscuro se indican los exones provenientes del gen *RHD* mientras que en gris claro aquellos provenientes del gen *RHCE*.

Figura 4. Estructura molecular del alelo *RHD-CE(3-9)-D*.

- Una muestra con fenotipo dccEe, presentó las secuencias correspondientes al intrón 4 y a la región 3' no codificante del gen *RHD*. En el análisis de los 10 exones se observó un patrón *RHD* aparentemente normal. Estudios posteriores de secuenciación del ADN genómico permitieron identificar un nuevo alelo del gen *RHD* con una mutación puntual en la posición 46 del exón 1, *RHD* (46 *T>C*). Este cambio de nucleótidos origina la sustitución del aminoácido triptófano de la posición 16 por una arginina (Figura 5).

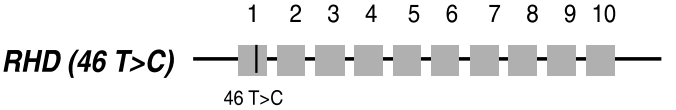


Figura 5. Estructura molecular del alelo *RHD (46 T>C)*.

Discusión

Los antígenos Rh son altamente inmunogénicos y juegan un papel central en la patogénesis de la Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal y en algunas reacciones hemolíticas transfusionales[1,6]. La investigación de las bases moleculares de la variabilidad alélica *RHD* permitirá desarrollar nuevas metodologías de estudio y optimizar la provisión de componentes sanguíneos hemocompatibles por el Banco de Sangre.

En nuestro trabajo observamos que la frecuencia de individuos RhD negativo en la muestra hospitalaria analizada fue significativamente menor a la reportada en poblaciones caucásicas[13,20]. Este hallazgo podría atribuirse al aporte indígena y africano en el acervo genético de la actual población argentina, demostrado en otros estudios[21-24].

Para realizar una correcta genotipificación *RHD* es necesario analizar previamente las bases moleculares y la distribución poblacional de las variantes alélicas capaces de ocasionar resultados discrepantes con los hallazgos serológicos. Los estudios realizados nos permitieron profundizar los conocimientos sobre los eventos genéticos responsables del fenotipo RhD negativo. Se encontraron 7 alelos producto de la duplicación de material genético y 7 alelos híbridos originados, probablemente, por un mecanismo de recombinación homóloga que conduce a un intercambio unidireccional de fragmentos de ADN entre los genes *RHD* y *RHCE.* Además se describió un alelo causado por una mutación puntual. Debido a que no pudimos obtener una

nueva muestra de este individuo, para realizar ensayos de absorción y elución, consideramos que el alelo descrito podría ser responsable de un fenotipo DEL, que se origina por mutaciones puntuales de sentido equivocado. Los eritrocitos DEL positivo son capaces de desencadenar un mecanismo de aloinmunización en receptores RhD negativo[25]. Este hallazgo demuestra además la importancia del triptofano 16 para una correcta expresión de los epitopes D.

Los resultados obtenidos indican que en la muestra analizada, el fenotipo RhD negativo no es debido exclusivamente a un proceso de deleción génica. Se encontró que 2.30% (15/653) de los individuos que no expresan el antígeno D son portadores de alelos *RHD* nulos. Se observó que los alelos *RHD-CE(3-7)-D*, *RHD-CE(3-9)-D* y *RHD (46 T>C)* están presentes únicamente en individuos RhD negativo que expresan los antígenos C y/o E con una frecuencia del 14.55% (8/55). Por otro lado, el alelo ***RHDψ*** está asociado exclusivamente al fenotipo dccee, observando que el 1.17% (7/598) de estos individuos son portadores del pseudogen *RHDψ*.

La caracterización molecular de los 15 alelos *RHD* silentes hallados, demostró que el 80% (7 alelos *RHDψ* y 5 *RHD-CE(3-7)-D)* son característicos de la población negra del Africa subsahariana[9,19,26]. El hallazgo de estas variantes alélicas confirma la contribución de alelos africanos al pool genético de nuestra población.

Este trabajo señala la importancia del estudio del polimorfismo molecular del locus *RH* para el desarrollo de estrategias de tipificación de ADN confiables que permitan realizar la genotipificación *RHD* prenatal y optimizar la selección de unidades a transfundir en los Bancos de Sangre de la ciudad de Rosario.

Referencias

1. Mollison P, Engelfreit C, Contreras M. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10th Edition, Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK, 1997.
2. Avent N. New insight into the Rh system: structure and function. Vox Sang., 2007; 93: 35-43.
3. Huang C, Liu P, Cheng J. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. Semin. Hematol., 2000; 37: 450-465.
4. Wagner F. Rhesus Base [database on the internet]. [cited 2008 Dec 5]. Available from: http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB.
5. Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by southern analysis. Blood, 1991; 78:2747-2752.
6. Avent N, Reid M. The Rh blood group system: a review. Blood, 2000; 95: 375-387.
7. Okuda H, Suganuma H, Kamesaki T. The analysis of nucleotide substitutions, gaps and recombination events between RHD and RHCE genes through complete sequencing. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2000; 274: 670-683.
8. Wagner F, Flegel W. RHD gene delection occurred in the Rhesus box. Blood, 2000; 95: 662-668.
9. Singleton B, Green C, Avent N. An RHD pseudogene containing a 37 bp duplication and a nonsense mutation is present in most Africans with the RhD negative blood group phenotype. Blood, 2000; 95: 12-18.
10. Wagner F, Frohmajer A, Flegel W. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. BMC Genet., 2001; 2: 1.
11. Wagner F, Moulds J, Tounkara A, Kouriba B, Flegel W. RHD allele distribution in Africans of Mali. BMC Genet., 2003; 4: 14.
12. Pham B, Peyrard T, Juszczak G, Dubeaux I, Gien D, Blancher A, Cartron J, Rouger P, Le Pennec P. Heterogeneous molecular background of the weak C, VS+, hrB–, HrB– phenotype in black persons. Transfusion, 2009;49:495-504.
13. Brecher M, ed. Technical Manual 14th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2002.
14. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res., 1988; 16:1215.
15. Arce M, Thompson E, Wagner S, Coyne K, Ferdman B, Lublin D .Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. Blood, 1993; 82: 651-655.
16. Cotorruelo C, Biondi C, García Borrás S, Racca A. Molecular determination of RhD phenotype by DNA typing. Clinical applications. Ann. Clin. Bioch., 2000; 37: 781-789.
17. Gassner C, Schmarda A, Kilga-Nogler S, Jenny-Feldkircher B, Rainer E, Müller T, Wagner F, Flegel W. RHD/CE typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. Transfusion, 1997; 37: 1020-1026.
18. Legler T, Maas J, Köhler M, Wagner T, Daniels G, Perco P, Panzer S. RHD sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. Transfus. Med.,D 2001; 11: 383-388.
19. Daniels G, Faas B, Green C, Smart E, Maaskant-van Wijk P, Avent N, Zondervan H, von dem Borne A, van der Schoot C: The VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serologic and molecular analysis. Transfusion, 1998; 38:951-958.
20. Reid M. Overview of molecular methods in immunohematology. Transfusion, 2007; 47:10-16.
21. Fejerman L, Carnese F, Goicoechea A, Avena S, Dejean C, Ward R. African ancestry of the population of Buenos Aires. Am. J. Phys. Anthropol., 2005; 128:164-170.
22. Cotorruelo C, Munini G, García Borrás S, Racca L, Biondi C, Racca A. The Dc(G48) es haplotype is frequent among the Dce haplotypes within a white population. Transfusion, 2007; 47:486-491.
23. Seldin M, Tian C, Shigeta R, Scherbarth H, Silva G, Belmont J, Kittles R, Gamron S, Allevi A, Palatnik S, Alvarellos A, Paira S, Caprarulo C, Guillerón C, Catoggio L, Prigione C, Berbotto G, García M, Perandones C, Ponds-Estel B, Alarcon-Riquelme M. Argentine population genetic structure: large variance in Amerindian contribution. Am. J. Phys. Anthropol., 2007; 132:455-462.
24. Cotorruelo C, Fiori S, García Borrás S, Racca L, Biondi C, Racca A. Distribution of the FYB^{ES} and RHCE*ce(733C>G) alleles in an Argentinean population: Implications for transfusion medicine. BMC Med. Genet., 2008; 9:40-48.
25. Wagner T, Körmöczi G, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr W, Legler T. Anti-D immunization by DEL red blood cells. Transfusion, 2005; 45:520-526.
26. Noizat-Pirenne F, Lee K, Pennec P, Simon P, Kazup P, Bachir D, Rouzaud A, Roussel M, Juszczak G, Menanteau C, Rouger P, Kotb R, Cartron J, Ansart-Pirenne H. Rare RHCE phenotypes in black individuals of Afro-Caribbean origin: identification and transfusion safety. Blood, 2002; 100:4223-4231.

AAHI - Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Cdad. Aut. de Bs. As. - Argentina
Tel/Fax: (54-11)4771-2501 - L.Rot.
E-mail: aahi@aahi.org.ar

Análisis del Producto no conforme en el Banco de Sangre del Hospital Dr. Max Peralta, Enero-Abril, 2009: Importancia en la toma de decisiones.

Dr. Cerdas-Quesada, César*

Resumen

El análisis de productos no conformes es un aspecto clave en la seguridad de la sangre. La producción de hemocomponentes ha avanzado pero muchos son los aspectos que deben ser valorados en relación a la aceptación de productos con el fin de evitar los efectos adversos que se pueden suscitar. Se realizó un análisis de todos los productos obtenidos entre Enero-Abril de 2009 y se obtuvo los productos que fueron descartados y las razones por las cuales se tomó la decisión de descarte, así como el análisis del error y las acciones preventivas y correctivas empleadas. El producto no conforme representó un 7% del total de unidades obtenidas entre Enero y Abril del 2009.

Palabras clave: Producto no conforme - Hemocomponentes - Seguridad transfusional - Costa Rica

Summary

The Nonconforming product analysis is a key in the blood safety. The hemocomponents production has been advanced but there are many aspects to consider and thus, to avoid adverse effects. The analysis included the unsatisfied products and the reasons why they are nonconforming. The analysis searched the preventive and corrective actions. The nonconforming product was 7% of the product obtained since January – April 2009 at the Dr. Max Peralta Hospital.

Key Words: Nonconforming product - Hemocomponent - Blood safety - Costa Rica.

Introducción

La producción de hemocomponentes ha avanzado desde la obtención de concentrados eritrocitarios, plaquetarios y plasma a partir de las unidades de sangre total hasta la producción de componentes sanguíneos complejos, nuevas opciones de la terapia de componentes sanguíneos a través del uso de células progenitoras hematopoyéticas de médula ósea, de sangre periférica o de cordón umbilical y del aislamiento y cultivo de estas células para incrementar su número.

A pesar de todo lo anterior, muchos son los aspectos que deben ser valorados en relación a la aceptación de productos con el fin de evitar los efectos adversos que se pueden suscitar.[1]

La medicina transfusional es una de las especialidades que más medidas de control y aseguramiento de la calidad ha adoptado en los últimos años debido a que esta especialidad se sitúa en el punto de mira de la sociedad general y a que las transfusiones siguen presentando riesgos, aunque sean mínimos, para la salud de los receptores.[2]

La creciente demanda de la calidad y seguridad por parte de los pacientes y de la sociedad ha impulsado esfuerzos continuos para mejorar las prácticas y garantizar que la transfusión cumpla con los objetivos determinados.

A este punto es importante definir el Producto no conforme (PNC) como todos aquellos productos que no cumplen con uno o más requisitos establecidos, lo que impide dar visto bueno a su conformidad y en este caso, al uso de las unidades generadas en el procesamiento y fraccionamiento.

*Banco de Sangre, Hospital Max Peralta, Cartago, Costa Rica y Curso Internacional de Inmunohematología y Medicina Transfusional 2009-2010. Universidad Nacional de Rosario e Instituto Universitario Italiano de Rosario, Rosario, Argentina. ccerdasq@costarricense.cr

Materiales y métodos

Se realizó un análisis de todos los productos obtenidos entre Enero-Abril de 2009 y se obtuvo los productos que fueron descartados y las razones por las cuales se tomó la decisión de descarte, así como el análisis del error y las acciones preventivas y correctivas empleadas por el Banco de Sangre del Hospital Dr. Max Peralta J. Se dividió el proceso en fraccionamiento, serología y pruebas inmunohematológicas que son los procesos diarios por los que pasan las unidades obtenidas de la donación.

Resultados

En el período en estudio se obtuvo un total de 1776 unidades luego del fraccionamiento (Cuadro I). El producto no conforme representó un 7% del total de unidades obtenidas entre Enero y Abril del 2009 (Fig.1). La mayoría de las causas del descarte se debió a ítemes correspondientes al Procesamiento y el fraccionamiento (70%), seguido por un 37% correspondiente a resultados de las pruebas serológicas. Las causas que contenían resultados de pruebas inmunohematológicas (Antiglobulina directa e indirecta, 2 DAT y 2 IAT respectivamente) representaron el porcentaje más bajo (3%) (Fig. 2).

Las causas de descarte durante el proceso encontradas fueron: Volumen insuficiente (22) Plasma quiloso (18) error técnico (15), Bolsa abierta durante el procesamiento (8), producto bemolizado (7), punción fallida (4) y la bolsa se rompe durante el proceso (3). (Fig. 3).

En cuanto a las causas serológicas, se cuenta con 18 casos de Anti-HBc positivos, 13 casos de VDRL (de los cuales 5 fueron FTA positivo), 7 HCV (1 caso de Immunoblot positivo), 4 HTLV I-II (con 2 HTLV I/II Western Blot positivos), 3 Chagas, 3 HBsAg y 0 HIV (Fig. 4).

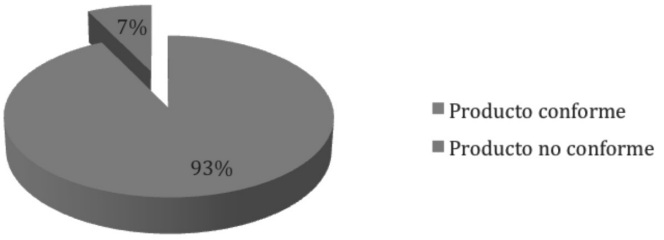


Figura 1. Clasificación del producto obtenido. Banco de Sangre, Hospital Dr. Max Peralta J. Enero-Abril, 2009.

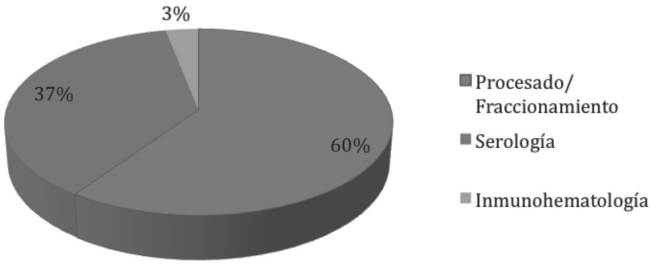


Figura 2. Producto no conforme según Sección de Descarte. Banco de Sangre, Hospital Dr. Max Peralta J, Enero-Abril, 2009.

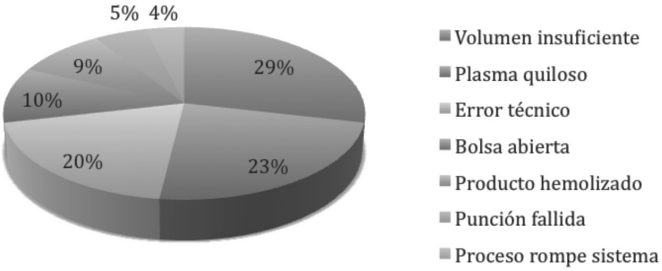


Figura 3. Producto no conforme durante el procesamiento/ fraccionamiento. Banco de Sangre, Hospital Dr. Max Peralta J. Enero-Abril, 2009.

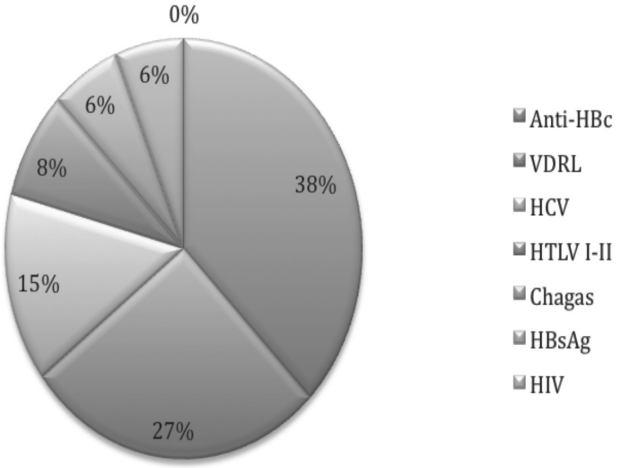


Figura 4. Producto no conforme según criterios serológicos. Banco de Sangre, Hospital Dr. Max Peralta J. Enero-Abril, 2009.

Discusión

Para un correcto control del producto no conforme se deben aplicar criterios tales como la detección e identificación de los productos no conformes donde en cada uno de los procesos de la cadena de valor, se realizan actividades de verificación y control del trabajo realizado, las que pueden dar como resultado la detección de PNC ya que se asume que es más rentable prevenir los fallos de calidad que corregirlos o lamentarlos y por lo tanto es necesario incorporar el concepto de la prevención a la gestión de la calidad bajo la denominación de Aseguramiento de la Calidad. El aseguramiento de la calidad no sustituye al Control de Calidad, sino que lo absorbe y lo complementa como herramienta de gestión.[1]

El proceso de donación y el fraccionamiento representaron los puntos donde más descartes se producen debido a volumen insuficiente por venipunciones no exitosas. Debido a que la superficie interna de los sis-

Cuadro I. Producto obtenido por Fraccionamiento de la Donación.
Banco de Sangre Hospital Dr. Max Peralta J. Enero-Abril, 2009.

01/01/2009 - 01/04/2009
TODAS LAS DONACIONES
Número Unidades: 1776

GLOBULOS ROJOS EMPACADOS (GRE)	A+	A-	B+	B-	O+	O-	AB+	AB-	Total
GLOBULOS ROJOS EMPACADOS (GRE)	172	17	72	7	292	23	6	5	594
Total	172	17	72	7	292	23	6	5	594
PLASMA (PL)	**A+**	**A-**	**B+**	**B-**	**O+**	**O-**	**AB+**	**AB-**	**Total**
PLASMA FRESCO CONGELADO (PFC)	172	17	72	7	292	23	6	5	594
Total	172	17	72	7	292	23	6	5	594
PLAQUETAS (PQ)	**A+**	**A-**	**B+**	**B-**	**O+**	**O-**	**AB+**	**AB-**	**Total**
PLAQUETAS (PQ)	171	17	72	7	287	23	6	5	588
Total	171	17	72	7	287	23	6	5	588
SANGRE TOTAL (ST)	**A+**	**A-**	**B+**	**B-**	**O+**	**O-**	**AB+**	**AB-**	**Total**
SANGRE TOTAL (ST)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	515	51	216	21	871	69	18	15	1776

temas de recolección no está completamente impregnada con anticoagulante, es necesario mantener un flujo adecuado y prevenir la activación de los factores de la coagulación que llevarían a la formación de coágulos que van a limitar el volumen recolectado. Es importante tomar en cuenta de que la recolección no debe de tardar más de 15 minutos ya que se puede generar un incremento en la formación de trombina en el plasma y un descenso en el recuento de plaquetas.[3,4]

Es importante mencionar que una recolección adecuada y el procesamiento de las unidades deben operar por procedimientos estandarizados, entrenamientos y validación de los equipos para la recolección donde se busca la calidad del producto final y los hemocomponentes, minimizar los riesgos al donador y crear una elevada satisfacción del donador que lo llevara a repetir el proceso a futuro.

En cuanto a los análisis serológicos, el anti-HBc representó la mayoría de los casos donde es bien conocido que estudios implicaron a los anticuerpos contra el antígeno del core de la Hepatitis B como otra entidad para la infectividad de los casos de hepatitis residual post transfusión no-A, no-B.[5,6] Seguidamente, se posicionó el VDRL positivo pero los análisis son marcadamente no específicos y tienen la desventaja de identificar infecciones activas o recientes.[7] Además, se sugiere que muy pocos son los donadores que tienen análisis positivos para anticuerpos y ARN o ADN detectable de *Treponema pallidum* en su circulación.[8] En contraste, muchos individuos identificados con clínica de transmisión sexual están claramente bacterémicos. Hay que considerar que a pesar de que una sífilis activa podría correlacionarse con una riesgo incrementado para HIV, no hay evidencia de que una prueba positiva para sífilis tenga una significativa asociación con el período de ventana de HIV.[9]

Se encontró 7 casos de Hepatitis C (HCV) donde es clave mencionar que la prueba tiene grandes problemas de sensibilidad y especificidad al comparlarla con los resultados obtenidos del Immunoblot (Prueba confirmatoria) donde se utiliza una tira de papel de nitrocelulosa con los péptidos de HCV en localizaciones específicas.[10]

A pesar de que 2 HTLV I/II repetidamente reactivos resultaron positivos para las pruebas confirmatorias de Western-Blot hay que tener en cuenta que en el sistema de la Cruz Roja Americana, solo el 9% de las muestras repetidamente reactivas son positivas para el Western Blot, 19,3% negativas y el faltante 71,7% son indeterminadas.[11]

Es importante por lo tanto, recolectar y analizar los PNC observados, así como los que estuvieron a punto de cometerse, debido a que de su estudio se obtendrá medidas encaminadas a evitarlos.

Conclusiones

El análisis de productos no conformes es un aspecto clave en la seguridad de la sangre. El entrenamiento constante al personal es una de las piezas claves en este punto, donde es necesario en cuanto al manejo del procedimiento así como en cuanto a la correcta flebotomía para alcanzar volúmenes necesarios para el procesamiento de las unidades de sangre total.

Consecuentemente, los hemocomponentes deben ser manejados cuidadosamente con respecto a los resultados de los análisis y una donación debe ser des-

cartada cuando un resultado es repetidamente reactivo y los donadores repetidamente reactivos deben ser diferidos en las donaciones siguientes. Claramente, este proceso resulta en la perdida de muchos donadores no infectados por lo que se debe de manejar protocolos de reingreso luego de que en un período de tiempo, los falsos positivos resulten negativos por pruebas suplementarias o confirmatorias aprobadas.

Referencias

1. Zapata-Menchaca MG. Programa de Calidad para Bancos de Sangre. Gac Med Mex. 2003: 139; 113.
2. Franco, E. El control de la calidad de los análisis inmunohematológicos en la Región de las Américas. Rev Panam Salud Publica 2003; 12: 176-182
3. Huh YO, Lichtiger B, Giacco GG. Effect of donation time on platelet concentrates and fresh frozen plasma. An in Vitro study. Vox Sang 1989;56:21-24.
4. Reiss RF, Katz AJ. Platelets and factor VIII as functions of blood Collection time. Transfusion 1976;16:229-231.
5. Stevens CE, Aach RD, Hollinger FB. Hepatitis B virus antibody in blood donors and the ocurrente for non-A, non-B Hepatitis in transfusion recipients. An análisis of the Transmission-Transmitted Viruses Study. Ann Intern Med 1984; 101:733-738.
6. Koziol DE, Holland PV, Alling DW. Antibody to hepatitis B core antigen as a paradoxical marker for non-A, non-B hepatitis agents in donated blood. Ann Intern Med 1986;104:488-495.
7. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin Microbiol Rev 1995;8:1-21.
8. Orton SL, Liu H, Dodd RY. Prevalence of circulating *Treponema pallidum* DNA and RNA in blood donors with confirmed positive syphilis test. Transfusion 2002;42:94-99.
9. Herrera GA, Lackritz EM, Janssen RS. Serologic test for syphilis as a surrogate marker for human immunodeficiency virus infection hmong United States blood donors. Transfusion 1997;37:836-840.
10. Dow BC, Buchanan I, Munro H. Relevance of RIBA-3 supplementary test to HCV PCR positivity and genotypes for HCV confirmation of blood donors. J Med Virol 1996;49:132-136.
11. Dodd RY, Stramer SL. Indeterminate results in blood donor testing: what you don´t know can hurt you. Transf Med Rev 2000;14:151-160.

Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional
Programa Consulta al Experto
Producción de Factor VIII antihemofílico plasmático

Coordinadora: Dra. León de González, Graciela
Profesoras invitadas: Mgter. Massa, Catalina*; Mgter. Zucchi, Corina*; Dra. Ahumada, Amelia*; Lic. Moya, Cristian*; Mgter. Vitali, Susana*

Introducción

El factor VIII de coagulación humano es una fracción de proteínas plasmáticas que contiene la glicoproteína factor VIII de la coagulación, junto con cantidades variables de Factor de von Willebrand, dependiendo del método de preparación.

Factor VIII se utiliza para el tratamiento de la Hemofilia A. Esta es una enfermedad que se caracteriza por una deficiencia hereditaria de la fracción coagulante del Factor VIII y se manifiesta a través de la aparición de hemorragias. En función de la concentración de esta proteína en plasma la enfermedad se clasifica en leve, moderada o severa, siendo esta última la de mayor gravedad por los riesgos de sangrado y sus consecuencias.

El desarrollo de métodos industriales de producción de derivados plasmáticos con aplicaciones terapéuticas tiene su origen en la segunda guerra mundial, cuando el Dr. Edwin J. Cohn y su grupo desarrollaron el método de fraccionamiento alcohólico del plasma, el cual se basa en la separación diferenciada de distintas proteínas del plasma a través de la modificación selectiva de diferentes variables críticas.

Actualmente este método continua siendo la base del fraccionamiento proteico del plasma en el mundo, aun cuando en numerosas situaciones se utiliza combinado con otras técnicas de purificación proteica tales como cromatografías de intercambio iónico y afinidad.

Si bien, en nuestros días ha adquirido una importancia significativa la elaboración de factores de coagulación por técnicas recombinantes, la limitada producción y el alto costo de los mismos hacen que los productos de origen plasmático sean altamente requeridos para responder a las necesidades actuales de profilaxis y tratamiento de la población hemofílica mundial.

La elaboración de Factor VIII plasmático requiere del cumplimiento estricto de requisitos de calidad de la materia prima utilizada y de los procesos de producción, control e inactivación viral aplicados, de tal manera de garantizar la seguridad y la eficacia terapéutica del producto final.

Materia prima empleada en la elaboración de Factor VIII antihemofílico

La calidad del plasma empleado en la elaboración de Factor VIII antihemofílico es crítica para garantizar la calidad y seguridad del producto elaborado.

La gran labilidad de la proteína determina la necesidad de partir de plasma con alto contenido de Factor VIII, ya que se produce una significativa pérdida de actividad a lo largo del proceso productivo y de los pasos de inactivación viral correspondientes.

Por otra parte, el hecho de que los virus precipitan en la misma fracción proteica que el Factor VIII determina la necesidad de asegurar en los bancos de sangre la adecuada selección del donante, el análisis serológico de los marcadores virales empleando métodos analíticos de última generación, el estricto cumplimiento de Normas de Buenas Prácticas de Fabricación y Control, y un sistema que garantice la trazabilidad

*Laboratorio de Hemoderivados - Universidad Nacional de Córdoba, República Argentina.
Publicado por el Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional (GCIAMT), año 2010. www.gciamt.org

de cada unidad de plasma desde el donante a la industria.

El plasma empleado como materia prima puede obtenerse a partir de donaciones de sangre entera o de plasmaféresis automatizada, siendo este último el método de elección al permitir mayor volumen por donación, mayor frecuencia de donación y mayor contenido de Factor VIII en el plasma de partida.

Toda unidad de plasma destinada a la elaboración de Factor VIII antihemofílico debe cumplir los requerimientos de la Monografía de Plasma Humano para Fraccionamiento de la Farmacopea Europea 6º edición. El mismo debe ser no reactivo para los marcadores virales HBsAg, anti-VHC, anti-VIH 1/2 y PCR-HVC. Debe asimismo contener un mínimo de 0,7 UI/ml de Factor VIII.

El plasma empleado en la elaboración de Factor VIII antihemofílico tiene requisitos más estrictos al habitualmente procesado en los bancos de sangre. Por este motivo, cada banco de sangre proveedor deberá estandarizar los diferentes procedimientos relacionados a la obtención de este tipo de plasma atendiendo a los puntos críticos del proceso:

1) Extracción de sangre

En caso de que el plasma se obtenga de una unidad de sangre entera, la agitación constante de la unidad, manual o automatizada, es el primer punto crítico que debe asegurarse para garantizar un contenido mínimo de 0,7 UI/ml de Factor VIII. La misma debe asegurar la correcta mezcla de la sangre con el anticoagulante, previniendo la activación de la cascada de la coagulación. Igualmente, el banco de sangre deberá asegurar que se excluye como plasma de calidad para la elaboración de concentrado de Factor VIII antihemofílico, cualquier unidad que provenga de una extracción traumática o en la que el tiempo de extracción de la sangre haya excedido los 15 minutos.

2) Almacenamiento de la unidad de sangre hasta su fraccionamiento

El tiempo transcurrido y la temperatura a la que se almacena la unidad de sangre desde la extracción de la misma hasta la separación del plasma son variables críticas a considerar en la estandarización del procedimiento. La bibliografía establece que el plasma puede ser separado de la unidad de sangre entera hasta 24 horas desde la extracción. El parámetro crítico que debe garantizarse es la conservación de la unidad de sangre a temperatura ambiente, entre 20 y 24ºC. Algunos autores sugieren para esto el empleo de placas de butanodiol que permiten mantener esta temperatura controlada durante 24 horas.

No obstante el amplio margen dado se establece que cuanto menor es el tiempo transcurrido desde la extracción de la sangre hasta la separación de la unidad, mayor es la actividad de Factor VIII recuperada.

El Laboratorio de Hemoderivados ha definido como especificación para los bancos de sangre proveedores que la unidad de plasma debe ser separada lo antes posible y no más de 8 horas desde la extracción de la sangre, manteniéndola a temperatura ambiente (20-24°C).

3) Separación del plasma

El bajo contenido celular es indispensable para asegurar la estabilidad de la molécula de Factor VIII, ya que las enzimas proteolíticas liberadas por las células la afectan significativamente.

En este sentido, el método de colecta de elección es la plasmaféresis, ya que los procesadores celulares poseen una fotocélula que interrumpe la separación de plasma ante la presencia de células.

Dado que la principal fuente de plasma en los países de Latinoamérica es la proveniente de donaciones de sangre entera, la estandarización del procedimiento de centrifugación, el mantenimiento adecuado de las centrífugas refrigeradas y la separación del plasma, automática o manual, inciden directamente en la calidad del mismo, y son factores necesarios de asegurar.

4) Congelamiento de la unidad de plasma

Un punto crítico en el proceso de obtención de plasma para industrialización es el congelamiento de la unidad de plasma, el cual debe iniciarse inmediatamente después de su separación de los componentes celulares. En caso de que el método de extracción sea la plasmaféresis, el congelamiento debe iniciarse inmediatamente después de finalizado el procedimiento.

La velocidad de congelamiento del plasma es el elemento clave que permite la optimización del contenido de Factor VIII. La temperatura de congelamiento está en relación inversa a la velocidad de congelamiento: a menor temperatura mayor velocidad de congelamiento. Los estudios realizados establecen la importancia de que se alcance en el corazón de la unidad de plasma una temperatura de congelamiento de por lo menos -30ºC en el menor tiempo posible. Para esto se requiere una temperatura de por lo menos -30ºC, siendo el método de elección colocar las unidades de plasma separadas unas de otras bajo una corriente continua de aire frío y a la menor temperatura tolerada por el contenedor plástico del plasma.

Uno de los factores claves a tener en cuenta es la disposición de las unidades de plasma durante el congelamiento. Es indispensable que las mismas se dispongan separadas unas de otras y evitando que se vayan agregando nuevas unidades.

5) Almacenamiento del Plasma Fresco Congelado

Una vez congelada la unidad de plasma debe ser sometida al mínimo de variaciones de temperatura posibles. Por este motivo, debe almacenarse a una temperatura de por lo menos -30ºC.

El tiempo de almacenamiento en el banco de sangre debe ser el mínimo necesario. La bibliografía sugiere una pérdida de aproximadamente el 13% de la actividad de Factor VIII durante el almacenamiento y transporte.

AAHI - Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Cdad. Aut. de Bs. As. - Argentina
Tel/Fax: (54-11)4771-2501 - L.Rot.
E-mail: aahi@aahi.org.ar
Vol. XXXVI / Nº 2-3 / 2010
Págs. 135 / 141
Coordinadora: Dra. León de González, Graciela
Profesoras invitadas: Mgter. Massa, Catalina; Mgter. Zucchi, Corina; Dra. Ahumada, Amelia; Lic. Moya, Cristian; Mgter. Vitali, Susana

6) Transporte

El transporte desde el centro proveedor hasta las instalaciones de la planta fraccionadora debe garantizar el mantenimiento de la cadena de frío, minimizando los tiempos de transporte y las variaciones de temperatura. En este caso se hace indispensable el monitoreo de la temperatura durante el transporte y su verificación a la recepción en la planta industrial.

Actividad de Factor en material de partida y producto final

Ensayo de Factor VIII de la Coagulación Sanguínea:

Existen tres métodos capaces de medir la actividad como cofactor de la coagulación de FVIII. Estos son los coagulométricos (en una y en dos etapas) y métodos basados en sustratos cromogénicos.

El método coagulométrico en una etapa, ha sido aplicado por la mayoría de los laboratorios clínicos y ha tenido resultados satisfactorios durante mucho tiempo, por su simplicidad, economía, fácil automatización, y la semejanza de las condiciones fisiológicas de la coagulación.

El método en dos etapas fue empleado por las empresas elaboradoras de concentrados de FVIII por ser preciso y mostrar independencia del plasma carente de factor VIII que se emplee en la reacción.

En la actualidad ha sido reemplazado por aquellos que se fundamentan en el empleo de en sustratos cromogénicos, ya que éstos son los métodos recomendados por la mayoría de los comités internacionales.

Es importante destacar que la técnica del método cromogénico no ha sido adoptada por los todos los laboratorios clínicos, y que existen muchas referencias en la literatura que describen la diferencia en el valor de FVIII:C que se obtiene para una misma muestra cuando se analiza por método coagulométrico en una etapa o por el cromogénico.

Estas discrepancias no se limitan sólo a los diferentes métodos empleados, también se ven afectados por los estándares o sustancias de referencia, si se emplea plasma de hemofílicos o plasma deficiente de factor VIII, si posee o no niveles normales de factor de Von Willebrand, composición de los fosfolípidos, tipo de buffer empleado, instrumentos o aparatología, número de diluciones de la muestra a analizar, conservación y tipo de plasma de referencia entre otros.

Los estándares, tienen una marcada influencia en el resultado encontrado. En general debe emplearse un estándar concentrado para valorar actividad FVIII:C en productos concentrados (comerciales) y uno no concentrado para medirlo en muestras clínicas y otros preparados, manteniendo el principio "like vs. like". También se encuentran diferencias si el concentrado analizado es de origen plasmático o recombinante.

Actualmente los estándares internacionales disponibles son de origen plasmático.

Los estándares recomendados internacionalmente son:

Organización Mundial de la Salud (WHO):

5th International Standard Factor VIII and Von Willebrand factor in Plasma, ref: 02/150 de origen plasmático.0,68 Unidades Internacionales por ampolla

7th International Standard Factor VIII Concentrate, ref: 99/678 de origen plasmático. 11,0 Unidades Internacionales por ampolla

United States/Food and Drug Administration y Ph. Eur.:

European Pharmacopeia Biological Reference Preparation Batch 3/Mega 2, de origen plasmático. 8,6 Unidades Internacionales por ampolla

Existe también un "working standard" que es el 12th British standard for blood coagulation factor VIII concentrate, human; versión 02/122; de origen plasmático; 8,7 UI por ampolla.

La ISTH (International Society Thrombosis and Haemostasis) y la Farmacopea Europea recomiendan el método cromogénico en la determinación del FVIII en concentrados de alta pureza, pero también es el menos empleado en los laboratorios clínicos. Nuestra Farmacopea Argentina 7ma. Ed., también adopta esta metodología, la que se publicará en el próximo volumen en el capítulo de Valoraciones Biológicas.

Algunas de las ventajas que presenta este método, lo constituye el hecho que se ve menos afectado por el contenido de impurezas de la muestra (por ejemplo heparina y otros anticoagulantes), sin embargo entre sus limitaciones podemos decir que hay que trabajar con concentraciones variables de factores de la coagulación activados y la influencia que tienen la trombina y tiempos de incubación.

El fundamento del método descrito es que el FVIII se ensaya por su actividad biológica como factor en la activación del factor X por el factor IX activado (factor IXa) en presencia de iones calcio y fosfolípidos. La actividad de la preparación se calcula por la estimación comparativa de la cantidad necesaria para alcanzar una cierta velocidad de formación de factor Xa en una mezcla de ensayo que contenga las sustancias que intervienen en la activación del factor X, y la cantidad de un patrón internacional o de una preparación de referencia calibrada en Unidades Internacionales, referida para producir un mismo efecto.

El método cromogénico consta de dos pasos consecutivos: la activación del factor X, dependiente del factor VIII, en un reactivo factor-coagulación compuesto por componentes purificados, y la ruptura enzimática de un sustrato factor Xa cromogénico para dar un cromóforo que se puede cuantificar espectrofotométricamente. En las condiciones adecuadas de ensayo, hay una relación lineal entre la velocidad de formación del factor Xa y la concentración del factor VIII.

Etapa 1:

$$\text{Factor X} \xrightarrow[\text{factor IXa, fosfolípidos, Ca ++}]{\text{factor VIII activado}} \text{Factor Xa}$$

Etapa 2:

$$\text{Sustrato cromogénico} \xrightarrow{\text{factor Xa}} \text{Péptido + cromóforo}$$

En ambos pasos se emplean reactivos que pueden adquirirse comercialmente.

La composición de cada reactivo puede estar sujeta a alguna variación. Los reactivos comerciales pueden ser empleados de acuerdo a las instrucciones del fabricante, pero es importante demostrar la aptitud de los mismos.

Una vez finalizado el ensayo, se debe comprobar la validez del mismo y calcular la actividad de la preparación con métodos estadísticos usuales, por ejemplo los descriptos en el capítulo 5.3 de la farmacopea europea.

La optimización del método en las limitaciones expuestas y el seguimiento de los principios básicos de estandarización son fundamentales para lograr resultados reproducibles.

Aspectos industriales en la obtención de FVIII

Anteriormente se utilizaba el plasma fresco congelado o crioprecipitado obtenido de donantes individuales como terapia de reemplaza para el tratamiento de la hemofilia A. Posteriormente y a partir de la aplicación de diversos procedimientos técnicos, los tratamientos clínicos comenzaron a basarse en la infusión de concentrados industriales, mejorando significativamente la eficacia terapéutica y seguridad de los mismos.

El proceso de elaboración de concentrados de factor VIII industriales (FVIII) comienza con la obtención en los bancos de sangre de un plasma fresco congelado (PFC) que responda a los requisitos especificados por la industria farmacéutica. Una segunda etapa involucra la separación del crioprecipitado. A partir de este semielaborado, que en muchos casos es tomado como material de partida en la elaboración de concentrados de FVIII. El crioprecipitado se obtiene por el método de Cohn a partir de un pool de PFC para fraccionamiento industrial, siendo esta la primera fracción proteica separada en condiciones físicas y físico-químicas establecidas, la cual es aislada del criosobrenadante por centrifugación.

A partir de este crioprecipitado, y desde la aplicación en la industria de los hemoderivados, de métodos de purificación por técnicas cromatográficas, es posible obtener concentrados purificados de FVIII, de variadas características, en cuanto a concentración, pureza, estabilidad, etc. Además, estas técnicas también se utilizan como un paso de remoción de la mezcla solvente – detergente (S/D), cuando se aplica este método de inactivación viral

Las técnicas cromatográficas son metodologías, ampliamente utilizadas para la purificación de proteínas de diversas fuentes, que utilizan un ligando específico unido a una matriz, el cual es capaz de retener la proteína buscada, presente en una solución proteica, eliminando la mezcla de proteínas consideradas como impurezas u otras sustancias. Por último, modificando las condiciones físico-químicas del medio, la proteína en cuestión es despegada del ligando, obteniendo un concentrado purificado de la misma.

Las técnicas cromatográficas para la purificación de FVIII involucran diferentes propiedades para la unión de las moléculas al ligando: intercambio iónico, afinidad o inmunoafinidad. Del tipo de matriz utilizada depende la actividad específica del producto y de la presencia o no del factor de von Willebrand (FvW) acompañando a la molécula de FVIII.

Posteriormente, a través de técnicas de ultrafiltración, se ajusta la concentración de FVIII y de los estabilizantes agregados, que van a componer la forma farmacéutica final de polvo liofilizado para inyectables. Generalmente, un segundo método de inactivación viral por termotratamiento es aplicado en producto liofilizado.

En resumen, las etapas involucradas en un proceso productivo de obtención de un concentrado de FVIII serían las siguientes:

PFC → Crioprecipitado → Eliminación de fibrinógeno por Precipitación o Método Cromatográfico → Inactivación viral por S/D → Purificación Cromatográfica → Ultrafiltración → Formulación → Filtración esterilizante → Envasado aséptico → Liofilización → Inactivación viral por tratamiento térmico.

La purificación industrial de FVIII o complejo FVIII/FvW es particularmente dificultosa, por las bajas concentraciones presentes en plasma y por ser la molécula de FVIII, extremadamente lábil. Por este motivo todo el proceso productivo apunta a la obtención de un producto con una alta actividad específica, estable, y aceptables rendimientos de procesos.

Seguridad de los derivados del plasma humano

El plasma humano es el material de partida para una amplia gama de medicamentos hemoderivados que se utilizan en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, entre ellos se encuentran la albúmina, las gammaglobulinas y los factores de la coagulación, entre otros. Se producen a escala industrial a partir de grandes volúmenes de plasma mediante diversos procedimientos de separación y purificación.

La característica particular del origen biológico de los derivados plasmáticos trae aparejado un riesgo potencial de transmisión de enfermedades infecciosas especialmente las de origen viral. Por ello, el valor clínico de los mismos depende fundamentalmente de su calidad, eficacia y seguridad viral.

Numerosas estrategias se han implementado con el objeto de disminuir este riesgo potencial y además reducir la carga viral de las mezclas de plasma utilizadas en el fraccionamiento de las proteínas plasmáticas. Estas se inician a nivel de los bancos de sangre, donde se debe cumplir con una serie de requerimientos asociados con la selección adecuada del donante, el cuestionario de autoexclusión y el control serológico de los marcadores virales en cada unidad extraída, con métodos de selección sensibles y específicos.

En la industria farmacéutica, productora de los medicamentos hemoderivados, se deben cumplir con una serie de requisitos que garantizan la seguridad de los mismos. En este sentido, se deben tener en cuenta los principios generales de normas de calidad de la materia prima o sea el plasma, los de correcta fabricación y control (BPFyC), y los requerimientos específicos para la producción de los derivados plasmáticos. Es por ello que además del recontrol serológico de las unidades de partida y la purificación de las proteínas mediante el fraccionamiento alcohólico de Cohn, se deben incluir métodos específicos de inactivación viral. Los más apropiados y reconocidos por su capacidad para inactivar y/o eliminar una amplia gama de virus son los métodos que aplican principios físicos y aquellos basados en propiedades químicas.

Métodos físicos

Los tratamientos térmicos son los más utilizados y poseen una eficiente capacidad para reducir la infectividad de un amplio espectro de virus envueltos y desnudos, aún en presencia de estabilizante. Entre ellos:

- **Pasteurización:** es un calentamiento en solución a 60ºC durante 10 horas y es el método más antiguo y el mejor documentado por su eficacia en la inactivación viral de soluciones de albúmina desde hace más de medio siglo. La distribución de calor en la solución proteica a tratar debe ser uniforme y la humedad contribuye a que el calor sea más efectivo en su capacidad virucida aún con el agregado de sustancias estabilizantes.
- **Calor seco:** es un calentamiento a 100ºC durante 30 minutos que se realiza en producto liofilizado y su efectividad varía según los porcentajes de humedad residual, por ello previamente se debe delimitar el porcentaje aceptable en la proteína en estado seco.
- **Calor húmedo:** este método utiliza vapor húmedo a presión y por lo tanto es crítica la presión parcial de vapor de agua durante el proceso de inactivación.

Métodos químicos

Son utilizados para proteínas termolábiles y emplean una mezcla de un solvente orgánico y un detergente (S/D) que tiene la capacidad de destruir las propiedades vitales de los virus envueltos, actuando sobre la membrana lipoproteica.

- **Mezcla solvente y detergente:** se basa en la adición de una mezcla de un solvente orgánico (éter o tri n butil fosfato) y un detergente no iónico (tween 80, colato de sodio o tritón X-100) a la proteína de interés incubándolos a 26ºC durante 6 horas. El proceso de purificación de las proteínas inactivadas viralmente es capaz de eliminar estas sustancias utilizadas hasta valores residuales aceptables.

Debido a la selectividad del método, y con el objetivo de inactivar una amplia gama de virus, en el caso de los factores de la coagulación como Factor VIII, Factor IX y Complejo Protrombínico, se recomienda utilizar dos métodos de inactivación complementarios, la mezcla S/D y el calor seco, para reducir la infectividad de los envueltos y desnudos respectivamente.

Método de eliminación

Además de la eliminación viral, producida durante el fraccionamiento alcohólico de Cohn o durante la purificación por métodos cromatográfico, en algunos casos y como metodología de innovación, se aplica un método específico de eliminación por nanofiltración.

- **Nanofiltración:** es un método de exclusión viral, y actualmente es incorporado a numerosos productos porque el tamaño de poro de las membranas filtrantes permite la eliminación de pequeños virus no envueltos como el parvovirus B19 y el virus de la hepatitis A, que por su mayor resistencia a los tratamientos térmicos o al S/D, es posible detectar infectividad residual en los derivados plasmáticos.

Validación de la inactivación viral

El objetivo del estudio de validación es evaluar el grado de eliminación de la infectividad viral durante el proceso de fabricación. Los estudios deben realizarse por cada fabricante, para cada proceso específico y para cada sitio de producción, los que consisten en simular una etapa de la fabricación introduciendo previamente una dosis de virus en la muestra de proteína a purificar y evaluar la efectividad del proceso para eliminarlo o inactivarlo. Se requiere que cualquiera sea el método utilizado se demuestre al menos una disminución de la infectividad de 4.0 log de un amplio espectro de virus con características físico-químicas diferentes.

No siempre es posible realizar la validación con todos los virus transmisibles y puede no ser posible modelizar completamente las condiciones de fabricación, por lo tanto para el estudio se deben utilizar virus relevantes y virus modelos. En el primer caso, se incluye a los virus transmisibles, como el VIH, el cual es de carácter obligatorio para su validación; y en el segundo, todos aquellos virus que se utilizan en reemplazo de los virus transmisibles con características físico-químico similares y que no pueden ser propagados en cultivos celulares (como el VHB y VHC).

Además de los logaritmos de reducción viral, es importante considerar la cinética de la pérdida de la infectividad, su velocidad y la forma de la curva (tipo bifásica), la selectividad de la inactivación y la robustez del procedimiento.

Los métodos empleados deben poseer una serie de atributos relacionados con la conservación de la integridad de la molécula proteica, la no formación de neoantígenos, de residuos tóxicos, y fundamentalmente que inactiven una amplia gama de virus con diferentes características físicas y químicas y diferencia resistencia a los mismos.

La albúmina y las gammaglobulinas de administración intramuscular son inactivadas generalmente por pasteurización. Las gammaglobulinas de administración endovenosa son además tratadas a pH 4.0 con trazas de pepsina para eliminar los agregados de IgG para permitir su administración por vía endovenosa y es un método de reconocida actividad virucida en las referencias bibliográficas.

Los factores de la coagulación, son proteínas lábiles al calor, por lo tanto se recomienda inactivarlos combinando dos métodos, el tratamiento con S/D, para virus envueltos, y la complementación con el calor seco en productos liofilizados, para los virus desnudos; o en su defecto nanofiltración.

Cabe destacar que la eficiencia de estos procesos de inactivación puede ser extensiva a la reducción potencial de otros virus desconocidos incluyendo, entre ellos, a los emergentes y reemergentes, que posean características similares a los virus transmisibles.

Para otorgar aún mayor seguridad a los hemoderivados, en la última década se ha implementado el control del ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC) mediante técnicas de biología molecular. El principal objetivo es disminuir la carga viral de los *pooles* de plasma empleados en la elaboración de los hemoderivados. Según los requerimientos, el límite de aceptación de virus en el *pool* de producción no debe superar las 100 UI/ml detectadas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Numerosas metodologías caseras y comerciales han sido diseñadas, y validadas con elevada sensibilidad y especificidad. La selección de los plasmas por PCR, a nivel industrial, requiere de una logística que permite un control adecuado mediante el sistema de pequeños *pooles,* sin necesidad de llegar a la etapa del *pool* destinado a la producción, que en algunos casos puede superar las 5000 donaciones y debe ser descartado si resultara reactivo.

La mayor seguridad que otorgan hoy los hemoderivados está asociada a la combinación de estrategias tales como, la selección del donante de sangre, el control serológico con métodos sensibles y específicos, la purificación de las proteínas plasmáticas con métodos confiables y que cumplan con las BPFyC, la incorporación obligatoria de métodos de inactivación y/o eliminación de virus validados y las técnicas de PCR.

Conclusión

La evolución tanto en calidad como en seguridad viral de los Factores de coagulación de origen plasmático, se ha basado fundamentalmente en garantizar la calidad y seguridad de la materia prima utilizada a través de la implementación de estrictas normas de selección de donantes, procedimientos estandarizados para la obtención del plasma, rigurosos procedimientos de tamizaje de las unidades de plasma de partida y estricto cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación durante las etapas de fraccionamiento del plasma, inactivación viral y formulación del producto final. Por lo tanto, cabe resaltar que el estricto cumplimiento de lo antes mencionado, permite garantizar la eficacia terapéutica y seguridad clínica y viral del Factor VIII plasmático para la profilaxis y tratamiento de la hemofilia tipo A

Referencias

- Reglamento Técnico de Medicina Transfusional del Mercosur / GMC/ Res. Nº 130/96
- Cohn EJ, Strong LE, Hughes W, Mulford D et al. Preparation and properties of serum and plasma proteins. J. AM.chem.Soc. 68: 459-475 (1946).
- Disposición Nro. 3779/98 del Ministerio de Salud, a través de la Administración

Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Medica – ANMAT: Especialidades Medicinales: "Normas generales para la producción de productos hemoderivados de origen plasmático".
- Disposición Nro. 2819 del Ministerio de Salud, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Medica (ANMAT): Especialidades Medicinales. "Buenas prácticas de Fabricación de Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos" Anexo X. Buenas Prácticas de Fabricación de Productos medicinales Derivados de la Sangre o del Plasma Humano.
- Myllytë: "Factors determining quality of plasma". Vox Sang 74 (Suppl 2): 507-511 (1998).
- Wisher, Garwood et al: "The effect of storing whole blood at 22°C for up to 24 hours with and without rapid cooling on the quality of red cell concentrates and fresh-frozen plasma". Transfusion 48: 2338-2347 (2008).
- Allersma, Imambaks and Meerhof: "Effect of whole blood storage on Factor VIII recovery in fresh frozen plasma and cryoprecipitate". Vox Sang 71: 150-154 (1996)
- Swärd-Nillson, Persson et al: "Factors influencing Factor VIII activity in frozen plasma". Vox Sang 90: 33-39 (2006).
- Gabra, Prowse and Boulton: "Importance of a Quality Assurance Scheme for Factor VIII assays in quality monitoring of human plasma destined for fractionation into Factor VIII concentrate". Vox Sang 56: 65-70 (1989).
- WHO Technical Report Series: WHO Recommendations for the production, control and regulation of Human Plasma for fractionation. Annex 4. October 2005.

"Human Plasma for frationation". European Pharmacopoeia 6.0 edition. 2008

V. Jiménez Yuste, A. Villar, M. Quintana, F. Hernández Navarro; Monitorización del factor VIII:C: técnicas coagulativas frente a cromogénicas, Rev. Iberoamer Trom Hemostasia 14: 3-11 (2001).

J. C. Reverter, G. Gutierrez, J. M. Jouo; Garantía de la calidad en la determinación de la actividad coagulante del factor VIII. Rev. Iberoamer Trom Hemostasia 14:21-26 (2001).

T. W. Barrwcliffe; Standarization of FVIII & IX assays; Haemophilia,

9: 397-402 (2003)

R. Lundblad, H. Kingdon, Kenneth Mann, G. White; Thromb Haemost: 84: 942-948 (2000)

Farmacopea Argentina, última edición, Ensayo del Factor VIII de la Coagulación Sanguínea, en proceso de aprobación e impresión.

S. Rodgers, E. Duncan, D. Barbulescu, D. Quinn and J. Lloyd; In vitro kinetics of factor VIII activity in patients con haemophilia A and a discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII assay results; British Jounal of Haematology, 136, 138-145 (2006).

Farmacopea Europea, ensayo 2.7.4, " Assay of human coagulation factor VIII" edición 6 (2008).

Farmacopea Europea, Capítulo 5.3, " Statistical Análisis of results of Biological Assays and test"" edición 6 (2008).

Cuthbertson B, Reid K, Foster PR. Viral Contamination of Human Plasma and Procedures for Preventing virus Transmission by Plasma Products. Harris JR (Ed). Blood Separation and Plasma fractionation: 385-435, England (1991).

- Mogenthaler JJ. Effect of ethanol on viruses. Curr.Stus.in Hematol.Blood Transf. 56: 109-121 (1989).

- WHO Technical Report Serie 924. Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products (2004).

- Horowitz B, Prince AM, Horowitz M.S., ¨Virus safety of solvent-detergent treated blood products in: Virological safety Aspects of Plasma Derivatives¨. Dev. Biol. Stand. Vol 81, Ed by F. Brown pp 147-161 Karger, Base L (1993).

- CPMP/BWP/269/95/Rev.3. Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. London: The European Agency for Evaluation of Medicinal Products (1996).

- Committee for Propiertary Medicinal Products . The introduction of nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma pools (CPMP/BWP269/95). London (1998).

- Saldanha J. Validation and standarisation of nucleic acid amplification technology (NAT) assays for the detection of viral contamination of blood and blood products. J Clin Virol 20: 7-13 (2001).

AAHI - Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Cdad. Aut. de Bs. As. - Argentina
Tel/Fax: (54-11)4771-2501 - L.Rot.
E-mail: aahi@aahi.org.ar

Reacciones adversas en donadores del Banco de Sangre del Hospital Dr. Max Peralta: Análisis del grado de las reacciones de los donadores de enero a abril, 2009.

Dr. Cerdas-Quesada, César*

Resumen

En la donación de sangre se puede experimentar reacciones adversas, las cuales son procesos autolimitados de pronta recuperación y sin secuelas. De las 569 donaciones comprendidas en el período de enero a abril, 2009, sólo 19 presentaron reacciones adversas a la donación donde la mayoría de los casos se presentaron en mujeres (11 casos) y se asociaron a factores como miedo, ansiedad, falta de conocimiento, el estrés o la anticipación a un hecho inesperado ya que no se notó gran significado en cuanto a donación por primera vez o peso, talla o presión arterial ya que estos parámetros estaban dentro de los criterios establecidos por el Banco de Sangre y la literatura internacional.

Palabras clave: Reacciones adversas - Donación - Donadores alogénicos - Reacciones vagales - Factores predeterminantes - Banco de Sangre - Costa Rica.

Summary

There are different kinds of adverse reactions to allogenic whole blood donations and they are defined as self-limited. From 569 donations between January to April, 2009, 19 adverse reactions had been documented where the most happened to female donations and were associated to fear, anxiety, lack of knowledge and stress because the whole of them achieved the Blood Bank international protocol.

Key words: Adverse reactions - Allogenic donations - Vagal reactions - Blood Bank - Costa Rica.

Introducción

En la donación de sangre se puede experimentar reacciones adversas, las cuales son procesos autolimitados de pronta recuperación y sin secuelas. Las reacciones adversas que se presentan con mayor frecuencia son: vasovagales, locales como hematomas, punción arterial, punción nerviosa y alérgicas a soluciones o a parches adhesivos.[1]

La edad es un factor significativo que puede predecir el rango así como el grado de reacción mientras que el peso no predice el grado de la reacción vasovagal. Es bien conocido que la corta edad, el bajo peso y el estatus de la primera donación incrementan la probabilidad de tener una reacción. Por otra parte, el género es un factor independiente de reacción del donador, donde las mujeres tienen 2,5 veces más de posibilidad de una reacción.[2]

Para disipar los temores de una persona hacia la donación es de vital importancia dar una información completa y bien canalizada en todo lo relacionado a la donación de sangre. Es evidente, que disponer de una serie de mecanismos de protección en relación al donador y detectar cualquier elemento que pudiera ser perjudicial, permitirá reducir el riesgo.[3]

Para promover la donación de sangre es necesario conocer las características generales y psicológicas de las personas que han donado y de las que nunca lo han hecho. Existen tres estados afectivos en el proceso de la donación. El estado A o aversión, que se presenta en la fase de predonación y se caracteriza por nerviosismo, tensión y ansiedad. El B, se presenta en la fase de postdonación y se caracteriza por una sensación positiva de bienestar personal, regocijo y euforia. El estado C, característico de individuos que han donado por se-

*Banco de Sangre, Hospital Max Peralta, Cartago, Costa Rica y Curso Internacional de Inmunohematología y Medicina Transfusional 2009-2010. Universidad Nacional de Rosario e Instituto Universitario Italiano de Rosario, Rosario, Argentina. ccerdasq@costarricense.cr

gunda vez y en quienes se debilitó el proceso del estado A y se afirmó el proceso del estado B.[4]

El programa de hemovigilancia de la Cruz Roja Americana clasifica las complicaciones en categorías definidas, con intervalos de severidad (mayores o menores) para ciertos tipos de reacción.[5] Los síntomas presincope (menores) incluyen palidez, diaforesis sin perdida de consciencia. La perdida de consciencia corta está definida por una duración menor a un minuto mientras que la larga está definida por una duración mayor a un minuto o la existencia de complicaiones como perdida de control de esfínteres, ataques o convulsiones.

La recuperación prolongada está definida por síntomas presíncope, con a sin perdida de la consciencia que no se resuelve en un término de 30 minutos.

Los hematomas pequeños (<25,8 cm^2) y grandes (>25,8 cm^2) incluyen contusiones e infiltración y masas palpables.

Las reacciones clasificadas como "otras" no se pueden colocar en las categorías establecidas e incluyen hiperventilación (menor) y dolor de pecho (mayor). Las reacciones alérgicas son extremadamente raras y han ocurrido en donadores mayores de 20 años.

Las complicaciones además, deben clasificarse dependiendo de si el donador recibe revisión médica, tratamiento, visitas a médicos de cuidado primario o especialista.[6]

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, del 1 de enero al 31 de marzo de 2009. La población de estudio la constituyó el total de donadores que acudieron al Banco de Sangre del Hospital Dr. Max Peralta. La muestra fue el total de la población, 569 donadores alogénicos que cumplieron con los criterios establecidos para la disposición de sangre y sus componentes con fines terapéuticos, dentro de este grupo se incluyeron a los donadores que presentaron reacciones adversas.

La donación de sangre fue la variable dependiente y la independiente comprendió aspectos sociodemográficos como edad, sexo, además del tipo de reacciones adversas: mareo, náusea, disnea, vómito, lipotimia, etc.

Resultados

De las 569 historias clínicas revisadas (Cuadro I), sólo 19 presentaron reacciones adversas a la donación (RAD) (Fig 1) donde la mayoría de los casos se presentaron en mujeres (11 casos) (Fig. 2).

Las reacciones adversas se presentaron fueron mareos, palidez, debilidad (7 casos), Hematomas (7 casos), hematomas grandes (2 casos), nauseas (2 casos), lipotimia (1 caso) (Fig. 3).

Dos casos de mujeres fueron trasladas al Servicio de Emergencias para recibir atención. Cuatro casos se presentaron en mujeres que donaron por primera vez y 3 casos en mujeres de bajo peso.

En el caso de los hombres, dos de los casos se presentaron en donadores por primera vez.

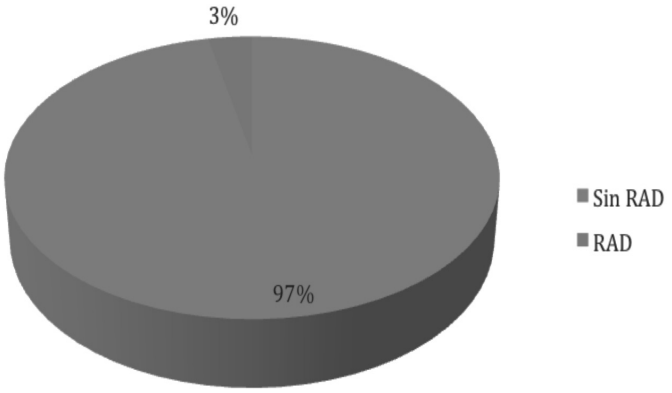


Figura 1. Reacciones adversas a la donación de sangre en 569 donadores del Banco de Sangre Hospital Max Peralta, Enero-Marzo, 2009.

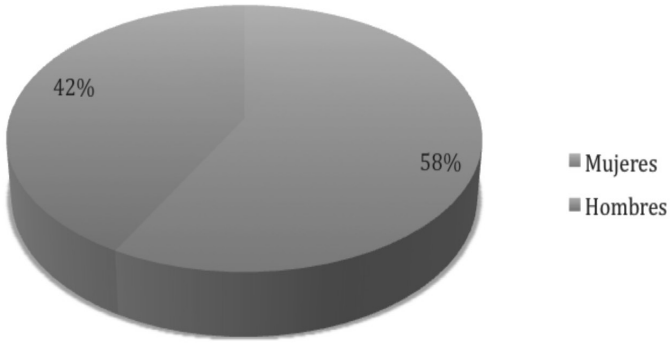


Figura 2. Reacciones adversas a la donación según sexo. Banco de Sangre Hospital Max Peralta, Enero-Marzo 2009.

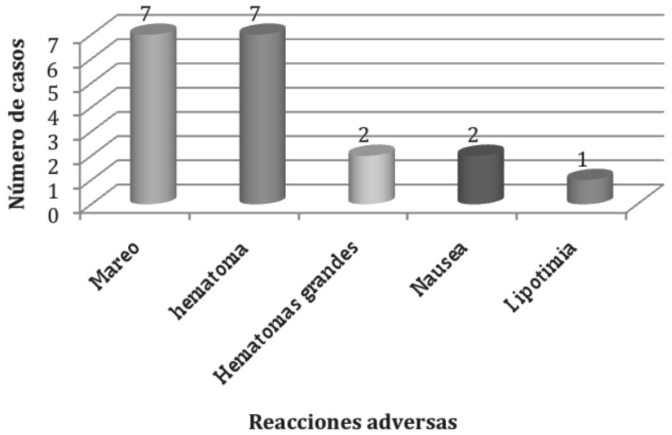


Figura 3. Clasificación de Reacciones adversas por número de casos, Banco de Sangre, Hospital Max Peralta, Enero-Marzo, 2009.

Cuadro I. Donaciones recibidas en el Banco de Sangre, Hospital Dr. Max Peralta J, Enero-Abril 2009.

01/01/2009 - 01/04/2009
TODAS LAS DONACIONES

	Hombres	%	Mujeres	%	Total	%
A+	125	71.84	49	28.16	174	29.54
B+	54	76.06	17	23.94	71	12.05
0+	191	66.09	98	33.91	289	49.07
AB+	5	83.33	1	16.67	6	1.02
A-	9	56.25	7	43.75	16	2.72
B-	3	50.00	3	50.00	6	1.02
0-	13	43.48	10	43.48	23	3.90
AB-	4	100.00	0	0.00	4	0.68
TOTAL GENERAL	404	68.59	185	31.41	589	100.00

Discusión

La frecuencia de RAD encontrada es de 3,3% donde es importante tomar en cuenta los procesos fisiológicos que ocurren durante el proceso de donación. El organismo inicialmente va a reaccionar con vasoconstricción inmediata y restitución del volumen plasmático a partir del fluido intersticial en un período de 24 horas por lo que es importante que el donante se hidrate después del proceso.[7]

De la misma forma que ocurren consecuencias fisiológicas durante la donación, se experimentan reacciones adversas, de las cuales se estima una prevalencia de 11-21%, en esta cifra se incluyen hematomas (9-16%), reacciones vasovagales (2-5%) y reacciones sistémicas (<0,5%).

Las reacciones vagales (RV), incluyen palidez, debilidad, ansiedad, sudoración, alteración en el ritmo respiratorio, náusea, vómito, hipotensión y bradicardia donde estos síntomas aparecen de forma brusca y con frecuencia ocurren cuando ha finalizado la donación. De acuerdo a la Cruz Roja Americana, las RV se clasifican en: *Leve* cuando el donante presenta los síntomas antes mencionados y se recupera en menos de 15 minutos; *Moderada* si el donante tarda más de 15 minutos y hay perdida de la consciencia y *Grave* cuando aparece convulsión, tetania, incontinencia o cianosis.[5]

Existen factores predeterminantes que ayudan a diferenciar a los donadores en riesgo potenciadle experimentar una RV, tales como edad menor a 20 años (3 casos de mujeres entre 18-19 años), peso entre 50 y 60kg (3 casos de mujeres bajo peso), primera donación (4 mujeres y 2 hombres), la velocidad en el tiempo de sangrado, cifra de la hemoglobina, hematocrito, constitución corporal y sexo femenino.

En la fisiopatología de las RV existe una primera fase prodrómica que consiste en una vasoconstricción periférica con hipovolemia; esta respuesta precede a una fase fisiopatológica en la que ocurre una vasodilatación periférica con hipotensión y bradicardia, ante el estímulo que ocasiona el dolor, las emociones y el estrés estimulando al hipotálamo que es el vehículo a la respuesta vasodilatadora a través del sistema nervioso autónomo y desencadena la RV.[3]

En cuanto al hematoma, se observó que es autolimitado y está asociado a la falta de entrenamiento del personal, una técnica de flebotomía incorrecta y torniquete demasiado ajustado.

En cuanto a donaciones de plaquetas por aféresis no se registro ningún tipo de RAD.

Conclusiones

Las reacciones adversas a la donación de sangre en este análisis fueron más frecuentes en mujeres y se asociaron a factores como miedo, ansiedad, falta de conocimiento, el estrés o la anticipación a un hecho inesperado ya que no se notó gran significado en cuanto a donación por primera vez o peso, talla o presión arterial ya que estos parámetros estaban dentro de los criterios establecidos por el Banco de Sangre y la literatura internacional. Además, se plantea la necesidad de los bancos de sangre por monitorizar constantemente los factores de riesgo y hacer un esfuerzo por minimizarlos y continuar enfocándose en una donación segura.

Referencias

1. Vidal J, Contreras E, Elies F. Reacciones adversas en la donación de sangre. Disponible en http://www.sets.es/boletin-45/45-articulos.htm
2. Tondon R, Pandey P, Chaudhary R. Vasovagal reactions in at risk donors: A univarite análisis of effect of age and weight on the grade of donor reactions. Transfusion and Apheresis Science 2008; 39: 95-99.
3. Rojas-Saldaña L, Luna-Mendoza L, Suaste-Mendoza M, Cruz-Rodríguez L, Mejía-Domínguez A. Reacciones adversas a la donación de sangre. Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica 2007; 15: 42-46.
4. Juarez-Ocaña S, Fajardo-Gutiérrez A. Factores que influyen en la no donación de sangre. Gaceta Médica 2001; 137: 315-322.
5. Eder AF, Dy BA, Kennedy JA, Notari EP. The American Red Cross Donor Hemovigilance Program, complications of donation reported in 2006. Transfusion 2006; 46: 284-288.
6. Eder AF, Hilley CD, Dy BA, Notari EP, Benjamin RJ. Adverse reactions to allogenic whole blood donation by 16- and 17-year-olds. JAMA 2008; 19: 2279-2286.
7. Factores de riesgo para desarrollar reacción vasovagal severa en donadores postsangría. Revista de Hematología 2001; 2: 98-102.

Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional
Programa Consulta al Experto
Prueba cruzada positiva

Coordinadora: Dra. León de González, Graciela
Profesor invitado: Dr. González, Carlos Alberto*

Introducción

Existen pocas situaciones en la medicina actual, y particularmente en la medicina transfusional, tan controvertidas y cargada de mitos como la de transfundir a un paciente cuyas pruebas cruzadas son inicialmente positivas.

Si bien en la literatura existen excelentes manuales y libros relacionados con el tema, y sobreabundan las descripciones de técnicas (inclusive las moleculares) hay pocas publicaciones que orienten acerca de qué pasos seguir a la hora de seleccionar una unidad destinada a un paciente cuyas pruebas cruzadas son positivas. Muchas de estas publicaciones están casi exclusivamente enfocadas al diagnóstico serológico del paciente.

Esta publicación, intenta reflejar la propia experiencia en el área que comenzó en los años ´80 y no pretende ser un algoritmo diagnóstico. Por el contrario, la intención es aportar un esquema básico de resolución destinado a aquellos que realizan tareas de guardias o trabajan en servicios de baja complejidad.

Una de las primeras premisas a tener presente, es documentar la real necesidad de transfundir y el grado de urgencia. Comunicarse con el médico del paciente e indicarle que los estudios especiales llevan mucho tiempo y que estamos intentando minimizar la posibilidad de reacción hemolítica por transfusión.

Los antecedentes del paciente siempre deben de ser tenidos en cuenta, ayudan a orientarnos acerca de las posibles causas de la prueba cruzada positiva, prueba de antiglobulina directa (PAD) y prueba de antiglobulina indirecta (PAI).

	Antecedente	**Observación**
Transfusión en los últimos 3 meses	Concentrados eritocitarios	Campo mixto Reacción hemolítica post transfusional
	Concentrados plaquetarios, plasma, hemoderivados	Anticuerpos pasivos (anti-A, -B, -D) pueden producir discrepancias ABO, PAD/ PAI Positiva, muy raramente hemólisis
Diagnóstico	Autoinmunes, oncológicas, infecciones	PAD/PAI Positiva, hemólisis
	Drepanocitosis, talasemia	Mayor frecuencia de aloanticuerpos
	SIDA, hipergammaglobulinemia	PAD positiva clínicamente no significativa
Drogas		PAD/PAI Positiva, hemólisis
Etnicidad		Algunas etnias se asocian con la ausencia de antígenos de alta incidencia (puede sensibilizarse y desarrollar un anticuerpo de alta incidencia).
Registros previos		Discrepancias ABO, sensibilización

*Red de Medicina Transfusional - Ministerio de Salud – Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires – República Argentina. gonzalez@datafull.com
Publicado por el Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional (GCIAMT), año 2010. www.gciamt.org

Luego de esto, nuestro próximo paso consistirá en responder a las siguientes preguntas originadas por la prueba cruzada positiva:

1) ¿Se trata realmente de un anticuerpo hacia antígenos eritrocitarios?

2) ¿Es clínicamente significativo?

3) ¿Es aloanticuerpo o autoanticuerpo?
   a. ¿Solamente hay autoanticuerpo? ¿pudieran haber aloanticuerpos enmascarados?
   b. Si es aloanticuerpo,
      i. ¿es una mezcla de aloanticuerpos?
      ii. ¿es un aloanticuerpo hacia un antígeno de alta incidencia?
      iii. ¿son ambas cosas?

Para una mayor comprensión, nos remitimos al Esquema 1 que contiene un algoritmo simplificado de resolución.

1) ¿Se trata realmente de un anticuerpo hacia antígenos eritrocitarios?

Como cualquier prueba de laboratorio cuyo resultado no es el esperado, se deben verificar los procedimientos empleados a fin de descartar los errores que pudieron haberse producido. Desde luego que esto también implica la recertificación ABO y el la correcta identificación del paciente.

Entre las causas más frecuentes de pruebas cruzadas positivas no producidas por anticuerpos se encuentran aquellas provocadas por problemas en la muestra, los reactivos o el procedimiento:

- **La muestra:** hiperlipemia, contaminación con sueros parenterales, rouleaux.

- **Reactivos:** contaminación bacteriana, formación de precipitados, solución fisiológica inadecuada, reactivos mal estandarizados.

- **Procedimiento:** materiales sucios, exceso de centrifugación, confundir reactivos incoloros, no seguir las indicaciones del fabricante.

2) ¿Es clínicamente Significativo?

Probablemente el título alternativo de este documento podría ser: "¿cómo definir un anticuerpo clínicamente significativo? y no morir en el intento.

Una forma simplificada podría ser: aquel anticuerpo eritrocitario capaz de producir:

1) Hemólisis post transfusional.

2) Enfermedad hemolítica feto neonatal.

3) Daño en el tejido trasplantado.

Si bien las pruebas inmunohematológicas convencionales no nos permiten predecir en casos individuales que anticuerpo hemolizará, si podemos (con un aceptable grado de seguridad) identificar al que no hemolizará. Ciertamente, existe una excelente correlación entre especificidad y rango térmico (entre otras características) con el significado clínico de los anticuerpos de grupos sanguíneos.

En el siguiente cuadro podemos ver los ejemplos de anticuerpos más frecuentemente hallados y su significado clínico basado en especificidad.(Cuadro 1)

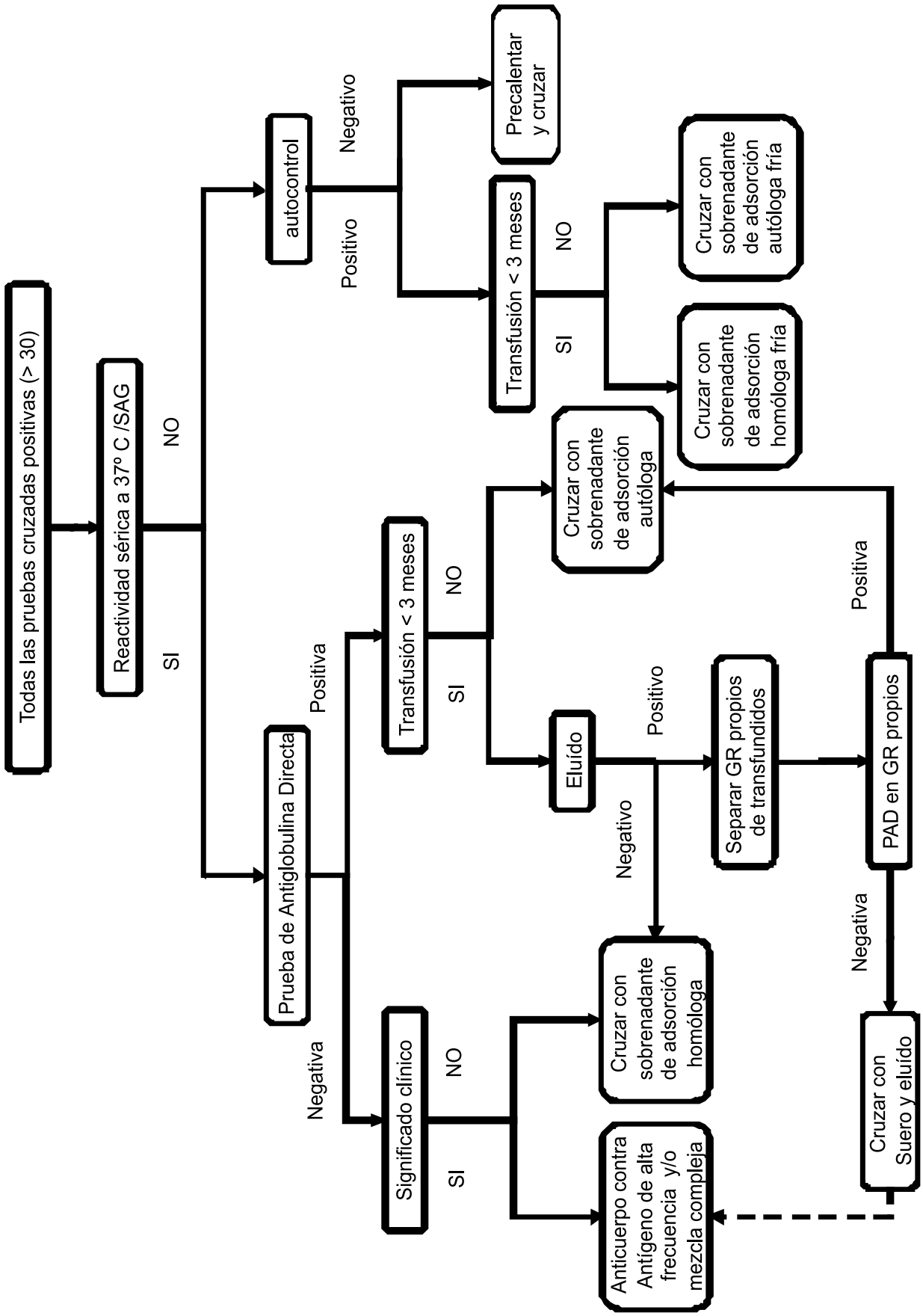
Cuadro 1.

Clínicamente importantes	Solo si es reactivo a 37º C	A veces significativo*	Clínicamente benignos*
ABO	Le^a	Yt^a	Knops
Rh	M, N	Ge	Chido/Rogers
Kell	P_1	Gy^a	Xg^a
Duffy	Lutheran	Hy	Bg
Kidd	A1	Sda	Cs^a
Ss			Yk^a,
Vel			McC^a
			JMH

*Aún si es reactivo a 37º C y en PAI

AAHI - Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Cdad. Aut. de Bs. As. - Argentina
Tel/Fax: (54-11)4771-2501 - L.Rot.
E-mail: aahi@aahi.org.ar
Vol. XXXVI / Nº 2-3 / 2010
Págs. 147 / 153
Coordinadora: Dra. León de González, Graciela
Profesor invitado: Dr. González, Carlos Alberto

Esquema 1. Esquema simplificado de trabajo



Algunas especificidades son siempre importantes, clásicamente los sistemas ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd MNS y Vel. En cambio, otros sólo lo serán si el anticuerpo es reactivo a 37º C, como anti-Le^a, -M, -N, -P_1, -Lu, -A_1. Estos cuadros pueden resultar sumamente útiles si podemos disponer del tiempo y medios para identificar el/los anticuerpos. En estos casos, poder diagnosticar, por ejemplo anticuerpos HTLA, relativamente comunes, Chido/Rogers CR1 relacionados (Kn^a, Yk^a, Cs^a) usualmente no son clínicamente significativos pero pueden "tapar" un anticuerpo importante.

A continuación veremos algunos ejemplos de reacciones de muestras de pacientes y unidades cruzadas:

Unidad	Fase			Causa probable	Resolución
	LIS	37º C	SAG		
1	1	0	0		
2	3	0	0	Aloanticuerpo	Pruebas cruzadas
3	2	0	0	(1 o más)	pre calentadas
4	2	0	0	no significativo	
Auto	0	0	0		

LIS: Lectura inmediata en medio salino

Este patrón obedece a la presencia de un aloanticuerpo frio (ej. Anti-Le^a, anti-P_1, etc.) y por ser reactivo solamente a temperatura ambiente no reviste significado clínico.

Realizar las pruebas cruzadas a 37º C ofrece un margen de seguridad suficientemente adecuado.

Unidad	Fase			Causa probable	Resolución
	LIS	37º C	SAG		
1	3	0	0		
2	2	0	0	Crioaglutinina	Pruebas cruzadas
3	2	0	0	no patológica	pre calentadas
4	2	0	0	(1 o más)	Adsorción autóloga fría
Auto	2	0	0		

Este ejemplo a diferencia del anterior, presenta autocontrol positivo, y es un caso típico de crioaglutinina no patológica (por ej. anti-I) que por su temperatura de reacción no amerita estudio adicional alguno.

Estudios recientes realizados en más de 3.000 muestras panaglutinantes nos informan que la gran mayoría (96%) tienen un autocontrol positivo (IgM autoanticuerpo). De esto resulta que si implementamos algunas técnicas que nos permitan evitar la detección de crioaglutinina no patológica podremos fácilmente resolver los resultados no significativos.

Si incubamos las pruebas cruzadas en LISS a temperatura ambiente, leemos post incubación a 37º C, usamos antiglobulina Poliespecífica y la lectura final la efectuamos con microscopio, detectaremos crioaglutininas no patológicas con una frecuencia de 1 cada 71 muestras.

En cambio, si para realizar las pruebas de antiglobulina indirecta pre calentamos los reactivos y muestra 30 minutos a 37º C y omitimos tanto la lectura a temperatura ambiente, post incubación a 37º C como la microscópica y usamos anti-IgG la frecuencia disminuye a menos de 1 en 1.000.

En algunas ocasiones, suele ser suficiente sacar la muestra y dejar retraer el coágulo a 4º C durante más de 1 hora y sin centrifugar aspirar el sobrenadante. Repetir las pruebas cruzadas con este sobrenadante "autoadsorbido en frío" nos ofrece un adecuado margen de seguridad transfusional.

Cuando estas pruebas resulten aun reactivas por tratarse de una crioaglutinina potente se debe realizar adsorción autóloga fría y cruzar con el sobrenadante.

Para un mayor detalle de las técnicas mencionadas, nos remitimos a las referencias.

AAHI - Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Cdad. Aut. de Bs. As. - Argentina
Tel/Fax: (54-11)4771-2501 - L.Rot.
E-mail: aahi@aahi.org.ar
Vol. XXXVI / Nº 2-3 / 2010
Págs. 147 / 153
Coordinadora: Dra. León de González, Graciela
Profesor invitado: Dr. González, Carlos Alberto

Unidad	Fase			Causa probable
	LIS	37º C	SAG	
1	0	0	3	
2	0	0	3	1. Aloanticuerpo (efecto de dosis)
3	0	0	0	2. Mezcla de aloanticuerpos
4	0	0	1	
Auto	0	0	0	

En este caso, la reactividad es sólo en medio antiglobulina, probablemente de naturaleza IgG mostrando efecto de dosis o mezcla de anticuerpos.

Unidad	Fases			Causa probable
	LIS	37º C	SAG	
1	4	2	4	
2	0	0	0	Mezcla de aloanticuerpos
3	1	3	4	fríos y calientes
4	4	2	0	
Auto	0	0	0	

Aquí tenemos unidades que reaccionan con intensidad variable en las diferentes fases de reacción y unidades; esta situación es muy probablemente producto de mezcla de anticuerpos fríos y calientes (IgG e IgM).

En estos últimos dos casos, al encontrar unidades no reactiva podremos disponer de unidades compatibles recurriendo a mayor número de muestras.

3) ¿Es Aloanticuerpo o autoanticuerpo?

La prueba de antiglobulina Directa, el autocontrol y el eluido son las pruebas más útiles para definir la presencia de autoanticuerpos antieritrocitarios.

Unidad	Fases			Causa probable
	LIS	37º C	SAG	
1	0	0	2	1. Autoanticuerpo
2	0	0	2	2. Autoanticuerpo + aloanticuerpo
3	0	0	2	3. Aloanticuerpo (reacción pos
4	0	0	2	transfusional
Auto	0	0	2	

En este ejemplo el antecedente de transfusión en los últimos 3 meses nos obliga a confirmar o descartar una reacción hemolítica pos transfusional. Para resolverlo debemos realizar un eluído, que si es positivo nos indica la presencia de anticuerpo en los eritrocitos, pero no sabemos si es alo o auto. Para ello debemos separar los hematíes propios de los transfundidos y hacer PAD en los eritrocitos propios; que de ser positiva indi-

ca la presencia de autoanticuerpo. Por el contrario, si la PAD en los hematíes propios es negativa excluye la presencia de autoanticuerpo y confirma los hallazgos como producidos por aloanticuerpo (uno o más) (Cuadro 1 y ver métodos del Manual Técnico AABB, 13ª Ed.).

En éste mismo caso y más allá de este diagnóstico diferencial inicial, a la hora de seleccionar sangre a transfundir, erróneamente suele recurrirse a la "transfusión menos incompatible" o (peor) contraindicar la transfusión (aun con indicación clínica cierta). Veremos estos dos mitos:

MITO: Cuando es positivo, transfundir la unidad "menos incompatible"

La transfusión "menos incompatible" es eficiente sólo cuando el Aloanticuerpo tiene el título más alto que el Autoanticuerpo. Sin embargo, no se puede asumir que esto siempre sucederá. El peligro de usar la unidad "menos incompatible" reside en que el autoanticuerpo enmascare el aloanticuerpo. Sabemos que aproximadamente 1 de cada 3 pacientes con autoanticuerpos posee un aloanticuerpo clínicamente significativo y responsable de reacción hemolítica y que el 42 – 77 % de los aloanticuerpos no son detectados antes de adsorción.

En algunos casos, la muestra del paciente mostrará diferencias en la intensidad de reacción entre las unidades a cruzar. Por ejemplo, un Autoanticuerpo puede reaccionar con todas las muestras pero más intensamente con las e-positivas (especificidad relativa). Algunas publicaciones de la especialidad sugieren emplear la unidad "menos incompatible", basados en publicaciones anecdóticas.

Existe poca evidencia científica que demuestre que el uso de GR e-negativos, como el ejemplo, para transfundir muestre una mejor sobrevida *in vivo* de la unidad transfundida.

Claramente, el uso de la unidad "menos incompatible" no garantiza la seguridad transfusional de los eritrocitos elegidos. El método definitivo para compatibilizar a pacientes con autoanticuerpos es adsorción. La adsorción autóloga (u homóloga si fue transfundido en los últimos 3 meses) debe ser usada y ha sido aceptada ampliamente como prueba de compatibilidad apropiada para pacientes con autoanticuerpo (Ver anexo 1).

MITO: Nunca transfundir cuando "la compatibilidad" es positiva

Existe un frecuente recelo en transfundir pacientes con pruebas cruzadas positivas, aún en aquellos con anemia severa.

La transfusión de sangre incompatible solo con el autoanticuerpo no resulta en reacción hemolítica postransfusional (salvo casos extremadamente raros), ya que los eritrocitos del donante tienen una sobrevida *in vivo* aproximadamente igual a la de los propios hematíes del paciente.

Probablemente uno de los errores más comunes en nuestra especialidad sea el negarse a transfundir a los pacientes con anemia severa. Al respecto, en el informe del SHOT de 2001/2002 una denuncia relata el caso de un paciente cardiópata del que se sospecha la presencia de anti-c + P_1 y posible reacción hemolítica transfusional. El problema no fue resuelto durante varios días por el servicio de transfusión del hospital. Se derivó la muestra al laboratorio de referencia, su hemoglobina era de 4 g/dl. El paciente murió durante la discusión acerca de que sangre transfundir.

Efectivamente, la transfusión nunca debe ser considerada como contraindicada, aun cuando las pruebas de compatibilidad sean fuertemente positivas.

Conclusión

Entre los mitos más difundidos, existe la creencia que cuando las pruebas cruzadas son positivas no se debe transfundir o hacerlo con la unidad "menos incompatible".

Esta publicación, pretende contribuir a desterrar este mito.

Referencias

González CA. «Colección de Grupo Sanguíneo Ii». «Hemotécnica» Rev Téc Hemoter Inmunohem 1994; IV: 15-24

González CA «Colección de Grupo Sanguíneo Ii». Métodos más utilizados en la resolución de problemas inmunohematológicos debidos a crioaglutininas. «Hemotécnica» Rev Téc Hemoter Inmunohem 1995; V, 10-16

González CA: Semiología Inmunohematológica en la Infección por el VIH-1. Rev Arg Infectol 1997; X: 11-20,

González CA Anemia Hemolítica Droga-Inducida. Rev Arg Infectol 1998; XI: 10-21

González CA, Successful Treatment of Autoimmune Haemolytic Anaemia (AHAI) with Intravenous Immunoglobulin (IVIG) in a Patient with AIDS. Transplant Proceedings 1998; 30: 4151- 415

González CA, Diagnostico Inmunohematológico de anemia hemolítica autoinmune**.** Revista Argentina de Transfusión 2000; XXVI: 21 – 40

Gonzalez C. A. Anemia hemolítica autoinmune – Criterios de diagnóstico y tratamiento – Sociedad Argentina de Hematología – 2003.

Judd WJ How I manage cold agglutinins Transfusion 2006; 46: 324-326

Endoh T, Kobayashi D, Tsuji N, Tanabe H, Koshida S, Yagihashi A, Watanabe N. Optimal prewarming conditions for Rh antibody testing Transfusion 2006; 46: 1521-1525

Chiaroni J, Gouvitsos J, Dettori I, Ferrera V. How we evaluate panagglutinating sera Transfusion 2009; 49: 1540-1545

Daniels y Col The clinical significance of blood group antibodies Transfusion Medicine 2002.12:287-295

Daniels and Poole Blood Group Antibodies and their significance in transfusion medicine. Trans med Rev 2007; 21:58-71

ANEXO 1

TÉCNICA DE ADSORCIÓN AUTÓLOGA / HOMÓLOGA

Elección de las células

La elección de los eritrocitos depende del tipo y propósito de la adsorción. Para la adsorción homóloga, las células deberán ser frescas y reaccionar fuertemente con el autoanticuerpo. El tratamiento enzimático de los eritrocitos permite captar mayor cantidad de anticuerpo; no obstante, desnaturaliza los antígenos: M, N, S, Fy^a, Fy^b, Yt^a, Ch, Rg, Pr1, Pr2, Pr^a, Tn, Mg, Mi^a/Vw, Cl^a, Je^a, Ny^a, JMH.

Preparación de las células antes de la adsorción

1. Mezclar un volumen de GR lavados, con un volumen de salina isotónica.
2. Incubar a 45º C por 30-60 minutos o a 56º C por 3-5 minutos. Centrifugar y remover el sobrenadante.
3. Lavar los eritrocitos termotratados 3 veces con grandes volúmenes de solución salina isotónica.

   Paso no esencial: Mezclar un volumen de eritrocitos con un volumen de solución de enzimas. Incubar el tiempo y temperatura de acuerdo con la enzima empleada.
   Lavar los GR tratados con enzimas 4 veces usando grandes volúmenes de salina y remover el último lavado por aspiración tan completamente como fuera posible.
4. La solución salina residual puede eliminarse introduciendo una tira de papel de filtro en los eritocitos.
5. Transferir los hematíes a un tubo de boca estrecha. Preferentemente la altura de la columna de eritrocitos debe ser aproximadamente 4 veces el diámetro interno del tubo.

Para optimizar los resultados frente a una crioaglutinina, podemos preparar los eritrocitos para adsorción obteniendo una muestra anticoagulada y la mantenemos a 37º C, la dejamos sedimentar por gravedad o centrifugamos a 37º C y removemos el plasma sobrenadante. Luego lavamos los eritrocitos con salina a 37º C.

Preparación del suero antes de la adsorción

Si el anticuerpo es hemolítico, puede inactivarse el suero a 56º C por 30 minutos o agregarse EDTA para evitar la hemólisis.

Si es una crioaglutinina podemos lograr óptimos resultados si tomamos una muestra de sangre y la dejamos coagular espontáneamente a 4º C por más de 1 hora y SIN CENTRIFUGAR y manteniendo la temperatura constante, aspirar el sobrenadante (suero).

Relación suero / células

Para la remoción total de un Anticuerpo, usar volúmenes iguales de suero y hematíes.

Generalmente IgG con títulos hasta 8 son eficazmente removidos con 2 adsorciones; títulos mayores a 16 pueden requerir 3 o más adsorciones.

Son más efectivas varias adsorciones de pequeñas alícuotas de eritrocitos por 15 minutos, que una de mayor volumen por más tiempo. Si se dispone de una cantidad limitada de los eritrocitos apropiados, es preferible realizar dos adsorciones con la mitad de la muestra globular que una sola adsorción con todas ellas.

Procedimiento:

1. Mezclar lentamente el paquete globular con el suero e invertir cuidadosamente varias veces.
2. Incubar el tubo a la temperatura apropiada por 15-60 minutos. La eficacia es mayor si aumentamos el área de contacto entre los eritrocitos y el suero, para ello se recomienda utilizar un tubo ancho. Agitar la mezcla durante la incubación, preferentemente con un instrumento rotatorio.
3. Centrifugar la mezcla por 3-5 minutos teniendo la precaución de mantener la temperatura de adsorción.
4. Transferir el suero adsorbido (sobrenadante) a otro tubo por aspiración (NO VOLCAR) y probar una alícuota contra células fuertemente reactivas (las mismas empleadas para el procedimiento) a fin de detectar la presencia de anticuerpo no adsorbido.
5. Si el suero adsorbido aún conserva actividad anticorpórea, la adsorción pudo no haber sido completa y debe repetirse el procedimiento con una nueva alícuota de eritrocitos.

Adsorción con PEG

1. Mezclar volúmenes iguales de eritrocitos nativos, suero y PEG al 20%
2. Incubar 15 minutos a 37º C (o 4º C si crioaglutinina)
3. Enfrentar 4 gotas del sobrenadante con 1 gota de eritrocitos
4. Incubar 15 minutos a 37º C
5. Lavar 3 veces con solución salina isotónica y agregar SAG.

Si es necesario seguir adsorbiendo, continuar haciéndolo con el mismo suero sin agregar más PEG.

El sobrenadante adsorbido conservado a 4º C puede precipitar proteínas, (y con ellas Anticuerpos) por ello se sugiere resuspender el precipitado de la mezcla suero-PEG conservado

AAHI - Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Cdad. Aut. de Bs. As. - Argentina
Tel/Fax: (54-11)4771-2501 - L.Rot.
E-mail: aahi@aahi.org.ar

Planta fraccionadora de derivados plasmáticos

Barrios, Eva*

Historia

El proyecto de una Planta fraccionadora de plasma para la obtención de derivados sanguíneos en Venezuela, se gesta desde los años setenta producto del panorama existente en el país en relación al uso de hemoderivados importados en un 100%, la posibilidad de desarrollar y estandarizar la metodología de fraccionamiento, la creciente demanda por parte de los Bancos de Sangre nacionales de derivados plasmáticos y la existencia de materia prima (plasma) para llevar a cabo dicho proyecto.

En Diciembre de 1988 se crea Quimbiotec, C.A. como empresa venezolana sin fines de lucro, perteneciente al Estado Venezolano con la participación del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), cuyo objetivo es la elaboración y comercialización de derivados sanguíneos y otros productos químicos y biológicos para satisfacer las demandas del mercado venezolano y proyectarse a la región andina. El primer proyecto asignado a Quimbiotec, fue el desarrollo y puesta en marcha de la Planta de Derivados Sanguíneos (PPDS) para la obtención de productos de uso terapéutico a partir del plasma humano (Albúmina, Factores de Coagulación, Inmunoglobulinas).

Es precisamente en al año 1988 cuando Quimbiotec se constituye como el brazo empresarial del IVIC y, dado el origen de la materia prima principal (plasma), la ley de Transfusión y Bancos de Sangre le otorga al estado el procesamiento industrial de la misma, generando una empresa con fines sociales, cuyas ganancias permitirían su manutención y consecuentes inversiones en nuevos proyectos y tecnología avanzada.

Durante el año 1989 se selecciona el Método de Cohn modificado como el aplicado para llevar a cabo el fraccionamiento de plasma y subsiguiente purificación de las fracciones que representarán finalmente los productos terapéuticos. La elección y transferencia de esta metodología se realizó en base al funcionamiento de plantas fraccionadoras de diferentes países como Francia, Alemania, Holanda y Estados Unidos, llevando a cabo una licitación para la transferencia tecnológica a través de una empresa de origen alemán Seitz Enzinger Noll A.G. (SEN) para la dotación de equipos, así como también de la Cruz Roja Alemana para la transferencia de procesos. Ya en el año 1.992 finaliza la construcción física siguiendo la instalación y pruebas de los equipos para llevar a cabo la puesta en marcha de la planta. En este año se cuenta con la asesoría de un experto norteamericano Dr. Fred Rothsein, culminando el contrato con el SEN durante el año 1996.

En el año 1997 se obtiene el registro del primer producto representado por la Albúmina Humana al 20%. Este avance marca el comienzo de una nueva etapa durante la cual se fortalece la estructura organizacional de la empresa creando la Gerencia de Desarrollo e incorporando personal farmacéutico experto en el área de Producción, así como auditores de procesos para el levantamiento escrito de los procedimientos y procesos. Durante ese mismo año, se establecen alianzas con empresas de origen francés para lograr asesorías orientadas al desarrollo del Factor VIII, así como también se fomentan las relaciones con la Planta de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC), de la cual se obtienen evaluaciones de diferentes Departamentos como Producción, Control de Calidad y Desarrollo, etapa marcada por la transferencia tecnológica para iniciar la producción de Inmunoglobulinas G líquida e intramuscular. De las operaciones del Laboratorio de Desarrollo se elaboran lotes piloto y se llevan a cabo estudios de estabilidad en los Laboratorios de Control de Calidad para lograr el

*Jefe Laboratorio de Serología, QUIMBIOTEC, C.A., Venezuela.

registro de este producto en el año 1999, cuya presentación inicial es un liofilizado, para pasar a una presentación líquida mediante un cambio de formulación en el año 2000. A partir de ese mismo año, mediante una transferencia de tecnología de la compañía francesa CLB, se optimiza el proceso de fraccionamiento de la Pasta II para la obtención de Inmunoglobulinas. En el Laboratorio de Desarrollo se realizó la evaluación, aplicación y transferencia del proceso de purificación al Departamento de Producción, obteniéndose el registro de la nueva presentación para el año 2002. Durante los últimos diez años se han desarrollado Inmunoglobulinas específicas de uso intramuscular como Antitetánica y Anti D y diferentes presentaciones de las Inmunoglobulinas intravenosas, desarrollándose la Inmunoglobulina intramuscular Anti Hepatitis B como nuevo producto a registrar. Así mismo, desde el año 1998 se inicia el desarrollo del Factor VIII cuyo registro se obtiene en el año 2000.

La puesta en marcha de la Planta Productora de Derivados Sanguíneos representa el logro del primer proyecto de Quimbiotec, C.A., considerándose el año 2000 como el de inicio de operaciones.

Entre los años 2000 y 2001 se gesta la idea de una Planta Productora de Fármacos mediante tecnología recombinante, mostrando sus primeros avances entre los años 2000 y 2004 durante los cuales se redirecciona la Gerencia de Desarrollo y se crea la Gerencia de Desarrollo Analítico. Entre los años 2004 y 2008 se instalaron los Laboratorios de Purificación y Fermentación para la elaboración de productos mediante Ingeniería Genética, adquiriendo materia primar purificada para realizar la formulación y envasado del producto e iniciar el proceso de registro.

Dentro de los procesos de Desarrollo se encuentra la fase de transferencia tecnológica, llevando a cabo la primera para el G-CSF en el año 2004. Al final del año 2005 se realiza en llenado de lotes piloto de G-CSF, Eritroproyetina e IFN alfa 2B, iniciando los estudios de estabilidad, especialmente de tres lotes elaborados a escala piloto de G-CSF.

Actualmente en Quimbiotec, se continúa llevando a cabo el abastecimiento de hemoderivados (Albúmina Humana, Inmunoglobulinas, Factor VIII, Arginato de Hemina), desarrollando a escala industrial el Complejo Protrombínico, Factor IX y Anti trombina III. Así mismo, se encuentra iniciando un proyecto para la elaboración de Anti veneno y vacuna contra la influenza humana y levantando el proyecto para la elaboración de insulina, al mismo tiempo que se pretende la culminación de la construcción de la Planta de Recombinantes y el inicio del proceso de registro del primer producto de tecnología recombinante (G-CSF)

Actividades de la PPDS

Abastecimiento

Mediante la recolección nacional de materia prima (plasma humano), Quimbiotec dedica sus recursos a la elaboración de hemoderivados acompañada de la divulgación y seguimiento para el uso adecuado, distribución y optimización de inventarios en las farmacias hospitalarias en el marco de una misión social como es manufacturar y comercializar derivados sanguíneos y otros productos químicos y biológicos de alta tecnología en áreas donde existen ventajas competitivas, actuando como elemento de vinculación entre centros de investigación nacional y el sector productivo, así como entre el sector tecnológico y el sector productivo de bienes y servicios, encontrando en sus funciones un beneficio para la comunidad.

Contar con un suministro constante de materia prima, responde a la obtención de plasma mediante donaciones de sangre completa y plasmaféresis en el marco de una estrategia basada en cuatro programas de recolección de plasma humano:

Plan de Intercambio:
Actualmente constituido por alrededor de 200 Bancos de Sangre a nivel nacional con los cuales se lleva a cabo el intercambio de bienes y servicios por plasma obtenido mediante donaciones de sangre completa las cuales representan aproximadamente (datos 2008) 23.000 litros de plasma recolectado.

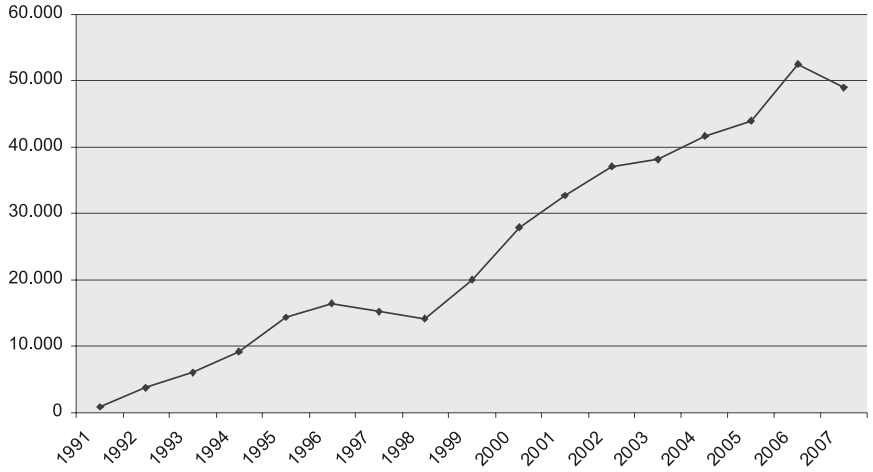
Centros de Recolección Quimbiotec:
Conocidos como Centros Regionales en los estados Lara y Carabobo promoviendo la donación voluntaria (sangre completa y plasmaféresis), e incrementando así el autoabastecimiento para recolectar anualmente aproximadamente 12.000 litros de plasma.

Banco de Sangre de la PPDS:
Promoviendo la captación y donación de sangre completa y plasma en el Banco de Sangre de la PPDS y mediante la realización de unidades itinerantes en instituciones públicas y privadas atendiendo a los donantes en sus lugares de trabajo; recolectando anualmente cerca de 8.000 litros de plasma.

Plasmaféresis Intrahospitalarias:
Desde 1994 se han colocado máquinas de plasmaféresis en las instituciones hospitalarias, recolectando aproximadamente 22.000 litros anualmente.

Desde el año 1993 hasta el año 2008 se ha logrado incrementar la recolección aproximadamente 5 veces (10.000 a 60.000 litros) por lo que el resto de la materia prima requerida para suplir las demandas de producción se obtiene mediante la adquisición de subproductos importados (pastas).

Desarrollo de la Recolección de Plasma 1991-2007



Control de Calidad

La clasificación inicial del plasma en apto o no apto para el proceso productivo se lleva a cabo en el Laboratorio de Serología en donde se realiza el despistaje para los marcadores serológicos de infección. A saber: AgSHB, Anti CoreHB, Anti HCV, Ag/Ac HIV, Anti HTLV, Anti T. cruzi y Anti T. pallidum, realizado mediante técnicas serológicas, basadas en casi un 100% en la técnica de ELISA. Así, todo el plasma que resulte No Reactivo a los marcadores de infección por HBV, HCV, HIV y Treponema pallidum es aprobado inicialmente para ser sometido a pruebas de despistaje molecular mediante PCR para los Virus de Hepatitis B, Hepatitis C, Inmunodeficiencia Humana y Parvovirus, ampliando el margen de detección de cualquiera de estos agentes al analizar el plasma en pools.

Iniciado el proceso productivo mediante la mezcla de las unidades de plasma aprobadas, se desencadenan una serie de eventos para el fraccionamiento plasmático durante los cuales se realizan varios ensayos destinados a garantizar la pureza y calidad microbiológica del producto final, realizando determinaciones de proteínas, potencia, título de endotoxinas, pH y otras para garantizar que todas las variables físico químicas, microbiológicas y biológicas se encuentran dentro de las especificaciones requeridas para obtener productos de alta pureza e inocuos al ser humano. Las fracciones obtenidas (Criopasta, Pasta II y Pasta V) son sometidas a procesos de purificación, los cuales varían de acuerdo a la proteína de interés (Factor VIII, Inmunoglobulinas y Albúmina respectivamente). Todos los productos son formulados utilizando estabilizantes adecuados que garanticen la viabilidad de la proteína e igualmente son sometidos a eventos de inactivación viral validados de acuerdo a los estándares internacionales.

Comercialización

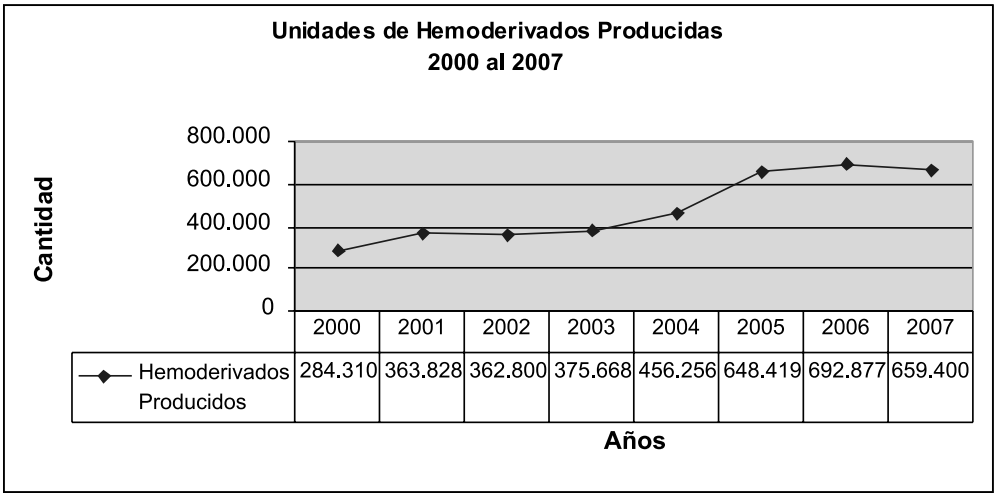
Desde el año 1998 existe en Quimbiotec la Gerencia de Comercialización cuyo objetivo es el mercadeo de los hemoderivados obtenidos, realización de campañas de promoción y divulgación, determinar los canales de distribución y venta, evaluar las demandas de la población, monitorear el uso de los productos registrando cualquier evento adverso durante su administración, optimizar el inventario en las farmacias de los hospitales y realizar los estudios requeridos para la atención del mercado. De acuerdo al tipo de venta la distribución planteada es del 7% para el IVSS, 84% Ministerio de Desarrollo Social, 4% otras ventas y 3% para exportación. Los objetivos del Programa de Optimización de Uso en el sector público implementado desde el año 1999 entre el Ministerio de Salud y Quimbiotec se resumen en: garantizar la disponibilidad de hemoderivados al dotar a los centros asistenciales en el ámbito nacional, mejorar la terapia a los pacientes quienes acceden las tratamiento preciso e indicado sin costo minimizando los efectos adversos que pudieran ocasionar tratamientos alternativos, seguridad transfusional al administrar a los pacientes productos concentrados sometidos a técnicas de inactivación viral, ahorro en días de hospitalización, aumentar la recepción y uso de plasma para fraccionamiento y lograr la autosuficiencia en componentes sanguíneos y hemoderivados.

En relación a la optimización del uso de hemoderivados se encuentra que desde el año 1999 hasta el año 2008 el consumo de Albúmina Humana al 20% en Kg/millones de habitantes se ha incrementado de 18,08 a 115,26, así mismo en el caso de la Inmunolglobulina G polivalente desde el año 2000 hasta el año 2008 ha sido de 3,23 hasta 13,88 y en el caso de Factor VIII se distribuyeron aproximadamente

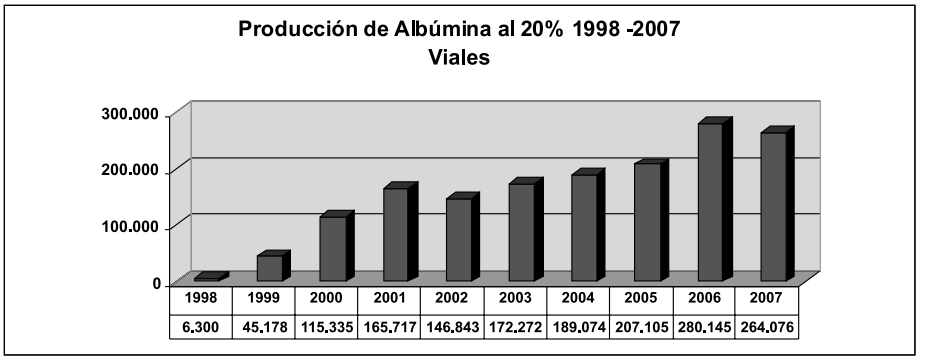
17.000.000 UI durante el año 2008 lo cual representaría hasta 49.000 pacientes atendidos. El Programa de Optimización también contempla la distribución de Inmunoglobulinas con elevados títulos de Anticuerpos específicos como la Anti D, Anti Tétanos y Anti Hepatitis B. En relación a los anteriores puede destacarse que desde el año 2002 se trabaja en el programa de para la prevención de isoinmunización de madres Rh Negativo, esperándose una cobertura superior al 90% de las madres de alto riesgo que acuden a consultan prenatal, lo cual, para efectos de las expectativas durante el año 2008 representó que se esperara la solicitud de al menos 11.000 viales de Ig G hiperinmune Anti D, basándose en una tasa de nacimientos de 22 x 1.000 habitantes/año con una prevalencia del 0,68%. Adicionalmente, para el año 2008 se estimó la dotación de aproximadamente 1.000 viales de Inmunoglobulinas con elevados títulos de anticuerpos Anti tetánicos y en el caso de Anti Hepatitis B, de unos 4.200 viales.

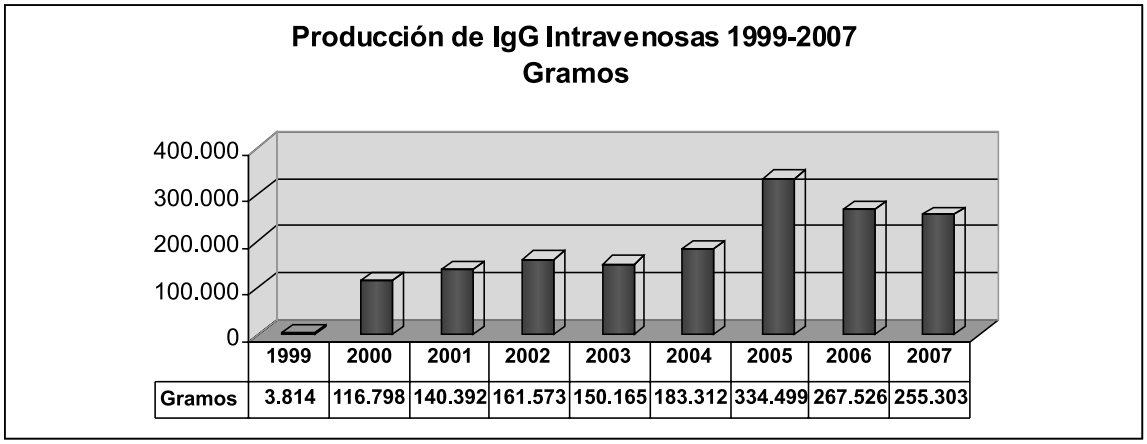
Asegurar que los hemoderivados de Quimbiotec, se utilizan en forma idónea en los centros hospitalarios del país requiere de un equipo multidisciplinario que visita semanalmente los servicios verificando la disponibilidad en la las farmacias, nuevas indicaciones y datos de uso, recolectando información inherente a las fechas de solicitud de los productos, presentación y cantidad de los mismos, patología diagnóstica y servicio hospitalario que administró el hemoderivado. Toda al información recabada es ingresada en forma electrónica en un sistema de rede intranet utilizando la codificación para la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE) a fin de ser analizada y evaluada estadísticamente. Trimestralmente se emite un reporte con los resultados de uso, mostrando la cantidad de hemoderivados utilizados, número de pacientes atendidos, diagnóstico y cualquier desviación asociada a la prescripción y dosificación. El estudio de uso se lleva a cabo en 55 hospitales a nivel nacional, donde el consumo de los productos representa aproximadamente el 80% del consumo total de los hemoderivados distribuidos a todos los hospitales, en el Programa de Optimización.

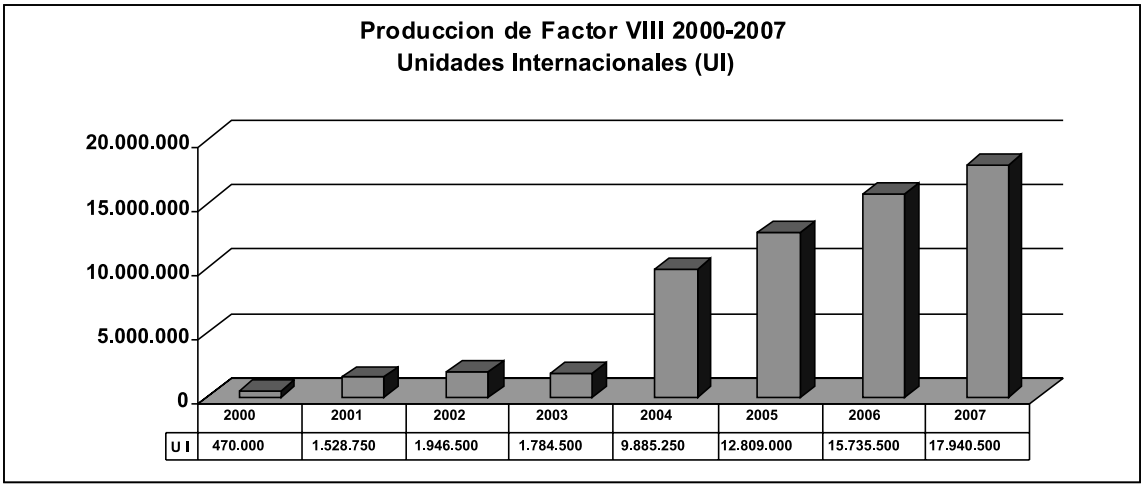
Los resultados de la gestión en unidades de producción "viales" desde el 2000, inicio de operaciones, al 2007, se muestran a continuación:



El factor VIII se considera en viales de 250 UI y la inmunoglobulina en viales de 1 gramo.







Nuevos Proyectos

En los últimos 5 años, se han desarrollado una serie de actividades orientadas a la obtención y registro de nuevos productos, implementando nuevas tecnologías mediante el ensamblaje de nuevos Laboratorios y áreas productivas. Así, se han forjado avances en relación a la estandarización de técnicas para bioensayos, mapeos peptídicos, determinación de ADN y ELISA aplicadas al estudio de G-CSF, EPO, IFN alfa 2b, Factor VIII recombinante, en conjunto con la realización de lotes piloto de purificación y fermentación para la obtención de materia prima destinada a la elaboración de G-CSF. Actualmente sometidos a evaluación se encuentran los proyectos relacionados con la obtención de Hormona del Crecimiento Humano, Vacuna Recombinante anti-Hepatitis B e Insulina humana recombinante.

Aliados

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y Tecnología, Ministerio del Poder popular para la Salud, Fuerza Armada Nacional, Bancos de Sangre Nacionales, Hospitales y Farmacias Hospitalarias.

Universidad Central de Venezuela

Instituto de Estudios Avanzados

Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias

Instituto Nacional de Higiene

Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba.

Proveedores nacionales e internacionales.

Representantes de Quimbiotec en Colombia, Perú, Bolivia, Brasil y Nicaragua

ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) Italia e India

Genscript USA

Pangen Corea

Universidad Nacional de Buenos Aires. Argentina

Quimbiotec es una empresa del Estado sin fines de lucro, cuyas actividades promueven la elaboración de productos que reemplacen importaciones y que se utilicen en la mejor atención de venezolanos que hasta el

momento no hubieran tenido acceso a ellos por su escasez y costo.

La intención es atender al menos el 87% de la población venezolana, en forma idónea y con la calidad que representa la distribución de productos biológicos. En resumen, atender pacientes cubiertos y no cubiertos por la seguridad social, e inclusive mejorar la atención de los protegidos por el seguro, así como, extender los beneficios de contar con plantas de alta tecnología a los países de la Región Andina, Centro América y el Caribe. QUIMBIOTEC y la PPDS son organizaciones únicas en el país. Su desarrollo ha requerido un esfuerzo gerencial considerable a nivel político, financiero, ingenieril, tecnológico y educativo. Gracias al IVIC, Venezuela cuenta hoy con una empresa capaz de producir albúmina plasmática inmunoglobulinas y factores de coagulación. Para el MSDS y el Estado Venezolano, QUIMBIOTEC constituye además el elemento modernizador e industrializador que le da carácter de sistema al conjunto de bancos de sangre y otras entidades que hasta ese momento habían venido actuando individualmente. Y más allá de la PPDS, QUIMBIOTEC se proyecta con miras a producir y comercializar otros productos químicos y biológicos que tengan un alto componente tecnológico proveniente de las investigaciones del IVIC y otras instituciones, ubicándose así como dispositivo de transferencia desde el sector científico hasta el sector productor de bienes y servicios.

Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional
Programa Consulta al Experto
Autotransfusión

Coordinadora: Dra. León de González, Graciela
Profesor invitado: Dr. Tejerina, Mario Luis*

Introducción

Se le denomina Autotransfusión a la extracción de sangre o componentes sanguíneos a un paciente para su posterior reinfusión en el acto quirúrgico o durante su permanencia hospitalaria[1,2,3].

Debido a la inexistencia de seguridad transfusional absoluta y recientemente al problema cada vez más grave de disponibilidad de sangre de donador altruista, la prevención de la utilización de sangre alogénica en pacientes clínicos y quirúrgicos se volvió un tópico importante en Medicina Transfusional.

La Transfusión Autóloga es considerada la que menor riesgo ofrece para el paciente, por eliminar la posibilidad de transmisión de enfermedades por la transfusión, los riesgos de aloinmunización, la enfermedad injerto contra huésped, evita reacciones hemolíticas, febriles o alérgicas y reduce o elimina el uso de sangre homóloga con todas sus desventajas[1,2,3,4].

La autotransfusión tuvo su mayor auge en la década de 1980 ante la aparición del SIDA que llevó a un uso exagerado, incluso para cirugías con posibilidad mínima de necesidad de transfusión.

Es muy importante mencionar que la transfusión Autóloga no es 100% segura ya que aun pueden ocurrir complicaciones con su uso, como por ejemplo, sobrecarga de fluidos, contaminación bacteriana de las unidades, error ABO por cambio de unidades, anemia e hipovolemia, unidades perdidas al retrasar lo suspender la cirugía, aumento del costo, burocracia, diseminación de células tumorales, reacciones adversas durante el proceso de donación, etc[1,2,3,4,5].

Técnicas o Modalidades

Existen varias modalidades las cuales tienen aplicación en situaciones bien definidas y todas son alternativas para reducir el uso de sangre alogénica [5,6]. Se ha hablado mucho de los altos costos en relación con el beneficio real de estas técnicas, particularmente con la autodonación preoperatoria de la que se informa que casi 50% de las unidades donadas no se transfunden y sólo incrementan los costos globales[1,2,3]. **Por lo tanto, se debe considerar que para cirugías con pocas probabilidades de requerimiento de transfusión no se debe indicar la transfusión antóloga, motivo por el que no se debe generalizar su uso**[3,5,6,7,8]**.** Así, por ejemplo la donación preoperatoria no puede utilizarse en cirugía de emergencia. La hemodilución normovolémica aguda es factible en cirugía de emergencia con pacientes sin hemorragia; en algunos centros hospitalarios en La Paz - Bolivia ésta técnica se utiliza en pacientes con eritrocitosis secundaria con un hematocrito mayor a 60% sin descompensación cardiopulmonar. Por último se puede emplear la técnica de recuperación intraoperatoria en cirugías de emergencia con hemorragia[1,5,9.]

Entre sus técnicas o modalidades destacan:

❑ **Donación autóloga pre depósito**. Es la técnica más utilizada. Tres o cuatro semanas antes de la intervención, se le extraen al paciente las unidades necesarias y se conservan en el Banco de Sangre para administrarlas durante la intervención o en el pos operatorio

*Hematología – Hemoterapia. MSc. en Epidemiología. Clínica del Sur- La Paz - Bolivia. hemato44 @ yahoo.es
Publicado por el Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional (GCIAMT), año 2010. www.gciamt.org

inmediato. Aunque la propia extracción estimula la eritropoyesis, es conveniente administrar hierro y en ocasiones Eritropoyetina para conseguir el número de unidades necesarias. Se debe disponer de protocolos para estos casos[1,2,3,5,6,10,11].

❑ **Hemodilución Normovolémica Aguda (HNA)**. Consiste en la toma de dos o más unidades de sangre y su reemplazo por un volumen igual de cristaloides o de coloides, de manera que no se modifica el volumen circulante de sangre. Las donaciones se realizan en el quirófano o inmediatamente antes de la intervención, se realizan en una sola sesión. La(s) unidad(es) de sangre extraída(s) queda(n) en la sala de operaciones y es/son transfundida(s) al final de la cirugía; no se necesita realizar la tipificación de grupo sanguíneo ni estudios serológicos, tampoco se requiere refrigerador para conservar la(s) unidad(es), es la única sangre total que tiene factores lábiles (V VII y VIII), plaquetas y glóbulos blancos viables[11,12,13,14]. El estado hemodinámico, cardiopulmonar, la Hb y Htc y la edad son factores limitantes y su indicación se debe considerar en ciertos casos de cirugía cardiovascular, ortopédica y urológica[3,5,14,15]. En muchos pacientes se conserva adecuada oxigenación hística, siempre que se mantenga una adecuada concentración de oxígeno y normovolemia, puesto que la disminución de la viscosidad facilita la entrega de oxígeno a los tejidos[16,17]. Hay reportes en los que se evidencia una buena tolerancia en pacientes ancianos sin enfermedad cardiaca conocida[16,17,18,19]. Algunos trabajos muestran que las pruebas de coagulación TP, TTPA, fibrinógeno y el recuento de plaquetas no sufren alteraciones importantes que conlleven a pérdidas sanguíneas peri operatorias importantes por coagulopatía dilucional[6,14,18,21].

Tsai e Intaglietta han demostrado en hámsteres que el aumento de la viscosidad plasmática mantiene la funcionalidad y viabilidad de los capilares, libera vasodilatadores como el óxido nítrico (NO) y prostaciclina por la células endoteliales[17]. Los efectos en la densidad funcional capilar son consecuencia directa de vasodilatación inducida y de una redistribución de la presión en la micro circulación. Consecuentemente, la hemodilución causa una disminución significativa en la viscosidad sanguínea en la circulación central y un menor decremento en la micro circulación. Cuando la hemodilución es realizada con un expansor plasmático de alta viscosidad, la viscosidad es moderada en la circulación central y es más elevada en la periferia. El resultado es una redistribución de la presión hidráulica en la periferia. En ésta situación, la presión capilar está aumentada y los capilares no sufren colapso[17]. La literatura afirma que una elevada viscosidad plasmática es benéfica y que no tiene efectos adversos en hemodiluciones extremas[14,16,17,19]. Por lo tanto, los "gatillos" de transfusión muestran un punto en que la función micro vascular está en peligro o riesgo debido a una baja viscosidad sanguínea y no a un déficit del transporte o entrega de oxígeno. Una adecuada viscosidad sanguínea y plasmática es necesaria para mantener una normal función micro vascular y densidad capilar funcional[17].Todo depende del expansor plasmático que se utilice, o sea, que cuando se utilizan expansores de alta viscosidad el "gatillo" de la transfusión puede ser un nivel de Hb menor que cuando se utiliza, por ejemplo líquidos como solución fisiológica, Ringer Lactato o Dextran 70.

Las ventajas de la HNA son similares a las de la donación de pre depósito, y es importante mencionar que la pérdida de eritrocitos durante la operación sea menor por efecto de la hemodilución. Tal es así, que la masa que se perdería en 1000 ml de sangre con Htc de 50% es de 500 ml, mientras que al disminuir el Htc a 25% luego del procedimiento la pérdida se reduciría a 250 ml[3,5,10,22,23].

El estado de salud del paciente, el grado de hemodilución, el tipo y la duración de la cirugía determinarán el tiempo de monitoreo cardiovascular en pacientes que serán sometidos a HNA. Aunque es una técnica segura y efectiva, su eficacia es moderada, por lo tanto no se justifica su uso generalizado[14,16,18,19,21,24]. Puede considerarse útil en pacientes en los que el ahorro de 1 o 2 unidades es vital, además se debe considerar el ahorro en transporte y en tiempo en el banco de sangre[24]. Varios trabajos demuestran que niveles bajos de hemoglobina alcanzados por una hemodilución marcada no son seguros, pueden estar asociados a isquemia de miocardio y a niveles bajos de fibrinógeno; en estos casos se debe considerar la técnica de donación pre operatoria[24,25]. La realización de meta-análisis sobre la eficacia de la hemodilución normovolémica aguda es muy difícil, especialmente cuando los estudios son heterogéneos en términos de la cantidad de la pérdida sanguínea quirúrgica[8,12,21,22,24]. Se puede mencionar a favor de la HNA que los riesgos de errores de "oficina", reacciones transfusionales y contaminación bacteriana son reducidos, al contrario de lo que sucede en donaciones de pre depósito y en transfusiones alogénicas[24]. La técnica de HNA, por estos motivos y por su menor costo – ya que muchas veces no se necesita realizar los exámenes pretransfusionales-, brinda seguridad porque las unidades sanguíneas extraídas en el quirófano se las puede dejar en la misma sala, utilizándolas de inmediato cuando se las requiera; evitando así el descarte de unidades sanguíneas, como sucede a veces con la técnica de donación de predepósito. Tomar en cuenta que es la única manera de provisión de sangre total fresca el mismo día de la cirugía, por lo tanto viene ganando popularidad en varios países. Sin embargo, trabajos clínicos han demostrado que tanto la donación autóloga preoperatorio y la HNA tienen resultados transfusionales equivalentes[12,15,26].

Numerosos trabajos científicos han demostrado que progresos en las técnicas anestésicas, en las técnicas quirúrgicas y el aumento a la tolerancia de la anemia normovolémica han reducido la exposición a transfusiones alogénicas en muchos pacientes[14,16,18,19,21,22].

Existen estudios de HNA en niños donde se utilizó esta técnica en cirugías de columna vertebral y

craneosinostosis, donde se beneficiaron en la reducción de transfusión alogénica[28]. Sin embargo se requieren más estudios para determinar si el uso de moderada a profunda hipotermia y el uso rutinario de hiperventilación durante la anestesia pueden mejorar el margen de seguridad en este grupo de pacientes con moderada a extrema hemodilución[28]. Se requieren más trabajos clínicos randomizados lo más pronto posible para promover nuestros conocimientos en cuanto a la seguridad y utilidad de esta técnica en pediatría.

Quiero resaltar que en La Paz –Bolivia muy pocos anestesiólogos se animan a realizar ésta técnica por diversos motivos entre los principales: a. el temor a que el paciente se descompense clínicamente, b. el equipo quirúrgico no tiene buena disposición o no está de acuerdo con esta técnica, y c. al desconocimiento del procedimiento.

❑ **Recuperación intraoperatoria**. Se recupera la sangre del campo operatorio y después de un proceso de lavado y filtrado, se re-infunde al paciente. Es útil en intervenciones con grandes requerimientos de sangre como en trasplantes de órganos, cirugía de columna, cardiovasculares, neuroquirúrgicas[2]. Requiere el empleo de equipos especiales, de instalaciones adecuadas, personal bien capacitado y una suficiente garantía de calidad[1,2,5]. Este procedimiento hace que se disponga inmediatamente de grandes volúmenes de sangre durante una hemorragia masiva. Cuando se utiliza la recuperación intraoperatoria, se ha demostrado que se reduce la necesidad de transfusión homóloga en un 50-90%[2,3,15]. Las posibles complicaciones por el uso de sangre de recuperación intraoperatoria incluyen hemólisis, trombocitopenia, hipofibrinogenemia, coagulación intravascular diseminada, embolia gaseosa y posible diseminación de células cancerosas[2]. **Lastimosamente en mi país no se cuenta con ningún equipo "cell saver". La utilidad de contar con este equipamiento principalmente en el sector público de salud, brindaría enormes beneficios a los médicos y pacientes, ya que contribuiría con la seguridad transfusional (menos transfusión homóloga) y en los costos. Otro beneficio que podría obtenerse sería el de ingresos económicos a las arcas de las instituciones públicas si estos equipos se alquilaran o se utilizaran para venta de servicios en las instituciones de salud del sector privado.**

❑ **Recuperación postoperatoria**: Es la recuperación de la sangre acumulada o drenada de un campo quirúrgico, después del término de la misma. Para que se obtenga éxito, el material debe ser recuperado en las primeras 24 a 48 horas del postoperatorio, utilizándose equipos plásticos descartables y estériles. La sangre recuperada debe ser lavada y filtrada, previo a su re infusión, que debe hacerse siempre antes de las 6 horas para evitar la proliferación bacteriana. Para que este método de recuperación sea utilizado, el sangrado debe ser superior a 50 ml / h. Está indicado en cirugías torácicas y ortopédicas fundamentalmente. Aproximadamente del 60 al 70 % de la sangre perdida puede ser re aprovechada[1,2,5,6].

Programa de Autotransfusión Pre operatoria

El factor tiempo es un gran limitante: cerca de 40% de los pacientes candidatos al programa de autotransfusión son encaminados, cuando ya no hay tiempo suficiente para una respuesta eritropoyética adecuada[2,3,5,8,11,21,26,27,28].

Lo ideal es que los intervalos entre las donaciones sean de una semana, así como el período entre la última donación y la cirugía; sin embargo, puede permitirse un intervalo de tres días previo al acto quirúrgico. La extracción debe ser realizada bajo supervisión médica y con controles seriados de los índices hematimétricos. La separación de la sangre en hemocomponentes es opcional[1].

Un importante aspecto es la administración de Hierro a los pacientes, principalmente cuando está programada más de una extracción. Se recomienda el uso de un comprimido de Sulfato Ferroso (300mg, 3 veces al día), iniciándose preferiblemente algunos días antes de la primera colecta y continuándose hasta la total recuperación[1].

Puede utilizarse por vía parenteral Hierro y Eritropoyetina asociado a Ácido Fólico, para posibilitar una recuperación más rápida del paciente y la obtención de un mayor número de unidades sanguíneas, así como para disminuir la transfusión de sangre homóloga[1].

Las unidades autólogas deben seguir la rutina del tamizaje serológico habitual[1].

La indicación de transfusión de una unidad autóloga es bien conocida: son las mismas para una unidad homóloga[1,2,3,5,11,22,29,30].

Se debe restringir la colecta de muestras sanguíneas para exámenes de laboratorio y evitar las coagulopatías farmacológicas[21,27,29,30,31]

Para que la técnica de Donación Autóloga Preoperatoria sea efectiva, deberá ser combinada con otras técnicas y la anemia pos operatoria debe ser monitoreada y tratada farmacológicamente siempre que sea necesaria[2,6,11].

Indicaciones de la donación autóloga con pre depósito.

Entre sus indicaciones destacan:

1.- Pacientes que van a someterse a cirugía electiva, con alta probabilidad de requerimientos transfusionales como:

❑ Cirugía ortopédica y traumática
❑ Cirugía cardiovascular
❑ Cirugía urológica
❑ Cirugía ginecológica

❑ Cirugía maxilofacial
❑ Cirugía plástica
❑ Cirugía torácica
❑ Cirugía gastrointestinal

2. Pacientes con dificultad para la transfusión homóloga por ser portadores de anticuerpos múltiples o grupos sanguíneos raros.

3. Para prevenir la aloinmunización a eritrocitos y disminuir el riesgo de inmunomodulación, reacciones febriles y alérgicas en el receptor.

4. Para mantener el suministro de sangre en comunidades aisladas o remotas.

5. Para mejorar la práctica transfusional por medio de implicar a los médicos en la revisión de las indicaciones, riesgos y modalidades de transfusión, conjuntamente con sus pacientes y animándoles a analizar otras formas alternativas de transfusión como la HNA

6. Para prevenir las principales enfermedades infecciosas (VIH, VHC, VHB, HTLV I-II, Chagas y Lúes) que pueden darse por la transfusión.

7. Mayor disponibilidad de sangre homóloga para otros pacientes (con autorización firmada) siempre que cumplan con los criterios de donación homóloga[1].

8. Esta técnica debería estar restringida para ser utilizada en situaciones donde la seguridad del suministro local de sangre y hemocomponentes es cuestionable. Como sucede en varios países subdesarrollados[1,2, 26].

9. Probablemente es eficiente en escenarios clínicos con bajos costos de producción de depósito para sangre autóloga, alta probabilidad de transfusión peri operatoria, riesgo bajo durante la donación y en pacientes donde se supone un beneficio sustancial de evitar los riesgos de transfusión alogénica porque tienen una expectativa de vida significante[1,8,20,26].

10.Un enfoque personalizado para definir los requerimientos transfusionales individuales puede facilitar la decisión de ingreso al programa de autodonación y definir el número de unidades para ser colectadas[3,11,21,26].

11.Se deben realizar esfuerzos para que esta técnica sea más eficiente y se minimicen los costos. Particularmente, debería ser apropiadamente planificada para garantizar beneficios fisiológicos a partir de las donaciones (estimulando la producción de hematíes)[3,11,21,23,26].

Criterios de selección de pacientes y administración de hemocomponentes para el programa de autodonación con pre depósito.

El donador autólogo no necesita llenar todos los criterios establecidos para la donación de sangre homóloga[1,3,5,11]. Sin embargo, existen algunas condiciones básicas para el procedimiento, que son:

1. Edad. No hay límite superior, pero en pacientes con más de 70 años, o con una expectativa de vida menor de 5 años, la indicación debe valorarse cuidadosamente. En cuanto al límite inferior, cualquier niño que vaya a intervenirse quirúrgicamente y sea capaz de cooperar y comprender, y tenga venas adecuadas, es candidato a ser incluido[1,2,3].

2. Peso. No hay requisitos específicos pero se admite un peso superior a 10 Kg. El volumen de anticoagulante debe reducirse proporcionalmente si la cantidad de sangre extraída es inferior al límite admisible para una bolsa estándar de 450 ml[2]. Debido a que en Bolivia no tenemos experiencia en niños y a la falta de insumos adecuados para realizar esta técnica en niños, solamente aceptamos el ingreso al Programa de pacientes adolecentes y adultos.

3. Hemoglobina / Hematocrito. Entre 11 y 20 g/dl; Htc 33% y 60% (dependiendo del lugar de residencia - altitud) quedando a juicio del hematólogo. Por debajo de 11 g/dl, no se extraerá ninguna unidad[1,2,3].

4. Volumen de sangre que se extrae en cada sesión de preferencia semanal:

Peso = 50 Kg = 450 ml
Peso = 50 Kg = 8 ml/kg

5. Marcadores infecciosos. Los marcadores virales HBV, HCV, VIH, Chagas, Sífilis y Malaria deben ser negativos. De ser positivos el médico tratante o el equipo de trabajo decidirá la realización del proceder[1].

6. Embarazo. Se evitarán procedimientos de extracción en el 1er y 3er trimestre de la gestación[2,3]. Sin embargo, existen trabajos publicados donde se demuestra que la donación autóloga no tuvo problemas a las mujeres embarazadas durante el tercer trimestre del embarazo[2] Se debe tener en cuenta sobre posibles efectos adversos para el feto a consecuencia de una hipotensión materna durante la donación de sangre autóloga.

7. Consentimiento informado. Aceptación del procedimiento por el paciente, una vez reciba la información por escrito y en lenguaje comprensible[31].

8. Identificar la unidad de sangre colectada. Las unidades autólogas deben ser rotuladas de manera que se destaque que su uso es restricto al donador / paciente, **"PARA AUTOTRANSFUSION"** y que contenga los siguientes datos: nombre completo del paciente, grupo ABO y Rh, número de la donación y fecha de expiración del hemocomponente. Deben tomarse todas las precauciones necesarias para evitar intercambio de destinatarios[1,2,3,5,11,31].

9. Las pruebas pretransfusionales deben comprender obligatoriamente:

- Grupo ABO y Rh del receptor
- Prueba de Coombs Indirecta del receptor

Contraindicaciones

-Infecciones bacterianas activas
-Enfermedades autoinmunes.
-Hipertensión arterial no controlada
-Enfermedad cardiaca tipo angina inestable y estenosis aórtica grave.
-Neoplasias en estado avanzado.

-Enfermedad cerebral vascular
-Antecedente de convulsiones o epilepsia.

Solicitudes de Autotransfusión Preoperatoria

Cuando se desee incluir a un paciente en programa de autotransfusión pre depósito se deberán dar los siguientes pasos:

1. Solicitar la misma al Banco de Sangre o Servicio de Transfusión en la orden habitual de transfusión indicando todos los datos referidos en el modelo y destacando que se trata de Transfusión Autóloga, la fecha prevista de la cirugía y el número de unidades que se requerirán.
2. Una vez aceptado el paciente para ingresar al protocolo de Autotransfusión, se procederá a la extracción de las mismas por el Banco de Sangre. El número de unidades extraídas constará en la historia del paciente.
3. En caso de marcadores serológicos positivos para VIH, VCH, VBH, Chagas, Sífilis, Malaria, no se procederá a extraer nuevas unidades. Los resultados se comunicarán al médico tratante y el decidirá si el paciente continuará con el protocolo previsto y será quien comunicará al paciente los resultados de los estudios serológicos y la conducta a seguir[1]
4. Se respetará la fecha de intervención comunicada al Banco de Sangre o servicio de Transfusión y en caso de cambios se consultará para evitar que las unidades extraídas caduquen.
5. El día de la intervención se hará constar en el parte de quirófano que el paciente está en el Programa de Autotransfusión.

Tras la experiencia de más de tres décadas del inicio de Programas de Autotransfusión, deben tenerse en cuenta algunas consideraciones como son:

Primero: las técnicas de autotransfusión exigen un sistema más seguro, organizado y complejo, si se compara con los procedimientos que se realizan en los donantes de sangre homóloga, se requiere mayor comunicación con el equipo médico quirúrgico y anestesiología, personal de Banco de Sangre, Servicio de Transfusión, debiendo existir una intervención integral en el manejo de los pacientes quirúrgicos, puesto que son importantes conocer datos sobre la técnica quirúrgica y anestésica a ser empleada, fecha de la cirugía; por o tanto debemos involucrarnos en el manejo del paciente.[1,2,3,5,6,11,21,27, 29].

Segundo: en la donación preoperatoria de sangre los costos son francamente superiores a los de la transfusión convencional[24,27].

Tercero: se debe optimizar el nivel de hemoglobina pre-operatoria del paciente, para reducir o evitar la transfusión sanguínea[27].

Cuarto: la decisión de potenciar los programas de autotransfusión debe valorarse con prudencia y ser analizados todos los factores a favor y en contra que intervienen en cada lugar. La elección de las técnicas más apropiadas a cada paciente específico debe basarse en la situación clínica del paciente, tipo de cirugía a que va ser sometido, condiciones logísticas, disponibilidad de las diferentes estrategias en la circunstancia específica y su eficacia, ya sea clínica como en términos de costo[2,4,6,11,22,26,27]. Por lo tanto, un buen análisis es fundamental para obtener excelentes resultados clínicos sin desperdicio de recursos preciosos y sin riesgos innecesarios.

Quinto: incentivar la educación en alternativas a la transfusión sanguínea, con el compromiso y colaboración de otras especialidades y profesiones que contribuyan al objetivo de mejorar el "manejo" de la sangre[2,6,15,21,23,27].

Sexto: Tres parámetros fuertemente afectan los requerimientos de transfusión: la pérdida sanguínea peri operatoria, los valores iníciales Hb/Htc del paciente y el "gatillo" transfusional que depende de la edad, condición clínica y principalmente cardiopulmonar[16,25,27]

Séptimo: La donación de sangre autóloga pre operatoria y la HNA son modalidades que pueden ser integradas al programa de conservación de sangre y no son panaceas para reducir o evitar la exposición de sangre alogénica durante el peri operatorio[6,24,27].

Octavo: El "gatillo" de transfusión es el "gatillo" de viscosidad, mostrando que la micro circulación a alcanzado su límite en términos de compensación por condiciones mecánicas alteradas subsecuentes a una viscosidad disminuida[17].

Noveno: Cualquier transfusión sea autóloga u homóloga deberá ser evitada si el paciente tolera bien la anemia[1,3,5, 6,15,21].

Quisiera dejar por último una reflexión: Necesitamos políticas nacionales de conservación de sangre que puedan educar a los médicos y a la población en general con la intención de que busquen opciones o alternativas a la transfusión de sangre. Preguntarse **¿Se puede hacer algo diferente?** Se tiene que aprender cómo tratar a los pacientes cuando no se puede conseguir sangre, se debe poder enfrentar la situación cuando se produce una escasez – como ocurre con frecuencia – y no enseñar que hay una sola manera: si se pierde sangre, se la reemplaza con sangre. En mi país no se tiene esa facilidad. **¡¡¡Se requiere urgente un cambio de mentalidad!!!**

Referencias

1. Tejerina Valle ML, González Treassure AL, Pereira Vallejo M. Transfusión de Sangre, hemocomponentes y hemoderivados. Recomendaciones y Guías Prácticas. Programa Nacional de Sangre Bolivia. 2004: pág. 81-6.
2. AABB Manual Técnico. 1990: 10ª Edición. Cap. 20 Transfusión autóloga. Pág. 513-29.
3. U.S. Department of Health and Human Services. National Blood Resource Education Program. Transfusion Alert. Use of Autologous Blood. Sept. 1989.
4. Lee, D. Transfusión Autóloga. Pág. 18 – 21.En: ABC de la Trans-

fusión. BMJ. Publishing Group, Publicaciones Técnicas Mediterráneo, 1994. – p. 18 – 21.
5. Di Pascuale S, Borbota Escoboza JR. Manual de Medicina Transfusional. Sección 4 Capítulo 16 transfusión en cirugía. Transfusión autóloga en cirugía y Cirugía sin sangre. p. 245-2258. Mc Graw Hill. 2005.
6. Goodnouhg L, Shander A, Spencer R. Bloodless medicine: clinical care without allogeneic blood transfusion. Transfusion 2003; 43:668-676.
7. Etchason J, Petz L, Keeler E et al. The cost of effectiveness of preoperative autologous blood donation. N. Engl.J. Med 1995; 332: 719-724.
8. Brecher M, Goodnough L. The rise and the fall of preoperative autologous blood donation. Transfusion 2001; 41:1459-1462.
9. Rogers D, Kendall C. The approach to the patient who refuses blood transfusion. Transfusion 2006; 46: 1471-1477.
10. Rodriguez- Moyado H. Medicina sin transfusiones. Rev Med Inst Mex Seguro 2005; 43(Supl 1): 151-153
11. Bacará, J P. Transfusao Autóloga. En: Jornal HEMOMINAS. Julho / agosto, 1995. año V. núm. 23. p. 13 – 15.
12. Karger R, Kretschmer V. Cost-effectiveness of autologous blood predonation.Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2000; 2(4): 14-19. .
13. Monk TG. Autologous blood predonation versus acute normovolemic hemodilution.Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine2000; 2(4):23-26.
14. Shander A. Practical Limits of Acute Normovolemic Hemodilution status and future prospects. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2000; 2(4): 27- 30.
15. Mercuriali F. Utilizacao integrada de alternatives a transfusao de sangue de dador: contribucao para a auto-suficiencia. 2) Estratégias para aumentar a perda sanguínea tolerável em doentes cirúrgicos. ABO junho 2005; 22: 39-45.
16. Shander A, Perelman S, Moskowitz D, Enchin J, Bennett H, Ozawa S. Hemodilution and transfusion avoidance. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2001; 3(1): 27- 31.
17. Tsai AG, Intaglietta M. Hemodilution and increased plasma viscosity for the design of new plasma expanders. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2001; 3(1): 17- 23.
18. Van Der Linden P. Physiology of intentional hemodilution. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2001; 3(1): 5-9.
19. Spahn DR, Zollinger A, Schlumpf RB,Stohr S, Seifer B, Schmid ER et al. Hemodilution tolerance in elderly patients without known cardiac disease. Anesth Analg 1996; 82(4): 681-6.
20. Carson J, Noveck H, Gould S. Mortality and Morbidity in patients with very low post-operative haemoglobin levels who decline blood transfusion. Transfusion 2002; 42:812-818
21. Shander A, Goodnough L. Objectives and limitations of bloodless medical care. Current Opinion in Hematology 2006; 13:462-470.
22. Cardemil G, Braghetto I, Gonzáles M, Escobar C. Programa de atención Médico – Quirúrgica sin transfusiones sanguíneas. Revista Hospital Clínico Universidad de Chile 2000; Vol. 11 N 3:212-221.
23. Mercuriali F, Inghillieri G. Utilizacao integrada de alternativas a transfusao de sangue de dador: contribucao para a auto-suficiencia. 1) Estratégias para reduzir a perda sanguínea cirúrgica. ABO junho 2005; 22: 31-37.
24. Monk TG. PAD is superior to ANH to avoid allogeneic transfusions: Con. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2003; 5(2 S): 22- 23.
25. Toy P. PAD is superior to ANH to avoid allogeneic transfusions: Pro. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2003; 5(2 S): 21- 22.
26. Mecuriali F, Inghililleri G. Efficacy of Autologuos Blood Predonation. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2001; 3(6): 6 - 11.
27. Baele PL. The risks of autologous predonation. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2000; 2(4): 4-6.
28. Wong ECC. Acute Normovolemic hemodilution: A critical evaluation of its safety and utility in pediatric patients. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 2004; 6(2): 10- 21.
29. Forgie M, Wells P et al. Preoperative autologous donation result of metaanalysis. International Study. Arch Inter Med 1998; 158:610-616.
30. Heddle NM. Evidence-based decision making in transfusion medicine. Vox Sanguinis 2006. 46: 1471-1477.
31. Vilchez E. Consentimiento informado y transfusiones de sangre. Revista Hospital Clínico Universidad de Chile. 2000; 2(4): 4-6.

Reseña histórica
Historia de los antibióticos*

Belloso, Waldo H.**

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son considerados habitualmente como uno de los descubrimientos terapéuticos más importantes de la historia de la medicina. En la actualidad es muy improbable que alguien pueda vivir su vida sin recibir algún tipo de agente antimicrobiano.

Durante gran parte de la historia se pensaba, siguiendo las enseñanzas de Hipócrates (siglo IV a.C.), que las enfermedades eran producto del desequilibrio de sustancias -o «humores»- corporales. Galeno, en el siglo II d.C. revolucionó la terapéutica al incorporar sustancias existentes en la naturaleza con el objeto de restaurar el balance perdido entre los «humores». Los preparados galénicos no contaban con especificaciones acerca de las cantidades necesarias de cada componente. La ciencia farmacéutica, que estudia la producción y las acciones de las drogas, avanzó muy lentamente en sus inicios, librada al arbitrio de cada médico, y aun de cada paciente particular.[1]

El camino hacia la terapéutica moderna se inició probablemente en el siglo XIII con la aparición del apotecario como una figura separada del médico, inicialmente en Inglaterra y Alemania.[2]

Seguramente uno de los investigadores que dio mayor impulso a esta nueva ciencia fue Paracelso, en el siglo XVI, quien, pretendiendo haber comprendido la esencia de la terapéutica médica, introdujo el concepto y los métodos para la extracción de los principios activos de las prescripciones. Paracelso pensaba que no era el conjunto de componentes de una prescripción lo que producía el efecto sino que dentro de la prescripción existían sustancias específicas con funciones específicas. Aun más, fue el primero en introducir el concepto de dosis, requisito necesario para comprender los efectos deseados y los tóxicos de la mayoría de las sustancias.[1] La rivalidad de las teorías de los galenistas y los seguidores de Paracelso dominó la escena por mucho tiempo y durante más de dos siglos los medicamentos combinaban preparaciones galénicas con detalles farmacéuticos más modernos como la dosificación y la forma de prescripción.

Muchos de estos preparados estaban destinados a combatir las enfermedades más difundidas de ese tiempo, que nadie había logrado agrupar en una categoría común: las infecciones. No fue sino entrado ya el siglo XIX cuando la Teoría Microbiana de la Enfermedad permitiría esclarecer la causa subyacente verdadera de estas patologías, abriendo el camino para la aparición de los agentes terapéuticos específicos y su revolución en la historia de la medicina. A principios del siglo XX la expectativa de vida al nacer para el promedio de la población era de 47,3 años en los Estados Unidos de Norteamérica y de 40 años en la Argentina. Hacia fines del siglo XX esta cifra superaba los 75 años (Fig. 1).

Desde el punto de vista epidemiológico las razones fundamentales de esta virtual duplicación de la expectativa de sobrevida al nacer recaen en la disponibilidad de agua potable y la disponibilidad de tratamiento para las enfermedades infecciosas.

Aun hoy, el mapa de la expectativa de vida se asemeja mucho al mapa de la disponibilidad de agua y antibióticos (Fig. 2).

AIRE

LOS INICIOS. LA TEORÍA DE LA «GENERACIÓN ESPONTÁNEA»

Hacia fines del siglo XVII, el comerciante holandés Anton von Leeuwenhoeck refinó el microscopio y describió la existencia de un mundo hasta ese entonces desconocido. Llamó animalículos a las formas móviles que observó en muestras orgánicas y presentó su descubrimiento a la Royal Society de Londres en 1676 abriendo las puertas de un nuevo tipo de materia viviente que no podía ser vista por el ojo humano. Este

*Publicado en la Revista del Hospital Italiano de Buenos Aires, Vol. 29 Nº 2, diciembre 2009.
**Sección Farmacología Clínica. Hospital Italiano de Buenos Aires. waldo.belloso@hospitalitaliano.org.ar

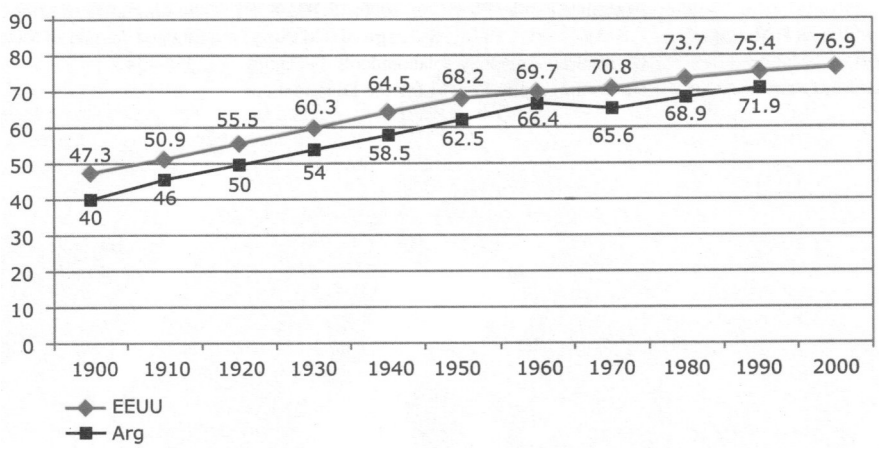


Figura 1. Expectativa de vida al nacer.
Fuentes: CDC, National Center for Health Statistics, Estados Unidos e INDEC, Rep. Argentina, 2002.

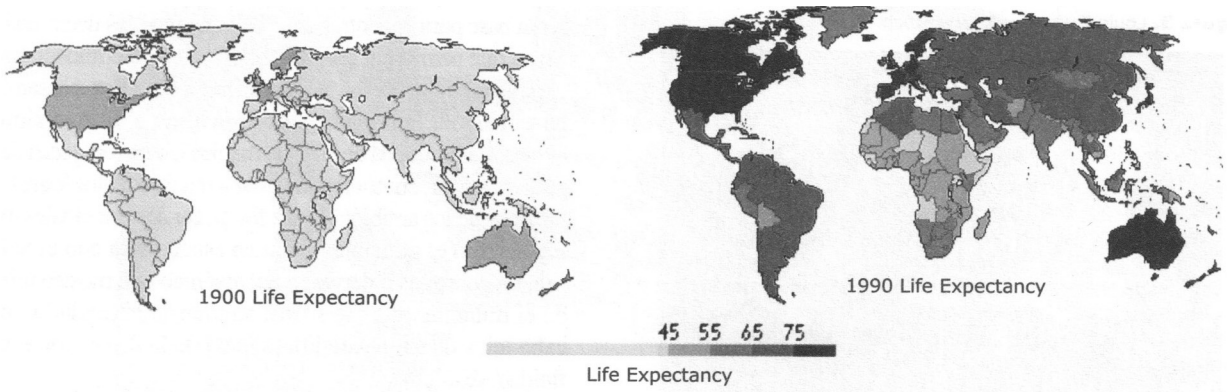


Figura 2. Mapa de expectativa de vida en 1900 y en 1990.

hallazgo permaneció durante dos siglos casi como una curiosidad, antes que el mundo científico pudiera aceptar el papel de los microorganismos en la patogénesis de distintas enfermedades.

Se consideraba, en general, que los animalículos que aparecían en el tejido o los cultivos en descomposición provenían de un proceso de generación espontánea (abiogénesis). La primera persona que realizó experimentos controlados con el objetivo de refutar esa teoría fue el biólogo y médico italiano Francesco Redi. Su obra *Experiencias sobre la generación de los insectos* de 1668, si bien desconocida por la corriente primaria del pensamiento de esos días, postuló tempranamente la diferenciación entre los fenómenos naturales y su percepción humana y sentó las bases para la «teoría microbiana de la enfermedad».[1]

LA TEORÍA MICROBIANA DE LA ENFERMEDAD

Hacia 1859, Louis Pasteur sentó las bases de la «teoría microbiana de la enfermedad», presupuesto fundamental para el desarrollo posterior de la terapéutica antibiótica.

Pasteur fue originalmente un químico aunque en realidad fue un científico completo. Con múltiples inquietudes y planteándose múltiples desafíos desarrolló su inagotable actividad en áreas muy diversas de la ciencia, como la química, la fisica, la veterinaria y la bacteriología. Mientras estudiaba los procesos de la degradación de los vegetales y animales a través de la putrefacción y la fermentación demostrando que se trataba de procesos biológicos protagonizados por hongos, levaduras y bacterias presentes en el aire del am-

biente, en lugar de procesos meramente químicos, comenzó a pensar que los mismos gérmenes que actuaban en dichos procesos podrían tener un papel patogénico en los seres humanos.[3] En su difusión acerca de las ideas «biogénicas» de los procesos de descomposición escribió: «Todo indica que las enfermedades contagiosas deben su existencia a causas semejantes», y aventuró: «Lo infinitamente pequeño puede tener un papel infinitamente grande».[4] En 1864, luego de vencer gran hostilidad de parte de muchos intelectuales de la época, la Academia Francesa de Ciencias aceptó finalmente y avaló la teoría de Pasteur, contribuyendo así a modificar decisivamente la percepción de la patogénesis que se tenía hasta entonces. Las implicaciones de esta aceptación también repercutieron en industrias como la de la alimentación al explicar los procesos de fermentación que permiten por un lado leudar el pan o producir el vino o la cerveza, y por otro son los responsables de agriar la leche o enranciar la manteca, entre muchas y diversas capacidades.[5] Pasteur, un observador atento, curioso incansable y un hombre eminentemente práctico, dedicó la mayor parte de sus esfuerzos a aplicar su conocimiento en la resolución de problemas concretos de la vida cotidiana y, si bien recibió críticas en relación con que algunos de sus hallazgos -como en muchas circunstancias de la historia de las ciencias- eran producto de la casualidad, solía decir que «las casualidades afortunadas sólo llegan a las mentes predispuestas».[6] En el campo de la medicina fue Joseph Lister uno de los primeros en llevar a la práctica la teoría de Pasteur, al desarrollar la antisepsia en la cirugía con el objeto de destruir los microorganismos que suponía que eran responsables de los procesos de supuración. Lister fue uno de los primeros en reconocer el enorme legado de Pasteur.

La terapéutica migró paulatinamente de una intervención orientada al órgano afectado hacia una intervención dirigida al agente etiológico de la infección, el cual podía comprometer en su desarrollo diversos órganos y sistemas. El siguiente salto cualitativo lo propuso el médico rural alemán Robert Koch, en 1881, al introducir un medio sólido en placas en el cual se podía sembrar y detectar el crecimiento de las bacterias.

La forma, la textura y el color de las colonias (progenie a partir de un microorganismo viable) identificables en el medio permitieron contar con una manera objetiva de distinguir los distintos tipos de bacterias. Asimismo, Koch demostró que un solo tipo de bacteria, aislada y reinoculada en animales, producía la misma enfermedad que la que había dado origen al aislamiento. Pudo aislar el *Bacillus anthracis,* el vibrión colérico y el bacilo tuberculoso. En 1878 publicó su famoso tratado *Etiología de las enfermedades infecciosas de origen traumático.*[7] Hacia fines de la misma década el danés Hans Christian Gram desarrolló la técnica de la tinción bacteriana que permitió la identificación más eficaz de las bacterias y cuyo uso persiste hasta nuestros días.

Los agentes causales de la mayoría de las enfermedades bacterianas fueron descubiertos y descriptos en las dos décadas siguientes a los estudios de Koch y Pasteur (Fig. 3).

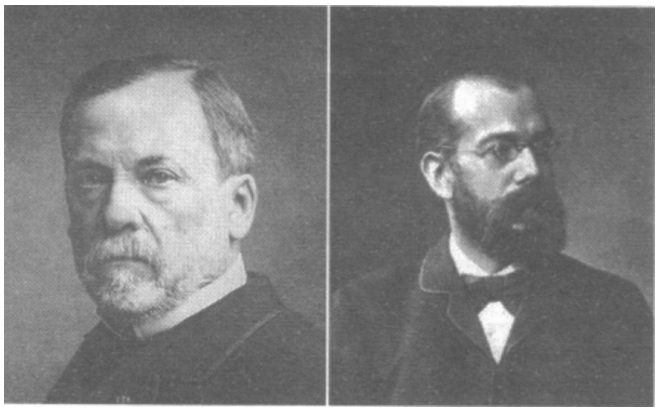


Figura 3. Louis Pasteur y Robert Koch.

Desde la faringitis bacteriana hasta la meningitis, desde la tuberculosis conocida en el antiguo Egipto hasta nuestros días, las bacterias constituyen un componente ineludible de nuestro ambiente que en general convive pacíficamente pero en ocasiones busca su supervivencia a expensas de sus huéspedes, los seres humanos.

La actividad de los leucocitos y la producción de anticuerpos son las bases de nuestra capacidad natural de resistir la invasión bacteriana, pero desde mediados del siglo pasado contamos además con sustancias de origen natural que contribuyen a la muerte bacteriana sin afectar al huésped humano. Estas sustancias son los antibióticos.

INFLUENCIAS ANTIBIÓTICAS

La idea de que seres vivos fueran capaces de producir sustancias que inactivaran o directamente mataran a otros seres con los cuales convivían era un pensamiento absolutamente contraintuitivo. Paul Vuillemin, de la Universidad de Nancy, presentó en 1889 su descripción de este fenómeno al que denominó «influencias antibióticas», y fue Selman Waksman, el microbiólogo estadounidense descubridor de la estreptomicina, quien propuso en 1941 la utilización del término «antibiótico» para referirse al grupo creciente de sustancias con propiedades antibacterianas.[8] Muy probablemente los antibióticos fueron utilizados inadvertidamente mucho antes de su descubrimiento oficial. Existen evidencias de la presencia de tetraciclinas en materiales provenientes de la civilización egipcia, y, probablemente, la costumbre de utilizar tierra en la curación de enfermedades por parte de muchas tribus y civilizaciones antiguas guarde relación con el hecho de que el suelo es una de las principales fuentes de microorganismos productores de antibióticos.[9]

SUELO

LOS PRIMEROS ANTIBIÓTICOS Y LA «BALA MÁGICA»

El primer producto antibacteriano de origen natural fue descubierto por E. de Freudenreich al estudiar la piocianasa, el pigmento azul liberado por el «bacilo piociánico» (hoy conocido como *Pseudomonas aeruginosa).* La liberación de la piocianasa por la *Pseudomonas* en cultivo impedía el crecimiento de otras bacterias. Los primeros experimentos fueron realizados por Rudolf Emmerich y Oscar Loew en 1889, y demostraron que el pigmento no solamente inhibía el crecimiento de bacterias sino que verdaderamente podía destruir bacterias patógenas tales como las del carbunco, los abscesos cutáneos, la fiebre tifoidea y la peste. Sin embargo la piocianasa era demasiado inestable y tóxica como para permitir su uso en seres humanos. Como contrariando la creencia general sobre su seguridad, la historia de la primera sustancia antibiótica terminó debido a sus efectos tóxicos. Paul Ehrlich, un químico alemán, fascinado por la selectividad de algunos colorantes que se unían de manera específica a determinados tejidos o bacterias, razonó que tal selectividad podría ser la base para encontrar una «bala mágica», es decir, una sustancia que permitiera la erradicación de un determinado microorganismo sin dañar los tejidos del huésped.[10] Este pensamiento ha teñido toda la primera parte de la historia de los antimicrobianos. La búsqueda de la «bala mágica», o mejor la idea de que pudiera existir, contribuyó a la vez a maximizar los logros terapéuticos de los antibióticos y a fortalecer sus principales mitos. Ehrlich dio el puntapié inicial en esta carrera con el Salvarsán, un compuesto derivado del arsénico que mostró utilidad en el tratamiento de la sífilis, aunque su toxicidad lo colocaba lejos de ser el candidato ideal de la droga con especificidad absoluta.[11]

Otras sustancias probadas en las primeras décadas del siglo XX fueron también discontinuadas debido a sus inaceptables efectos secundarios. Y el entusiasmo inicial sobre el hallazgo de compuestos eficaces y sin toxicidad se empezó a desvanecer.

FLEMING

Sin embargo, la búsqueda continuó en algunos laboratorios. Alrededor de 1920 Alexander Fleming, un escocés que trabajaba en el Hospital St. Mary de Londres informó el descubrimiento de una sustancia presente en las lágrimas humanas que determinaba que algunas bacterias se destruyeran (Fig. 4). La llamó «lisozima». La lisozima despertó cierto interés, aunque las bacterias susceptibles eran primariamente bacterias no patógenas y la sustancia nunca llegó a tener un lugar en la terapéutica.

Hacia 1928, Fleming logró su principal descubrimiento, que cambiaría la historia de la terapéutica. Se encontraba estudiando las variantes cromógenas del *Staphylococcus aureus,* el principal germen colonizante de la piel y, a la vez, un microorganismo invasor capaz de producir infecciones graves.Al regresar a su laboratorio luego de un descanso de fin de semana encontró que una de las placas de agar que había descartado no se había sumergido por completo en la solución detergente. En un costado de esa placa observó que se había producido la lisis del germen, aparentemente en relación con el crecimiento de un hongo en la adyacencia. Mostró con asombro este hecho a su colaborador D. M. Pryce, y con profesionalismo de bacteriólogo aisló el hongo y lo mantuvo en cultivo permitiendo así la realización de nuevos experimentos de lisis bacteriana.[12] Otro hallazgo «casual» al que Fleming se refería diciendo que «uno a veces encuentra algo que no buscaba».[13] Fleming siempre admitió que la interferencia del crecimiento bacteriano determinada por hongos había sido

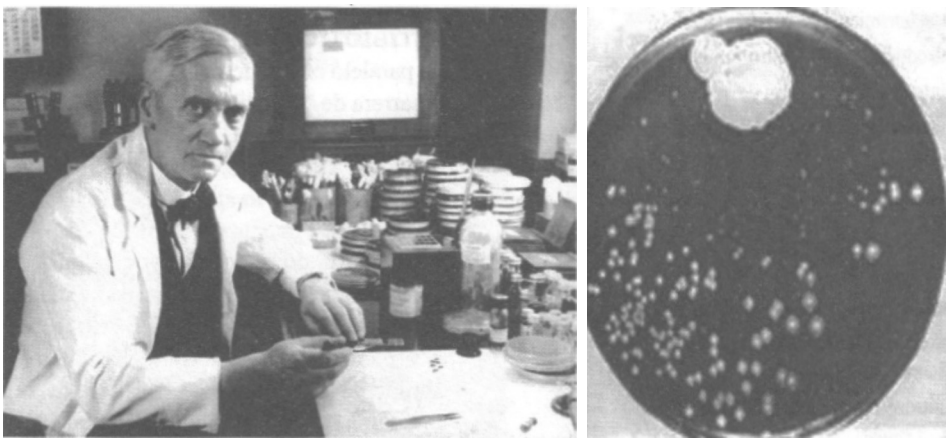


Figura 4. Fleming y la penicilina.

reconocida por muchos otros antes que él. Sin embargo, nadie había prestado atención particular a este fenómeno. Fleming, fascinado por su descubrimiento, rápidamente pudo demostrar que el hon*go (Penicillium)* producía una sustancia capaz de difundir a través del agar y de lisar la bacteria. Llamó a esta sustancia «penicilina».[14]

El camino de la penicilina como agente terapéutico en seres humanos, sin embargo, no se iniciaría hasta casi dos décadas después. Tal vez por falta de desarrollo tecnológico de la bioquímica de los fármacos en ese momento o tal vez influido por las experiencias de la piocianasa y la lisozima, Fleming -al igual que la mayoría de los hombres de ciencia contemporáneos a él- no creía que fuera posible la utilización sistémica de sustancias antibióticas para combatir las principales enfermedades infecciosas.[15,16] Otros eventos debieron suceder y otras personas debieron intervenir para establecer el inicio de la carrera terapéutica de los antibióticos.

En 1930, Gerhard Domagk trabajaba con colorantes químicos en la I. G. Farbenindustrie de Alemania cuando notó que una de las sustancias -el Prontosil- presentaba efectos antibacterianos sobre los estreptococos cuando era administrada en animales enfermos. Luego se descubrió que era el residuo de sulfonamida asociado al colorante el que presentaba las propiedades antibióticas. De esta forma las sulfas se convertían en el primer agente estable y sin toxicidad limitante que podía ser administrado internamente para combatir las infecciones.[17] Este hallazgo reavivaba el interés por los antibióticos y la idea de la «bala mágica». Distintos científicos retomaron sus tareas al encuentro de nuevas sustancias antibacterianas.

Desde Koch, y tal vez desde mucho antes, se conocían algunas propiedades «antibióticas» del suelo sobre distintas bacterias patógenas. La relativa escasez de este tipo de gérmenes en el suelo era la prueba más tangible. La tierra parecía, entonces, el lugar más indicado para continuar la búsqueda.

WAKSMAN Y LOS MICROBIÓLOGOS DEL SUELO

Hacia 1940, el microbiólogo Selman Waksman, de la Universidad de Rutgers, Nueva Jersey, y su discípulo René Dubós, entre otros, iniciaron el estudio metódico del suelo con el fin de encontrar cuáles eran las sustancias que antagonizaban el desarrollo de bacterias patógenas. Dubós fue el primero en aislar un microorganismo habitante del suelo productor de un antibiótico. Se trataba del *Bacillus brevis* que producía una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias grampositivas. Dubós la llamó «gramicidina» en honor a la tinción desarrollada por Gram; y, si bien era demasiado tóxica para readministrarla por vía sistémica, la gramicidina consiguió un lugar en la terapéutica cómo agente de uso tópico.

A su vez, Waksman aisló 10 microorganismos potencialmente productores de efectos antibióticos a partir de una revisión sistemática de más de diez mil muestras de suelo. Entre ellos se encontraba el *Streptomyces griseus,* un exponente de la familia de los actinomicetales. El *Streptomyces* producía una sustancia antibiótica que Waksman llamó «estreptomicina» (Fig. 5).[18,19]

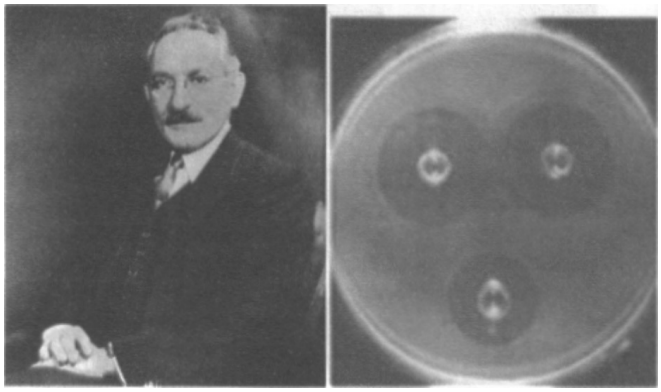


Figura 5. Selman Waksman y la estreptomicina.

Esta droga demostró ser eficaz en enfermedades que la penicilina no podía tratar, como las infecciones urinarias, la tularemia y aun la tuberculosis. Se encontraba así una nueva familia de antibióticos, los aminoglucósidos, que, si bien presentaban un perfil de toxicidad distinto y más relevante que el de la penicilina, se mantienen dentro del arsenal terapéutico aun en nuestros días. Una muestra de suelo venezolano -tomada por el microbiólogo de la Universidad de Yale Paul Burkholder- demostró contener una sustancia novedosa que inhibía el crecimiento tanto de bacterias grampositivas como gramnegativas, la cloromicetina o cloranfenicol. Esta sustancia resultaba útil también en el tratamiento de enfermedades producidas por *Rickettsias* dando lugar a la aparición de los antibióticos de «amplio espectro». Sin embargo la toxicidad del cloranfenicol se reconoció asimismo muy precozmente y limitó enormemente su uso y difusión. Al mismo tiempo que Burkholder identificaba el cloranfenicol, Benjamín Duggar estudiaba un microorganismo productor de una sustancia antibiótica de coloración dorada que llamó aureomicina y hoy conocemos como clortetraciclina. La droga -un nuevo antibiótico de «amplio espectro»- aparecida en 1948 demostró tener un espectro de acción similar y significativamente menor toxicidad que el cloranfenicol. El análisis del suelo también fue el origen del descubrimiento de la eritromicina a partir del *Streptomyces eritreus* proveniente de Filipinas, y de la vancomicina a partir del *Streptococcus orientalis* existente en la India e Indonesia. La investigación en diferentes laboratorios alrededor del mundo dio sus frutos en los años subsiguientes con la introducción de la mayor parte de los antibióticos conocidos (Tabla 1).

Tabla 1. Cronología del descubrimiento e introducción en la terapéutica de los principales antimicrobianos

Año	Evento
1929	Descubrimiento de la penicilina
1932	Descubrimiento del prontosil. Identificación de las sulfonamidas
1939	Descubrimiento de la gramicidina
1942	Introducción de la penicilina
1943	Descubrimiento de la estreptomicina (aminoglucósidos)
1943	Descubrimiento de la bacitracina
1945	Descubrimiento de las cefalosporinas
1947	Descubrimiento del cloranfenicol
1948	Descubrimiento de la clortetraciclina
1952	Descubrimiento de la eritromicina
1956	Descubrimiento de la vancomicina
1957	Descubrimiento de la rifampicina
1959	Introducción de los nitromimidazoles
1960	Síntesis e introducción de la meticilina
1961	Introducción de la ampicilina
1962	Introducción del ácido nalidixico
1963	Descubrimiento de la gentamicina
1964	Introducción de las cefalosporinas
1970	Introducción de la trimetoprima
1972	Introducción de la minociclina
1980	Introducción de la norfloxacina (fluoroquinolonas)
1993	Azitromicina y claritromicina
2000	Introducción del linezolid (oxazolidinonas)
2003	Introducción de la daptomicina (lipopéptidos)

Luego de muchos años de purificación y análisis, en 1964 el laboratorio de Howard Florey en Oxford logró aislar el compuesto antibiótico activo a partir de unas muestras de desagüe cercano a las costas de Cerdeña que el italiano Giuseppe Brotsu había comenzado a estudiar en 1945. Estas muestras contenían *Cephalosporium acremonium.* Comenzaba así la era de las cefalosporinas con la introducción de la cefalotina y la cefaloridina a las que siguieron pocos años después las primeras cefalosporinas activas por vía oral, entre ellas la cefalexina.

ANTIBIÓTICOS DE SÍNTESIS

En paralelo con el descubrimiento de antibióticos naturales, la carrera de los antibióticos obtenidos por síntesis química continuó a través del camino iniciado por las sulfonamidas y sus derivados. Poco tiempo después de la introducción de la penicilina en la terapéutica se comenzó a trabajar sobre la idea de lograr productos semisintéticos con nuevas propiedades a partir de la modificación química de la cadena lateral de la penicilina G original. La posibilidad de aislar el núcleo químico 6-aminopenicilánico (6-APA) permitió, mediante la incorporación de distintas cadenas laterales, iniciar el largo camino de las penicilinas semisintéticas que comenzaron la meticilina en 1960 y la ampicilina en 1961 (Fig. 6).[10]

Un desarrollo similar tuvieron las cefalosporinas a partir del núcleo químico 7-ACA.

El siguiente tipo de antibiótico sintético que llegó al mercado fue la trimetoprima, en 1970. Su combinación con el sulfametoxazol o con otras sulfonamidas significó un avance terapéutico indudable porque su mecanismo de acción involucraba la inhibición secuencial de una vía metabólica vital para las bacterias y su estructura química le permitía penetrar en la profundidad de los tejidos para el tratamiento eficaz de infecciones profundas.

Posteriormente se desarrollaron las fluoroquinolonas a partir del ácido nalidíxico, otro agente sintético. Las fluoroquinolonas resultaron una familia de drogas muy difundida debido a sus cualidades farmacocinéticas, su acción bactericida sobre un gran número de agentes patógenos y su baja toxicidad. Múltiples derivados de

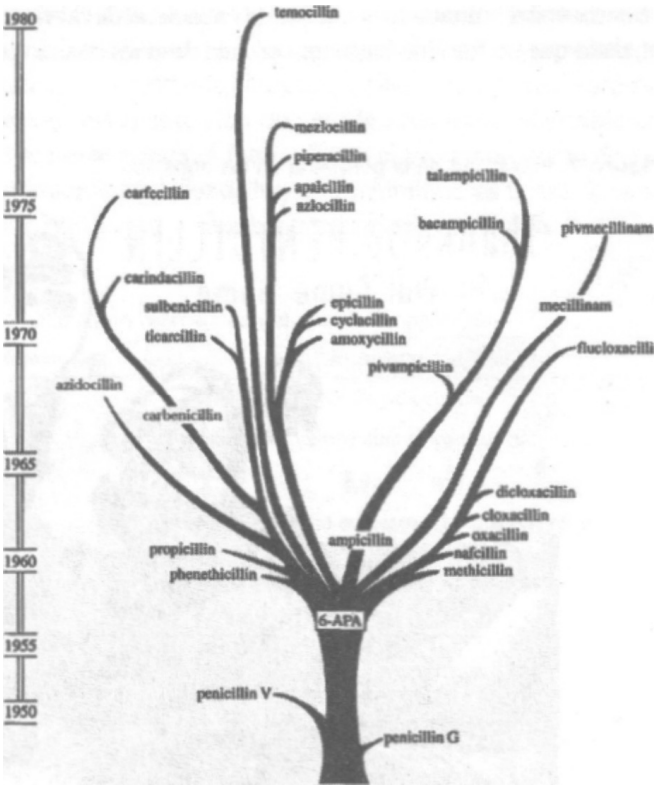


Figura 6. Desarrollo de las penicilinas semisintéticas (adaptado de Rollinson G.N.).[20]

las fluoroquinolonas aparecieron desde entonces y aún siguen llegando a ser comercializados con mínimas diferencias respecto de sus antecesores.[21] La exploración de nuevos compuestos continuó a un ritmo mucho más lento en los años subsiguientes. En los últimos 30 años sólo han aparecido dos nuevas familias de drogas. Muchos de los nuevos agentes naturales descubiertos luego de los primeros años de gran intensidad eran en realidad derivados de familias ya conocidas, y la síntesis química muchas veces produce también sustancias de características similares a las ya existentes.

La Food and Drug Administration (FDA), el ente regulador de los medicamentos en los Estados Unidos de Norteamérica, aprobó un promedio de 2.9 nuevas drogas antibacterianas anuales durante los años 60, 2.2 drogas por año en los 90 y 1.6 drogas por año a partir del año 2000.[22]

FUEGO

COCOANUT GROVE

En la década de 1940 el renovado interés por los antibióticos liderado por los microbiólogos del suelo estadounidense también tuvo eco del otro lado del Atlántico, donde el patólogo Howard Florey y el bioquímico Ernst Chain continuaron los trabajos de Fleming en relación con la penicilina.[23]

En su laboratorio de la Universidad de Oxford lograron extraer la sustancia, mantenerla estable y descubrir cómo producirla en cantidad suficiente como para poder evaluarla en animales, y aun en algunos seres humanos con infecciones devastadoras. Los resultados de estas experiencias fueron sencillamente espectaculares y entusiasmaron a los científicos, que comenzaron a utilizarla en cuentagotas de acuerdo con la medida de sus posibilidades pero soñando con la posibilidad de una producción en masa del producto para que pudiera estar disponible para quien lo necesitara. Sin embargo, esta demanda requería la toma de decisiones políticas. Frente al silencio de las autoridades británicas, la respuesta llegaría finalmente desde los Estados Unidos. El 28 de noviembre de 1942 el club nocturno Cocoanut Grove ubicado en el South End de la ciudad de Boston se encontraba colmado en su capacidad cercana a mil personas. Entre los asistentes al club de mayor predicamento en esos días estaban soldados que disfrutaban de algunos días de licencia en medio de la Segunda Guerra Mundial. De repente un fósforo encendido accidentalmente desencadenó la tragedia. En pocos minutos todo el local se encontraba ardiendo y la mayoría de los asistentes llegó a tiempo a escapar por la única puerta giratoria de la entrada de Piedmont Street. Con más de 450 muertos, el incendio de Cocoanut Grove se convertía así en una de las principales tragedias de la historia norteamericana. Gran parte de las víctimas rescatadas del incendio fueron trasladadas a los dos hospitales más importantes de la ciudad. Y allí tuvo lugar otro hecho singular en ese episodio. Más de dos tercios de las víctimas que sobrevivieron las primeras 24 horas luego del siniestro tuvieron una evolución favorable, estableciendo una tasa de éxito nunca antes alcanzada en casos de incendios. Esto se debió a la combinación de varios factores: el uso de sulfadiazina que permitió controlar infecciones precoces producidas por estreptococos, el uso masivo por primera vez de plasma humano como expansor plasmático que permitió la reposición de líquidos tan importante en los pacientes quemados, y la disponibilidad de una nueva droga cuya producción se intensificó en los laboratorios de la compañía Merck en Nueva Jersey y que por decisión gubernamental fue enviada con escolta policial hasta el Massachussets General Hospital de Boston, permitiendo el tratamiento de las severas infecciones cutáneas por *Staphylococcus aureus* que sufrían las víctimas del incendio: el sueño de la disponibilidad de la penicilina comenzaba a hacerse realidad. Posteriormente al incendio de Cocoanut Grove, el Gobierno de los Estados Unidos y algunas compañías farmacéuticas tomaron la decisión de cooperar con Florey y sus colegas para la producción de penicilina en grandes cantidades. En 1944 la penicilina estuvo disponible para el público general y su aparición fue acompañada por una publicidad arrolladora (Fig. 7).

Figura 7. Publicidad de la penicilina en los años 40.

Se la presentaba como la «bala mágica» de Ehrlich o directamente como un verdadero milagro. Se trataba de una droga nueva, que actuaba contra gérmenes hasta ese momento invulnerables, presentaba una toxicidad prácticamente irrelevante en relación con la de las sulfas y su uso no se encontraba limitado más que por la capacidad de fabricarla, dado que no fue sino hasta una década después cuando se requirió una prescripción médica para su comercialización. En medio de la destrucción de la guerra, la gente, ávida de una esperanza, confiaba en la penicilina para lograr la curación de prácticamente cualquier enfermedad. El descubrimiento científico comenzaba a desandar su destino de mito. Sin embargo, los antibióticos, al establecer la lucha contra organismos vivientes con capacidad de adaptación al medio, son herramientas cuyo uso determina su propia destrucción. El uso -apropiado o no- de los antibióticos determina la aparición o la selección de gérmenes resistentes. Ya el propio Fleming había alzado una voz de precaución, conocedor de que las dosis insuficientes o los tratamientos interrumpidos de la penicilina favorecían el desarrollo de variantes de gérmenes sobre los que la penicilina no podía actuar. Fleming creía que el fenómeno de la autoprescripción de los antibióticos iría en detrimento de su eficacia. Ya en una entrevista para el *New York Times* del 26 de junio de 1945 dijo que «...la mayor posibilidad de daño con la automedicación es el uso de dosis tan pequeñas que, en lugar de eliminar la infección, eduquen a los microbios a resistir a la penicilina. A su vez estos gérmenes pueden ser transmitidos a otros individuos y por estos a otros hasta encontrar un huésped que desarrolle una septicemia o una neumonía que la penicilina no podrá tratar». Hacia finales de la década de 1940 más de la mitad de los aislamientos hospitalarios de *Staphylococcus* eran resistentes.

RESISTENCIA

Desde muy temprano en la era antibiótica, la penicilina se utilizó indiscriminadamente en distintos productos de venta libre, desde pastillas para la garganta hasta ungüentos nasales y hasta cremas cosméticas; todo en respuesta al «clamor de la gente por su droga milagrosa». Este uso descontrolado favoreció el desarrollo de resistencia creciente contra la penicilina. Durante los años iniciales de utilización terapéutica de los antibióticos se creía que, al conocer los mecanismos por los cuales las bacterias generaban su resistencia, existiría siempre la posibilidad de sobrepasar este efecto mediante la síntesis de nuevos compuestos. Los laboratorios farmacéuticos rápidamente comenzaron a trabajar en el desarrollo de fármacos que no fueran susceptibles a las enzimas bacterianas que degradaban la penicilina. Y esta búsqueda dio por resultado la meticilina, que fue introducida en el mercado hacia 1960. La respuesta del lado de las bacterias no se hizo esperar: en 1961 se informaba desde Gran Bretaña la aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. Y en pocos años más estas cepas ya se habían diseminado en la mayor parte del mundo.»[24,25] La era de las penicilinas «resistentes a penicilinasa» había sido mucho más breve que lo que se esperaba (Tabla 2).[20] De hecho, los mecanismos bacterianos de resistencia no sólo se restringen a las mutaciones identificadas por los pioneros de la antibioticoterapia, sino en realidad son muy variados y su selección secundaria al uso de antimicrobianos puede producirse con extrema rapidez.[26] En poco tiempo se pudo reconocer que la resistencia bacteriana incluso frente a las nuevas drogas semisintéticas se manifiesta de una forma mucho más acelerada que los tiempos que demandan la síntesis, el desarrollo y la experimentación de nue-

Tabla 2. Descripción de la resistencia a las principales familias de antimicrobianos en relación con el año de su aparición.

Agente	Aprobación FDA	Informe de resistencia	Mecanismo
Penicilina G	1943	1940	Producción de penicilinasas
Estreptomicina	1947	1947	Mutación de proteína ribosomal S12
Tetraciclina	1952	1952	Eflujo
Penicilina + tetraciclina (Neisseria gonorrhoeae y enterobacterias)	1943 y 1952	1976 y 1980	β-lactamasas de amplio espectro y bombas de eflujo de tetraciclinas
Meticilina	1960	1961	MecA (Mutación de PBP2a)
Ácido nalidíxico	1964	1966	Mutación de topoisomerasa
Gentamicina	1967	1969	Enzimas inactivadoras
Cefotaxima	1981	1981 1983	β-lactamasa AmpC β-lactamasa de espectro ampliado (ESBL)
Linezolid	2000	1999	Mutación de ARN 23S

vos fármacos, en una competencia en la cual el desarrollo farmacéutico siempre está condenado de antemano.

AGUA

USO APROPIADO Y USO INAPROPIADO DE LOS ANTIBIÓTICOS

La difusión del mito de los antibióticos, en su eficacia y su seguridad, ha contribuido decisivamente a la sobreutilización que hoy existe, tanto en el ámbito hospitalario como en el ambulatorio.

La migración progresiva del uso de estos fármacos a partir de las infecciones graves que atestiguaron sus primeros «milagros» hacia infecciones más banales en busca de las mismas respuestas no tuvo en cuenta la propiedad de autolimitación de muchas de estas -en particular las infecciones del tracto respiratorio superior- ni, aun más, que en la realidad la mayoría ni siquiera responde a etiologías bacterianas. En 2002 el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos calculó que, si se restringiera la prescripción de antibióticos para las infecciones del tracto respiratorio superior, el consumo de antibióticos se reduciría en alrededor de un 40%.[27]

Surge entonces el concepto del uso apropiado de los antibióticos, que implica no solamente la selección del mejor fármaco disponible según su espectro de acción sino su empleo solamente cuando sea necesario, en la dosis adecuada y por el tiempo correcto. En contraposición, se entiende el uso inapropiado de antibióticos como la situación en que demasiados pacientes reciben innecesariamente antibióticos -habitualmente de amplio espectro- por la vía equivocada, en la dosis incorrecta o por demasiado tiempo.[28] Por esto, la emergencia de resistencia es producto de la cantidad de antibióticos que se consumen en un área geográfica determinada en el mismo tiempo, y también de cuántas personas se encuentran involucradas en este consumo, dado que mientras mayor sea el número de los destinatarios, mayor será el riesgo de la utilización de concentraciones subterapéuticas. Basándose en los parámetros antedichos, Stuart Levy propuso el concepto de «densidad de selección» de bacterias resistentes, que brinda un marco referencial para el análisis del problema.[29]

El uso apropiado de los antibióticos constituye un área de suma importancia en la terapéutica. Si bien este uso puede inducir el desarrollo de resistencia, su mantenimiento no solo es inevitable sino que es algo realmente deseable en el presente y para el futuro. Es en el uso inapropiado de los antimicrobianos donde hay que centralizar las tareas de control, restricción y -fundamentalmente- educación, tanto del personal de la salud como del público usuario en general. En este sentido muchos expertos han expresado su llamado de atención y existen diversas iniciativas tanto gubernamentales como independientes que promueven la educación para el uso apropiado de los antibióticos.[30-32] Una de las más relevantes es la Alianza para el Uso Prudente de los Antibióticos (APUA) formada como una organización sin fines de lucro en 1981 y que cuenta con capítulos locales en la mayoría de los países del mundo (http://www. tufts.edu/med/apua/).

OTROS USOS DE LOS ANTIBIÓTICOS

La explosión del uso de los antibióticos en la segunda mitad del siglo pasado tuvo repercusiones ajenas a la terapéutica humana muy diversas, y algunas de ellas hasta verdaderamente insólitas.

La mayoría de los animales criados para consumo reciben o están expuestos a algún tipo de antibiótico durante el curso de su vida. En muchos casos los animales reciben antibióticos, como en el caso de los seres humanos, para el tratamiento de infecciones. Pero también estos fármacos son utilizados para el tratamiento de los ambientes de desarrollo de distintos animales y, durante mucho tiempo, también se emplearon como factor de promoción del crecimiento. Estos usos generan principalmente la difusión de concentraciones subterapéuticas, hecho que, en asociación con los tiempos prolongados de exposición, determina un incremento consecuente del riesgo de inducir el desarrollo de cepas resistentes. Los antibióticos administrados en animales tienen asimismo más posibilidades de recircular en el medio ambiente a través de las deposiciones, en conjunto con los gérmenes resistentes que hubieran sobrevivido al antibiótico en el tracto intestinal. La selección de resistencia constituye un problema reconocido globalmente por el uso de concentraciones subóptimas de antibióticos con fines no terapéuticos, y en varios países su uso para algunos de estos fines se encuentra hoy prohibido.[33] Algunos de los antibióticos empleados con fines agropecuarios inicialmente no terapéuticos eran idénticos a los utilizados en seres humanos (p. ej., clortetraciclina para el crecimiento de aves de corral), y en estos casos la relación entre la administración del antibiótico y el desarrollo de cepas bacterianas resistentes es más fácil de evidenciar, aunque en los últimos años se ha podido confirmar vinculación entre antibióticos de uso animal exclusivo y el impacto ecológico sobre las bacterias que afectan a los seres humanos a partir de la similitud estructural con antibióticos de uso médico (p. ej., el riesgo de desarrollo de enterococo resistente a vancomicina por el uso de su análogo estructural avoparcina, la similitud entre la virginiamicina y el Synercid, o entre la tilosina y los antibióticos macrólidos).[34,35] La mayor parte de los antibióticos empleados en uso animal se focaliza en corderos, caballos, perros y gatos. Aunque también otro tipo de animales se expone en alguna medida a los antimicrobianos: por ejemplo, el uso de oxitetraciclina se encuentra muy difundido en la apicultura, así como otros antibióticos se emplean en la cría de algunos tipos de peces. La oxitetraciclina, la sulfamerazina (deri-

vado sulfonamídico) y la ormetoprima (análogo de trimetoprima) se utilizan en el tratamiento de la infección por *Aeromonas y Edwansiella* en el bagre, y en otras enfermedades infecciosas del salmón y la trucha.

Y la lista de usos parece ampliarse indefinidamente.

PENSAMIENTOS FINALES

Vivimos en la era terapéutica de los antibióticos. Ellos han modificado no solamente nuestra respuesta ante las infecciones sino muchos otros aspectos de la vida cotidiana. En su historia han intervenido muchas de las mentes más brillantes de la ciencia a lo largo de la historia. Y constituyen un instrumento insustituible que ha prolongado nuestra expectativa de vida pero a la vez ha condicionado su eficacia al uso que les sepamos dar.

Probablemente no hay en la terapéutica agentes como los antimicrobianos que, de una manera tan específica, logren muchas veces la cura de enfermedades. Su eficacia y seguridad han sustentado el mito sobre su uso en áreas tan diferentes como el tratamiento médico de pacientes en estado crítico y la automedicación para procesos patológicos banales. En gran medida el uso inapropiado de los antibióticos se basa en la creencia y persistencia de algunas de las «falacias» más difundidas a través de las décadas (Tabla 3). La sucesión de estas falsas presunciones en conjunto con la falta de diagnóstico etiológico de muchas infecciones y la desidia con la que se han utilizado estas drogas generan muchas veces «espirales empíricas» que solo conducen a la ineficiencia del gasto y a la resistencia de los gérmenes, alejándonos cada vez más del objetivo inicial.[36] Sabemos que representan un tesoro pero nunca los hemos tratado de esa forma. Los antibióticos son agentes altamente eficaces, que generan un profundo impacto sobre el individuo que los recibe de manera apropiada. Pero son también drogas que generan un impacto sobre la comunidad, al modificar las floras bacterianas naturales.

En este sentido, cada situación de uso de antibióticos condiciona la próxima. Además, el uso de un antibiótico puede generar o seleccionar resistencia no solamente frente a sí mismo sino también para otros agentes estructuralmente relacionados. Por eso el tratamiento antibiótico tiene un impacto individual -como cualquier otro agente terapéutico- pero también tiene un impacto «ecológico» que no debe soslayarse. En muchos casos estos impactos pueden tener sentidos diferentes y hasta opuestos .[37-39] Limitar el uso de los antibióticos a aquellas situaciones en las que son estrictamente necesarios es la llave para comenzar a transitar por un camino diferente que permita vislumbrar para el mayor descubrimiento terapéutico del siglo XX un futuro sustentable.

Tabla 3. Principales "falacias" sobre el uso de los antimicrobianos (modificado de Kim J.H., Gallis H.A.).[36]

Espectros más amplios determinan mejores resultados
La falta de respuesta inmediata implica falla en la cobertura antibiótica
Frente a la duda, cambiar el esquema antibiótico
A más enfermedades, mayor número de antibióticos
Las infecciones requieren tratamiento inmediato
Respuesta al tratamiento implica confirmación del diagnóstico
Los antibióticos no son tóxicos
A enfermedades más graves, antibióticos más amplios
A enfermedades más graves, antibióticos más nuevos

REFERENCIAS

1. Huxtable RJ. A brief history of pharmacology, therapeutics and scientific thought. Proc West Pharmacol Soc. 1999;42:181-223.
2. Hunting P. The worshipful Society of Apothecaries of London. Postgrad Med J. 2004;80(939):41-4.
3. Bordenave G. Louis Pasteur (1822-1895). Microbes Infect. 2003;5(6):553-60.
4. Hayward JA. Historia de la medicina. Buenos Aires: Fondo de Cultura Económica; 1989.
5. Dubós R Pasteur. Barcelona: Salvat; 1985.
6. Schwartz M. The life and works of Louis Pasteur. J Appl Microbiol. 2001;91(4):597-601.
7. Zetterstrtim R. Robert Koch (1843-1910): investigations and discoveries in relation to tuberculosis. Acta Paediatr. 2006;95(5):514-6.
8. Waksman SA. Definition of antibiotics. Antibiotic Med Clin Ther. 1956;2(2):82-6.
9. Levy S. The antibiotic paradox. How miracle drugs are destroying the miracle. New York: Premium; 1992.
10. Schwartz RS. Paul Ehrlich's magic bullets. N Engl J Med. 2004;350(1 1):1079-80.
11. Gensini GF, Conti AA, Lippi D. The contributions of Paul Ehrlich to infectious disease. J Infect. 2007;54(3):221-4.
12. Bentley R. The development of penicillin: genesis of a famous antibiotic. Perspect Biol Med. 2005;48(3):444-52.
13. Wennergren G, Lagercrantz H. "One sometimes finds what one is not looking for" (Sir Alexander Fleming): the most important medical discovery of the 20th century. Acta Paediatr. 2007;96(1):141-4.
14. Flemming A. The discovery of penicillin. Br Med Bull. 1944;2(1):4-5.
15. Fielding J. History of penicillin. Lancet. 1980;1(8158):43-4.
16. Sykes R. Penicillin: from discovery to product. Bull World Health Organ. 2001;79(8):778-9.
17. Edwards DI. History of antimicrobial chemotherapy. En: Edwards DI, editor. Antimicrobial drug action. London: Macmillan; 1980. p. 3-7.
18. Waksman SA. Selman Abraham Waksman, Ph.D. 22 July 1888-16 August 1973. Who "discovered" streptomycin? Ann Intern Med. 1973;79(5):646.
19. Zetterstrtim R. Selman A. Waksman (1888-1973) Nobel Prize in 1952 for the discovery of streptomycin, the first antibiotic effective against tuberculosis. Acta Paediatr. 2007;96(2):317-9.
20. Rolinson GN. Forty years of betalactam research. J Antimicrob Chemother. 1998;41(6):589-603.
21. Norris S, Mandell GL. The quinolones: history and overview. En:

Andriole VT, editor. The quinolones. San Diego: Academic Press; 1988. p.1-22.
22. Powers JH. Antimicrobial drug development-the past, the present, and the future. Clin Microbiol Infect. 2004; 10 Suppl 4:23-31.
23. Ligon BL. Sir Howard Walter Florey—the force behind the development of penicillin. Semin Pediatr Infect Dis. 2004;15(2):109-14.
24. Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. Br Med J. 1961;1(5219):124-5
25. Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, et al. The evolution of methicillin resistance in Staphylococcus aureus: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillinsusceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. Proc Nail Acad Sci U S A. 2001;98(17):9865-70.
26. Bush K. Antibacterial drug discovery in the 21st century. Clin Microbiol Infect. 2004;10 Suppl 4:10-7.
27. Emmer CJ. Rapid diagnostic testing for URIs in children: impact on physician decision making and costs. Infect Med. 2002;19:160.
28. Gould IM. Antibiotic policies and control of resistance. Curr Opin Infect Dis. 2002;15(4):395-400.
29. Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. Sci Am. 1998;278(3):46-53.
30. Cohen R. Approaches to reduce antibiotic resistance in the community. Pediatr Infect Dis J. 2006;25(10):977-80.
31. Niederman MS. Principles of appropriate antibiotic use. Int J Antimicrob Agents. 2005;26 Suppl 3:S170-5.
32. Doern GV. Optimizing the management of community-acquired respiratory tract infections in the age of antimicrobial resistance. Expert Rev Anti Infect Ther. 2006;4(5):821-35.
33. Phillips I. Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health. Int J Antimicrob Agents. 2007;30(2):101-7.
34. Smith DL, Dushoff J, Morris JG. Agricultural antibiotics and human health. PLoS Med. 2005;2(8):e232.
35. Smith DL, Johnson JA, Harris AD, et al. Assessing risks for a pre-emergent pathogen: virginiamycin use and the emergence of streptogramin resistance in *Enterococcus faecium.* Lancet Infect Dis. 2003;3(4):241-9.
36. Kim JH, Gallis HA. Observations on spiraling empiricism: its causes, allure, and perils, with particular reference to antibiotic therapy. Am J Med. 1989;87(2):201-6.
37. Lipsitch M, Samore MH. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. Emerg Infect Dis. 2002;8(4):34754. Errata en: Emerg Infect Dis 2002;8(5):540.
38. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. N Engl J Med. 2000;343(26):1925-32.
39. Nord CE. Studies on the ecological impact of antibiotics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1990;9(7):51

AAHI - Lavalleja 1214 (C1414DTZ)
Cdad. Aut. de Bs. As. - Argentina
Tel/Fax: (54-11)4771-2501 - L.Rot.
E-mail: aahi@aahi.org.ar

Opinión y debate
Evaluación sobre el conocimiento de la medicina transfusional y sus indicaciones entre médicos del Hospital Gobernador Centeno. General Pico, La Pampa, Argentina.

Dr. Marquesoni, Nicolás*

La transfusión sanguínea es un eslabón esencial en la cadena de la atención médica actual.

Como todos sabemos, utilizada con motivo y oportunidad puede mejorar estados generales de los pacientes e incluso salvar sus vidas.

Pero, ante los riesgos de reacciones agudas (hemólisis post transfusional, contaminación bacteriana, trali, etc.) o tardías (trasmisión de agentes infecciosos como: hepatitis C, VIH, hepatitis B, aloinmunizaciones, etc.), es imprescindible optimizar su uso y para ello darle rango de interconsulta; además de lograr que nuestros colegas conozcan sus indicaciones cuali y cuantitativas, todo ello, sumado a su escasez y elevado costo.

Estos riesgos pueden disminuirse (nunca anularse) mediante un elevado manejo en todas las etapas de la transfusión.

Esto implica:

a) un adecuado abastecimiento de componentes sanguíneos en cantidad y calidad por parte del Servicio de Medicina Transfusional.

b) un uso clínico eficiente, basado en guías que deben ser el pilar de acción que utilice el Comité de transfusiones intrahospitalario.

El objetivo de la presente evaluación es determinar el conocimiento de los profesionales médicos acerca de la práctica e indicaciones transfusionales utilizando las GUIAS NACIONALES PARA EL USO CLÍNICO APROPIADO DE LA SANGRE Y SUS COMPONENTES.

Realizamos encuestas voluntarias y anónimas, en forma de cuestionario compuesto de 10 preguntas (de opción múltiple y abierta) a médicos del establecimiento asistencial Gobernador Centeno que tiene un plantel de 111 profesionales.

Las preguntas estaban relacionadas al conocimiento de:

1) Riesgos y beneficios de las transfusiones.
2) Utilización de la solicitud de hemocomponentes mediante formularios escritos.
3) Indicaciones de leucodeplesión
4) Indicaciones de irradiación
5) Autotransfusión
6) Indicaciones de hemocomponentes

Sobre 105 encuestas entregadas se recibieron 80 respuestas.

Para la mayoría de los médicos que respondieron (62; 59.04%), el principal riesgo asociado a la transfusión es la trasmisión de enfermedades.

Las reacciones hemolíticas post transfusionales fueron la segunda causa de riesgo observada en las respuestas (35 médicos; 33.33% así lo indicaron).

Las reacciones febriles y anafilápticas fueron observadas como riesgos por cinco médicos, o sea, 4.76% del total de respuestas recibidas.

No se consideró en ninguna respuesta la contaminación bacteriana como causa grave secundaria a transfusión de componentes sanguíneos.

Con respecto a las indicaciones de los filtros de leucodeplesión, 75 médicos, o sea, el 71.42% de los que respondieron, no conocen su utilidad, mientras que 30 respuestas (28.57%) dijeron conocerlos; y solamente 12 (11.4%) de las respuestas enumeraron correctamente sus indicaciones.

El 80% de los médicos que respondieron dijeron no conocer por qué se indica irradiación de hemocomponentes, 21 dijeron tener algún tipo de conocimiento y solamente 11 (10.4%) detallaron correctamente sus indicaciones.

*Jefe del Banco de Sangre del establecimiento asistencial Gobernador Centeno (Gral. Pico, La Pampa). Jefe del Banco de Sangre del establecimiento asistencial Lucio Molas (Santa Rosa, La Pampa). Coordinador provincial de Hemoterapia, La Pampa.

En lo referente a la solicitud por escrito de hemocomponentes; 81 médicos (71.1%) la realizan siempre, 19 (18.09%) a veces y 5 nunca.

De las 80 respuestas obtenidas solamente 44 médicos (41.9%) conocen las bondades de los programas de autotransfusión.

Para poder tener una mejor referencia con respecto a las indicaciones transfusionales se sugirió que el profesional indique dos criterios que avalen la transfusión solicitada y el volumen, o las unidades que solicitan de cada hemocomponente, las respuestas fueron cotejadas con el Manual Técnico 15ta. Edición y con las Guías Nacionales para el uso apropiado de la sangre y sus componentes.

El 52.3% consignó, por ejemplo, el uso de sangre entera en hemorragias agudas.

El 60% respondió correctamente las indicaciones de glóbulos rojos desplamatizados, el 44% las de plasma fresco congelado, el 40% las de plaquetas y el 29% las de crioprecipitados.

Conclusiones

- Fue elevado el porcentaje de colegas que se preocupó por realizar las encuestas. Hemos avanzado mucho en el ámbito de nuestro hospital en la solicitud por escrito de hemocomponentes, lo cual, hasta épocas recientes, se realizaba de manera oral.
- Se observa un marcado desconocimiento en la real frecuencia de los efectos adversos transfusionales, observamos que al igual que para la mayoría de la población, para muchos colegas, las mayores preocupaciones están relacionadas a las infecciones virales y parasitarias transmisibles por transfusión.
- Seguimos contando con un elevado nivel de sobre indicaciones e indicaciones erróneas de transfusión de plasma, destacándose la indicación de plasma como elemento de expansión y como fuente de albúmina, con el consiguiente efecto adverso y la disminución de dicha fracción sanguínea para su envío a las plantas de producción de hemoderivados.
- También es de destacar la sobre indicación transfusional de plaquetas, tanto en pacientes con recuentos bajos sin clínica de sangrado como en pacientes plaquetopénicos. Esto se ve con mayor asiduidad en pacientes que deben ser sometidos a procedimientos invasivos o quirúrgicos.
- Es importante también el desconocimiento de las indicaciones de leucodeplesión e irradiación y de los protocolos de autotransfusión que oportunamente trabajamos con los distintos servicios.
- Por último, se evidencia la necesidad de conformar el Comité de transfusión intrahospitalario, como herramienta imprescindible, para crear una instancia de discusión y formación de los colegas médicos de nuestro hospital.

Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional
Programa Consulta al Experto
Células madre:
Potenciales usos clínicos

Coordinadora: Dra. León de González, Graciela
Profesor invitado: Cardier Montalvo, José MD, PhD*

Las células madres (CM) constituyen los elementos fundamentales a partir de los cuales pueden diferenciarse diversos tipos de células del organismo[1,2]. Procesos de vasculogénesis, miogénesis, neurogénesis y aun diferenciación a células de hígado han sido reportadas a partir de CM de medula ósea[3-8]. Basados en estas evidencias se han realizado diversos protocolos, tanto experimentales como clínicos, para el uso de las CM como posibles terapias regenerativas de órganos y tejidos.

Una de las características más importantes de las CM es su capacidad de autorenovación ilimitada. Mediante esta propiedad las CM pueden dar origen a "copias" de ellas mismas, al proliferar sin diferenciarse (se mantienen como células indiferenciadas). La capacidad de autorenovación y diferenciación de las CM esta directamente relacionada con la expresión de determinados genes durante cada estadio de diferenciación de las CM[9,10]. Así, se conoce que los genes Sox-2, Oct-4, Klf-4 *y c-myc* juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las CM[9,10]. Basado en este conocimiento, recientemente se ha reportado que células somáticas pueden adquirir la capacidad pluripotencial de las CME (CM pluripotentes inducidas, CMPi), posterior a la transfección de estos genes[10,13], por lo cual no solo pueden autorenovarse, sino también dar origen a cualquier tipo de células e incluso experimentalmente se ha demostrado a un animal completo[14].

Actualmente, el transplante de médula ósea constituye la única terapia basada en CM que ha demostrado su efectividad clínica en humanos. Trabajos experimentales recientes han demostrado la posibilidad de producir células madre hematopoyéticas a partir de CMPi, sugiriendo el potencial uso de estas células en clínica[15,16]. Con relación a otras posibles aplicaciones de CM en clínica, muy pocos son los reportes que se pueden encontrar en revistas médicas de impacto internacional, sobre la efectividad clínica del uso de CM en humanos[17]. Así, protocolos clínicos realizados para evaluar la posibilidad de regenerar tejido cardiaco en humanos, mediante CM, no han demostrado la eficacia de estos procedimientos en pacientes con infarto al miocardio o con insuficiencias cardíacas severas[18,19]. Es importante resaltar que más de 5000 pacientes han sido evaluados a nivel mundial, mediante este tipo de tratamiento sin demostrase mejorías significativas en estos pacientes. A pesar de esos resultados, se continúan desarrollando nuevas formas de protocolos para el uso de CM en regeneración cardíaca. En dichos protocolos se usan como fuentes de CM: células progenitoras de tipo hematopoyético (CMH), endotelial, y mesenquimales (CMM) provenientes de médula ósea. A pesar de que en la mayor parte de estos protocolos el implante es de CM autólogas, la posibilidad de diferenciación a otros tipos celulares constituye un potencial efecto secundario para la regeneración tisular. Recientemente, se ha reportado en un modelo experimental de regeneración cardíaca la formación hueso en el sitio en el cual fueron implantadas CMM[20]. Actualmente en nuestro laboratorio, junto a un grupo de cardiólogos, se esta llevando a cabo un protocolo de regeneración cardíaca en pacientes con infarto al miocardio. En

*Unidad de Terapia Celular - Laboratorio de Patología Celular y Molecular, Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 21827, Caracas 1020-A, Venezuela. jcardier@ivic.ve.
Publicado por el Grupo Cooperativo Iberoamericano de Medicina Transfusional (GCIAMT), año 2010. www.gciamt.org

dicho protocolo se evalúa el efecto de la movilización de CM a sangre periférica, posterior a la administración del factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), en pacientes con una extensa área de daño miocárdico y que no han sido sometidos a procesos de revascularización. Es importanteresaltar que mediante este procedimiento no solo se movilizan CMH sino también progenitores de células endoteliales (CPE), los cuales podrían favorecer procesos de angiogénesis en áreas de infarto.

Basado en la gran "plasticidad" de las CM, se ha planteado el uso de CM con el fin de regenerar el tejido pancreático en pacientes con diabetes tipo I. Debido a lo complicado que resulta el transplante de páncreas en estos pacientes y que el transplante de islotes requiere un gran numero de células vivas, el transplante de CM de islotes a pacientes diabéticos sustituiría la administración crónica de insulina en estos pacientes. Se ha reportado el aislamiento de CM precursoras de islotes pancreáticos[2]. En modelos experimentales de diabetes tipo I se ha evidenciado una significativa mejoría de la función de las células o (producción de insulina) y de reducción de los niveles de glicemia, luego de transplantar CM o precursoras de islotes pancreáticos en estos animales[21]. A nivel clínico, se ha reportado que el transplante autólogo de CMH en pacientes con diabetes tipo-1 de corta evolución (previa inducción de inmunosupresión), indujo en un pequeño número de estos pacientes la independencia de la administración de insulina y mejoría en los niveles de glicemia[22]. Es de hacer notar el alto riesgo que involucró este protocolo por los riesgos asociados a la administración de drogas inmunosupresoras administradas. En nuestro laboratorio en un modelo experimental de diabetes (inducida por la destrucción de las células o luego de la administración de streptozotocina) hemos observado que la movilización de CM indujo, en alguno de estos animales, una mejoría temporal de los niveles de glicemia (datos no publicados). En conjunto, estas evidencias clínicas y experimentales indican que terapias celulares basadas en el uso de CM podrían tener un efecto benéfico en la diabetes.

El uso de CM también podría ser considerado en pacientes con falla aguda de un órgano vital, como por ejemplo en pacientes con insuficiencia aguda o fulminante del hígado (ocasionadas por toxinas, infecciones, drogas, etc.), y que por incompatibilidad con posibles donantes o por falta de donantes, la única forma de recuperar la función de este órgano y por tanto salvar la vida de estos pacientes sea mediante la administración de CM capaces de diferenciarse a células hepáticas[23,24]. Consideraciones similares podrían aplicarse a la regeneración de músculo esquelético en el caso de distrofias musculares u otras condiciones asociadas a perdida de músculo[2,25]. Con relación a enfermedades del sistema nervioso, evidencias recientes en modelos animales sugieren el posible uso de CM en ciertas enfermedades degenerativas[26]. Trabajos recientes han reportado la caracterización de CM del sistema nervioso las cuales son capaces, *in vitro,* de dar origen a neuronas *y* células de la glia[26]. Como se mencionó anteriormente, es importante tener siempre en cuenta la posibilidad de diferenciación a otros tipos celulares, incluyendo de naturaleza tumoral, en el posible uso de CM para el tratamiento de enfermedades del SNC. Recientemente, se reportó el desarrollo tumoral a nivel del SNC, en un paciente al cual se le había implantado CM de origen fetal para el tratamiento de ataxia telangectasia[27]. Basados en reportes que demuestran la regeneración de cornea a partir de CM aisladas de la región limbal (CML)[28], en nuestro laboratorio hemos iniciado estudios en animales para el aislamiento de estas células y su crecimiento sobre membrana amniótica humana, para su posterior implante en modelos experimentales de regeneración corneal en conejos. Estos estudios permitirán evaluar la posibilidad del uso de esta tecnología en pacientes.

El desarrollo continuo de técnicas de cultivos celulares no solo ha permitido avanzar en el campo de las CM, sino también ha permitido el poder cultivar y expandir una gran variedad de tipo celulares, algunos de ellos con potencial para uso clínico. En nuestro laboratorio hemos desarrollado técnicas de cultivo no solo para expandir sino para diferenciar algunos tipos de CM provenientes de diferentes tejidos. Entre estos precursores podemos mencionar el aislamiento de CMH/CD34+ de sangre periférica de pacientes, posterior a inyección de GCSF. En cuanto a diferenciación, el uso de diferentes tipos de cultivo ha permitido obtener diferentes células sanguíneas a partir de CMH[29-32]. Aislamiento de CM mesenquimales (CMM), las cuales *in vitro* son capaces de autorenovarse *y* proliferar por largos períodos de tiempo, manteniendo su capacidad de diferenciarse hacia células que conforman tejidos mesodérmicos, tales como osteoblastos, fibroblastos, condroblastos, adipocitos, mioblastos esqueléticos, entre otros[33]. Con relación a la obtención de CMM, hemos aislado estas células de pulpa dental humana. Es interesante resaltar que estas células tienen características muy similares a las CMM obtenidas de médula ósea: capacidad de autorenovación, crecimiento indefinido y la formación de colonias parecidas a las de fibroblastos (CFU-F). En cultivo hemos podido demostrar la capacidad de diferenciación de las CM de pulpa dental en diferentes linajes celulares, tales como odontoblastos, fibroblastos, osteoblastos, adipocitos, condroblastos y células endoteliales (manuscrito en preparación). Células madre con similares características las hemos obtenido en el líquido amniótico (CMLA). Estas CMLA se ha demostrado que pueden dar origen a diversos tipos celulares tales como: adipocitos, hepatocitos, células musculares, óseas y neuronales[34]. En nuestro laboratorio iniciaremos tratamientos clínicos para regeneración ósea y de cartílago usando CMM y condrocitos autólogos.

Precursores de células endoteliales (PCE) han sido identificados y aislados, demostrándose que estas células tienen potencial angiogénico y vasculogénico. Experimentalmente se ha demostrado que la administración de estas PCE, obtenidas de medula ósea, po-

dría ser de utilidad en el tratamiento de vasculopatías periféricas como las que se observan en pacientes con diabetes de larga evolución[35].

Uno de los campos de mayor investigación en área de las CM, lo constituyen las células madre embrionarias (CME), las cuales son obtenidas de la masa celular interna (MCI; "inner cell mass") en la etapa de blástula. Estas células son pluripotentes, capaces de dar origen a todo tipo de células del organismo[36]. Basado en esta capacidad, se ha planteado la posibilidad de que las vías de diferenciación y desarrollo de las CME puedan ser controladas y/o reguladas *ex vivo* para el desarrollo de CM específicas de tejidos *y* órganos. En nuestro laboratorio hemos desarrollado técnicas de cultivo y diferenciación de CME (provenientes de ratón). Estas técnicas nos permitirán establecer modelos *in vitro y* en animales para evaluar regeneración de tejidos.

En conclusión, los resultados reportados hasta el momento, en revistas biomédicas de alto impacto internacional, muestran que la mayor parte de estudios de regeneración de órganos *y* tejidos, mediante el uso de células madre, provienen de modelos animales *y* protocolos clínicos experimentales. Estos estudios no han demostrado claramente la efectividad clínica del uso de CM en humanos hasta el momento. El desarrollo de tecnologías que permitan usar las CM con fines terapéuticos, constituye uno de los campos de investigación y desarrollo de mayor impacto en la medicina actual para el tratamiento sustitutivo (regeneración o reparación) de órganos y tejidos. La posibilidad de aislar, cultivar, expandir *y* diferenciar estas células en el laboratorio, *y* su uso en modelos experimentales *y* potencialmente en humanos, tendrán un enorme impacto no solo en la salud de estospacientes, sino también que podría disminuir los costos de tratamientos de estas enfermedades.

Agradecimientos

El trabajo experimental y clínico sobre CM es llevado a cabo por el grupo de investigación de Células Madre del Laboratorio de Patología Celular y Molecular del IVIC (Dr. José Cardier, Dr. Egidio Romano, MsSc. Olga Wittig y Lic. José Alonso) en conjunto con ASCARDIO, Hospitales: José María Vargas, Universitario de Caracas, Victorino Santaella, Miguel Perez Carreño;Unidad de Hematología-Oncología, Clínica la Floresta, Facultad de Odontología UCV. La construcción y equipamiento de la Unidad de Terapia Celular fue realizada a través de financiamientos otorgados por el FONACIT (Nº G-29564) y la gobernación del Estado Miranda.

Referencias

1. Weissman IL. Translating Stem and Progenitor Cell biology to the Clinic: Barriers and opportunities. Science 2000; 287:14421446
2. Klimanskaya I, Rosenthal N, Lanza R. Derive and conquer: Sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. Nature Rev Drug Discov. 2008; 7: 2008:131-142
3. Brazelton TR, et al. From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. Science 2000; 290:1775-11778.
4. Mezey E, et al. Turning Blood into Brain: Cell Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. Science 2000; 290:1779-1782.
5. McKinney-Freeman SL, et al. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002,99:1341-6.
6. Theise ND, et al. Liver from bone marrow in humans. Hepatology. 2000, 32:1.
7. Krause DS, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell. Cell. 2001, 105:369-77.
8. Masuya M, et al. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. Blood. 2003, 101:2215-8.
9. Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, et al. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. Cell 2009;136:364-377.
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from Mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126:663–676.
11. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature 2007; 448:313–317
12. Wernig M, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES cell-like state. Nature 2007; 448:318–324
13. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieut J, Sridharan_R, Clark AT, Plath K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 26:105-108
14. Zhao X, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, et al. IPS cells produce viable mice through tetraploid complementation Nature 2009; 461:86-90
15. Raya A, Rodríguez-Pizá I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. Nature. 2009 460:53-59.
16. Kaufman DS. Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. Blood 2009; 114:3513-3523
17. Sullivan MJ. Banking on cord blood stem cells. Nat Rev Cancer. 2008; 8:555-563.
18. Intracoronary Injection of Mononuclear Bone Marrow Cells in Acute Myocardial Infarction. Lunde K, et., al. New Eng J Med. 2006, 355: 1199-1209
19. Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschlager G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schomig A; REVIVAL-2 Investigators. Stem cell mobilization by granulocyte colonystimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. JAMA. 2006, 295:1003-1010.
20. Breitbach M, Bostani T, RoellW, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries J, et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. Blood. 2007; 110: 13621369.
21. Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, et al. Differentiation of In Vitro–Modified Human Peripheral Blood Monocytes Into Hepatocyte-like and Pancreatic Islet–like Cells. Gastroenterology. 2005, 128:17741786
22. Voltarelli J, Couri C, Stracieri A, Oliveira M, Moraes D, Pieroni F, et al. Autologous Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Newly Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus. JAMA. 2007; 297: 1568-1576
23. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L,. Liver from bone marrow in humans. Hepatology. 2000, 32:11-16.

24. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multiorgan, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell. 2001; 105:369-377.
25. McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA.. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99:1341-1346.
26. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrbm H, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. Science. 2000; 288:1660-1663.
27. Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. PLoS Med. 2009; 6:221-231.
28. Tsai RIF, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. N Engl J Med 2000; 343:86-93.
29. Cardier J, Foster D, Lok Si, Jacobsen S.E.W, Murphy MJ, Jr. Megakaryocytopoiesis in vitro: from the stem cells perspectives. Stem Cells, 1996; 14:163-172 .
30. Wittig O, Paez-Cortez J, Cardier JE. Liver sinusoidal endothelial cells promote B lymphopoiesis from primitive hematopoietic progenitors. Stem Cells and Development 2009. (en prensa).
31. Cardier J, Erickson-Miller CL, Murphy MJ, Jr. Differential effect of erythropoietin and GM-CSF on megakaryocytopoiesis from primitive bone marrow cells in serum-free conditions. Stem Cells, 1997; 15:286-290.
32. Cardier J, Barberá-Guillem E. Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. Hepatology 1997; 26:165175.
33. Serafíni M, Dylla SJ, Oki M, Heremans Y, Tolar J, Jiang Y, Buckley S, et al. Hematopoietic reconstitution by multipotent adult progenitor cells: precursors to longterm hematopoietic stem cells J Exp Med. 2007; 204:129-139
34. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et., al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nature Biotechnology. 2007, 25:100106
35. Capoccia BJ, Robson DL, Levac KD, Maxwell D, Hohm S, Neelamkavil MJ. Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. Blood 2009;113:5340-5351.
36. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. Science. 1998 282:1145-1147