

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**“FRECUENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTIPLAQUETARIOS EN
PACIENTES HEMATOLÓGICOS, POLITRANSFUNDIDOS EN EL HOSPITAL
NACIONAL EDGARDO REBAGLIATI MARTINS EN EL PERIODO ENERO –
MARZO DEL 2013”.**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica Área de
Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica**

AUTOR

Jenny Manzano Romero

ASESOR

: Mg. TM José Antonio Paredes Arrascue

Lima – Perú

2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a Dios y todas las personas que me apoyaron en la realización del presente trabajo.

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este trabajo A Dios quien ha iluminado mi camino, y me ha dado el valor y fortaleza suficiente para alcanzar esta meta.

A mi familia y amigos por estar siempre a mi lado dándome un apoyo incondicional para que no decaiga en los malos momentos y así poder seguir con mis sueños y metas

GLOSARIO

HLA: Antígeno leucocitario humano

HPA: antígeno plaquetario humano

MAIPA: Monoclonal antibody specific immobilization of platelet antigens

(Inmovilización específica de antígenos plaquetarios con anticuerpos humanos)

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

LCT: Lymphocytotoxicity (Linfocitotoxicidad)

SMD: Síndrome mielodisplásico

AA: Anemia aplásica

OMS: Organización Mundial de Salud

FDA: Food and Drug Administration (Administración de alimentos y drogas)

GP: Glicoproteínas

CCI: Corrected Count Increment (Incremento Corregido)

PRP: Porcentaje de recuperación de plaquetas

TRAP: Trial to reduce alloimmunization to platelet (Estudio para reducir la aloinmunización de plaquetas)

PIFT: Platelet immunofluorescence Test (Ensayo de inmunofluorescencia para plaquetas)

PRA: Panel reactive antibodies (Panel reactivo de anticuerpos)

SPRCA: Solid phase red cell adherence (Adherencia de células rojas a una fase sólida)

LLA: Leucemia Linfocítica Aguda

LNH: Linfoma no Hodgkin

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

MM: Mieloma Múltiple

HPN: Hemoglobinuria Paroxística Nocturna

RESUMEN

INTRODUCCION: La producción de los anticuerpos antiplaquetarios constituye una complicación frecuente e importante de la transfusión de plaquetas, debido a que pueden conllevar a desarrollar refractariedad plaquetaria y un inadecuado aprovechamiento de estos componentes sanguíneos. **OBJETIVO:** Determinar la frecuencia de los anticuerpos antiplaquetarios en pacientes hematológicos politransfundidos en HNERM, Lima – Perú. **MATERIALES Y METODOS:** Estudio descriptivo, prospectivo de corte transversal. Por conveniencia se colectaron 40 muestras de plasma de pacientes politransfundidos y mediante el método de fase sólida se detectaron anticuerpos antiplaquetarios, y además, las muestras positivas fueron tratadas con cloroquina disfosfato para poder identificar los anticuerpos anti HPA. **RESULTADOS:** De un total de 40 muestras, 15 (37.5%) fueron positivos para los anticuerpos antiplaquetarios, con una frecuencia de 100% para los anticuerpos anti HLA. **CONCLUSION:** Los pacientes politransfundidos generalmente desarrollan anticuerpos anti HLA. Estos anticuerpos pueden traer complicaciones graves para su tratamiento, es por ello que es importante adoptar estrategias transfusionales adecuadas para así poder optimizar el soporte transfusional en este tipo de pacientes. El número de transfusiones, la enfermedad hematológica de base, el género, y la edad no fueron estadísticamente significativos para el desarrollo de los anticuerpos antiplaquetarios.

Palabras clave: *Anticuerpos antiplaquetarios, transfusión de plaquetas, pacientes hematológicos, pacientes politransfundidos, refractariedad plaquetaria.*

ABSTRACT

INTRODUCTION: The production of antiplatelet antibodies is a common and important complication of platelet transfusion, because they can lead to develop platelet refractoriness and improper use of these blood components. **OBJECTIVE:** Determine the frequency of antiplatelet antibodies in polytransfused hematological patients HNERM, Lima - Peru. **MATERIALS AND METHODS:** Descriptive, prospective cross-sectional study. Blood samples from 40 patients polytransfused were collected for convenience. The samples were screened for antiplatelet antibodies using a solid phase method. Positive samples further were treated with chloroquine diphosphate to identify the antibody anti HPA. **RESULTS:** Of a total of 40 samples, 15 (37.5%) were positive for antiplatelet antibodies, with a frequency of 100% for anti-HLA antibodies. **CONCLUSION:** The polytransfused patients usually develop anti HLA antibodies. The use of additional method more sensitive and specificity that identify correctly anti HPA antibodies, such as MAIPA, is important for the appropriate management of these patients. The number of transfusions, haematological underlying disease, gender, and age were not statistically significant for the development of antiplatelet antibodies.

Keywords: *antiplatelet antibody, platelet transfusion, hematology patients, polytransfusedpatients, platelet refractoriness*

INDICE

1.	DATOS GENERALES	01
2.	Capítulo I	
	INTRODUCCION Y OBJETIVOS	07
3.	Capítulo II	
	MÉTODOS	26
4.	Capítulo III	
	RESULTADOS	32
5.	Capítulo IV	
	DISCUSIÓN	40
6.	Capítulo V	
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
7.	Capítulo VI	
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	49
8.	Capítulo VII	
	ANEXOS	56

CAPITULO I:
INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

La transfusión de plaquetas es considerada como una parte esencial en el tratamiento de pacientes con enfermedades hematológicas, debido a que la mayoría de ellos presentan una trombocitopenia que puede ocasionar hemorragias fatales. Estos pacientes por lo general requieren múltiples transfusiones de concentrados de plaquetas¹. En estos pacientes las transfusiones de plaquetas ha reducido de forma importante la morbilidad y mortalidad por hemorragia secundaria a la trombocitopenia². Es por ello, que el requerimiento prolongado de este componente sanguíneo, conlleva a un incremento en la demanda de concentrado de plaquetas en los servicios de banco de sangre y que no siempre están disponibles.

Las múltiples transfusiones pueden inducir la producción de los anticuerpos antiplaquetarios. Los antígenos plaquetarios capaces de inducir la producción de estos anticuerpos son principalmente los antígenos del Sistema Antígeno Leucocitario Humano (HLA) y los Antígenos Específico de Plaquetas (HPA)³. Estos anticuerpos pueden llevar a desarrollar refractariedad plaquetaria, un fenómeno caracterizado por la falta de incremento del recuento de plaquetas después de las transfusiones y que puede llevar al fracaso del tratamiento transfusional del paciente².

En los últimos años, la literatura internacional registra altas tasas de aloinmunización y refractariedad en pacientes hematológicos que reciben múltiples transfusiones de plaquetas³. Según la literatura revisada, aproximadamente hace 5 décadas la aloinmunización y la refractariedad fueron reconocidos como complicaciones potencialmente graves de transfusiones de plaquetas⁴. Debido a esto en los últimos años su investigación ha aumentado considerablemente.

Según profesionales que laboran en este campo, en nuestro país, las transfusiones de plaquetas son cada vez más frecuentes (comunicación personal), en especial en los pacientes politransfundidos, y la investigación de los anticuerpos antiplaquetarios en este tipo de pacientes es nula en nuestra población. Motivo por el cual se diseñó el presente estudio para evidenciar lo importante que es determinar la frecuencia de los anticuerpos antiplaquetarios y el papel que juegan estos en la refractariedad plaquetaria, para así tomar medidas adecuadas para optimizar el soporte transfusional, y así contribuir a reducir el número de transfusiones de plaquetas, la estancia hospitalaria y el costo del tratamiento.

1.1.2. Antecedentes

La aloinmunización a antígenos plaquetarios constituye una complicación frecuente e importante de la transfusión de plaquetas. Esto se traduce en una falta de respuesta a la transfusión y como consecuencia en una incapacidad para obtener una hemostasia normal, fenómeno conocido como refractariedad plaquetaria². La frecuencia de aloinmunización en pacientes hematológicos politransfundidos es muy variable y depende de los criterios para definirla y de del tipo de pacientes. Varios estudios han reportado tasas de aloinmunización que va de 34% a 60% en pacientes politransfundidos¹. De los cuales los anticuerpos dirigidos al antígeno HLA clase I se ha encontrado en un 70% a 80%^{2, 4} y son considerados como la principal causa inmunológica de la refractariedad plaquetaria. En cambio, la incidencia de los anticuerpos HPA es menos conocida y fue previamente considerada rara. Con el desarrollo de técnicas de detección más sensibles e específicas, los anticuerpos HPA han sido reportados con más frecuencia y también han sido implicados como causante de refractariedad plaquetaria⁶.

En Chile, Pereira y col: (1997)² en un estudio de 41 pacientes adultos y 24 niños politransfundidos reportan una frecuencia de 17% de anticuerpos anti HLA y 4.8% de

anticuerpos anti HPA en los pacientes adultos, utilizando las técnicas de Elisa y MAIPA respectivamente. En cambio la frecuencia de los anticuerpos antiplaquetarios en los niños fue nula. El mismo año en Alemania, Legler y col⁷ nos muestra que la incidencia de anticuerpos antiplaquetarios en pacientes refractarios que reciben productos sanguíneos leucorreducidos disminuye. La incidencia de anticuerpos anti HLA y anti HPA fue de 11.7% y 2% respectivamente, en este trabajo se utilizó para el tamizaje de los anticuerpos las técnicas de linfocitotoxicidad y citometría de flujo y para confirmar se utilizó el MAIPA.

Años más tarde, en Taiwan Lo y col. (2000)⁶ nos muestra que de 103 pacientes que recibieron transfusiones de plaquetas 40 (39%) fueron positivos para los anticuerpos antiplaquetarios, siendo la más frecuente los anticuerpos anti HLA con un porcentaje del 85%, mientras que la frecuencia de los anticuerpos anti HPA en ausencia de anti HLA fue de 12.5%, y acompañados con anticuerpos anti HLA se detectó en un 68%. Además un 2.5% representa un anticuerpo no identificado. En este estudio el tamizaje de los anticuerpos antiplaquetarios fue realizado con la técnica de fase sólida y la identificación de la especificidad de los anticuerpos fue realizado con la técnica de ELISA. Al año siguiente en Alemania Kiefel y col⁸ reportan que de 252 pacientes hematológicos politransfundidos, 113 pacientes (44.8%) están aloinmunizados, de los cuales 108 pacientes (95.6% de los pacientes aloinmunizados) tienen anticuerpos anti HLA y 5 pacientes (4.4% de los pacientes aloinmunizados) presentan anticuerpos anti HPA, para la detección de anticuerpos HLA se usó la técnica de linfototoxicidad (LCT) y para la identificación de los anticuerpos HPA el MAIPA.

En el 2005, en India Baipai y col¹ nos muestra que la incidencia de los anticuerpos antiplaquetarios fue del 66% (n = 50) siendo en mayor porcentaje los anticuerpos anti HLA (60%) (Usando la técnica de linfototoxicidad). En Brasil, Arruda y col. (2008)⁵

realizaron un estudio con el objetivo de verificar la frecuencia de los anticuerpos anti HLA de clase I en pacientes portadores de los síndromes mielodisplásicos (SMD) y anemia aplásica (AA), fueron estudiados 110 pacientes, siendo 70 con SMD y 40 con AA. La investigación de estos anticuerpos fue realizado utilizando la técnica de microlinfototoxicidad, la incidencia general de aloinmunización HLA fue de 34,5% (SMD (28.6%) y AA (45%)).

Por otro lado, en España, Canals y col. (2010)⁹ nos muestran en su estudio retrospectivo de cuatro años que los anticuerpos anti HLA se identificaron en un 59% del total de pacientes estudiados (n = 83) utilizando la técnica de ELISA. Y anticuerpos anti HPA en un 11% utilizando la técnica de MAIPA. Además nos menciona que estos anticuerpos podrían ser el causante del incremento pobre del recuento de plaquetas. Por último en Brasil el año 2011 Ferreira y col³ nos muestran que de los 16 pacientes que tenía como población 56% presentaba anticuerpos antiplaquetarios utilizando la técnica de inmunofluorescencia de plaquetas y utilizando la técnica de citometría de flujo solo el 19% presentaba anticuerpos anti HLA.

1.1.3. Bases teóricas

Características generales de las plaquetas

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos pequeños, irregulares, de forma discoide y carentes de núcleo, provienen de la fragmentación de sus células precursoras, los megacariocitos; miden de 3 a 5 micras de diámetro aproximadamente^{10, 11, 12}, tienen un citoesqueleto muy organizado, receptores únicos y gránulos secretores especializados¹². Las plaquetas poseen un tiempo de vida media en el organismo de aproximadamente de 5-10 días, antes de su remoción por parte de los macrófagos del sistema retículo endotelial. Para mantener la integridad del

endotelio vascular es necesario una cantidad de alrededor de 7×10^9 plaquetas / l por día. En individuos sanos la cantidad de plaquetas que circulan en la sangre oscila entre 150 a 450×10^9 plaquetas /L¹⁰.

Entre sus muchas funciones, el papel que mejor cumplen las plaquetas es responder a la lesión de los vasos sanguíneos mediante el cambio de forma, secreción del contenido de sus gránulos, y su agregación¹². Por lo tanto, las plaquetas son un componente de vital importancia para la hemostasia.

En una persona sana, los dos tercios del total de las plaquetas que produce (en promedio 1.3 trillones) circulan en la sangre y el porcentaje restante se encuentra almacenado en el bazo¹¹.

Las plaquetas humanas, al igual que el resto de los elementos formes sanguíneos, presentan en la superficie externa de su membrana estructuras polimórficas e inmunogénicas. Estas estructuras genéticamente determinadas (HLA y HPA) y localizadas en las proteínas, glicoproteínas y glucolípidos, pueden causar aloinmunización durante el embarazo, la transfusión sanguínea o el trasplante.

El interés del estudio de los anticuerpos antiplaquetarios, radica en su importancia diagnóstica y terapéutica en los cuadros clínicos asociados a la aloinmunización. Estos son la trombocitopenia feto-maternal aloimmune, la púrpura trombocitopénica postransfusional, la trombocitopenia pasiva postransfusional y la refractariedad a la transfusión de plaquetas. Siendo esta última la más frecuente¹³.

Transfusión de plaquetas

Desde la década del 60, la terapia de transfusión de plaquetas ha jugado un papel importante en el manejo de pacientes con trastornos hematológicos y oncológicos con trombocitopenia intermitente o de larga duración que podría conducir a una hemorragia fatal^{14, 15}.

En los últimos años las transfusiones de plaquetas han tenido una creciente demanda debido a la quimioterapia intensiva y al trasplante de células progenitoras hematopoyéticas que se han ido usando para el tratamiento de enfermedades hematológicas y oncológicas¹⁴.

Los pacientes hematológicos y / u oncológicos por lo general requieren de un soporte transfusional de plaquetas a largo plazo debido a su trombocitopenia intensa y persistente, con un consiguiente aumento en la demanda de concentrados de plaquetas, que no siempre están disponibles en los servicios de medicina transfusional. Esta situación es incluso más grave cuando el paciente desarrolla refractariedad a la transfusión de estos componentes de la sangre³. La transfusión de plaquetas se utilizan de forma profiláctica, para prevenir las complicaciones hemorrágicas, o terapéuticamente, para detener la hemorragia^{1, 14}.

La transfusión profiláctica o preventiva es utilizada en pacientes que están crónicamente trombocitopénicos debido a la quimioterapia, trasplante de médula ósea, o por las condiciones de la médula ósea que resulta en trombocitopenia tales como aplasia o mielodisplasia¹⁶. El objetivo fundamental de la transfusión profiláctica de plaquetas es aumentar el recuento de plaquetas del paciente por encima de un determinado umbral, para evitar las complicaciones hemorrágicas que previsiblemente

aparecerán por debajo del mismo. Este umbral se ha ido modificando en el curso del tiempo, pasando de $20 \times 10^9/L$ a 10×10^9 plaquetas/L^{14, 17, 18}.

Las transfusiones de plaquetas es considerado "terapéutico" cuando se logra controlar el sangrado activo ya sea debido a la trombocitopenia y / o disfunción de las plaquetas¹⁶. El uso de plaquetas terapéuticas sólo se recomienda cuando hay un sangrado significativo o cuando hay una intervención invasiva^{14, 16}. Según la OMS, las transfusiones terapéuticas de plaquetas en pacientes con trombocitopenia crónica suelen indicarse cuando la hemorragia es \geq al grado 2^{14,19}. La OMS clasifica la escala de hemorragia en 5 grados: en el grado cero no hay evidencia de hemorragia; el grado 1 presenta una hemorragia más suave caracterizado por petequias, hemorragia de las mucosas o hemorragia de la retina sin reducción visual; el grado 2 presenta una hemorragia fuerte que incluye melena (sangre en heces), hematemesis (vómito con sangre), hematuria (sangre en orina) o hemoptisis (esputo con sangre); el grado 3 incluye cualquier hemorragia que requiere una transfusión de paquete globular y el grado 4, incluye sangrado de la retina con reducción visual, sangrados cerebrales asociados con morbilidades y hemorragias fatales¹⁹. Así como la transfusión profiláctica la transfusión terapéutica va dirigida en especial a los pacientes con trombocitopenia crónica.

Los concentrados de plaquetas para la transfusión se obtienen por dos métodos de preparación diferentes; el primer método consiste en obtener las plaquetas a partir de las unidades de sangre total extraídas de los donantes de sangre (a partir de plasma rico en plaquetas y del buffy coat)¹⁴, con este método se obtiene como mínimo $5,5 \times 10^{10}$ plaquetas/concentrado y el segundo método es el de aféresis, que consiste en separar un solo componente de la sangre y regresar al donante el resto de los componentes que no serán utilizados. Este proceso se realiza en equipos

automatizados llamados separadores celulares ²⁰, según los requerimientos de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), por este método se obtiene como mínimo 3.0×10^{11} plaquetas/colecta de aféresis. Una de las ventajas principales de usar las plaquetas de aféresis es que se pueden obtener suficientes plaquetas de un solo donante para constituir una dosis de transfusión de plaquetas para un paciente adulto trombocitopénico. Por el contrario, para obtener un número equivalente de plaquetas requeridas para una transfusión utilizando el primer método, es necesaria la agrupación de concentrados de plaquetas a partir de 4 a 6 donantes diferentes ^{14, 16}, teniendo como desventaja la exposición del paciente a una mayor carga antigénica.

Otra de las ventajas del método de aféresis es que nos permite obtener concentrados plaquetarios leucorreducidos, y además reducir la exposición a la transmisión de enfermedades virales (Citomegalovirus y Epstein-Barr) y bacterianas así como la incidencia de aloinmunización plaquetaria ^{14, 20}.

Aloinmunización plaquetaria

La aloinmunización es una respuesta inmune que ocurre cuando el cuerpo reacciona a antígenos extraños (sangre del donante) y forma anticuerpos contra ellos²¹. Las plaquetas expresan en la superficie externa de su membrana una variedad de antígenos que están involucrados en la aloinmunización y en la refractariedad plaquetaria, estos incluyen antígenos ABO, HLA clase I (A y B) y HPA ^{1, 4}.

La aloinmunización depende de un número de factores tales como el tipo de productos de plaquetas transfundidas, el número de transfusiones recibidas y el estado inmunitario del paciente^{1, 22}. El desarrollo de la aloinmunización es un fenómeno relativamente precoz, aparece dentro de las primeras 4-6 semanas después de la transfusión².

La aloinmunización ocurre, en la mayoría de los casos, debido a la presencia de leucocitos contaminantes en los hemoderivados. La aloinmunización puede llevar a los pacientes politransfundidos a desarrollar refractariedad y a un inadecuado aprovechamiento de las transfusiones de plaquetas, perjudicando el resultado terapéutico.

Los antígenos plaquetarios que causan aloinmunización y que son considerados clínicamente relevantes como causantes de refractariedad inmune pueden ser separados en dos grupos, las que se comparten con otras células sanguíneas y los tejidos, tales como el sistema de antígeno leucocitario humano (HLA), y aquellos que son específicos de las plaquetas como el sistema de antígenos de las plaquetas humanas (HPA) ¹¹.

Aloinmunización HLA

El sistema HLA surge del complejo mayor de histocompatibilidad, que codifica proteínas polimórficas en la superficie celular, importantes para la presentación de antígenos. Las plaquetas pueden sintetizar antígenos de clase I y también absorber antígenos HLA soluble del plasma que conlleva a un número relativamente alto de antígenos HLA de clase I en su superficie, en comparación a los glóbulos rojos y granulocitos¹¹.

Los HLAs son los principales antígenos implicados en la aloinmunización y en la refractariedad plaquetaria ¹. En la membrana plaquetaria se encuentran co-expresados los antígenos HLA-A, HLA-B, y HLA-C. Los anticuerpos HLA causantes de aloinmunización y refractariedad reaccionan principalmente contra los antígenos de clase I de los loci A y B, debido a que la expresión de los antígenos HLA-A y HLA-B son superiores y más inmunogénicos que los antígenos HLA-C.¹³

La respuesta humoral primaria de HLA pueden inducirlos los antígenos expresados en las plaquetas o en los linfocitos del donante, pero es imprescindible la intervención de células nucleadas del donante con antígenos HLA de clase II que sean reconocidos como extraños por el huésped. Estas mismas células son las que actúan como presentadoras de los antígenos HLA de clase I a los linfocitos T del receptor y así determinando el desarrollo de células B memoria ²³. Por esta razón, la eliminación de las células presentadoras de antígeno mediante la leucorreducción o su inactivación mediante la irradiación, debería reducir la aloinmunización HLA. Esta respuesta inmune a los antígenos HLA ocurre alrededor de 3-4 semanas tras la primera transfusión en aquellos pacientes que reciben múltiples transfusiones². La respuesta secundaria no exige células presentadoras del antígeno y puede observarse en pacientes con antecedentes de embarazo o transfusiones previas ¹⁸.

Aloinmunización a los antígenos HLA es muy variable, depende del tipo de paciente y los criterios utilizados para definirla, se produce aproximadamente entre 40% a 70% de los pacientes con enfermedad hematológica que requieren soporte transfusional durante períodos prolongados de tiempo ^{5, 24}.

Aloinmunización HPA

Los antígenos plaquetarios humanos (HPA) resultan del polimorfismo de los genes que codifican los aminoácidos de las glicoproteínas de la membrana plaquetaria ²². Los polimorfismos HPA se deben principalmente a un solo cambio de aminoácidos en las glicoproteínas (GP) presentes en la superficie de las plaquetas.

Existen diferencias significativas en la prevalencia de los polimorfismos HPA en diversas poblaciones, y los pacientes se aloinmunizan a los antígenos HPA al igual que los antígenos HLA a través de transfusiones y el embarazo¹¹.

Los antígenos plaquetarios humanos (HPA) que son capaces de inducir la producción de aloanticuerpos, se encuentran localizados en su mayoría en los receptores de la membrana plaquetaria y frecuentemente están asociados a la aloinmunización. Los HPA-1, -2, -3, -4, -5 y -15, están presentes en las glicoproteínas GPIIIa, GPIIb, GPIIIa, GPIa y CD109 respectivamente. Según Ghevaert et al, 95% de los anticuerpos antiplaquetarios son específicos para HPA-1a o 5b; 5% de los casos se trata de anticuerpos para HPA-2, -3 y -15²².

Actualmente se conocen 24 aloantígenos específicos de plaquetas definidos por sus correspondientes anticuerpos humanos, de los cuales 12 están agrupados en 6 sistemas bialélicos,^{6, 13} un alelo de alta y otra de baja frecuencia que representa una baja prevalencia para el estado homocigoto¹⁸.

La incidencia de estos aloanticuerpos era menos conocida y se consideró previamente rara. Con el desarrollo de técnicas más eficaces la detección de los anticuerpos anti HPA se han reportado con mayor frecuencia y también han sido implicados como causas de refractariedad plaquetaria²⁵.

La frecuencia de pacientes politransfundidos aloinmunizados con HPA es variable, pero oscila en 2 a 17%³. En la mayoría de los casos se detectan combinados con anticuerpos HLA, pero en ocasiones pueden detectarse aislados¹⁸.

La frecuencia de los anticuerpos anti-HPA que pueden causar refractariedad en ausencia de los anticuerpos HLA es rara (0% -2%)²⁶. Y las especificidades más comunes son anti-HPA-1b y anti- HPA-5b^{5, 6, 11, 23}.

Refractariedad plaquetaria

La refractariedad plaquetaria es una complicación frecuente de la transfusión de plaquetas que afecta a una proporción variable de pacientes, sobre todo en función de su diagnóstico, a los estímulos inmunológicos anteriores, y el tipo de producto sanguíneo utilizado para la transfusión²⁶. La refractariedad plaquetaria se define de manera general como un fallo en el incremento del número de plaquetas después de dos o más transfusiones consecutivas de concentrado de plaquetas^{11, 18 27}.

La respuesta a la transfusión de plaquetas es usualmente medida por la determinación del incremento corregido (CCI) o por el porcentaje de recuperación (PPR)¹⁹. Siendo la primera la más utilizada.

El incremento corregido (CCI) o el porcentaje de recuperación de las plaquetas, se determinan mediante una fórmula basada en el volumen de sangre estimado o el tamaño del paciente, así como el número de plaquetas en el producto infundido²⁸. Ambos índices permiten definir una recuperación inadecuada (evaluada a los 10-60 minutos) y una inadecuada supervivencia postransfusional (evaluada a las 18-24 horas).^{19, 23} La dos determinaciones son calculadas por las siguientes formulas:

$$\text{CCI} = \frac{\text{Incremento del recuento de plaquetas/ } \mu\text{L} \times \text{superficie corporal (m}^2\text{)}}{\text{Número de plaquetas transfundidas} \times 10^{11}}$$

$$\text{PPR} = \frac{\text{Incremento del recuento de plaquetas/ } \mu\text{L} \times \text{Peso (kg)} \times 75 \text{ mL} \times 100}{\text{Recuento de plaquetas del producto/ uL} \times \text{volumen de plaquetas (ml)}}$$

La refractariedad es usualmente definido como un CCI de ≤ 7500 o ≤ 5000 y una PRP de 30% a 20% , respectivamente 1 hora post-trasfusión; y a los 18-24 horas post-trasfusión se considera un ICC de < 4500 o 2.500 y PRP $<$ de 15%¹⁹ .

A pesar de los diferentes valores del CCI que se han utilizado para definir una respuesta adecuada de transfusión, el estudio TRAP (Trial to reduce alloimmunization to platelets) define la refractariedad plaquetaria como un CCI menos de $5 \times 10^9/l$ a una hora después de la transfusión en dos ocasiones consecutivas^{11, 29, 30, 31, 33} , usando plaquetas ABO compatibles y frescas (recolectadas antes de 72 horas)^{11, 23, 27, 32} . Esta definición ha sido generalmente aceptada por la Sociedad Americana de Oncología Clínica^{3, 23} .

Los pacientes trombocitopénicos que necesitan de transfusiones continuas, pueden desarrollar refractariedad plaquetaria. Esta condición puede ser causada por factores inmunes y no inmunes. Las causas no inmunes representan la principal etiología (más de 80% de los casos) de la refractariedad plaquetaria e incluye esplenomegalia, fiebre, infección, coagulación intravascular deseminada, algunos antibióticos (vancomicina) y antifúngicos (anfotericina B), y la calidad del concentrado^{1, 33, 34} . Las causas inmunes, ocurren en menos de 20% de los casos, involucra aloinmunización HLA (responsables aproximadamente de 80-90% de los casos de refractariedad plaquetaria) y en menor medida (aproximadamente 10-20%), la aloinmunización HPA³⁴ . Es importante mencionar que la presencia de anticuerpos antiplaquetarios no es sinónimo de refractariedad plaquetaria debido a que solo aproximadamente 20% a 50% de los pacientes aloinmunizados se podrían convertir en refractarios⁵ .

Repetidos valores bajos de CCI entre 10 minutos y 1 hora después de la transfusión son generalmente atribuidos a una destrucción inmune^{11, 29} . En cambio una reducción

de CCI a los 18 a 24 horas después de un CCI normal a la hora indica consumo debido a la presencia de factores clínicos^{11, 23, 29, 32}.

Pruebas de Laboratorio para detectar Anticuerpos Antiplaquetarios

La detección de aloanticuerpos plaquetarios es importante para el diagnóstico y el tratamiento de los trastornos plaquetarios de tipo inmune (trombocitopenia feto-maternal aloinmune, la púrpura trombocitopénica postransfusional, y la refractariedad plaquetaria). Por lo tanto la detección de estos aloanticuepos tiene que ser rápida y efectiva. Diferentes pruebas serológicas se han desarrollado para detectar los aloanticuerpos plaquetarios, pero cada una de estas técnicas tiene limitaciones importantes. Para lograr la máxima sensibilidad y especificidad en la detección e identificación de anticuerpos plaquetarios se requiere una combinación de los diversos ensayos disponibles. Un estudio de la variación entre laboratorios en la detección de anticuerpos de plaquetas muestra que los mejores resultados se obtienen al usar por lo menos dos técnicas⁶.

Técnica de linfocitotoxicidad (LCT): LCT es el método clásico para detectar los aloanticuerpos anti- HLA, detecta aquellos anticuerpos (Ac) dependientes del complemento que son capaces de lisar linfocitos. El porcentaje de células de un panel frente a los que un paciente presenta anticuerpos citotóxicos se conoce como PRA (panel reactive antibody). Un PRA mayor a 10-20% de las células del panel comienza a ser indicativa de significación clínica. Se emplea como técnica de cribado^{11, 18}.

Prueba de inmunofluorescencia para plaquetas (PIFT): esta prueba fue el primer método simple, fiable y versátil para la detección de anticuerpos de reactividad de las plaquetas⁶. Esta prueba evidencia la presencia de los aloanticuerpos fijados a la

membrana de las plaquetas control mediante una antiglobulina humana fluorescente. Tiene como desventajas su baja sensibilidad y además que requiere microscopio de fluorescencia. Entre sus ventajas tenemos que es una técnica rápida y reproducible.

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA): este ensayo está basado en métodos que se utilizan para determinar la presencia de anticuerpos anti HLA, para calcular un PRA y para definir la especificidad de anticuerpos¹¹. Este ensayo se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, puede ser medido por un espectrofotómetro. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, simple en su realización, económico y consigue, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.

Inmovilización específica de antígenos plaquetarios con Anticuerpos monoclonales (MAIPA). Es una técnica muy buena y efectiva considerada como el “gold standard” de referencia en la inmunología plaquetaria^{35, 36}, es una modificación de la técnica de Elisa que es manejada con anticuerpos monoclonales en un principio y posteriormente es procesada y leída como una elisa³⁶. Esta técnica se basa en la detección de complejos trimoleculares formados por un anticuerpo monoclonal específico de una glicoproteína de membrana plaquetaria o de una molécula de HLA, el anticuerpo presente en el paciente, y la molécula de membrana que expresa el correspondiente antígeno HPA^{35, 36}; es una técnica más sensible que permite definir, simultáneamente, la especificidad del anticuerpo detectado, debido a que puede diferenciar entre un anticuerpo HLA y un anticuerpo HPA. Su principal inconveniente es que los anticuerpos monoclonales pueden reconocer epitopes parecidos o conocidos produciéndose falsas reacciones³⁵.

Adherencia de células rojas a una fase sólida (SPRCA): Un test más simple es el test de aglutinación en fase sólida (Capture- P). En dicho test las membranas de las plaquetas son fijadas a la superficie de pocillos. Tras la adición del plasma o suero se incuba la mezcla y se muestra la reacción utilizando IgG ligada a hematíes ²³. La velocidad y la sencillez de SPRCA permiten a muchos laboratorios de banco de sangre utilizar como prueba de screening para la detección de anticuerpos de plaquetas y también para realizar pruebas de compatibilidad ^{7, 37}. Sin embargo, presenta como limitación que puede detectar los anticuerpos de grupo ABO ²³, y no diferenciar entre anticuerpos anti-HLA y anti-HPA ^{7, 23}. Para distinguir los anticuerpos anti-HPA y anti-HLA se realiza un tratamiento adicional con difosfato de cloroquina¹.

El difosfato de cloroquina destruye los determinantes antigénicos HLA de las plaquetas, a su vez se ha demostrado que el tratamiento de plaquetas con difosfato de cloroquina no tiene ningún efecto sobre los antígenos HPA plaquetarios³⁸.

La prueba se usa para eliminar la reactividad de anticuerpos HLA en aquellos pacientes que tienen un resultado de screening positivo con la prueba de SPRCA.

Por último tenemos la técnica de Citometría de flujo: una técnica sensible, que utiliza esferas con especificidades antigénicas múltiples o restringidas. Dado que los antígenos fijados pueden ser tanto del sistema HLA como HPA, y con especificidades limitadas o múltiples. Esta ha sido considerada como posible método de referencia al igual que el MAIPA. Sin embargo, este ensayo requiere más tiempo y además no se adapta fácilmente para el uso rutinario⁷.

Prevención de la aloinmunización

La utilización de donantes HLA compatibles y/o remoción de leucocitos presentes en los componentes sanguíneos disminuye el riesgo de aloinmunización o retarda su aparición²

En la actualidad existen múltiples métodos para reducir la cantidad de leucocitos contaminantes en las transfusiones. Estos métodos incluyen la utilización de filtros antes de la transfusión y técnicas de fraccionamiento orientadas a disminuir la cantidad de leucocitos dentro del concentrado plaquetario, tales como la separación de la capa leucoplaquetaria, conocido mundialmente como Buffy Coat.

Para mejorar el incremento del recuento de plaquetas en pacientes aloinmunizados existen tres posibles estrategias y todas ellas son combinables entre sí: la selección de plaquetas HLA compatibles, la selección de plaquetas con prueba cruzada negativa y la selección de plaquetas carentes del/los antígeno/s contra los que van dirigidos los anticuerpos del paciente¹⁸.

1.2.1. Objetivo general

Determinar la frecuencia de los anticuerpos antiplaquetarios en pacientes hematológicos politransfundidos en el HNERM.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de los anticuerpos anti-HLA en pacientes politransfundidos con enfermedades hematológicas
- Conocer la frecuencia de los anticuerpos anti-HPA en pacientes politransfundidos con enfermedades hematológicas.

- Determinar la asociación entre el número de transfusiones y la presencia de anticuerpos antiplaquetarios.
- Determinar si la enfermedad de base es un factor de riesgo para la presencia de los anticuerpos antiplaquetarios.
- Demostrar la asociación que existe entre el género, y la edad con la presencia de los anticuerpos antiplaquetarios.

Capítulo II
METODOLOGIA

2.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio es de tipo Descriptivo, prospectivo y de corte transversal.

2.2. POBLACIÓN

Pacientes hematológicos hospitalizados en el Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins.

2.2.1 Muestra

Pacientes hematológicos que reciben múltiples transfusiones de concentrado de plaquetas.

2.2.2 MUESTREO

El tipo de muestreo para la selección de los participantes fue de forma no probabilístico por conveniencia. Se incluyó dentro del estudio muestras de sangre de 40 pacientes politransfundidos provenientes del Servicio de Hematología del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins entre enero y mayo del 2013. Estos pacientes cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión formulados.

2.3. CRITERIOS DE SELECCION

2.3.1. Criterios de inclusión:

- Pacientes diagnosticados con una enfermedad hematológica
- Pacientes que presentan trombocitopenia con recuento de plaquetas < 20 000 plaquetas/ μ L.
- Pacientes con solicitudes de transfusión de plaquetas en el periodo de estudio, mínimo tres veces por semana.

- Pacientes con historial mayor a 10 transfusiones de plaquetas.
- Pacientes que han recibido transfusiones de plaquetas por lo menos dentro de los 30 días.

2.3.2. Criterios de exclusión:

- Pacientes con examen antiglobulina directa positivo
- Pacientes con enfermedades autoinmunes
- Mujeres con más de dos embarazos previos.

2.4. Variables del estudio

Variables independientes: Politransfundido

Variable dependiente: Anticuerpo antiplaquetario

Variables intervinientes: edad, sexo, número de transfusiones, y el tipo de diagnóstico.

2.5. PLAN DE RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS E DATOS

2.5.1 Recolección de datos

Para ejecutar el estudio se realizó los trámites administrativos correspondientes, así como la autorización de los encargados del departamento de patología, del servicio de medicina transfusional y así como del servicio de hematología clínica.

Antes de comenzar a coleccionar las muestras de plasma y los datos respectivos, todos los pacientes y / o responsables fueron informados de los propósitos del estudio, obteniéndose de esta manera los consentimientos informados, por escrito, en términos explicativos y claros en cuanto a los procedimientos, siguiendo los preceptos dictados por la declaración de Helsinki.

Para recolectar los datos ya sea del laboratorio de banco de sangre y de las historias clínicas se utilizó una ficha estructurada de recolección de datos que incluía los criterios de exclusión e inclusión, para facilitar la selección y poder discriminar las variables aleatorias e intervinientes. Anexo 1

2.5.2 Obtención de muestra de sangre

Las muestras de plasma se obtuvieron a partir de la sangre anticoagulada con ácido Etilendiaminotetraacético sal dipotásico (K_2 EDTA). Los días de toma de muestra para estudios de rutina como protocolo que tienen estos pacientes son los días lunes, miércoles y viernes, por ello, estos días se aprovecharon para poder coleccionar las muestras de plasma que fueron necesarios para el presente estudio. Según la recomendación del fabricante del ensayo, el tubo hematológico fue centrifugado y el plasma separado y almacenado a $-80^{\circ}C$ hasta el momento de su procesamiento en el servicio de medicina transfusional del HNERM.

2.5.3. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

2.5.3.1. Técnicas e Instrumentos

La investigación de los anticuerpos antiplaquetarios fue realizada utilizando el equipo automatizado Neo Galileo (Inmucor). La técnica que utiliza este equipo automatizado es la de adherencia de células rojas a una fase sólida (Capture-P, Immucor Inc., Norcross, GA, EE.UU.). Esta técnica es utilizada como cribado no discriminatorio para la identificación de anticuerpos de tipo IgG anti HLA y/o HPA. También es utilizada para realizar pruebas de compatibilidad plaquetaria.

En esta técnica las plaquetas están adheridas sobre la superficie de los pocillos de las placas microtiter (poliestireno). Estas se utilizan a continuación para capturar los anticuerpos antiplaquetarios del plasma del paciente. El plasma se incubó brevemente

en los pocillos recubiertos de plaquetas para permitir que los anticuerpos, si existen, se enlacen a las plaquetas. Las inmunoglobulinas no enlazadas son eliminadas de los pocillos mediante lavado y enfrentadas con una suspensión de hematíes indicadores recubiertos con IgG. Una centrifugación pone en contacto los hematíes indicadores con los anticuerpos enlazados a las plaquetas inmovilizadas. En caso de test positivo, la migración de los hematíes indicadores al fondo del pocillo es impedida ya que puentes se han formado anti-IgG entre los hematíes indicadores y los anticuerpos enlazados a las plaquetas. Como consecuencia de tales puentes, los hematíes indicadores cubrirán las plaquetas inmovilizadas formando una monocapa. Y en un test negativo las interacciones antígenos plaquetares-anticuerpos están ausentes, por lo tanto, los hematíes indicadores no serán frenados durante su migración, y sedimentarán en el fondo del pocillo formando un pequeño botón, bien definido y delimitado de células. Anexo 2

Para determinar la presencia de anticuerpos anti HPA, las muestras positivas, obtenidas con el tamizaje inicial fueron tratadas con cloroquina difosfato (GammaQuin, Immucor Inc). El tratamiento con cloroquina difosfato se realizó con la finalidad de eliminar los antígenos HLA presentes en las plaquetas adheridas en los pocillos.

Este método no puede distinguir los anticuerpos antiplaquetarios específicos de los anticuerpos anti HLA, es por eso que es considerado como un método no específico para la detección de los anticuerpos anti HPA. Anexo 3

2.6. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron registrados en una hoja de Excel y luego se procesaron en el programa estadístico SPSS. Para verificar la asociación entre las variables fue utilizada la prueba exacta de Fisher por ser lo más adecuado para muestras

pequeñas. Fue considerada asociación significativa cuando el valor de p era menor a 0.05.

2.7. CONSIDERACIONES ETICAS

La aplicabilidad del presente estudio no involucró riesgo alguno a la salud e integridad de los participantes. La privacidad de la información suministrada se garantizó mediante la aplicación del instrumento únicamente por el equipo de investigación, de esta forma se garantizó la confidencialidad de la información proporcionada por los participantes.

Los formularios fueron custodiados por el investigador, y únicamente el investigador tuvo acceso a la base de datos.

Se aplicó el consentimiento informado a todos los pacientes que accedieron voluntariamente a participar del presente estudio. (Ver Anexo 4). El proyecto fue Aprobado por la comisión de Ética del HNERM.

Capítulo III
RESULTADOS

RESULTADOS

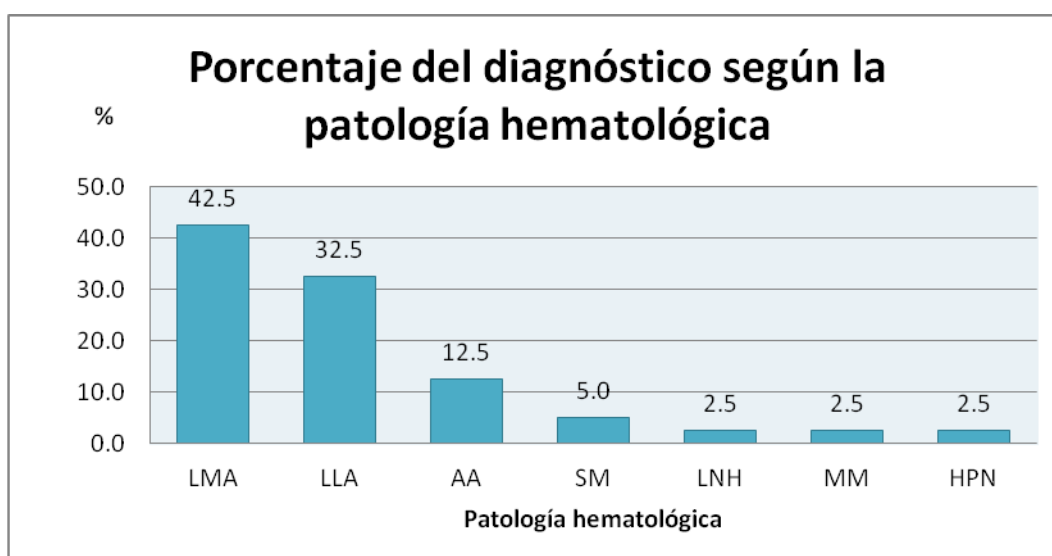
Características generales de los pacientes

De los 40 pacientes incluidos en el estudio, 26 (65%) corresponde al sexo masculino y 14 (35%) al sexo femenino. La media de la edad de los pacientes fue 39 años, con una variación de 14 a 69 años.

El número de transfusiones de concentrado de plaquetas (PQ) que han recibido los pacientes ha variado de 11 a 64 con una media 23.9 y en caso de unidades de glóbulos rojos (PG) varía de 4 a 59 con una media 15.6. Los concentrados de plaquetas que se transfundieron fueron plaquetas de aféresis y pool de plaquetas. Todas estas características se resumen en la tabla 1.

En relación al diagnóstico según patología hematológica a continuación se enlistan los principales trastornos presentes: la leucemia mieloide aguda (LMA) (16), leucemia linfocítica aguda (LLA) (13) y la anemia aplásica (AA) (5); con menor frecuencia se hallaron síndrome mieodisplásico (SM) (2), linfoma no-Hodgkin (LNH) (1) mieloma múltiple (MM) (1) y la Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) (1).

Grafico 1.



Fuente: Propia

Tabla 1 – Características clínicas de los pacientes hematológicos que han recibido múltiples transfusiones en el HNERM en el periodo Enero a Mayo 2013.

Características	N (%)
Pacientes	40
Sexo	
Masculino	26 (65.0)
Femenino	14 (35.0)
Edad (media /rango en años)	39 (14-69)
Patologías	
Leucemias	
LMA	16 (40.0)
LLA	13 (32.5)
Otros	
AA	05 (12.5)
SMD	02 (5.0)
LNH	01 (2.5)
MM	01 (2.5)
HPN	01 (2.5)
Numero de transfusiones (media/rango)	
Concentrado de plaquetas	23.9 (11-64)
Paquetes globulares	15.6 (4-59)

Fuente: Propia

Se formaron intervalos en relación a los grupos etarios y la cantidad de transfusiones, para ajustar el análisis. La edad han sido distribuidos en grupo de edades de 15 años, de 14-28 , 29-43, junto con un grupo extremo que son los mayores a 43 años; y el numero transfusiones han sido distribuidos en dos grupos extremos (menores a 20 transfusiones y mayores a 20 transfusiones).

Asimismo se realizó la distribución de las frecuencias por grupo etario, grupo de transfusiones y por género; donde se elabora una tabla que muestra la cantidad de individuos que lo conforma y el porcentaje que representa. A continuación se muestra la siguiente tabla.

Tabla 2- Intervalos de edad y numero de transfusiones según género.

	Masculino	Femenino	Total
	N (%)	N (%)	
Rango de edades (años)			
14-28	7 (26.9)	2 (14.3)	9 (22.5)
29-43	11 (42.3)	6 (42.9)	17 (42.5)
>43	8 (30.8)	6 (42.9)	14 (35.0)
Numero de transfusiones			
PQ			
<20	18 (69.2)	5 (35.7)	23 (57.5)
>20	8 (30.8)	9 (64.3)	17 (42.5)
PG			
<20	20 (76.9)	12 (85.7)	32 (80.0)
>20	6 (23.1)	2 (14.3)	8 (20.0)

Fuente: Propia

En la tabla se puede apreciar que el grupo etario 29 a 43 años supera en número a los demás grupos con 17 pacientes, seguido de los pacientes mayores de 43 años. Además en el grupo etario 29 a 43 años predomina el género masculino (11).

Con respecto al número de transfusiones, se observa que el género masculino recibió en su gran mayoría menos de 20 unidades ya sea de concentrados de plaquetas como de glóbulos rojos.

Presencia de los anticuerpos anti plaquetarios

Las 40 muestras al ser analizadas con el ensayo Capture-P Ready Screen Solid Phase System (Sistema en Fase Solida), se demostró anticuerpos antiplaquetarios en 15 (37.5%) pacientes (tabla 3). Los resultados postratamiento con cloroquina difosfato se observó lo siguiente: los anticuerpos anti HLA fueron detectados en 15 pacientes

(100% de los pacientes aloinmunizados) y los anticuerpos antiplaquetarios específicos no fueron encontrados (tabla 4).

Tabla 3. Resultados de la técnica de adherencia de células rojas en fase sólida en 40 pacientes que reciben múltiples transfusiones de plaquetas.

	Negativo SPRCA	Positivo SPRCA	Total
Cantidad	25	15	40
Porcentaje	62.5 %	37.5 %	100 %

SPRCA: Adherencia de células rojas a una fase solida

Fuente: Propia

Tabla 4. Resultado post tratamiento con cloroquina difosfato en 15 pacientes que presentan anticuerpos positivos.

	Negativo SPRCA	Positivo SPRCA	Total
Cantidad	15	0	15
Porcentaje	100 %	0.0 %	100 %

Fuente: Propia

En la tabla 5 se muestran las características de los pacientes que presentan anticuerpos antiplaquetarios. Se observa que la media de la edad de los pacientes con anticuerpos antiplaquetarios (anticuerpos anti HLA) es 32 (14-50). El número de masculinos y femeninos fueron 9 (60%) y 6 (40%), respectivamente. De los pacientes con anticuerpos positivos, tres tuvieron una historia de embarazo. Siete de los pacientes con LMA, 5 de LLA, 2 de AA y 1 de SM fueron anticuerpos positivos. La media del número de trasfusiones de plaquetas en los pacientes con anticuerpos positivos fue 29 (11-63) y la media del número de transfusiones de unidades de glóbulos rojos fue 17 (5-59).

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes que presentan anticuerpos antiplaquetarios

N° Pacientes	Edad	diagnostico	Sexo	N° de transfusiones	
				CP	PG
1	34	LMA	F	51	13
2	45	LMA	F	34	17
3	30	LLA	M	13	5
4	34	LMA	M	20	7
5	14	AA	M	22	11
6	50	LLA	M	11	8
7	38	LMA	M	28	11
8	44	LMA	F	22	9
9	40	AA	F	63	23
10	16	LLA	F	40	21
11	31	LLA	M	11	13
12	44	LMA	M	19	24
13	34	LLA	M	29	24
14	50	LMA	M	17	9
15	16	SM	F	53	59

Fuente: Propia

CP: Concentrado de plaquetas; PG: Paquete globular

En la tabla 6 se observa los antecedentes transfusionales (plaquetas y glóbulos rojos) por cada patología hematológica y además nos muestra cuanto de ellos presentan anticuerpos antiplaquetarios. La tabla muestra que las transfusiones de concentrado de plaquetas supera a las transfusiones de paquetes globulares (958 y 591 respectivamente). Los pacientes que padecen de la leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda y la anemia aplásica recibieron más transfusiones que el resto de los pacientes y además son los que presentan con mayor frecuencia los anticuerpos antiplaquetarios.

Tabla 6- Numero de transfusiones que han recibido y frecuencia de los anticuerpos antiplaquetarios de cada patología incluido en el estudio.

Patología	N° de pacientes	N° de transfusiones		Inmunización N (%)
		PQ	PG	
LMA	16	355	159	7 (46.7)
LLA	13	245	186	5 (33.3)
AA	5	200	118	2 (13.2)
SM	2	66	90	1 (6.7)
LNH	1	11	4	0
MM	1	17	4	0
HPN	1	64	20	0
Total	40	958	591	15 (100)

Fuente: Propia

Las principales asociaciones que se han determinado en este estudio con la presencia de anticuerpos antiplaquetarios, tenemos: la cantidad de transfusiones de concentrado de plaquetas, transfusiones de unidades de glóbulos rojos, patología, el sexo y la edad del paciente. (Tabla 7)

La relación de la edad de los pacientes con la presencia de los anticuerpos no fue estadísticamente significativo ($p=0.188$). Tampoco, hubo una diferencia significativa observada con respecto al sexo ($p=0.736$).

El número transfusiones de concentrados de plaquetas y unidades de globulos rojos también, mostraron que no hubo una asociación con la presencia de anticuerpos antiplaquetarios ($p >0.05$) y con respecto a la patología hematológica se observó que tampoco hubo una correlación con la presencia de estos anticuerpos antiplaquetarios.

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes asociados con la presencia de los anticuerpos antiplaquetarios.

	ANTICUERPOS NEGATIVOS N (%)	ANTICUERPOS POSITIVOS N (%)	Valor P
Pacientes	25 (62.5)	15 (37.5)	-
Edad			
14 – 28	6 (24.0)	3 (20.0)	0.188
29 – 43	8 (32.0)	8 (60.0)	
>43	11 (44.0)	4 (20.0)	
Sexo			
Femenino	8 (32.0)	6 (40.0)	0.736
Masculino	17 (68.0)	9 (60.0)	
Historia transfusional			
PQ			
<20	17 (68.0)	6 (40.0)	0.107
>20	8 (32.0)	9 (60.0)	
PG			
<20	21 (84.0)	11 (73.3)	0.444
>20	4 (16.0)	4 (26.7)	
Diagnostico			
LMA	10 (40.0)	7 (46.7)	0.842
LLA	8 (32.0)	5 (33.3)	
OTROS	7 (28.0)	3 (20.0)	

*La asociación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Fuente: Propia

Capítulo IV
DISCUSION

DISCUSIÓN

El estudio de la frecuencia de los anticuerpos antiplaquetarios en pacientes hematológicos se ha convertido cada vez más importante debido al aumento de la demanda de las transfusiones de plaquetas. Ya que, la aplasia medular y el daño endotelial causados por el tratamiento conllevan trombocitopenia intensa y persistente, llevando a la necesidad de repetidas transfusiones de concentrados de plaquetas, que no siempre están disponibles en los servicios de bancos de sangre. Esta situación es incluso más complicada cuando el paciente desarrolla refractariedad a las transfusiones de estos componentes sanguíneos. La destrucción inmunológica de plaquetas, mediada por aloanticuerpos dirigidos contra antígenos de las plaquetas (HLA y HPA) es con frecuencia el principal o un factor importante en el estado de refractariedad a las transfusiones de plaquetas³⁷. Estudios realizados con pacientes trombocitopenicos politransfundidos mostraron tasas de frecuencia de anticuerpos antiplaquetarios variando de 20% a 60%^{4, 27, 31}.

La frecuencia de anticuerpos antiplaquetarios (tanto HLA y HPA) en el presente estudio fue del 37.5%, similar a lo reportado por Dutcher y col. (1981)³⁹. En los pacientes hematológicos politransfundidos, la formación de anticuerpos contra los antígenos HLA es particularmente común, estos anticuerpos son considerados como los anticuerpos más importantes que intervienen en la refractariedad plaquetaria. En el presente estudio, el análisis de las muestras de los 15 pacientes con anticuerpos antiplaquetarios positivos mostro una frecuencia de aloinmunización HLA al 100%. Otras revisiones en aloinmunizacion HLA han mencionado incidencias que se extienden desde 25% a 95%, 30% a 70% y 30% a 100%^{1, 5, 40} en pacientes que han recibido componentes de sangre no leucorreducidas. Estas variaciones podrían ser debido a la heterogeneidad de la población de pacientes, al tipo de tratamiento, al

número o al tipo de transfusiones. El tipo de ensayo que cada investigador emplea para detectar y definir aloinmunización HLA podría ser otro de los factores intervinientes para encontrar diferentes incidencias de aloinmunización HLA.

Bajpai A y col. (2005)¹. En un estudio sobre 50 pacientes hematológicos con múltiples transfusiones, han reportado una incidencia de 60% de aloinmunización HLA, usando el ensayo LCT (Linfotoxicidad). Este estudio considero un resultado positivo para anticuerpo HLA cuando la reactividad del panel fuera mayor 20%. Mientras que otros estudios han considerado una reactividad > 10% o >5%. Por otra parte, estudios realizados por Pereira y col. (1997) y por Ferreira y col. (2011)³ nos muestran una incidencia relativamente baja (17% y 19% respectivamente) de anticuerpos anti HLA en pacientes con múltiples transfusiones usando el ensayo MAIPA en el primer caso y LCT en el segundo, el primer estudio lo ha atribuido esta baja incidencia al uso de esquemas de tratamiento más agresivos e inmunosupresores, mientras que el segundo lo ha atribuido al número pequeño de muestra incluido en el estudio. Las transfusiones de componentes sanguíneos leucorreducidos también disminuyen la incidencia de anticuerpos anti HLA. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que usar componentes sanguíneos leucorreducidos disminuye la aloinmunización HLA y la refractariedad plaquetaria^{4, 31, 33, 36}. En nuestro país los concentrados de plaquetas en su gran mayoría son no leucorreducidos provenientes de donantes al azar agrupadas de 5 a 6 donantes y en ocasiones puede ser transfundidas plaquetas provenientes de donantes por aféresis. La alta frecuencia de los anticuerpos anti HLA en el presente estudio podría ser debido a las transfusiones de componentes sanguíneos no leucorreducidos.

La frecuencia de los anticuerpos anti HPA en pacientes politransfundidos han sido determinados en la mayoría de los casos en forma indirecta, de acuerdo con el número de pacientes que continúan siendo refractarios a plaquetas HLA compatibles.

Existen muy pocos estudios que han determinado en forma directa los anticuerpos antiplaquetarios en pacientes refractarios^{2, 6, 21, 41}. En general, los reportes sobre la frecuencia de los anticuerpos anti HPA en pacientes politransfundidos son muy raros. Los reportes nos muestran una frecuencia de aloinmunización HPA, que va de 0% a 2%, dependiendo de la población de pacientes. Estas tasas son más altas en los individuos que también tienen anticuerpos anti HLA (entre 9% y 25%)³⁹. Se sabe que los pacientes con anticuerpos HLA parecen ser más propensos a desarrollar anticuerpos específicos plaquetarios. De hecho, los anticuerpos específicos plaquetarios inducidos por transfusiones se han encontrado casi exclusivamente en pacientes aloinmunizados con HLA, en el cual aparecen en estrecha relación temporal con los anticuerpos HLA⁴². En el presente estudio no se encontró ningún caso de anticuerpos anti HPA en los pacientes que fueron aloinmunizados con HLA. Aunque en nuestro país no se ha realizado estudios sobre frecuencia de expresión de los aloantígenos plaquetarios, una posible explicación para esta ausencia, podría ser que nuestra población presente una menor frecuencia de los antígenos específicos de plaquetas que son responsable de la mayoría de los casos de aloinmunización en la población caucasica (HPA-1b y 5b). Así como nos muestra el estudio realizado por Pereira y col. (1997)², donde la población chilena presenta una baja incidencia de aloinmunización HPA debido a que la frecuencia génica que presenta esta población, de los sistemas HPA-1, 2 y 5 es menor a comparación de la población caucásica de Europa y Estados Unidos.

La naturaleza del ensayo empleado es otra razón para explicar la discrepancia que existe entre los estudio sobre la frecuencia de los anticuerpos HPA. Con el desarrollo de técnicas de detección más eficaces, anticuerpos anti HPA se han reportado con más frecuencia y también se han implicado como causas de refractariedad plaquetaria²⁴. Los resultados del presente estudio muestran que la técnica de fase

solida utilizada en este estudio no fue útil para detectar los anticuerpos anti HPA, debido a que es menos sensible y especifica comparado con otras técnicas, como por ejemplo, la técnica de MAIPA, que es altamente sensible y específica para detectar los anticuerpos anti HPA. Diversos estudios han elegido esta técnica como una prueba de referencia para investigar los anticuerpos anti HPA ^{2, 9, 25, 35, 40, 41}.

En este estudio no se encontró una asociación significativa entre el número de transfusiones recibidas y la presencia de los anticuerpos antiplaquetarios. Esto es concordante con otros estudios publicados (Pereira y col. (1997); Lo y col. (2000); Bajpai y col. (2005), pero no con los resultados de Arruda y col. Esta discrepancia podría ser debido al tamaño pequeño de la muestra o la heterogeneidad variable de los donantes y el paciente. La resolución entre el número de transfusiones y la aloinmunización sigue siendo controversial. Con respecto a la enfermedad de base sucede lo mismo, no existe una asociación significativa con la presencia de anticuerpos.

En la tabla 4 podemos observar que los pacientes con LMA presentan una mayor frecuencia de aloinmunización (46.7%) en comparación con los aquellos con LLA (33.3%). Lee y Schiffer ⁴³, también reportaron que los pacientes con LMA eran más propensos a desarrollar la aloinmunización HLA (44%) que los pacientes con LLA. Holohan y col. encontraron que los pacientes con anemia aplásica presentaban una mayor frecuencia de aloinmunización que los pacientes con neoplasias hematológicas. En este estudio los pacientes con neoplasias hematológicas, presentaban una mayor frecuencia de aloinmunización en comparación con los pacientes con anemia aplásica. Arruda y col.³ nos muestran que los pacientes con anemia aplásica son más propensos a desarrollar los anticuerpos antiplaquetarios. Estas diferencias se pueden atribuir a los distintos grados de inmunosupresión y de la alteración del estado inmunitario resultante del proceso de la enfermedad y/o la terapia de inmunosupresión. De

acuerdo con la literatura, pacientes con enfermedades hematológicas tratados con inmunosupresores producen menos respuestas aloinmunes de las que no son tratados^{2,5}.

Arruda y col.⁵ quienes han analizado pacientes con anemia aplásica y síndrome mielodisplásica encontraron que no existen diferencias significativas entre el grupo etario y la presencia de los anticuerpos. La incidencia de aloinmunización en pacientes con síndrome mielodisplásico fue menor, y se atribuyó al decaimiento del sistema inmunológico. Diferentes estudios nos muestran que el aumento de la edad se asocia con incremento adecuado de plaquetas. Se sabe que el fenómeno de la inmunosenescencia puede disminuir las respuestas inmunológicas de los individuos. Los resultados obtenidos en este estudio nos muestran que no hay una asociación significativa entre el grupo etario y la presencia de anticuerpos.

Con respecto al género, diferentes estudios han mostrado que las mujeres son más propensas a desarrollar los anticuerpos antiplaquetarios, debido a embarazos previos. Por esta razón, se debería implementar la utilización de filtros leucodepletores y transfusiones plaquetarias de aféresis en mujeres con historial de múltiples gestaciones, por ser pacientes naturalmente aloinmunizados. Entre los pacientes aloinmunizados en este estudio, se observó que los hombres superan a las mujeres. Las mujeres que presentan los anticuerpos antiplaquetarios tienen un historial hasta de dos embarazos previos. En algunos estudios consideran que mujeres que tienen dos o más gestaciones previas favorecen el desarrollo de aloanticuerpos y la ocurrencia de la refractariedad. En este estudio no se encontró una asociación significativa entre el género y la presencia de anticuerpos antiplaquetarios, tal vez sea por el tamaño de la muestra.

Capítulo V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Queda claro, que la presencia de los anticuerpos antiplaquetarios en pacientes con enfermedades hematológicas politransfundidos es común en nuestra población (37.5%). En el presente estudio, los pacientes politransfundidos presentan como único anticuerpo al anti HLA.

Usando la técnica de fase sólida y el tratamiento adicional con cloroquina difosfato se encontró que el 100% de los pacientes con anticuerpos antiplaquetarios presentaban anticuerpos anti HLA. Con esta metodología la frecuencia de los anticuerpos anti HPA fue nula.

Estudios realizados a nivel internacional, muestran que para identificar los anticuerpos anti HPA es necesario el uso de técnicas adicionales que sean más sensibles y específicos, como el MAIPA.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, los servicios de banco de sangre deberían de tomar conciencia de la importancia de desarrollar medidas que puedan prevenir la aloinmunización y la refractariedad plaquetaria, permitiendo de esta manera un adecuado soporte transfusional para los pacientes hematológicos con el fin de garantizar la prevención y tratamiento de los eventos hemorrágicos comunes en estos pacientes.

Por último, el número de transfusiones, enfermedad de base, el género y la edad no influyeron en la tasa de aloinmunización plaquetaria, es decir que estas variables no fueron estadísticamente significativos.

5.2. Recomendaciones

Realizar nuevas investigaciones más detalladas de los anticuerpos antiplaquetarios en muestras más representativas y además que sean estudios prospectivos y longitudinales.

Realizar estudios sobre el papel que juegan los anticuerpos antiplaquetarios en la refractariedad plaquetaria incluyendo factores clínicos y terapéuticos, para así tomar medidas adecuadas para optimizar el soporte transfusional, y así contribuir a reducir el número de transfusiones de plaquetas y el costo del tratamiento.

Implementar la investigación de los anticuerpos antiplaquetarios de forma rutinaria, en los Bancos de Sangre, para así mejorar la atención de estos pacientes.

Adoptar las siguientes estrategias transfusionales: asegurar que los productos sanguíneos transfundidos en pacientes hematológicos sean leucorreducidos, disminuir el número de donadores de plaquetas aleatorias (pool de plaquetas por buffy-coat), realizar transfusiones de plaquetas aleatorias por aféresis en pacientes aloinmunizados y en pacientes con oportunidad de trasplante, efectuar transfusiones de plaquetas de donantes aleatorias por aféresis de donantes seleccionados con compatibilidad HLA en los casos de pacientes hiperinmunizados y por último realizar análisis de los sueros de los pacientes contra los sistemas HLA después de ciertas transfusiones para seguir la producción de estos anticuerpos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se sugiere también que la leucorreducción se pueda implementar de forma rutinaria al menos para aquellos casos en que se anticipe una alta probabilidad de aloinmunización como es el caso de pacientes con aplasia medular.

Capitulo VI
BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

1. Bajpai A, M, Kaura B, Marwaha N, Kumari S, Sharma RR, Agnihotri SK. Platelet alloimmunization in multitransfused patients with haemato-oncological disorders. *Natl Med J India*. 2005; 18(3):134-6.
2. Pereira J, Bronfman L, Bertin P, Et Al. Platelet alloimmunization in patients with oncologic blood disorders treated with multiple transfusions: prospective study in adults and children. *Rev med chil* 1997; 125(11):1305-12.
3. Ferreira Aa, Zulli R, Soares S, Castro V, Moraes-Souza H. Identification of platelet refractoriness in oncohematologic patients. *Clinics* 2011; 66(1):35-4.
4. Pavenski K, Freedman J, Semple JW. HLA alloimmunization against platelet transfusions: pathophysiology, significance, prevention and management. *Tissue Antigens*. 2012; 79(4):237-45.
5. Arruda DMM, Silva SFR, Silva SL, Pitombeira MH, Campos HH, Mota RMS, et al. Aloimmunity against HLA class I antigens in patients with myelodysplastic syndrome and aplastic anemia. *Rev Bras Hematol Hemot*. 2008; 30:18–23.
6. Lo Sc, Lin Dt, Lin Sw, Et Al. Frequency and characterization of platelet-specific antibodies in patients who received multiple platelet transfusions. *J ormos med assoc* 2000; 99(12):902-5.

7. Legler TJ, Fischer I, Dittmann J, Simson G, Lynen R, Humpe A, et al. Frequency and causes of refractoriness in multiply transfused patients. *Annals of Hematology*. 1997; 74:185–189.
8. Kiefel V, König C, Kroll H, Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion*. 2001; 41:766–770.
9. Canals C, Nogue´S N, Vinyets I, Gracia M, Palou E, Muñiz-Diaz E. Anti-Human leucocyte antigens (hla) and antihuman platelet antigens (hpa) antibody detection in patients with suspected immune refractoriness to platelet transfusions: a 4 year experience. *Vox sanguinis* (2010) 99 (suppl. 1), 1-516.
10. Garcia M, Coma C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev cubana angiología y cirugía vascular* 2000; 1(2):132-41.
11. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol* 2008; 142:348.
12. Thon JN, Italiano JE. Platelet formation. *Semin Hematol*. 2010; 47(3):220-6.
13. De La Vega CD. Genotipificación de los sistemas de antígenos plaquetarios humanos HPA 1,3 y5 en donantes de sangre y aborígenes tobas en Rosario, Argentina. (Tesis doctoral). España, Editorial: universidad de granada, 2007
14. Hannes Wandt, Gerhard Ehninger and Walter Michael G. New Strategies for Prophylactic Platelet Transfusion in Patients with Hematologic Diseases, *The oncologist* 2001; 6:446-450.

15. Heal JM, Blumberg N, Masel D. An evaluation of crossmatching, HLA, and ABO matching for platelet transfusions to refractory patients. *Blood*. 1987; 70(1):23-30-
16. Slichter SJ. Evidence-based platelet transfusion guidelines. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. 2007:172- 178.
17. Stanworth SJ, Hyde C, Brunskill S, et al. Platelet transfusion prophylaxis for patients with haematological malignancies: where to now? *Br J Haematol*. 2005; 131:588-595.
18. Muñoz-Díaz E, Martínez C, y Madoz.P. Refractoriedad a las transfusiones de plaquetas. *Med Clin (Barc)* 2003; 120(14):544-9.
19. Sherrill J. Slichter MD. Platelet Transfusion Therapy. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007; 21(4):697-729.
20. Luna ML, Lucila RS, María Luisa SM, Lidia CR. Aféresis plaquetaria. *Revista mexicana de enfermería cardiológica*. 2007; 15 (3): 89-93.
21. Haslindawani W, Mustaffa R. Platelet Alloantibody in Multiply Transfused Thrombocytopenic Patients. *Int. Med J*. 2007; 6(2): 1-10
22. Azevedo MR, Jens E, Nukui Y, Chamone DA. Frequency of Human platelet antigens in oncohematological patients with thrombocytopenia and the probability of incompatibility to platelet transfusions. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012; 34(3):202-5

23. Simposio de Optimización del uso de concentrados de plaquetas y plasma. L Reunión Nacional de la Asociación española de Hematología y Hemoterapia (AEHH) y XXIV congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETH). 2008; pág. 207-216.
24. Foro. Valor diagnóstico de los anticuerpos antiplaquetarios. XLVII Reunión Nacional de la Asociación española de Hematología y Hemoterapia (AEHH) y XXI congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea (SETH). 2005; pág. 510-516.
25. Nguyen XD, Goebel M, Schober M, Klüter H, Panzer S. The detection of platelet antibodies by simultaneous analysis of specific platelet antibodies and the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens: an interlaboratory comparison. *Transfusion* 2010; 50(7):1429-34.
26. Rebullá P. Refractoriness to platelet transfusion. *Curr Opin Hematol* 2002; 9:516-20.
27. Rebullá P. A mini-review on platelet refractoriness. *Haematologica*. 2005;90(2):247-53.
28. Schiffer CA, Anderson KC, Bennett CL, et al. Platelet transfusions for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2001; 19:1510-1538.
29. Delaflor-Weiss E, Mintz PD. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfus Med Rev*. 2000; 14(2):180-96.

30. Rebulla P. Platelet refractoriness .European Haematology Review,2007;1(1):21-2
31. Seftel MD, Grove GH, Petraszko T, Benny WB, Le A, Lee CY, Spinelli JJ, Sutherland HJ, Tsang P, Hogge DE. Universal prestorage leukoreduction in Canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness. Blood.2004; 103(1):333-9.
32. Chockalingam P, Sacher RA. Management of patients refractory to platelet transfusion. J Infus Nurs. 2007; 30(4):220-5.
33. Sniecinski I, O'Donnell MR, Nowicki B, Hill LR. Prevention of refractoriness and HLA-alloimmunization using filtered blood products. Blood. 1988; 71(5):1402-7.
34. Bonet C, Moraes B, Mendonça T, Gonçalves AC, Barjas ML, Castro V. Platelet antibody detection by flow cytometry: an effective method to evaluate and give transfusional support in platelet refractoriness. Rev Bras Hematol Hemoter. 2013; 35(4): 252–255.
35. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Müller-Eckhardt C. Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. Blood. 1987; 70(6):1722-6
36. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group. N Engl J Med. 1997; 337(26):1861-9.

37. Vongchan P, Nawarawong W, Linhardt RJ. Modification of solid phase red cell adherence assay for the detection of platelet antibodies in patients with thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130(3):455-66.
38. Langenscheidt F, Kiefel V, Santoso S, Nau A, Mueller C, Mueller-Eckhardt C. Quantitation of platelet antigens after chloroquine treatment. *Eur J Haematol.* 1989;42(2):186-92.
39. Dutcher J, Schiffer C, Aisner J, Wiernik P. Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of a dose-response relationship. *Blood.* 1981; 57(3):395-8.
40. Detection of platelet-reactive antibodies in patients who are refractory to platelet transfusions, and the selection of compatible donors. *Vox Sang.* 2003; 84(1):73-88.
41. Schnaidt M, Northoff H, Wernet D. Frequency and specificity of platelet-specific alloantibodies in HLA-immunized haematologic-oncologic patients. *Transfus Med.* 1996; 6(2):111-4.
42. Sanz C, Freire C, Alcorta I, Ordinas A, Pereira A. Platelet-specific antibodies in HLA-immunized patients receiving chronic platelet support. . *Transfusion.* 2001; 41(6):762-5.
43. Lee EJ, Schiffer CA. Serial measurement of lymphocytotoxic antibody and response to nonmatched platelet transfusions in alloimmunized patients. *Blood* 1987; 70: 1727–9.

Capítulo VII

ANEXOS

ANEXO 1:

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

“FRECUENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTIPLAQUETARIOS EN PACIENTES HEMATOLÓGICOS, POLITRANSFUNDIDOS EN EL HOSPITAL NACIONAL EDGARDO REBAGLIATI MARTINS EN EL PERIODO ENERO – MARZO DEL 2013”.

Número de seguro

social:.....Edad:

Sexo:.....

Diagnóstico de Enfermedad:.....

Número de unidades Transfundidas:

Aféresis: Pool: PG:

Recuento de plaquetas:

> 20.000 plaquetas/ μ L () < 20.000 plaquetas/ μ L ()

Fecha de transfusiones:

Primera transfusión: última transfusión:

Coombs directo positivo: SI () NO ()

Enfermedad autoinmune: SI () NO ()

Mujeres multíparas: SI () NO ()

Tratamiento con heparina: SI () NO ()

Observaciones:

ANEXO N° 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

“FRECUENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTIPLAQUETARIOS EN PACIENTES HEMATOLÓGICOS, POLITRANSFUNDIDOS EN EL HOSPITAL NACIONAL EDGARDO REBAGLIATI MARTINS EN EL PERIODO ENERO – MARZO DEL 2013”.

Jenny Manzano Romero

Tesista. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina

“San Fernando”. E.A.P. Tecnología Médica

PROPÓSITO DEL ESTUDIO: El presente estudio se realiza para conocer si los pacientes hematológicos que han recibido múltiples transfusiones de plaquetas han producido anticuerpos antiplaquetarios, estos anticuerpos son los causantes principales de que el número de plaquetas no aumente adecuadamente después de una transfusión de un concentrado de plaquetas. Conocer estos anticuerpos permitirá que a futuro se tome medidas adecuadas para que así se pueda optimizar el soporte transfusional, y así contribuir a reducir el costo del tratamiento y el número de transfusiones de plaquetas.

PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO: Se tomara la muestra del laboratorio, en ningún momento se le tomara una muestra a usted.

RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO: No existe ningún riesgo hacia su persona. No se dará ninguna retribución económica por participar. Su participación va a ayudar a tener información valiosa sobre la presencia de anticuerpos antiplaquetarios, esto traerá como beneficio a que más adelante se pueda mejorar la atención a los pacientes.

LA PARTICIPACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN ES VOLUNTARIA: Si usted por voluntad propia no desea participar en el estudio es libre de no hacerlo, si así lo prefiere.

CONFIDENCIALIDAD: En todo momento se guardara confidencialidad respecto a su identidad, los resultados serán utilizados y manejados con la mayor reserva, asegurando la privacidad y confidencialidad de la información. El nombre no aparecerá en ningún momento al final del estudio o el informe.

Disposición final de la muestra: La muestra restante será eliminada.

DECLARACION VOLUNTARA

Yo he sido informado(a) del objetivo del estudio, conocido los riesgos, beneficios y la confidencialidad de la información obtenida. Entiendo que la participación en el estudio es gratuita. He sido informado (a) de la forma de cómo se realizara el estudio y de cómo se tomara las muestras. Estoy enterado también que puedo participar o no continuar en el estudio en el momento en el que lo considere necesario. Por lo anterior acepto voluntariamente participar en la investigación de:

“FRECUENCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTIPLAQUETARIOS EN PACIENTES HEMATOLÓGICOS, POLITRANSFUNDIDOS EN EL HOSPITAL NACIONAL EDGARDO REBAGLIATI MARTINS EN EL PERIODO ENERO – MARZO DEL 2013”.

Lima, de del 2013

Firma del Participante

DNI:

ANEXO 3

Técnica de Capture P Ready Screen

Principio:

Los antígenos plaquetarios están unidos y desecados sobre la superficie del pocillo. Al adicionar plasma/suero junto con un potenciador los anticuerpos que están presentes en la muestra son capturados por los antígenos de membrana que se encuentran sobre la superficie del pocillo. Tras un breve periodo de incubación se eliminan del pocillo las inmunoglobulinas no enlazadas mediante un lavado. Se adicionan células indicadoras recubiertas de IgG que se unirán a las inmunoglobulinas capturadas. Una centrifugación revelará si las células indicadoras están unidas determinando el resultado del test.

Procedimiento:

Preparación de antes del escreening

- 1.- descongelar las muestras a temperatura ambiente por 30 minutos.
- 2.-identificar correctamente y rotular
- 3.- centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos.

Screening de anticuerpos antiplaquetarios.

1. Sacar las tiras de su bolsa. Los antígenos apropiados para el ensayo que están recubriendo el pocillo. Adicionar 2 gotas de Capture Liss (100 ul) en cada pozo, excepto en el pozo 14 destinado para el blanco.
2. Mediante una pipeta adicionar una gota de control positivo y una gota de control negativo en los pozos 15 y 16 respectivamente.

3. Adicionar una gota de suero o plasma que fueron centrifugados en los pozos de plaquetas 1 al 13 y agitar muy levemente, por ejemplo pasando el dedo a lo largo de la tira varias veces para mezclar. (el Liss cambia de púrpura a azul celeste, al adicionar muestras y controles).
4. Incubar entre 30 y 60 minutos (adicionar 5 minutos si es por calor seco) a 37° C.
5. Retirar del incubador e inmediatamente proceder a lavar las tiras en el lavador de microplacas CSW100, ejecutando el programa P1.
6. Adicionar una gota (50 ul) de células indicadoras recubiertas con IgG a cada pocillo.
7. En seguida centrifugar a la velocidad recomendada y el tiempo apropiado para la centrífuga a utilizar, teniendo cuidado de programar la centrífuga para una aceleración rápida y un frenado por inercia.
8. Leer e interpretar los resultados.

Interpretación de los resultados

El grado de fijación de las células indicadoras a la monocapa indica la positividad o negatividad de la reacción.



No adherencia = **negativo**

Adherencia parcial o completa = **positivo**

Test Positivo

La migración de las células indicadoras al fondo del pocillo es impedida por la formación de los complejos anti-IgG-IgG sobre la superficie de la monocapa de hematíes inmobilizados.



Test Negativo

En ausencia de una interacción antígeno-anticuerpo detectable la migración de las células indicadoras no se verá impedida.

Las células indicadoras se depositarán en el fondo del pocillo formando un botón compacto.



ANEXO 4: TRATAMIENTO DE PLAQUETAS CON CLOROQUINA DIFOSFATO POR EL METODO CAPTURE

Principio:

El difosfato de cloroquina destruye los determinantes antigénicos HLA de las plaquetas, a su vez se ha demostrado que el tratamiento de plaquetas con difosfato de cloroquina no tiene ningún efecto sobre los antígenos HPA plaquetarios.

La prueba se usa para eliminar la reactividad de anticuerpos HLA en aquellos pacientes que tienen un resultado de screening positivo con la prueba de Capture P Ready Screen.

Procedimiento:

- Remover los reactivos 30 minutos antes de ejecutar las pruebas para llevarlos a temperatura ambiente.
- Retirar una tira de 2x8 pozos del interior del empaque, verificando que el indicador de humedad esté azul. En caso de estar rosado no utilizar las tiras de ese empaque.

Colocar las tiras en los soportes respectivos.

- Adicionar 2 gotas de una solución comercial de difosfato de cloroquina (Gamma Quin) y 1 gota de suero fisiológico en los pozos de 1 a 13, de una tira nueva de Capture P Ready Screen y agitar muy levemente, por ejemplo, pasando con el dedo a lo largo de la tira varias veces para mezclar.
- Incubar entre 30 y 60 minutos (adicionar 5 minutos si es por calor seco) a 37° C.
- Retirar del incubador e inmediatamente proceder a lavar las tiras en el lavador de microplacas CSW100, ejecutando el programa P2.

- Ejecutar seguidamente o procedimiento normal para a técnica de Capture P Ready Screen.
- Adicionar 2 gotas de Capture Liss (100 ul) en cada pozo, excepto en el pozo 14 destinado para el blanco.
- Adicionar una gota de control positivo débil y una gota de control negativo en los pozos 15 y 16 respectivamente.
- Adicionar una gota de suero o plasma en los pozos de plaquetas 1 al 13 y agitar muy levemente, por ejemplo pasando el dedo a lo largo de la tira varias veces para mezclar. (el Liss cambia de púrpura a azul celeste, al adicionar muestras y controles).
- Incubar entre 30 y 60 minutos (adicionar 5 minutos si es por calor seco) a 37° C.
- Retirar del incubador e inmediatamente proceder a lavar las tiras en el lavador de microplacas CSW100, ejecutando el programa P1.
- Adicionar una gota (50 ul) de células indicadoras.
- En seguida centrifugar a la velocidad recomendada y el tiempo apropiado para la centrífuga a utilizar, teniendo cuidado de programar la centrífuga para una aceleración rápida y un frenado por inercia.
- Leer e interpretar los resultados.