

Implementación de un Sistema Automatizado de Inmunohematología en un Centro de Donación y Transfusión de España”

Dra. Luisa Barea

Centro de Transfusión de Toledo-
Guadalajara y
Servicio de Transfusión del Complejo
Hospitalario de Toledo (España)

Breve recuerdo histórico de la hemoterapia en la UE y en España

Principio de los años 80: Irrupción del SIDA

Real Decreto 1945/1985: Regula la Hemodonación y los Bancos de Sangre:

- Marca el carácter altruista y voluntario de la donación.
- Opta por una organización territorial de la transfusión: Las CCAA organizan, gestionan e inspeccionan los bancos de sangre
- Impulsa la aparición de los primeros centros regionales de transfusión.
- Permite la continuidad de la extracción y el procesamiento de la sangre en el hospital y para el hospital.

Datos demográficos de España

- Extensión: 504.782 Km²
- Habitantes: 46.704.314
 - 6.500.000 (11%) inmigrantes (Rumanía 21%, Ecuador 9.5%, Marruecos 9%, Colombia 6%, Perú 5%, China 4.5%, Bolivia 4.3%).
 - En 2000 la población inmigrante era de 900.000 personas.

Situación actual de la Hemoterapia en España

Habitantes:
46.157.822 (11%
immigrantes)

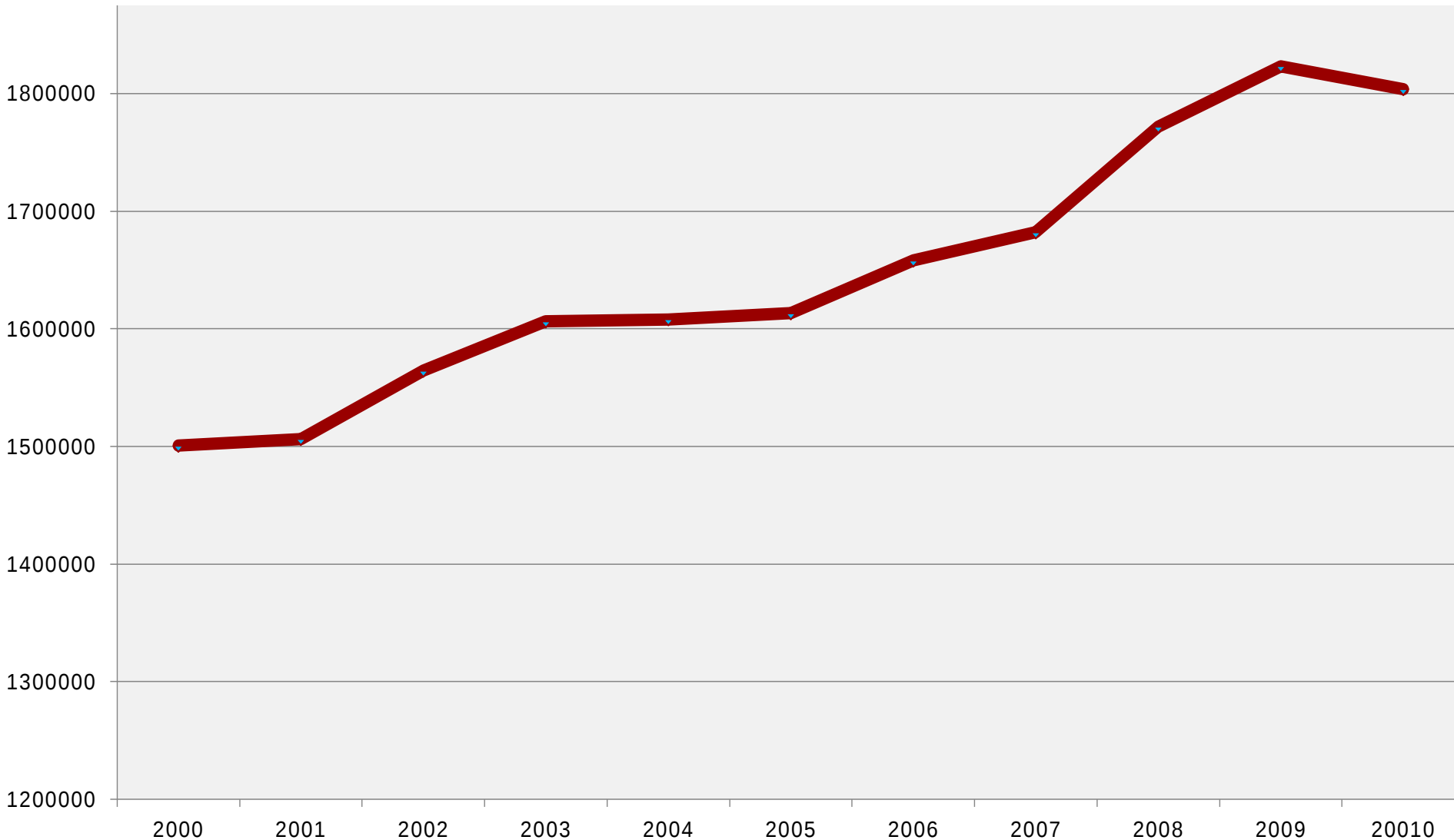
CCAA: 17. Tienen
transferidas las
competencias en
materia de
Sanidad

Ministerio de
Sanidad y
Consumo: Papel
armonizador de
las políticas
sanitarias.

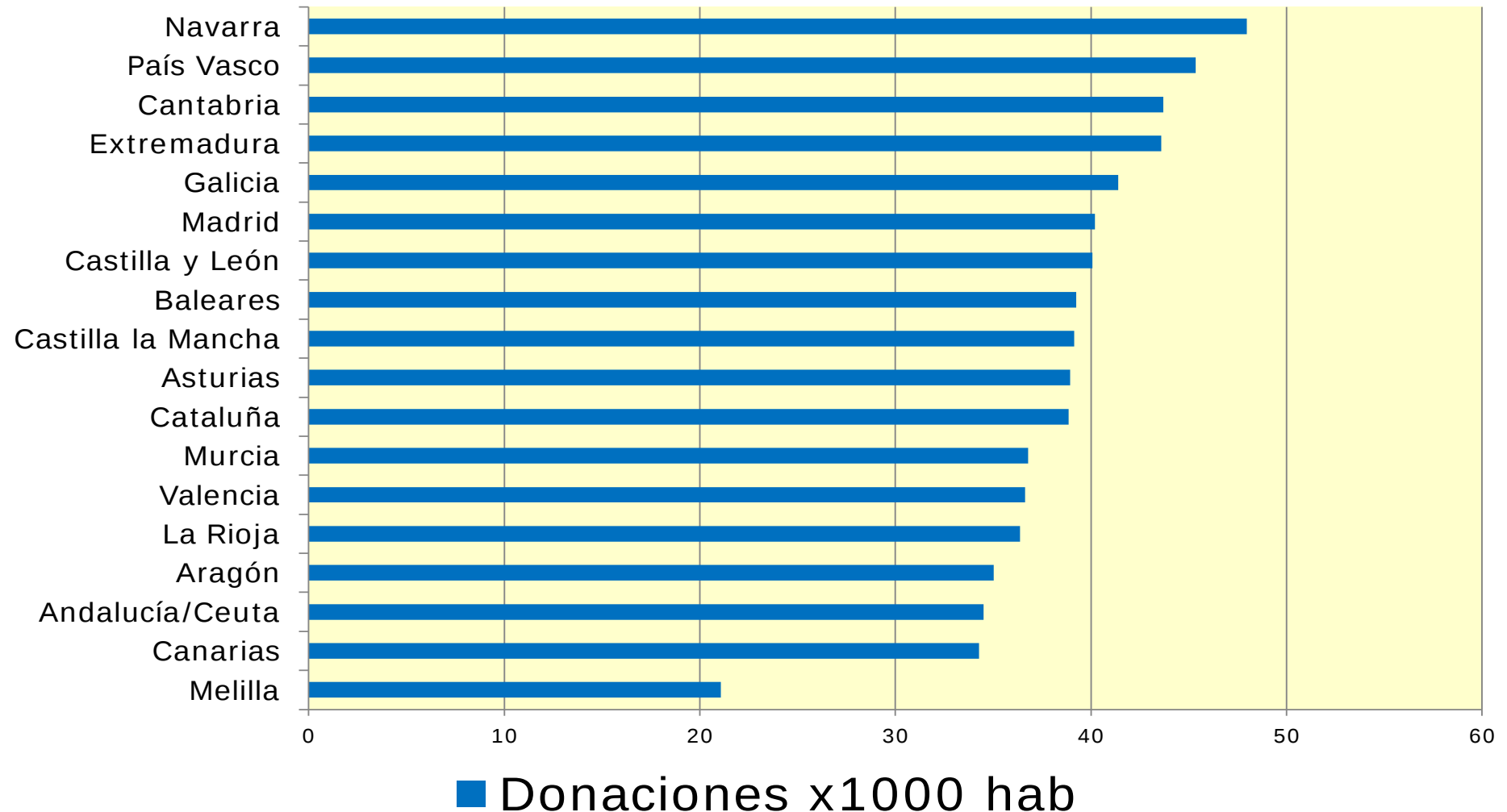
Centros de
Transfusión: 22

- Uno por comunidad
excepto Madrid que
con 2 y Castilla la
Mancha con 3

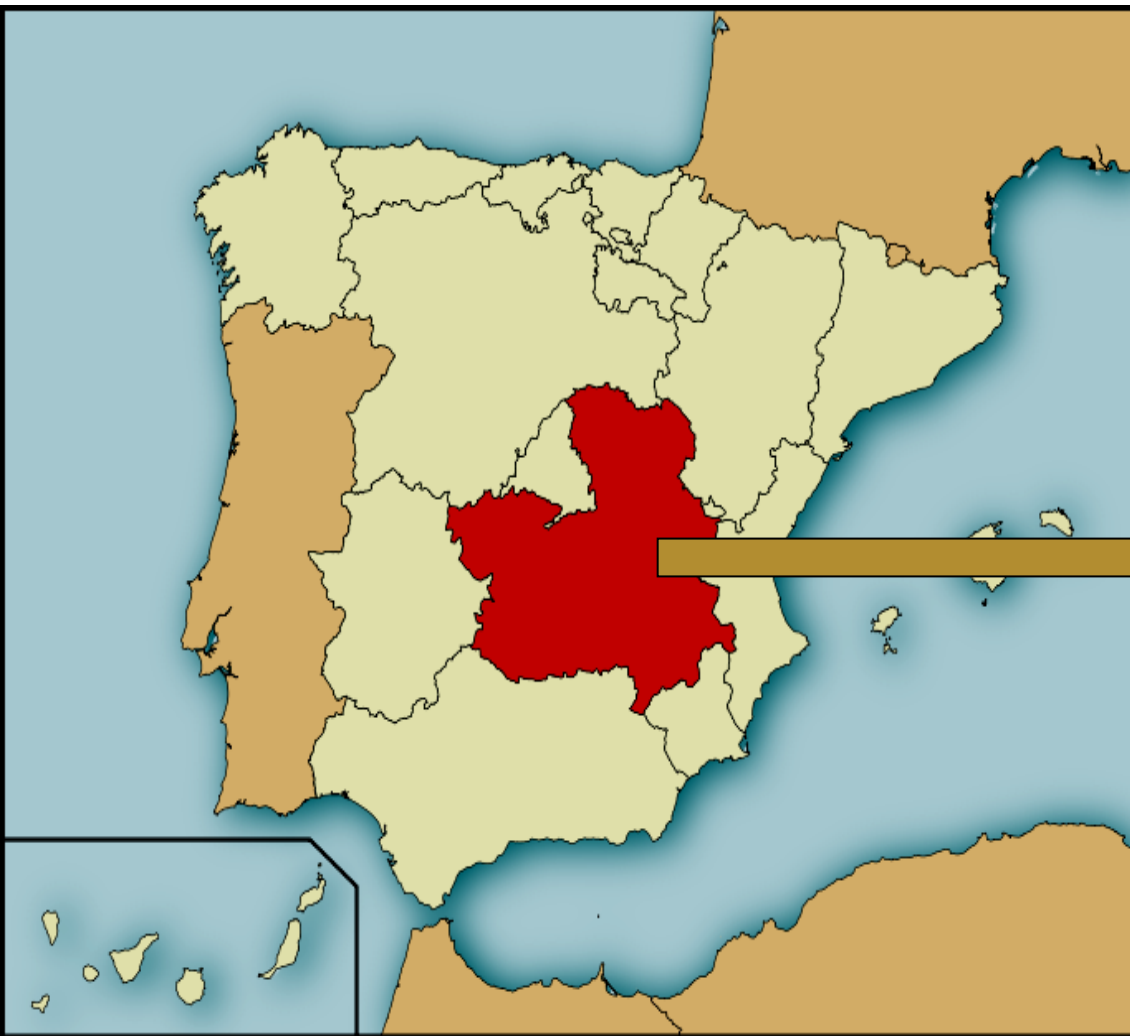
Evolución el número de donaciones de sangre en España



Índice de donación (donaciones /1000 habitantes/año)



Comunidad de Castilla la Mancha



Organización de la Hemoterapia en CLM: Los centros de Transfusión

- El 18 de febrero de 2005 se publica el Plan Regional de Hemoterapia de CLM.



Establecimientos intrahospitalarios.



Presupuestos individualizados.



La financiación y la gestión económica corre a cargo de la gerencia del hospital que los acoge.



Los responsables del CRT dirigen además el ST del hospital donde están ubicados.

Castilla la Mancha.

Características geográficas y demográficas

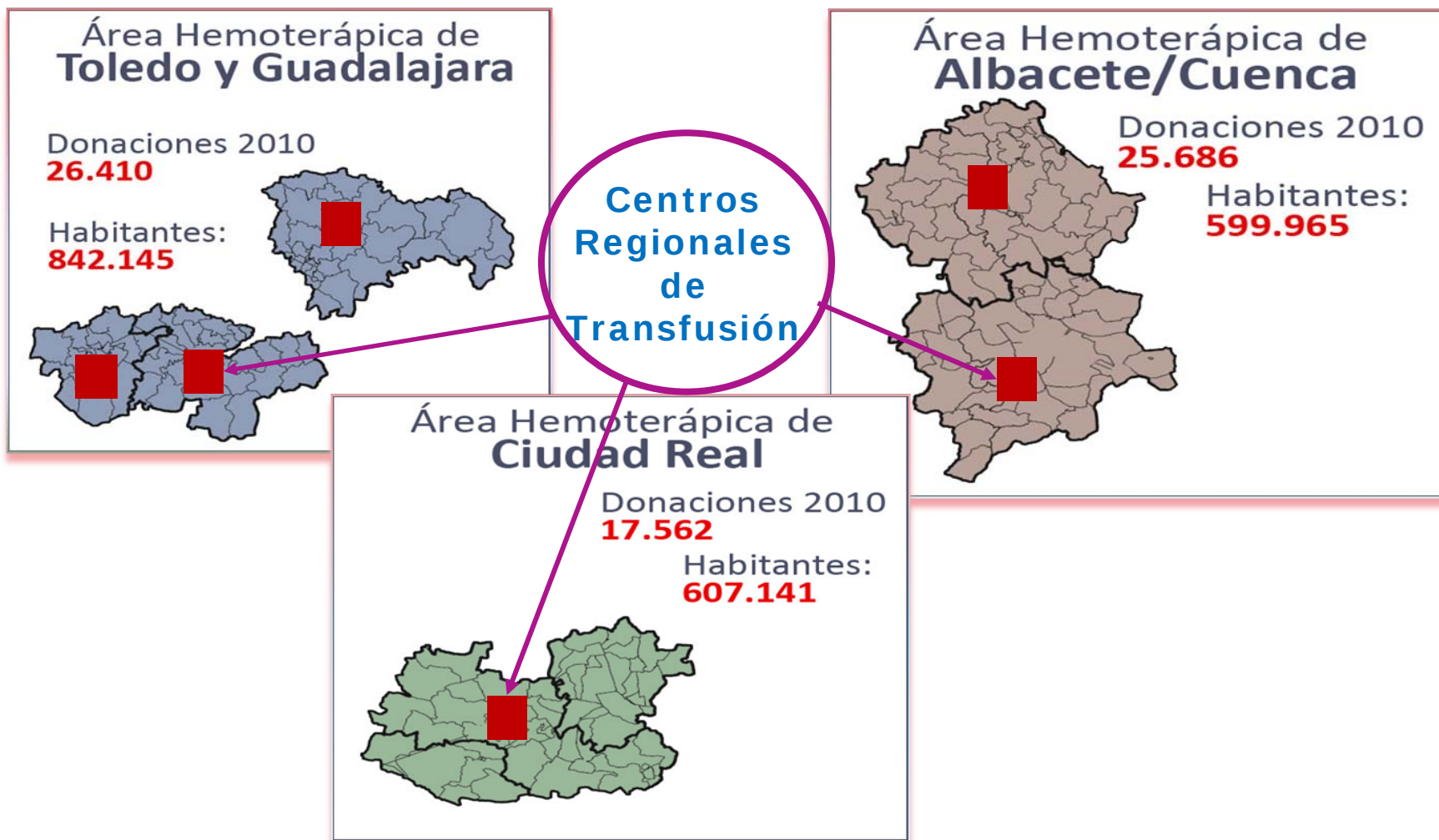
Extensión: 79.463 Km²

Población: 2.115.334

- 89% españoles
- 11% extranjeros (>50% de Centro y Suramérica):
 - Portadores de enfermedades infecciosas propias de otras zonas geográficas (Chagas, paludismo, HTLV-1/II).
 - Distinto fenotipo eritrocitario/plaquetario/leucocitario: Importancia clave desde el punto de vista inmunohematológico (donación, transfusión, seguimiento de gestantes, EHRN...)

Red de Hemoterapia, Hemodonación y Hemovigilancia de Castilla la Mancha.

Puntos fijos de donación

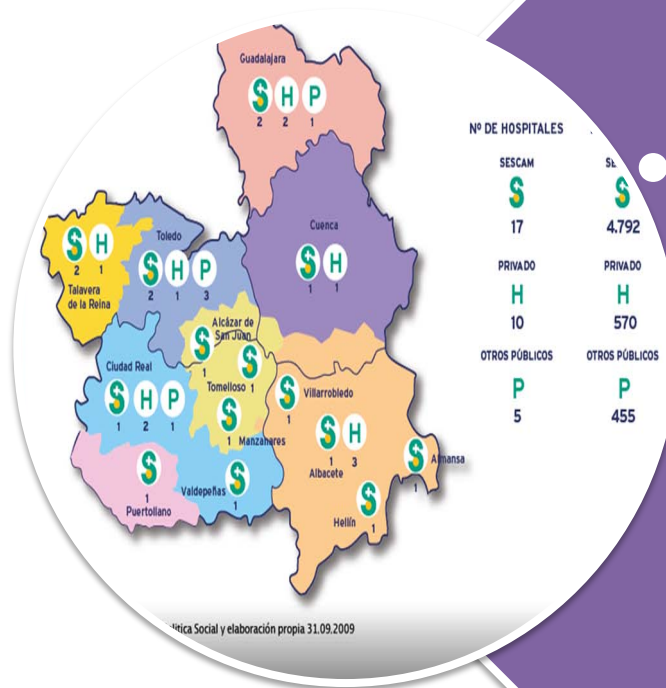


Puntos de donación en CLM

Características de los puntos de donación

- Funcionalmente dependientes del CRT, siguen los procedimientos elaborados por éste.
- Pero su personal está orgánicamente vinculado a los hospitales donde se ubican dichos puntos.

Servicios de Transfusión en CLM



- La configuración de la Red Hemoterápica de CLM termina con los Servicios de Transfusión de la Comunidad cuyo número asciende a 22.

El CT de Toledo-Guadalajara



Se ubica en las antiguas dependencias del Banco de Sangre del Hospital Virgen de la Salud. Integrado en el SESCAM, depende funcionalmente del Consejo de Dirección de la Red.



Organiza y lleva a cabo la donación de sangre en ambas provincias



Efectúa el procesado de la misma.



Distribuye hemocomponentes a los Servicios de Transfusión públicos y privados del área.



El CT de Toledo-Guadalajara

Las campañas de donación
se llevan a cabo:

En tres puntos fijos hospitalarios (hospital Virgen de la Salud de Toledo, hospital Nuestra Señora del Prado de Talavera y hospital Universitario de Guadalajara)

En las colectas externas en locales acondicionados para lo que se cuenta con cuatro equipos: colecta de plasma de Toledo, colecta de sangre de Toledo, colecta de sangre de Guadalajara y colecta de sangre de Talavera.

Nuestro Servicio de Transfusión

Según el RD 18/2002 del D.O.C.M.:
Cuando el ST se ubica en el mismo centro
hospitalario que el CT, éste asume las
funciones del Servicio de Transfusión.

La coordinadora del Centro de Transfusión
de Toledo dirige simultáneamente el
Servicio de Transfusión del Complejo
Hospitalario de Toledo que comprende el
HVS y los Depósitos de Sangre del HVV y
de la UCMA del HNP.

Estudio inmunohematológico automatizado del donante y de la donación (Galileo Neo)

- Tipaje ABO-Rh del tubo piloto en microplaca inerte:
 - Grupo ABO sérico y hemático.
 - Tipaje Rh(D) con dos anti-D (ImmuClone Anti-D rapid IgM y Novaclone AntiD-IgM+IgG, con alta capacidad de detectar D débiles).
- Prueba Du en microplaca mediante técnica Capture a las donaciones Rh (D) negativas en el tipaje del tubo y/o de la bolsa.
 - El donante que resulta positivo en la prueba Du es considerado como Rh(D) positivo y sus componentes sanguíneos se etiquetan como Rh positivos.
- Escrutinio de anticuerpos irregulares clínicamente significativos (activos a 37°C en antiglobulina) en microplaca con técnica Capture.
 - Donantes: dos célula(célula pool)/pocillo y un pocillo/donante.
- Comprobación del tipaje hemático ABO-Rh (D) a partir de una muestra del segmento del CH en microplaca inerte.

Estudio inmunohematológico automatizado básico de la gestante y del recién nacido (Galileo Neo)

- Gestante:
 - Grupo ABO-Rh-D
 - EAI con dos células en dos pocillos por gestante.
- Recién nacido (sangre de cordón) (hijos de madres Rh negativas o con grupo desconocido y niños con ictericia):
 - Grupo hemático ABO.
 - Coombs directo.

Pruebas inmuno hematológicas en donantes, gestantes, pacientes y neonatos

Estudio	Gestantes	Neonatos	Pacientes	Donantes (tubos piloto/bolsas)	TOTAL
Grupo ABO-Rh	5667	546		29194 / 29194	38481
EAI	5667			29194	34861
Grupo ABO-Rh		546			546
Coombs directo		546	3664		4210
Fenotipos (Ags)			5669		5669
Dus		5066			5066

Actividad transfusional del Complejo Hospitalario de Toledo

Número de solicitudes de transfusión recibidas	31.336
Número de pacientes involucrados en las solicitudes de transfusión	6279
Número de pacientes transfundidos	4097
Número de unidades enviadas a transfusión	17534
Número de unidades transfundidas	16621

Pruebas analíticas pretransfusionales

año 2012

Tipaje ABO-Rh	28936
Escrutinio de anticuerpos irregulares (EAI)	11399
Paneles de identificación (2/estudio de identificación)	902
Fenotipado de bolsas (antígenos)	1893
Fenotipado de pacientes (antígenos)	6060
Prueba cruzada salina	24253
Prueba cruzada en antiglobulina	2524

Actividad transfusional en el Complejo Hospitalario de Toledo en 2012

CONSUMO INTERNO HVS	C. Hematíes	Plasma	Plaquetas
	13191	784	1706
Servicios médicos	7304	295	1189
Servicios quirúrgicos	4214	243	251
Unidades de enfermos críticos	1673	246	206
CONSUMO HVV+HNP+UCMA	941	5	4
CONSUMO TOTAL DEL CHT	14131	789	1710

HVS: Hospital virgen de la Salud

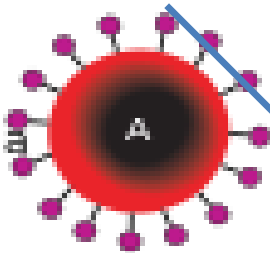
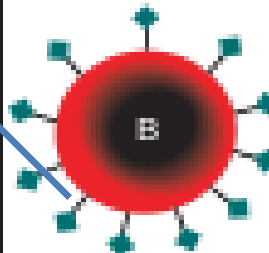
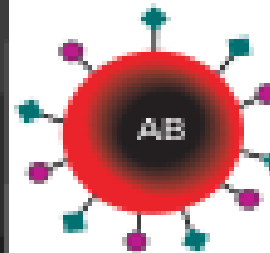
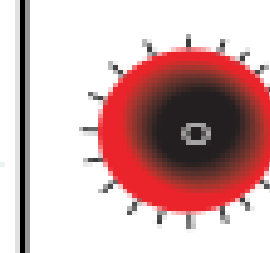
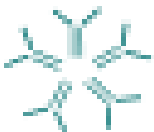
HVV: Hospital Virgen del Valle

HNP: Hospital Nacional de Parapléjicos

UCMA: Unidad de cirugía mayor ambulatoria del HVS, localizada en el HNP

Tipaje y Estudio de compatibilidad donante-receptor: El sistema ABO

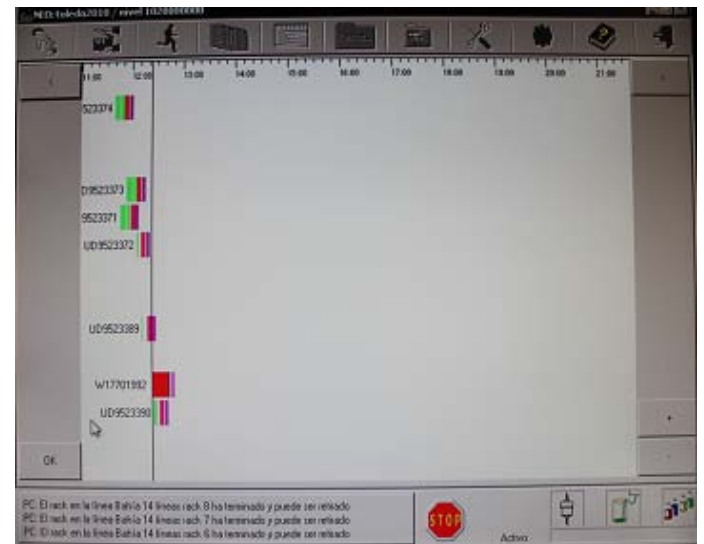
Técnicas serológicas (hemaglutinación en tubo, microcolumnas de gel)

	Grupo A	Grupo B	Grupo AB	Grupo O
Sangre roja célula				
Anticuerpos	 Anti-B	 Anti-A	Ningunos	 Anti-A y Anti-B
Antígenos	 A antígeno	 B antígeno	 A y B antígeno	No antígenos

Naturales

Clase IgM

Aportación del equipo Galileo Neo en el estudio IH del donante



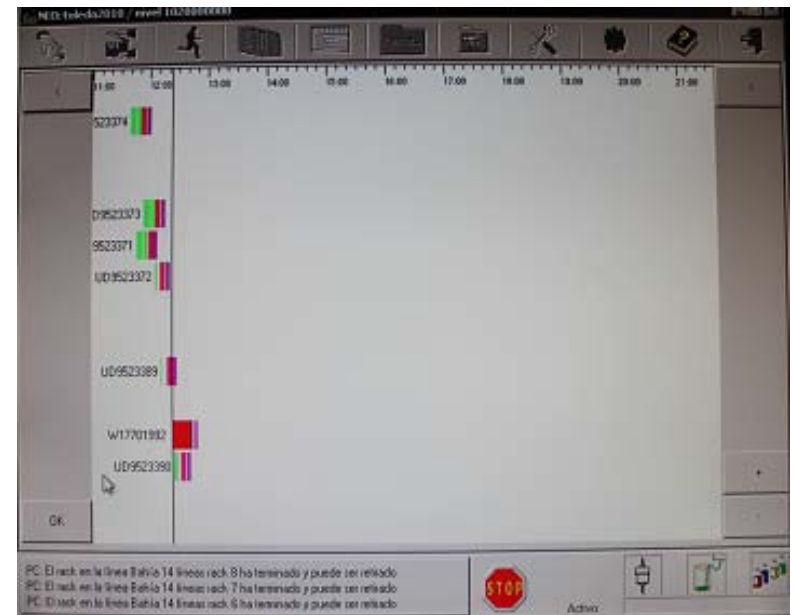
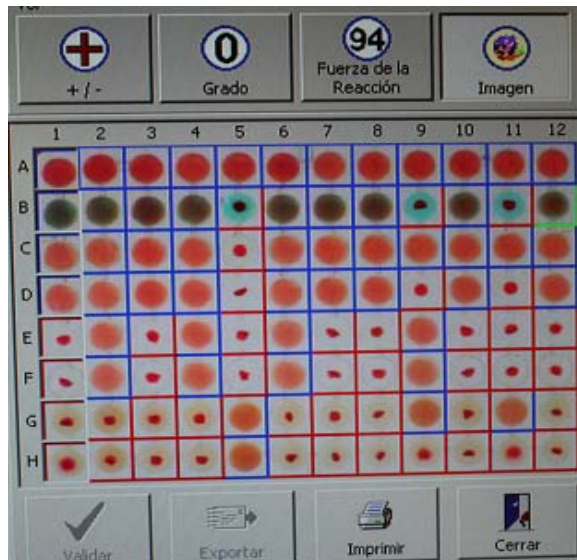
Aportación del equipo Galileo Neo en el estudio IH del donante



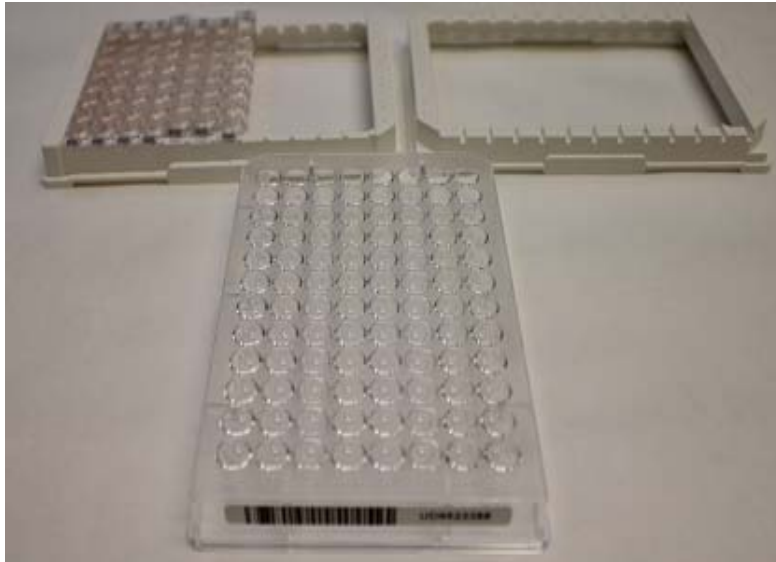
Test Details - Plate: CW26005654, Sample: 401301007, Assay: CAP R P

Test Overview Resultados **Read** Registro de Sucesos Plate Views

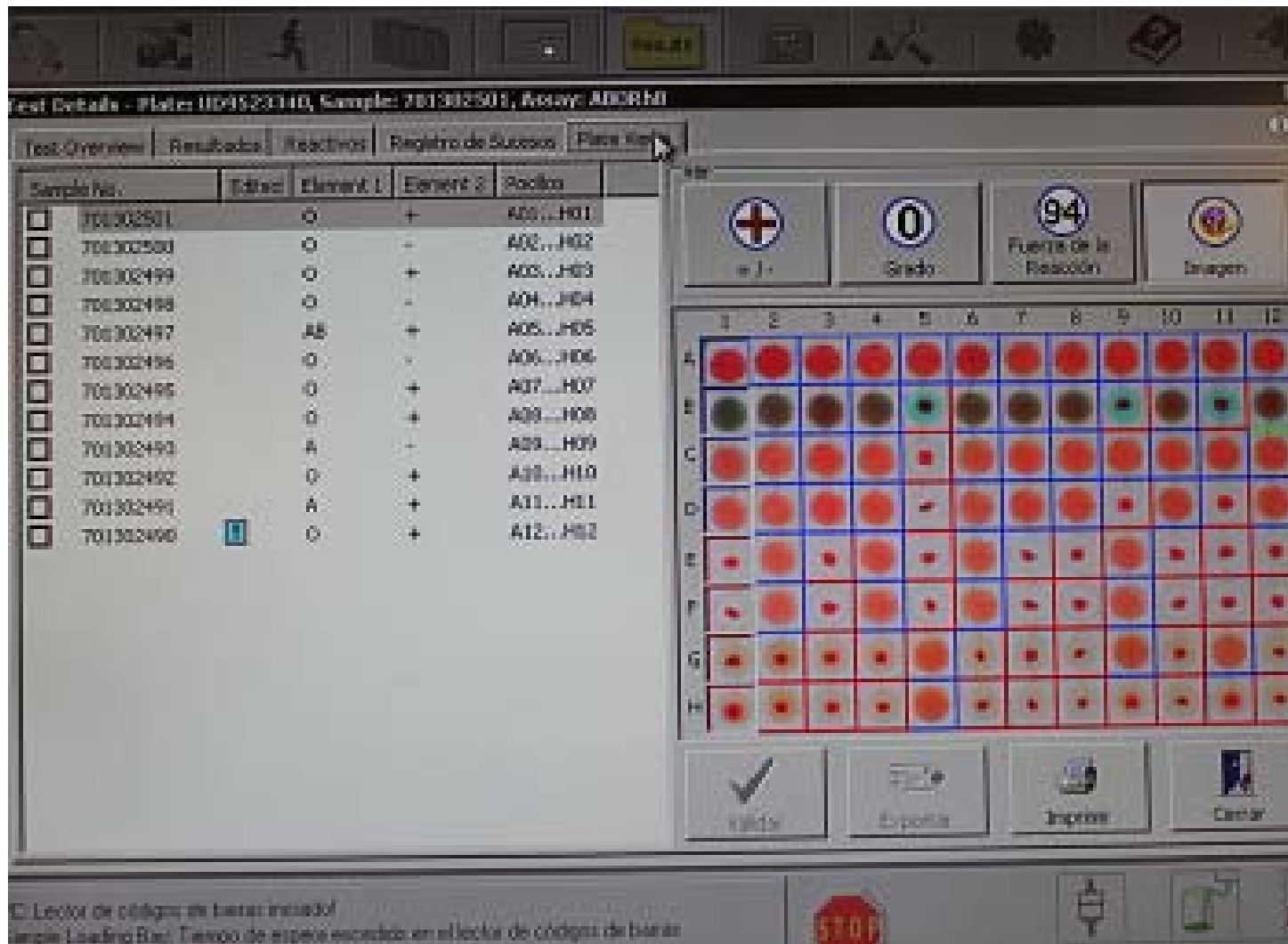
Poclos	Reactivo	Número de Lote	Calificado	Caducidad	List QC	QC Expires	Código de Barras
(All)	LIS5			29/10/1998			0000100001
(All)	Cap-R Ind Cells (10ml)	221053		10/10/2013			221283130530136408
A01...B01	Cap-R Pos Ctrl (10ml)	244250		19/04/2014			244100142500675696
C01...D01	Cap-R Neg Ctrl (10ml)	245120		19/04/2014			245109141200646390



Aportación del equipo Galileo Neo en el estudio IH del donante



Aportación del equipo Galileo Neo en el estudio IH del donante. Tipaje ABO-Rh



Estudio de compatibilidad: Otros grupos sanguíneos

La ISBT realiza una clasificación genética.

302 antígenos. 262 (67%) forman parte de 29 sistemas que están regulados por 34 genes.

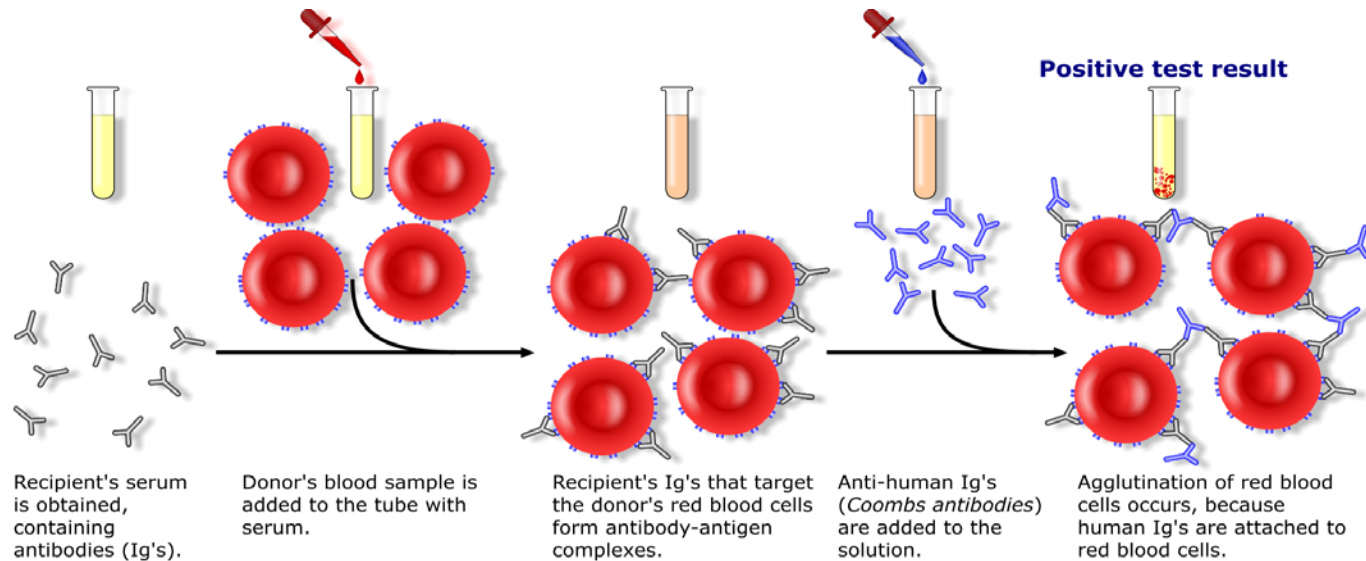
- 33/34 genes han sido clonados y secuenciados (excepto Gen P1)
 - Sistema Rh, Xg y Chido Rodgers: 2 genes.
 - Sistema MNS: 3 genes.
 - Resto de sistemas: 1 gen.
- Los genes de ABO, Lewis, H, I, Globósido (y sistema P) codifican glucosiltransferasas para la construcción de glucoproteínas y oligosacáridos.
- Los genes restantes codifican proteínas que se expresan en membrana celular.

Estudio de compatibilidad: Escrutinio de anticuerpos irregulares

Pretende detectar los aloanticuerpos clínicamente significativos desarrollados por el paciente en respuesta a estímulos antigénicos previos (transfusiones, embarazos)



Para ello se enfrenta el plasma/suero del paciente a varios hematíes comerciales de fenotipo conocido; la mezcla se incuba a 37°C para favorecer la unión Ag-Ac; se añade suero de Coombs (antiglobulina humana) para provocar la hemaglutinación en caso de que dicha unión se haya producido.



Significación clínica de los anticuerpos de grupo sanguíneo

Sistema	RTHA, RTHR	EHRN
ABO	RTHA severa	Muy raro
MNS	Raros Anti-M y anti-N activos a 37°C pueden producir RTHA y RTHR Anti-S,s, U y Mur pueden causar RTHA y RTHR	Anti-M: Raro Anti-S,s, U y Mur pueden causar EHRN severa
P	Raros P activos a 37°C pueden producir RTHA y RTHR	NO
Rh	RTHA y RTHR severas	EHRN severa
Lutheran	RTHR moderada	NO
Kell	RTHA y RTHR severas	EHRN severa
Lewis	Generalmente no son significativos	NO
Duffy	Anti-Fya, Fyb y Fy3: RTHA y RTHR Anti-Fy5: RTHR	Anti-Fya y Fyb: EHRN
Kidd	RTHR; Anti-Jka y Jk3 también causan RTHA	Raro
Colton	RTHA y RTHR	Anti-Coa: EHRN severa; anti-Co3: EHRN moderada
Dombrock	RTHA y RTHR	NO
Diego	Anti-Dia: 1 caso de RTHR; Anti-Dib: No evidencias; Anti-Wra: ha causado RTH	EHRN severa

Significación clínica de los anticuerpos de grupo sanguíneo

Sistema	RTHA, RTHR	EHRN
Xg	NO	NO
Sciama	NO	NO
LW	NO	NO
Ch/Rg	NO	NO
Cromer	NO	NO
Knops	NO	NO
Raph	NO	NO
Gill	NO	NO

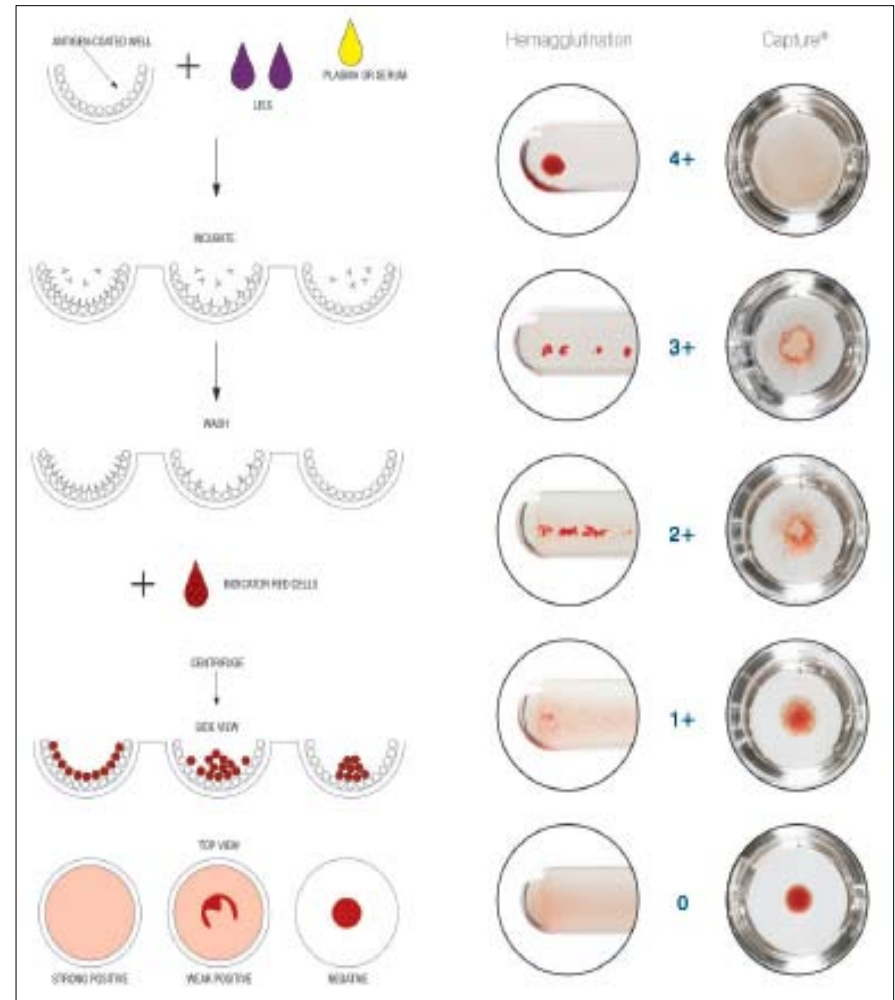
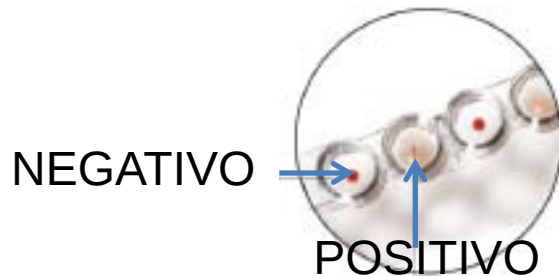
Importancia clínica de los aloanticuerpos en función de especificidad y subclase de IgG

Clinically important	Important only when reactive at 37°C	Sometimes significant	Clinically benign
ABO Rh Kell Duffy Kidd Ss Vel	Le ^a M, N P ₁ Lutheran A ₁	Yt ^a Ge Gy ^a Hy Sd ^a	Knops Chido/Rodgers Xg ^a Bg Cs ^a Yk ^a , McC ^a JMH

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Amino acids in hinge region	16	12	62	>16
	Flexible	Restricted	Greater flexibility	Intermediate IgG1 and IgG2
Enzymes	Intermediate	Resistant	Susceptible	Intermediate

Aportación del equipo Galileo Neo en el estudio IH del donante:

EAI en microplaca (técnica Capture)



Aportación del equipo Galileo Neo en el estudio IH del donante: EAI

Test Overview | Resultados | Reactions | Registro de Sucesos | Plate View

Sample No.	Edited	As Screen	Positor
☐ 244109142500675696		POS	A01...B01
☐ 245109141200646390		-	C01...D01
☐ 401301807		-	E01
☐ 401301808		-	F01
☐ 401301809		-	G01
☐ 401301810		-	H01
☐ 401301811		-	A02
☐ 401301812		-	B02
☐ 401301813		-	C02
☐ 401301814		-	D02
☐ 401301815		-	E02
☐ 401301816		-	F02
☐ 401301817		-	G02
☐ 401301818		-	H02
☐ 401301819		-	A03
☐ 601302018		-	B03
☐ 601302019		-	C03
☐ 601302020		-	D03
☐ 601302021		-	E03
☐ 601302022		-	F03
☐ 601302023		-	G03
☐ 601302024		-	H03

Win

+ / - Grad Fuerza de la Reacción Imagen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Validar Exportar Imprimir Cerrar

Estudio de compatibilidad: Prueba cruzada

En salino

Se realiza en tubo

Se utiliza como complemento del EAI cuando este resulta negativo

Se enfrenta el suero/plasma del receptor con los hematíes del donante u se ve si aglutinan o no tras incubar la mezcla a temperatura ambiente

Pretende identificar una incompatibilidad ABO entre el donante y el receptor (Aglutinación= incompatibilidad ABO)

En antiglobulina

Se realiza en tubo o en microcolumnas de gel.

Obligatorio siempre que el EAI sea positivo

Se enfrentan el suero/plasma del receptor con los hematíes del donante, se incuban a 37°C, se añade antiglobulina y se ve si aglutina o no.

Si aglutinación: Presencia de un aloanticuerpo en el receptor que reacciona con los hematíes del donante

Aloinmunización

- Prevalencia

Donantes sanos: 0.2-0.3%

Pacientes en general: 1-1.5%

Pacientes transfundidos: 8-76%

Requisitos de aloinmunización

Incompatibilidad

Capacidad inmunógena

Capacidad de respuesta

Papel HLA-II (DR)

Otros factores

- Score de antigenicidad

Score de
antigenicidad
(< a >)

- K, Cw, Lua, Jka, E, V, Lea, P1, c, M, Leb, e, Fya, C, s, S, N, Fyb, Jkb,

Aloinmunización. Severidad del aloanticuerpo

- Especificidad del anticuerpo.
- Concentración y avidéz.
- Amplitud térmica (carece de importancia si $<37^{\circ}\text{C}$).
- Clase y subclase de inmunoglobulina.
- Actividad del SMF.
- Densidad y movilidad del antígeno en la membrana.
- Volumen de sangre incompatible recibida.
- Presencia en sangre de sustancia soluble de grupo sanguíneo (efecto neutralizante)

Establecimiento de un panel de donantes ampliamente fenotipados.

- Doble interés desde el punto de vista transfusional:
 1. Disponer de unidades compatibles y antígeno-negativas para transfundir a los **pacientes aloinmunizados**.
 2. Disponer de unidades de fenotipo negativo para **prevenir la aloinmunización** en :
 - Mujeres en edad fértil.
 - Pacientes con **requerimientos transfusionales crónicos** y dentro de este grupo especialmente:
 - Pacientes con hemoglobinopatías estructurales.
 - Con síndrome mielodisplásico.
 - Con anemia aplásica.
 - Anemias crónicas congénitas y adquiridas

Papel del autómata Galileo Neo y la técnica Capture en el establecimiento de un panel de donantes fenotipados

- Fenotipo Rh-Kell:
 - C, c, E, K
- Placas inertes de 96 pocillos de fondo en u.
- Hemaglutinación directa.
- 16 muestras por placa
- Fenotipo Fya, Fyb, Jka, Jkb
- Placas Select.
- Técnica de Captura en antiglobulina.
- Potenciación de la reacción con LISS.
- 12 muestras por placa.

Prevención de la aloinmunización.

Selección de hematíes

- Premisa proteger el stock para poder abastecer al 100% de pacientes ya aloinmunizados.
- Evitar transfusiones innecesarias a pacientes no respondedores.
- Evitar problemas en pruebas pretransfusionales futuras.
- Evitar la aparición de reacciones hemolíticas retardadas

Prevención de la aloinmunización.

Selección de hematíes

- Fenotipo Rh-Kell y extensivo /genotipo eritrocitario pretransfusión del paciente.
- Selección de unidades ABO –Rh Kell compatibles.
- Si es posible respetar Kidd, Fy, Ss
- No tener en cuenta la selección de unidades de fenotipo compatible Fy(a-b-), U- a menos que el paciente esté aloinmunizado.

Selección de hematíes compatibles en el paciente aloinmunizado

Antigen-negative donor red cells	Anti-A, -B, -A,B Anti-M (at 37°C), -S, -s, -U All Rh antibodies (not -C ^m) Anti-Lu ^b , -Lu3 All Kell antibodies (not anti-Kp ^a , -Uf ^a , -K17) All Duffy and Kidd antibodies Anti-Di ^a , -Di ^b , -Wr ^b Anti-Sc1, -Co ^a , -H (in O _h), -Kx, -I (allo at 37°C), -P, -PP1Pk, -Vel, -AnWj
----------------------------------	---

Selección de hematíes compatibles en el paciente aloinmunizado

Serologically compatible by IAT at 37°C Anti-A₁, -N, -En^a, -low-frequency MNS antigens, -C^w, -P1, -Lu^a, -Kp^a, -U^a, -K17, -Le^a, -Le^b, -Le^{a+b}, -Wr^a, -Yt^b, -Xg^a, -Do^a, -Do^b, -Co^b, -HI, -In^a, Autoanti-I

Ideally antigen negative

Anti-Sc3, -Co3

When the antibodies are demonstrated by IAT at 37°C

Antigen-negative blood extremely rare. 'Least incompatible' may be required to be transfused, with extra caution where the physician deems transfusion necessary

Selección de hematíes compatibles en el paciente aloinmunizado

Serologically 'least incompatible'	Chido/Rodgers, Gerbich, Cromer, Knops, JMH, -Er ^a , -LKE, -Sd ^a Anti-LW ^a , -LW ^{ab}	D-cells, unless with anti-c in DCe/DCe patient
	Antibodies to other high-frequency Lu antigens Anti-Gy ^a , -Hy, -Jo ^a , -Yt ^a , -Lan, -At ^a , -Jr ^a	Antigen-negative cells for strong antibodies

Necesidad de un panel de donantes ampliamente fenotipados

- El establecimiento en una determinada sociedad de personas de diferente origen étnico puede repercutir
 - En la detección de aloanticuerpos eritrocitarios irregulares de especificidades poco frecuentes en pacientes subsidiarios de transfusión y en mujeres gestantes.
 - En la disponibilidad de concentrados de hematíes de fenotipo adecuado para cubrir los requerimientos transfusionales de estos pacientes.

Necesidad de un panel de donantes ampliamente fenotipados

- En estas circunstancias es importante tipificar a un número representativo de donantes inmigrantes.
- Con ello es posible:
 - Comparar los resultados con los obtenidos en la población autóctona, establecer las diferencias más importantes y prever sus consecuencias en el ámbito de la transfusión.
 - Disponer de un stock de hematíes de fenotipo compatible con el perfil antigénico de la población inmigrante que pueden ser usadas para prevenir la aloinmunización de mujeres en edad fértil, de pacientes con requerimientos transfusionales crónicos y/o para transfundir a los que ya estén aloinmunizados

Estudio inmunohematológico básico de la gestante automatizado en Galileo Neo

- Tipaje ABO-Rh en microplaca inerte:
 - Grupo ABO sérico y hemático.
 - Tipaje Rh(D).
 - IMPORTANTE: El reactivo anti-D no debe detectar la variante DVI. Si el resultado es dudoso se valora como Rh(D) negativo a todos los efectos (administración de gammaglobulina profiláctica).
- Escrutinio de anticuerpos irregulares clínicamente significativos (activos a 37°C en antiglobulina) en microplaca con técnica Capture.

Significación clínica del sistema HLA y los anticuerpos anti-HLA

Moléculas altamente polimórficas.

Se expresan sobre la superficie de múltiples células, entre ellas leucocitos y plaquetas (sólo moléculas HLA de clase I).

Realizan la presentación de antígenos a los linfocitos T.

Están implicados en:

- Rechazo de trasplantes.
- Reacciones transfusionales febriles.
- EICH transfusional.
- Desarrollo de refractariedad inmune a la transfusión de plaquetas.

Significación clínica del sistema HPA (human platelets antigens)

Existen 24 antígenos plaquetarios específicos definidos serológicamente y se conocen las bases moleculares de 22 de ellos.

Son glicoproteínas que se expresan sobre la membrana plaquetar.

Se relacionan con:

- Púrpura postransfusional
- Refratariedad inmune a la transfusión de plaquetas (raro)
- Trombopenia fetal-neonatal aloinmune



¿Por qué es necesario un registro de donantes HPA negativos

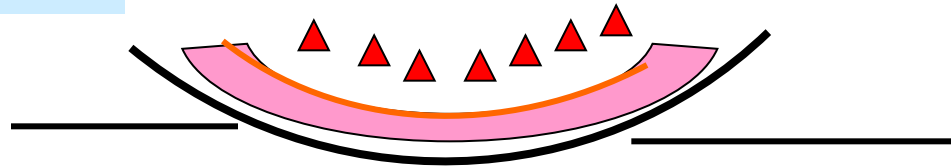
- Los aloanticuerpo contra los antígenos HPA están involucrados en la aparición de púrpura postransfusional, refractariedad a la transfusión de plaquetas (raras veces sólo. Más frecuentemente asociados a anti-HLA) y en la púrpura fetal/neonatal aloinmune (PFNAI)
- PFNAI afecta a 1 de 2000 gestaciones. Es la principal causa de trombocitopenia severa del recién nacido, con alto riesgo de sangrado en los primeros días de vida.
- Entre caucásicos, el anticuerpo materno más frecuentemente implicado es el anti-HPA-1a (80% de los casos), seguido por anti-HPA-5b y 5a (20%), todos de tipo IgG.
- El tratamiento ideal para los casos con trombopenia severa y/o sangrado es la transfusión de plaquetas negativas para el antígeno HPA implicado.

Técnica en fase sólida Capture P para la detección de anticuerpos antiplaquetarios. Fundamentos y pasos

1. Pipeteo del pool de plaquetas control y de los PRP de los donantes a estudiar
2. Centrifugación
3. Lavado
4. Pipeteo del LiSS

5. Pipeteo del control Capture P positivo y negativo
6. Pipeteo del antisuero (**Anti-HPA-1a**)
7. Incubación

8. Lavado
9. Pipeteo de las células indicadoras Capture P
10. Centrifugación
11. Lectura



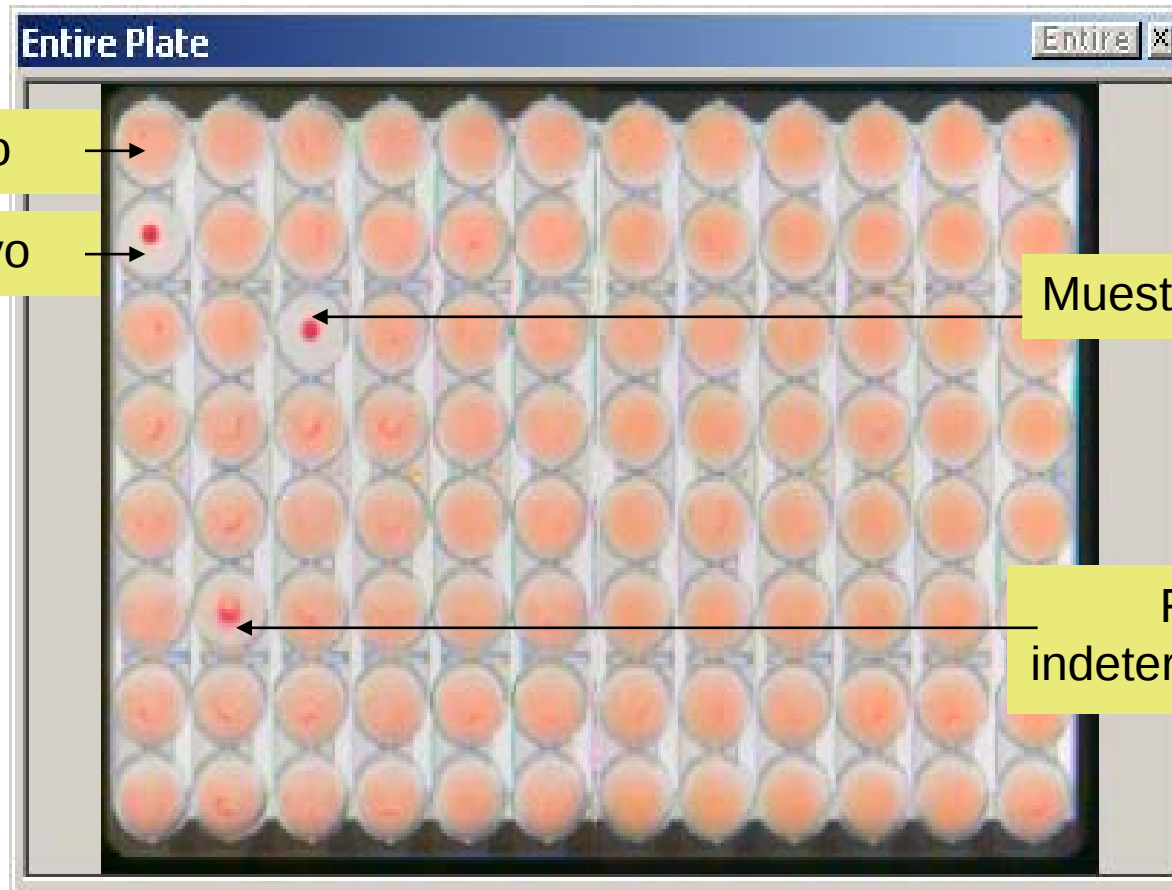
•Micropocillos recubiertos por un agente específico para la unión de plaquetas

•Monocapa de plaquetas del donante

•LISS + anti-HPA-1a comercial

•Células indicadoras

Papel del Sistema en fase sólida Capture P y del autómata Galileo Neo en la detección serológica del antígeno HPA-1a





Establecimiento de un panel de donantes HPA negativos: Cribado serológico del antígeno HPA-1a en el autómata Galileo

- **Período del estudio:** Junio y julio de 2009.
- **Método de cribado serológico empleado:** Sistema en fase sólida Capture P para la detección de anticuerpos antiplaquetas adaptado y automatizado en Galileo utilizando un antisuero comercial de origen humano anti-HPA-1a (Immucor).
- **Muestras analizadas:** 999 muestras de PRP de donantes repetidores de aféresis obtenidos por la sedimentación durante 8-12 horas, de un tubo de 5 ml de sangre entera anticoagulada con EDTA.
- **Muestras analizadas en cada tanda de trabajo:** 30-144 muestras.



Establecimiento de un panel de donantes HPA negativos: Tipificación molecular

- Número de muestras analizadas: 552 muestras.
 - 25 muestras que resultaron negativas para el antígeno HPA-1a en el cribado serológico realizado en el autómata Galileo.
 - 527 muestras adicionales de donantes de sangre repetidos
- Método de extracción del ADN: Extracción automática (MagNa Pure Compact, Roche), , Kit Magna Pure Compact Nucleic acid isolation kit I de Roche
- Almacenamiento de las muestras de ADN: a -20°C hasta el momento de realizar el genotipo

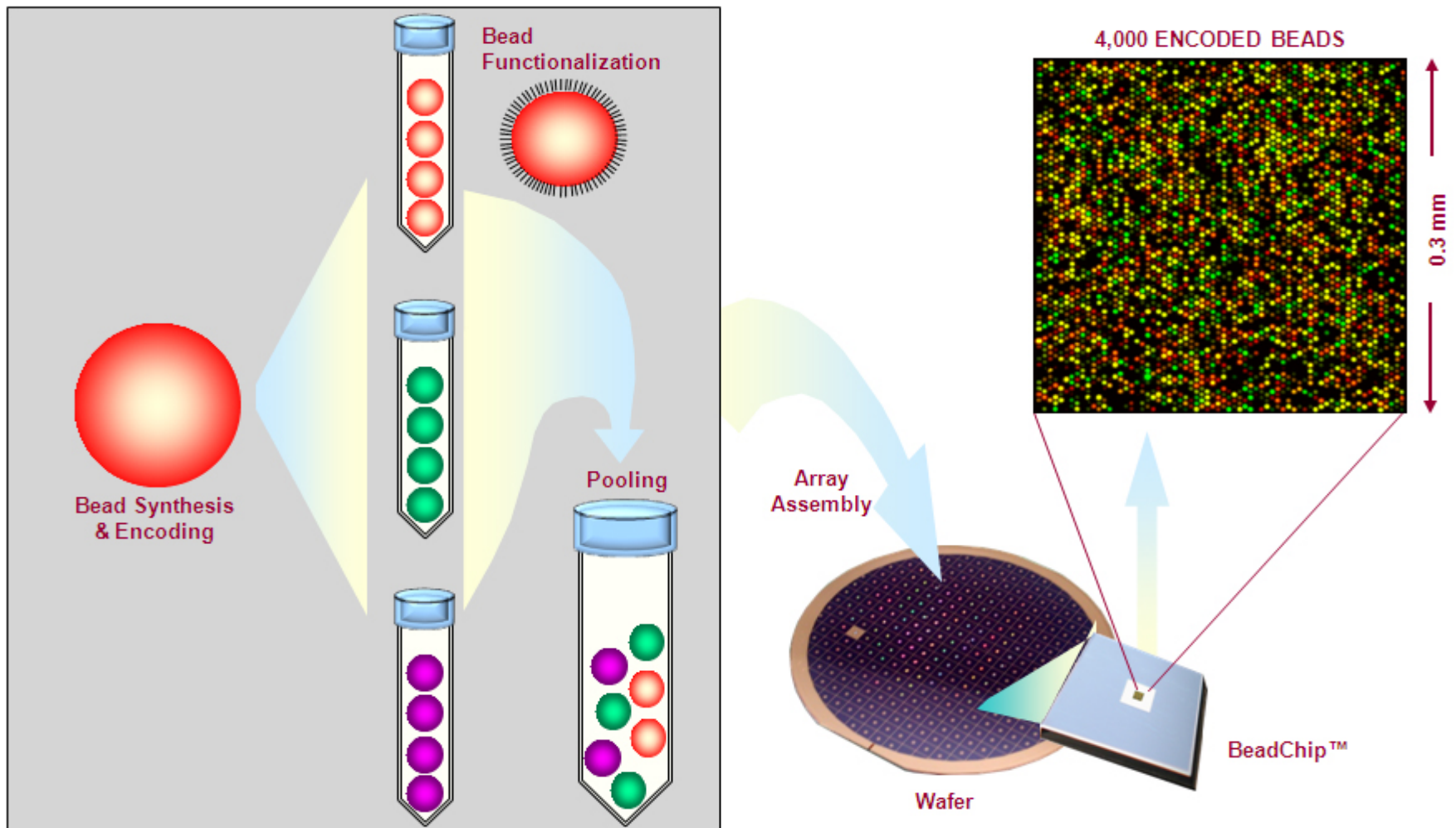


Establecimiento de un panel de donantes HPA negativos: Tipificación molecular

- **Período del estudio:** octubre de 2009 a septiembre de 2010.
- **Muestras analizadas:** 552 muestras.
- **Método usado:** Plataforma de genotipificación HPA BeadChip, de BioArray Solutions, Warren, NJ que detecta 11 polimorfismos y 22 antígenos.

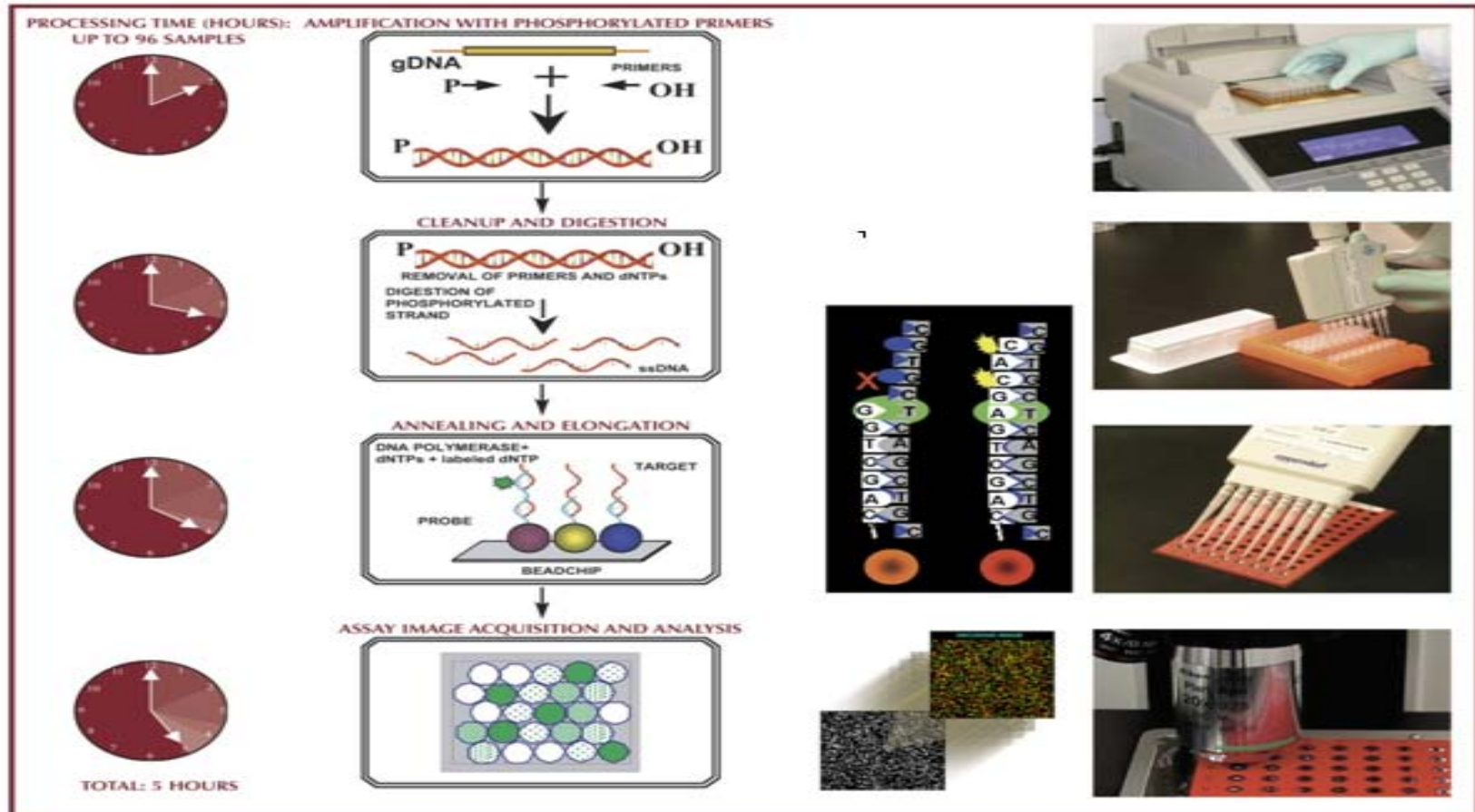
Establecimiento de un panel de donantes HPA negativos: Tipificación molecular

HPA Bead chip Array



Establecimiento de un panel de donantes HPA negativos: Tipificación molecular.

HPA Bead chip Array. Principios y pasos





Establecimiento de un panel de donantes HPA negativos. Resultados

- Tiempo de procesamiento:
- Fenotipo HPA-1a en Galileo: 144 muestras de PRP/80 minutos.
- Extracción del DNA: 8 muestras/ 30 minutos (10 minutos de tiempo de técnico).
- Genotipo HPA: 96 muestras/5 horas.

Establecimiento de un panel de donantes HPA negativos. Resultados

Escrutinio serológico automatizado de HPA-1a;
N= 999 muestras de

HPA-1a positivo
N= 974 (97.5%)

HPA-1a negativo
N= 25 (2.5%)

Extracción de ADN
N=25

HPA-1b1b

N= 24/25 (92.4%)
(1/25: Falso positivo en Capture P??)

Genotipo HPA
BeadChip
N=552

Muestras de ADN
del repositorio
N=527

HPA-1b1b

N= 17/527 (3.2%)



Establecimiento de un panel de donantes HPA negativos. Resultados

Antígenos negativos	Nº de donantes
1a, 5b, 15a	5
1a, 5b, 15a	26
1a, 15a	8
1a, 5a	2
5b, 15a	110
1a, 3a	5

- La estrategia ha permitido indentificar:
 - Un 59% más de donantes negativos de HPA-1a que usando solamente la tecnología molecular (41 contra 17).
 - Un número importante de los donantes múltiples de la negativa del antígeno.

Establecimiento de un panel de donantes HPA negativos. Resultados

	HPA-1		HPA -2		HPA-3		HPA-4		HPA-5	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Positivo	511	175	545	120	497	322	552	1	542	124
Negativo	41	377	7	432	55	230	0	551	10	428

	HPA-6		HPA-7		HPA-8		HPA-9		HAP-11		HAP-15	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Positivo	552	0	552	0	552	0	552	1	552	0	409	414
Negativo	0	552	0	552	0	552	0	551	0	552	143	138



Establecimiento de un panel de donantes HPA negativos. Conclusiones

- La combinación del cribado serológico automatizado de HPA-1a y de un método de genotipado HPA a gran escala es un proceso costo-eficiente, rápido y específico que permite que los centros de transfusión establecer un panel de los donantes de sangre negativos para los antígenos más frecuentes de HPA implicados en la TNFAI así como en otros procesos que cursan con trombopenia de origen inmune

Detección de variantes Del en el autómata Galileo Neo

- La identificación de variantes D Débiles y Del en donantes tipificados como D negativos es interesante por el riesgo potencial de sensibilizar a un receptor D negativos.
- No es infrecuente que las formas Del no pueden discriminarse con las técnicas serológicas habituales y que sólo se puedan poner de manifiesto con técnicas de adsorción elución o por estudio genético.

Detección de variantes Del en el autómata Galileo Neo

- Las nuevas técnicas moleculares han puesto de manifiesto que un porcentaje no despreciable de individuos tipificados serológicamente como RhD negativos pero con fenotipo Cc en realidad son portadores de alguna variante del gen D.
- El CT de Toledo Guadalajara dispone de un panel de 7316 donantes Rh D y Du negativos. De ellos 6096 donantes están fenotipados para el Rh-Kell.
- 273/6096 donantes Rh negativos fenotipados tienen fenotipo Cc (4.5%).

Detección de variantes Del en el autómata Galileo Neo (*)

- En Octubre de 2010 se implantó en rutina el autómata Galileo Neo.
- La determinación del Rh D se realiza con dos anti-D: ImmuClone Anti-D rapid IgM y Novaclone AntiD-IgM+IgG.
- Las discrepancias del Rh-Du con los resultados históricos fueron estudiadas:
 - Estudio en tubo con dos anti-D distintos en antiglobulina.
 - Fenotipo Rh-Kell.
 - Estudio del gen RhD (Blood Chip v.2.0.)

* Gemma Moreno, Félix García, Blanca Eguía, Miguel Ángel Rodríguez, Ascensión del Álamo, Julián García Hinojosa, Carlos Pérez, Valle Flores, Miguel Ángel Pérez de Albéniz. Centro Regional de Transfusión de Toledo-Guadalajara y Centro de Transfusión de Madrid, 22 Congreso Nacional de la SETS, 2011.

Detección de variantes Del en el autómata Galileo Neo

- Hasta el 04/10/13 se han obtenido un total de 27 resultados discrepantes (16 mujeres y 11 hombres) con los históricos.
- Los 26/27 donantes tienen un fenotipo Cce y 1 es de fenotipo Ce.
- 26/27 casos presentan una variante Rh Del y presentan una mutación en el nucleótico 885 (G>T) que genera un cambio en el aminoácido 295 del antígeno D (M295I).
- Entre estos 27 donantes el número de donaciones previas etiquetadas como Rh negativas asciende a 308.
- Estamos realizando una investigación retrospectiva de los receptores. Hasta el momento hemos detectado un caso de aloinmunización anti-D probablemente relacionada con la transfusión de una unidad Rh Del etiquetada como Rh negativa

Papel del Galileo Neo en la búsqueda de plaquetas compatibles para pacientes con refractariedad plaquetar

- La refractariedad a la transfusión de plaquetas lleva asociada una alta morbimortalidad.
- La incidencia en los pacientes oncohematológicos de nuestro ámbito, en el que desde hace 10 años se administran componentes leucodeplecionados, oscila entre un 15-25%.
- El 33% se deben a causas no inmunes.
- El 20% son por una combinación de causas inmunes y no inmunes.
- El 17% restante obedece a aloinmunización anti-HLA y/o HPA.

Papel del Galileo Neo en la búsqueda de plaquetas compatibles para pacientes con refractariedad plaquetar

- Manejo del paciente aloinmunizado con refractariedad plaquetar:
 - Selección de plaquetas “matched” o “mismatched” en los loci A y B (y C).
 - Selección de plaquetas compatibles antígeno HLA negativas.
 - Selección de plaquetas compatibles por prueba cruzada con el plasma del donante:
 - Capture P, automatizado en Galileo.
 - Técnica rápida, con alta capacidad de procesamiento, útil tanto en casos de aloinmunización HLA como HPA.