

Universidad de Concepción del Uruguay

Facultad de Ciencias Médicas

Rosario

Licenciatura en Hemoterapia e Inmunohematología

**Valoración de pruebas estandarizadas para la semicuantificación  
idiotípica implicada en la predicción de eritropenias fetales de origen  
inmune en el Servicio de Medicina Transfusional de una Maternidad  
en Vicente López, Provincia de Buenos Aires.**

Estudiante

**Andrea Ferreyra**

## Índice

Resumen	3
Introducción	5
Justificación	7
Planteamiento del problema	8
Hipótesis / Supuestos de partida	9
Objetivos general y específicos	10
Marco de referencia	11
Estado del arte	22
Diseño metodológico	24
Población y muestra	25
Métodos de recolección de información empírica	26
Tratamiento y análisis de la información empírica	30
Variables .....	31
Cronograma de actividades	33
Bibliografía.....	34
Anexos.....	37

## **Proyecto de Investigación**

Valoración de pruebas estandarizadas para la semicuantificación idiotípica implicada en la predicción de eritropenias fetales de origen inmune en el Servicio de Medicina Transfusional de una Maternidad de Vicente López, Provincia de Buenos Aires.

## **Resumen**

El suero de mujeres gestantes será evaluado inmunohematológicamente con el propósito de prevenir eritro y blastopenias en el feto o recién nacido. La génesis aloinmune, producto de la incompatibilidad paterno-materna, se medirá semicuantitativamente, una vez identificado el idiotipo. Mediante esta prueba se podrá establecer el número y actividad biológica de los anticuerpos y conocer cuáles están en condiciones de producir patología perineonatal. Las pruebas de titulación sérica de anticuerpos anti-eritrocitarios entrañan sesgos procedimentales, falta de estandarización, escasas medidas de control, inadecuada selección de métodos y desvíos que dependen del grado de experiencia del operador, estas variables se expresan en grados de subjetividad en los resultados. El objetivo del trabajo de valoración de las pruebas estandarizadas en la semicuantificación idiotípica implicadas en la predicción de eritropenias fetales de origen inmune en el Servicio de Medicina Transfusional de una Maternidad de Vicente López, Provincia de Buenos Aires, contrastará algunas hipótesis respecto de la responsabilidad de ciertas variables que nutren el sesgo procedimental, esto permitirá elaborar algoritmos de trabajo, para reducir la probabilidad de error, mejorando la certeza del instrumento diagnóstico en beneficio de la gestante y su hijo.

## **Palabras clave**

Eritropenia neonatal. Anticuerpos. Titulación.

## **Introducción**

La placenta de los mamíferos ha estado sujeta a dos presiones opuestas durante la evolución del nuevo ser, con el objeto de eliminar los patógenos mientras al mismo tiempo protege al feto del rechazo inmunitario<sub>1</sub>.

Hay cuatro razones por las que el feto habitualmente no provoca reacción inmunitaria en la madre Billingham y Medawar (1953) la separación anatómica del feto y la madre, la inmadurez antigénica del feto, considerar el útero como un lugar privilegiado inmunológicamente y la disminución de la respuesta inmunitaria por el organismo materno<sub>2</sub>.

Evidencias experimentales<sub>3</sub> indican que los aloantígenos fetales son reconocidos por el sistema inmune materno, pero este reconocimiento induce tolerancia en los linfocitos T y los linfocitos B específicos maternos. Sin embargo, a pesar de esta tolerancia inmune, también se objetiva que en muchas ocasiones en las que el embarazo fracasa hay detrás un mecanismo inmunológico, se observa que, previamente a los abortos hay importante actividad inflamatoria con activación del complemento e infiltración linfocitaria de los tejidos<sub>4</sub>.

Existen diversos lugares donde el sistema inmunitario materno puede ponerse en contacto con el feto e iniciar teóricamente el mecanismo de rechazo del aloinjerto.

Esta posibilidad se mantiene a lo largo de toda la gestación. El contacto puede producirse: En el lugar donde el blastocisto toma contacto con el endometrio para implantarse, en el espacio intervelloso, bañado por sangre materna y cubierto por el sincitiotrofoblasto de las vellosidades coriales, entre el citotrofoblasto veloso y las células del sistema inmune presentes en la decidua.

La decidua se considera el sitio donde con mayor probabilidad tiene lugar el reconocimiento inmune del trofoblasto. Es el lugar con mayor población de células del sistema inmune, con un 40% de linfocitos granulares grandes, un 20% de macrófagos y un 10% de linfocitos T. Estas proporciones varían a lo largo de la gestación. Nuestra mirada se centrará en dos procesos el de la eritropenia<sub>5</sub>.

Dosis tan bajas como 5µL de hematíes de traspaso feto-materno demuestran la capacidad de causar la inmunización al antígeno D, incluso en puérperas. Aumentando la tasa de respuesta si se aumenta el volumen por ejemplo hasta 90% para 200 ml. de glóbulos rojos desplasmatisados (1 unidad) en voluntarios sanos, y la mitad del 10% restante, si la paciente no realiza anti-D después de haber recibido incluso dos o más transfusiones los llamaremos. A éste cohorte le llamamos habitualmente "no respondedores"<sub>5</sub>.

Las pruebas de titulación de anticuerpos, como tradicionalmente le llamamos en nuestros laboratorios, consiste en medir proporcionalmente y de manera específica la concentración de una actividad idiotípica, para valorar si: a) ¿ha cesado el estímulo?, b) ¿se encuentra en un proceso de biosíntesis activo?, c) ¿es pasivo? d) ¿está consumiendo aloantígenos? ,e) ¿el consumo es autólogo u alogénico?

Necesitamos ciertos sustratos preanalíticos: 1) conocer el idiotipo, 2) que sea único en el suero/plasma (Incluso tendremos que adsorber si hay otros concomitantes), 3) adecuar al tipo de estructura antigénica, conociendo la probabilidad del número de copias por célula del antígeno que usaremos como blanco, 4) también podremos elegir el medio en que los haremos reaccionar

teniendo presente su mejor pH, 5) su rango térmico, 6) la necesidad o no de emplear suero antiglobulina.

Con todas estas variables yuxtaponiéndose al mismo tiempo, la estandarización resulta ineludible, la valorización del título como responsable de los cambios que predicen la severidad del daño fetal-neonatal por sí sola no alcanza, debemos acceder al registro y análisis de la sumatoria final del score y del puntaje final de la reacción del título.

Es preciso citar aquí que, el uso extendido de suero antiglobulínico de origen poli-específico entraña desvíos propios de su pluriespecificidad y que resulta de mayor aprovechamiento pronóstico los resultados que provienen de sueros monoespecíficos conteniendo las subclases IgG1 y 3, causantes de la patogenicidad<sup>6,7,8,9,10,11,12,13,14,15</sup>.

## **Justificación**

Las estandarización de pruebas de titulación, semicuantificación relativa de idiotipos, se lleva a cabo con el propósito de prevenir las eritropenias y eritroblastosis fetal neonatal, dichas pruebas poseen variables de sesgo procedimental interdependientes; tales como la selección de métodos, selección de reactivos, controles inter e intra ensayo y la propia experiencia del operador, el estudio. La cuantificación de las responsabilidades que implican estas categorías deben ser valoradas para reducir desvíos en los resultados<sup>16, 17,18</sup>.

## **Planteamiento del problema**

**¿Cómo influye la introducción de pruebas estandarizadas de sumatoria de score y puntuación final del título para la semicuantificación idiotípica implicada en la predicción de eritropenias fetales de origen inmune en el Servicio de Medicina Transfusional de una Maternidad de Vicente López, Provincia de Buenos Aires en el período octubre 2015 julio 2016?**

## **Hipótesis**

El método de medición sobre concentración de anticuerpos en sueros de puérperas protocolizado en una Maternidad de Vicente López mejora su performance predictiva si se introducen pruebas estandarizadas que observan las variables: puntuación final y sumatoria del score como parte de los resultados de titulación.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar las pruebas estandarizadas en la semicuantificación idiotípica implicadas en la predicción de eritropenias fetales de origen inmune en el Servicio de Medicina Transfusional de una Maternidad de Vicente López, Provincia de Buenos Aires.

### **Variables**

En la dimensión clínica, tres rasgos del proceso de titulación:

- Título
- Sumatoria del escore
- Puntuación final del título

Respecto de los anticuerpos implicados en la enfermedad hemolítica fetal-neonatal, la población objetivo de la que surgen las pruebas muéstrales resulta constituida por pacientes gestantes aloinmunizadas que asiste al Servicio de Medicina Transfusional de una Maternidad de Vicente López durante el período octubre 2015-julio 2016 en forma ambulatoria

Pasos en el análisis sobre la muestra

a) Estudiar la relación de los resultados de pruebas de titulación que resultan del empleo de suero antiglobulina poliespecífico de coombs en torno a la predicción del riesgo de enfermedad hemolítica fetal-neonatal respecto del empleo de reactivos mono-específicos de antiglobulina Tipo G de Subclase 1 y 3, en un grupo control de pacientes gestantes aloinmunizadas que asiste al Servicio de Medicina Transfusional de una Maternidad de Vicente López durante el período Octubre 2015-Julio 2016 en forma ambulatoria.

b) Comparar los resultados de pruebas de titulación que resultan del empleo de la dilución del suero de la paciente, respecto del empleo de reactivos mono-específicos de antiglobulina Tipo G de Subclase 1 y 3 en dilución controlada en torno a predecir la clínica eficiencia de los anticuerpos implicados en la enfermedad hemolítica fetal-neonatal en un grupo control de pacientes gestantes aloinmunizadas que asiste al Servicio de Medicina Transfusional de una Maternidad de Vicente López durante el período Octubre 2015-Julio 2016 en forma ambulatoria.

### **Marco de Referencia**

La enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN) se caracteriza por el acortamiento de la vida media de los hematíes fetales debido a la acción de anticuerpos maternos que atraviesan la placenta. A pesar del término EHRN, el

proceso comienza en la vida intrauterina, por lo que se ha propuesto el nombre de enfermedad hemolítica del feto y recién nacido<sup>20, 21,22</sup>.

### **Principales eventos históricos**

La enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido es una afección inmunológica aloinmune, en la cual la sobrevivencia del hematíe fetal y del recién nacido está acortada debido a la acción de anticuerpos maternos que pasan a través de la placenta y que son específicos contra antígenos de origen paterno presentes en las células rojas fetales y del recién nacido<sup>23, 24</sup>.

En 1609, la partera Louyse Bourgeois, describió en la prensa laica francesa el nacimiento de gemelos. El primero, fue una niña hidrópica que murió a las pocas horas del nacimiento. El segundo gemelo fue un niño, que nació bien, pero en las primeras horas de vida presentó un íctero intenso y en posición de opistótonos falleció<sup>25, 26</sup>.

Otros casos similares fueron descritos, hasta que en 1882, Ballantyne los reunió en una entidad nosológica denominada Hidrops foetalis universalis. En 1932, Diamond, Blackfan y Batty unificaron todos estos síndromes en una entidad que llamaron Erythroblastosis foetalis<sup>27</sup>.

En 1939, Levine y Stetson reportaron una reacción postransfusional en una mujer después del parto de un niño hidrópico. La madre presentó una hemorragia posparto y fue transfundida con sangre de su esposo. Levine demostró que la paciente tenía un anticuerpo que aglutinaba las células del esposo y postuló que se había inmunizado contra un antígeno fetal heredado del padre<sup>28, 29</sup>.

En 1940, Landsteiner y Wiener determinaron el antígeno responsable y realizaron experimentos donde reportaron que el suero procedente de conejos previamente inmunizados con células rojas de monos rhesus contenía un anticuerpo que aglutinaba el 85 % de los hematíes de sujetos caucásicos. Tales sujetos fueron llamados rhesus positivos (Rh positivos). El 15 % restante presentaba células que no aglutinaban con este suero y a estas se les llamó rhesus negativos (Rh negativo). Este experimento sirvió de marco a la inmuno-hematología moderna. Levine y otros usando el suero anti-Rh de Landsteiner y Wiener, determinaron que las pacientes reportadas en 1939 eran Rh negativas y que tenían un anticuerpo anti-Rh que aglutinaba los hematíes de sus esposos e hijos, demostrando así la etiología de la enfermedad<sup>30</sup>.

Posteriormente, C. Smith denominó a esta entidad enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, a la que hoy en día, dada la extensión de los conocimientos sobre ella, se le denomina enfermedad hemolítica perinatal (EHPN).

Desde entonces hasta la fecha han ocurrido grandes progresos en el conocimiento de los grupos sanguíneos que han permitido precisar que la EHPN no sólo se debe a anticuerpos contra el antígeno D, sino que también están involucrados otros antígenos del sistema Rh, el sistema ABO y de otros sistemas antigénicos; con los avances científicos en el diagnóstico, profilaxis y tratamiento de esta entidad se ha logrado disminuir su incidencia y morbimortalidad.

## Resumen de los datos relevantes de la historia

1609: Louise Bourgeois (comadrona): primera descripción clínica de hydropsfetalis. 1932: Diamond et al describen que anemia congénita, ictericia grave e hydropsfetalis son manifestación de la misma enfermedad: eritroblastosis fetal. 1938: Darrow postula que la hemólisis se debe al paso transplacentario de anticuerpos maternos a la circulación fetal. 1939: Levine y Stetson encuentran un anticuerpo que causa la EHRN. 1940: Landsteiner y Weiner describen el grupo sanguíneo Rh. 1954: Chow demuestra la sensibilización materna por hemorragia fetomaterna (HFM). 1966: Prevención de la EHRN mediante profilaxis Anti-D. Estudio multicéntrico (Inglaterra y Baltimore). 1971: OMS: Prevención de la sensibilización Rh. 1998: Edimburgo: conferencia de consenso sobre la profilaxis Anti-D.

## Fisiopatología

De las causas más frecuentes de hemólisis por inmunoglobulinas: anemia hemolítica autoinmune, reacción hemolítica transfusional y EHRN, es esta última la más compleja, ya que implica la producción de anticuerpos en un individuo sano (madre) y la destrucción de hematíes en otro (feto)<sup>31</sup>.

Aunque la circulación materna y la circulación fetal transcurren anatómicamente por separado, estudios mediante citometría de flujo han demostrado la existencia de pequeñas HFM en casi todos los embarazos. Así, hematíes fetales alcanzan la circulación materna y se produce la formación de aloanticuerpos maternos frente a antígenos eritrocitarios fetales. Una vez que se produce la aloinmunización, la placenta transporta activamente anticuerpos IgG a la circulación fetal; estos se unen específicamente a los hematíes fetales, que serán destruidos por el sistema mononuclear fagocítico (SMF)<sup>32</sup>. Sin embargo, no todos los anticuerpos IgG producen EHRN; en general, producen la enfermedad aquellos anticuerpos que causan destrucción acelerada de las células incompatibles. Es por tanto improbable que esté originada por anticuerpos del sistema Chido/Rodgers y Knops.

Aunque la incompatibilidad ABO es la más frecuente, pocos fetos y recién nacidos (RN) están afectados por la enfermedad hemolítica. Los anticuerpos más frecuentemente asociados con enfermedad hemolítica moderada y grave son los del sistema Rh (especialmente el anti-D, que es 50 veces más inmunogénico que otros anticuerpos de este sistema, seguido del anti-c) y los del sistema Kell. En el caso del anti-K, además de la hemólisis, el anticuerpo produce anemia en el primer trimestre de la gestación por inhibición de la eritropoyesis intramedular<sup>1</sup>. Esto puede agravar la enfermedad en las fases iniciales de la gestación. Ocasionalmente, anticuerpos frente a antígenos de otros sistemas causan enfermedad hemolítica grave en el feto y neo-nato. En ocasiones la ausencia de enfermedad en presencia de anticuerpos se debe al insuficiente desarrollo de los antígenos en los hematíes fetales y/o a la neutralización del anticuerpo por antígenos solubles.

El anti-D sigue siendo la causa más frecuente de morbilidad y mortalidad fetal por enfermedad hemolítica, a pesar de que su incidencia ha disminuido sustancialmente tras la introducción de la profilaxis anti-D<sub>32</sub>.

### **Factores inmunogénicos**

Los factores que influyen en la respuesta inmune a las células D positivas son:

1. Dosis del antígeno (volumen de hematíes D positivos). Es el factor crítico que determina la magnitud de la respuesta. La HFM se produce por procesos fisiológicos y patológicos, o por procedimientos obstétricos que causan rotura de la barrera fetomaterna de la placenta (tabla 1) La media de HFM durante el parto es menor de 1 ml; sin embargo, hasta un 0.24 % de mujeres supera los 30 ml.
2. Incompatibilidad ABO fetomaterna. Supone un efecto protector; aproximadamente un 50 % de todas las mujeres con embarazos ABO compatibles tienen hematíes fetales detectables en la circulación y sólo el 19 % de aquellas con embarazos ABO incompatibles. Esto es debido posiblemente a la rápida retirada de las células de la circulación materna por el sistema fagocítico mononuclear, principalmente en el hígado, órgano menos inmunorrespondedor que el bazo, lo que disminuye la probabilidad de estimulación de formación de anticuerpos.
3. Patrón de expresión de antígenos Rh del feto. El fenotipo R2r expresa mayor cantidad de antígeno D que los otros fenotipos siendo más efectivo en sensibilizar a las madres.
4. Capacidad de respuesta inmune de la madre. Es muy variable durante el embarazo y está influenciada por el sistema mayor de histocompatibilidad, clase II. Sólo un 16 % de madres D negativas no protegidas se sensibilizan durante el embarazo de un feto D positivo.

### **Sensibilización y desarrollo del aloanti-D**

En el primer trimestre del embarazo el paso es lento y pequeño. Solo es significativo cuando la concentración de anticuerpos anti-Rh es alta. Esto fue demostrado por Chown's (1955) y Mollison (1951) en fetos de 6 a 10 semanas, que presentaban una prueba de antiglobulina directa (PAD) positiva.

Puesto que los antígenos Rh están presentes sólo en los hematíes, la inmunización Rh-D se desarrolla en sujetos D negativos tras el contacto con antígeno D por inyección intramuscular o intravenosa de hematíes D positivos, o tras una HFM de un feto D positivo.

Como el antígeno D en el feto no está plenamente desarrollado hasta los 30-40 días de gestación y la HFM no se produce antes de la sexta semana, teóricamente la sensibilización materna por hemorragia transplacentaria no puede producirse antes de este período de gestación. El riesgo de HFM es del 1-3 % en el primer

trimestre, 43 % en el segundo y 64 % en el tercero, y en más del 50 % de los partos

El paso activo de la IgG es lento hasta la semana 24, y de aquí al final del embarazo se incrementa exponencialmente hasta alcanzar en el momento del parto niveles ligeramente superiores en el suero del recién nacido.

### **Papel de las subclases de IgG**

La concentración de las cuatro subclases de IgG es sensiblemente mayor en el cordón que en el suero materno. La IgG1 cruza la placenta en fases tempranas de la gestación y hacia la semana 20 es detectable en el suero del cordón en igual o mayor cantidad que en el suero materno. La IgG3 no alcanza ese nivel hasta la semana 28-32 y no se eleva más en el resto del embarazo. El anti-D responsable de la EHRN se produce solo como IgG1 y/o IgG3. Los casos anti-D IgG1 cursan con anemia más grave que la IgG3, quizá por una exposición más prolongada del feto a esta subclase. Sin embargo, IgG3 provoca un mayor incremento de bilirrubina en el neonato<sub>36</sub>.

Hay pruebas de que la intensidad del estímulo antigénico y la modalidad de la aloinmunización condicionan la producción de subclases de IgG. La mayoría de los casos presenta más de una subclase de IgG, pero son predominantes las IgG1 y las IgG3.

Las IgG2 y las IgG4 sensibilizan a los hematíes fetales, pero no disminuyen su vida media debido a la poca o ninguna unión a los receptores Fc de los macrófagos y a la no activación del sistema del complemento.

La IgG1 pasa a la circulación fetal a las 26 semanas de gestación. Por sus características produce una anemia más intensa y de forma precoz, aunque in vitro sea menos hemolítica que la IgG3.

La IgG3 pasa a la circulación fetal entre las 28 y las 32 semanas de gestación y produce anemia de forma tardía e hiperbilirrubinemia en el recién nacido.

La capacidad de la IgG3 de unirse a los receptores Fc de los macrófagos es mayor que la de los anticuerpos IgG1. En experimentos in vitro se ha comprobado que la IgG3 es más potente y letal que la IgG1;2, probablemente se deba a que el aclaramiento de células Rh positivas es causado por menos moléculas de IgG3 anti-D que de IgG1 anti-D.<sup>9,20,21</sup> La EHPN causada por IgG3 sola se observa con menor frecuencia, y los títulos de anticuerpos anti-D son más bajos y el cuadro clínico moderado, caracterizado por anemia tardía e hiperbilirrubinemia en el recién nacido. La combinación de estas 2 subclases produce una enfermedad hemolítica perinatal más severa.

### **Mecanismos de destrucción de hematíes**

Los mecanismos finales de destrucción inmune de hematíes son los mismos en caso de autoanticuerpos (anemia hemolítica autoinmune), aloanticuerpos contra

hematíes transfundidos (reacción hemolítica transfusional), o aloanticuerpos maternos contra hematíes fetales. Los hematíes que tienen los anticuerpos unidos a los determinantes antigénicos de la membrana son reconocidos por los macrófagos a través de receptores específicos para la fracción Fc de la IgG. La subclase IgG3 es captada con mayor avidéz por parte de este receptor. Además, la patogenicidad de los anticuerpos depende de otros factores:

- Eficiencia en el paso transplacentario de anticuerpos.
- Madurez funcional del bazo fetal.
- Presencia de anticuerpos bloqueantes relacionados con HLA.

La hemólisis *in vivo* comienza con la opsonización de los hematíes por los anticuerpos. Posteriormente, son reconocidos y eliminados de la circulación por los macrófagos en el bazo y en menor grado en el hígado. Los hematíes también pueden perder parte de su membrana por la acción de los macrófagos, volviendo a la circulación como esferocitos para después ser atrapados en el bazo, acortándose su vida media. Además de la fagocitosis mediada por receptor Fc, se cree actualmente que la citotoxicidad celular anticuerpo dependiente, puede también contribuir al daño celular durante la fase de íntimo contacto con los macrófagos del bazo.

### **Rasgos clínicos de la EHRN**

La EHRN se inicia durante la vida intrauterina por la hemólisis de los hematíes fetales recubiertos de anticuerpos. La anemia resultante conlleva una disminución de la capacidad de transporte de oxígeno y como mecanismo de compensación una hiperplasia intramedular de la serie roja y liberación a sangre periférica de formas inmaduras (*erythroblastosisfetalis*).

Cuando la capacidad de compensación de la médula es superada, aparece la hematopoyesis extramedular en hígado y bazo, lo que origina distorsión de la circulación portal, hipertensión portal y ascitis. La hipoalbuminemia causada por la disminución de la síntesis de albúmina en el hígado da lugar a una disminución en la presión oncótica con la aparición de edema generalizado, ascitis, e incluso derrame pleural y pericárdico (*hydropsfetalis*).

Otras manifestaciones son cardiomegalia, hemorragia pulmonar, etc.

La bilirrubina generada por la hemólisis es eliminada en el feto a través de la placenta. Sin embargo, si en el neonato se supera la capacidad de aclaramiento, presentará ictericia intensa y signos de afectación neurológica (*icterusgravisneonatorum*).

El nivel de hemoglobina y el recuento de hematíes del cordón, que están frecuentemente disminuidos, no siempre se correlacionan con la gravedad. En la

extensión de sangre periférica, los hematíes presentan macrocitosis, anisocitosis y poiquilocitosis. Los reticulocitos pueden representar el 30-40 % de la serie roja en RN no tratados, pudiendo ser bajos en aquellos con transfusión intrauterina (TIU). Son frecuentes los eritroblastos circulantes. Los esferocitos se ven sobre todo en casos de enfermedad por incompatibilidad ABO o en ciertos trastornos de la membrana del hematíe.

La amenaza más grave de la hiperbilirrubinemia del neonato es el daño cerebral, conocido como kernícterus. La bilirrubina no conjugada es particularmente tóxica para el tejido cerebral en que se deposita, especialmente en los ganglios basales, el tálamo, el cerebelo, la sustancia gris y la espina dorsal. El mecanismo por el que la bilirrubina libre pasa al cerebro en el RN no está del todo aclarado, pero el nivel de albúmina sérica, pH sanguíneo y la hipoxia parecen ser factores decisivos.

El nivel de bilirrubina necesario para producir kernícterus no es conocido, pero raramente se produce daño cerebral si la bilirrubina es menor de 20 mg/dl. Este umbral parece ser inferior en RN prematuros.

Existen diferentes grados de afectación. Un 45-50 % de los casos padece una enfermedad tan leve que no requiere tratamiento; un 25-30 %, aunque no desarrollan *hydrops*, padece una anemia moderada y pueden desarrollar intensa ictericia con el consiguiente riesgo de kernícterus; un 20-25 % desarrolla *hydropsfetalis*, 10-12 % antes de la 34 semanas de gestación y 10-13 % tras la semana 34. Por ello es preciso detectar precozmente y tratar a estos fetos que de otra manera tendrían alta mortalidad o probabilidad de daño cerebral irreparable.

### **Prevención de la isoimmunización Rh**

A pesar de los avances en la monitorización y tratamiento ante y posnatal, el mayor logro histórico en la EHRN ha sido su prevención, disminuyendo con su aplicación la mortalidad de 18,4 a 1,3/100.000 nacidos vivos (1977-1992). Sin embargo este sistema de prevención es imperfecto. A diferencia de las vacunas habituales, en esta enfermedad lo que se previene es la inmunización, lo que obliga a administrar Rh IgG en dosis adecuadas cada vez que exista una exposición al antígeno.

### **Mecanismo de acción**

El mecanismo exacto de acción de la IG Rh-D es desconocido aún en la actualidad. Tres teorías se han propuesto:

1. Desviación antigénica

Existen algunas evidencias que apoyan esta teoría:

a) Disminución de la frecuencia de inmunización en los casos de incompatibilidad ABO, posiblemente por la rápida retirada de las células incompatibles por el SMF del hígado.

b) El efecto supresor de anticuerpos IgG no es an-tígeno-específico. En inyecciones a voluntarios D-, K- con células D+, K+ y anti-K se observó la inhibición de la respuesta a ambos antígenos.

c) Las células D positivas recubiertas de IgG Rh-D son eficazmente eliminadas de la circulación, posiblemente por los macrófagos del bazo, que tienen una elevada expresión de FcR, antes de que sean reconocidas por las células presentadoras de antígeno.

## 2. Inhibición competitiva por bloqueo antigénico

Este mecanismo difícilmente explica la inmunosupresión mediada por anticuerpo de la IGRh ya que menos del 20 % del antígeno presente se une a la IGRh.

## 3 Inhibición central

Constituiría una teoría posible ya que el aumento de la concentración de complejos antígeno-anticuerpo en el bazo y los ganglios linfáticos podría suprimir la respuesta inmune primaria bloqueando la expansión clonal de los linfocitos B específicos mediada por linfocitos T *helper*. La respuesta inmune mediada por los linfocitos B de memoria no es, sin embargo, inhibida por la IGRh, por lo que es importante la identificación de las madres Rh-D negativas antes de que la respuesta inmune haya ocurrido. Por otra parte, la eficacia de la profilaxis antenatal se justifica porque es posible que a medida que el antígeno D es procesado, moléculas libres de anti-D (de la IGRh) compitan eficazmente por el antígeno, previniendo su unión con los receptores de los monómeros de IgM de los linfocitos B.

## Dosis e indicaciones

La dosis óptima, el momento de administración y las indicaciones han sido objeto de estudio por los distintos grupos de Norteamérica, Reino Unido y Canadá hasta la realización de documentos de consenso y guías de administración, cuya rigurosa aplicación permitiría la erradicación casi total de la EHRN. Un principio general es que 20g (100 U) de anti-D protegen frente a 1 ml de hematíes Rh-D positivos

La administración de IGRh a mujeres D negativas no inmunizadas previamente, en las 72 h tras cada alumbramiento de un RN-D positivo, previene la inmunización en la mayoría de los casos. Sin embargo, un 1,8 % de las mujeres con riesgo desarrollan anti-D, y de éstas, el 92 % lo hacen a partir de la 28 semana de gestación. La adición de una dosis de 300 g en esta semana de gestación disminuye la sensibilización al 0,12 %. La dosis de 300 g post-parto protege frente a la exposición de 15 ml de hematíes D positivos; del 0,24 % de las mujeres que

tienen una hemorragia superior a esta cantidad en el parto sólo el 30 % quedarán sensibilizadas, por lo que el fallo con esta dosis ocurrirá en el 0,08 %.

En EE.UU. todas las mujeres D negativas reciben 300 g (1.500 U) de anti-D entre la 28 y la 35 semana de gestación en todos los embarazos. Si el neonato es D positivo, esta dosis se repite tras el parto. En la mayoría de los países Europeos se administra una dosis inferior, 200-250 g (1.000-1.500 U) a la 28 semana y se repite a la 34 semana. Esta dosis se reduce aún más en el Reino Unido donde consideran que 100 g a la 28 y 34 semanas confieren la misma protección. Teóricamente, las dosis divididas tienen la ventaja de mantener un nivel elevado de IGRh a lo largo del tercer trimestre. Sin embargo, y en la práctica diaria, suponen un riesgo por falta de cumplimiento al precisar una mayor adherencia por parte de las embarazadas.

Está justificada la profilaxis IGRh en todos los casos de D parcial o débil, o débil-parcial.

### **Protección en situaciones de hemorragia fetomaterna**

En EE.UU. se utilizan habitualmente dosis de 300 g (1.500 U). En el Reino Unido la dosis depende del momento de la gestación en que se produce la HFM; así, se administran 50 g (250 U) si ocurre antes de la 20 semana de gestación y 100 g (500 U) si ocurre a partir de entonces. Esta dosis estándar es suficiente para la prevención de hemorragias menores de 4 ml de hematocrito fetal; es incrementándose la dosis (125 U/ml de hematocrito fetal) en el caso de hemorragias de mayor volumen. La Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) recomienda la cuantificación sistemática de la HFM para ajustar la dosis. La Asociación Americana de Obstetricia y Ginecología (ACOG) recomienda la cuantificación sólo en los casos de gestación múltiple, abrupción placentaria, placenta previa y extracción manual de la placenta. Si se sospecha HFM intermitente es importante repetir la dosis a intervalos de 6 semanas ya que niveles bajos de IGRh pueden paradójicamente incrementar la respuesta inmune en la presencia de un estímulo antigénico.

La cuantificación de la hemorragia se recomienda hacerla por la técnica de elución ácida de Kleihauer o equivalente, técnica de rosetas o por citometría de flujo.

La administración rigurosa en tiempo y dosis de la inmunoprofilaxis anti-D debe ser una prioridad, ya que fallos de administración constituyen aún hoy en día una importante causa de inmunización Rh.

### **Seguimiento en inmunización materna**

El objetivo del seguimiento prenatal es identificar a los fetos gravemente afectados (déficit de Hb > 7 g/dl de lo esperado para semanas de gestación), corregir su anemia y determinar el momento óptimo del parto.

La evaluación y manejo de las pacientes obstétricas con inmunización han sido ampliamente estudiados con un consenso bastante general en el tratamiento. Sin

embargo, aún existe controversia en el seguimiento respecto a las técnicas invasivas y al momento de su aplicación.

La información sobre el estado del feto se obtiene mediante la historia obstétrica, la identificación y cuantificación del anticuerpo, los ensayos funcionales, ultrasonidos, eco-Doppler de la arteria cerebral media, estudio del fenotipo fetal mediante análisis del ADN, amniocentesis estudiando la DO450 del líquido amniótico y análisis de sangre fetal para estudio de la anemia. La combinación de estos métodos invasivos y no invasivos nos permiten ser predictivos en aproximadamente el 95 % de los casos.

Una vez confirmado el diagnóstico de EHPN es necesario analizar la dinámica del proceso hemolítico, para asegurar el buen desarrollo del feto y su viabilidad.

La evolución de la gravedad de la EHPN debe basarse en la suma de los datos siguientes: Historia obstétrica y hemoterapéutica:

La EHPN tiende a manifestarse siempre como una de las formas clínica, íctero-anémica o hidrópica, que se agrava o no en las gestaciones siguientes. La presencia de un feto o recién nacido hidrópico en la historia de la gestante es un dato importante.

En cuanto a la historia hemoterapéutica se debe recordar que la transfusión de sangre incompatible produce una aloinmunización intensa.

### **Características del anticuerpo**

La mayoría de las formas graves están causadas por anticuerpos anti-D, aunque otros sistemas son capaces de producir la EHPN (Acs anti-c, -K, -S, -s, -PP<sub>1</sub>P<sup>k</sup>).

La titulación del anticuerpo es válida sólo en la primera gestación donde aparece el anticuerpo. En embarazadas inmunizadas posteriores, si el título de anticuerpos es elevado desde el comienzo, este puede aumentar más aún, disminuir o permanecer inalterado.

Por esta razón, en las pacientes previamente inmunizadas, los títulos seriados de anticuerpos no son un método confiable para evaluar el estado del feto. En estos casos debe evaluarse el líquido amniótico. Pero es en muchos casos el único método disponible.

La cuantificación del anticuerpo presenta más correlación con la severidad que el título; si es < 4-5 UI/mL, el recién nacido tendrá Hb superior a 100 g/L, la bilirrubina menor de 85 µmol/L y solamente el 4 % de ellos requieren exanguinotransfusión (ET). Si es > de 4-5 UI/mL, el 75 % de ellos necesitarán una ET y tendrán una Hb inferior a 100 g/L.

## **Estudio del líquido amniótico**

Un buen índice de la hemólisis intrauterina y de bienestar fetal es el nivel de pigmento biliar en el líquido amniótico obtenido por amniocentesis. El método de espectrofotometría, propuesto por *Liley*, permite determinar la concentración de bilirrubina en el líquido amniótico, y por consiguiente, predice la severidad de la enfermedad sobre la base de la variación de la densidad óptica a 450 nm ( $DO_{450}$ ).

El trabajo original de *Liley* era sobre fetos de más de 27 ó 28 semanas de gestación y no debe ser extrapolado hacia atrás. También pueden estudiarse otras variables fetales como la relación entre lecitina/esfingomielina para medir la madurez pulmonar, de gran importancia para decidir el momento del nacimiento.

## **Ultrasonografía**

Es un método no invasivo de inestimable valor, porque permite evaluar la función cardíaca y el tamaño del área cardíaca, hepática, esplénica, de la placenta y el volumen de líquido amniótico, que se incrementa con la hematopoyesis extramedular y la anemia progresiva. La técnica puede indicar la presencia de *hidrops* fetal.

El ultrasonido ha reducido al 20 % el riesgo de traumatismo placentario cuando se efectúa la amniocentesis, pues permite un perfil del sitio de implantación, de suma importancia si la ubicación de la placenta es anterior.

## **Extracción percutánea de sangre de cordón**

Permite establecer un diagnóstico de seguridad y gravedad, pues evalúa directamente variables hematológicas y bioquímicas del feto. Muchas veces se contamina con sangre materna o fluido amniótico; para diferenciar la sangre materna de la fetal se utilizan marcadores tales como el tamaño de los eritrocitos, la presencia de Hb fetal y la expresión de antígenos.

## **Toma de muestras de vellosidades coriónicas**

Se realiza bajo ultrasonografía. Puede obtenerse una muestra de vellosidades coriónicas a las 8-9 semanas de gestación; al romper las vellosidades se obtienen glóbulos rojos fetales y se puede efectuar la tipificación antigénica. La toma de muestra puede efectuarse por vía transabdominal o transcervical, bajo ultrasonografía.

Esta prueba presenta riesgo de HFM, con pérdidas fetales en el 0,8 %, y aumento del título de anticuerpos, por lo que debe indicarse profilaxis con gammaglobulina anti-D, si la mujer no está aloimmunizada. La indicación de esta prueba está reservada para mujeres con pareja heterocigota para el antígeno problema,

severamente inmunizadas, con antecedentes de EHPN severa y muerte intrauterina.

## **Estado del Arte**

### **Pruebas de Biología Molecular**

En los últimos años la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar el Rh fetal permitió amplificar selectivamente secuencias de ADN o ARN, produciendo grandes cantidades de ADN de longitud y secuencias definidas a partir de pequeñas cantidades de un complejo templado<sup>37, 38,39</sup>

*Bennet, Arce, Rossiter* y otros estudiaron células fetales de líquido amniótico y determinaron el Rh del feto. La determinación del antígeno D con métodos moleculares puede realizarse en vellosidades coriónicas o en líquido amniótico. Hay reportes (*Le Van Kim* y otros, 1993) de intentos de desarrollar la tipificación D por análisis del DNA de células fetales de la sangre periférica de madres Rh negativas, pero este sistema no está aún disponible como método de rutina. Esta técnica no invasiva podría convertirse en el método de elección para la tipificación del Rh fetal cuando se desarrollen mejores métodos de enriquecimiento de células fetales.

Prueba de respuesta a la oxitocina (PRO) y determinación de los valores de estriol materno: Pueden ser útiles. Aunque los niveles de estriol materno elevados indican la suficiencia de las vías metabólicas dependientes de una unidad fetoplacentariafuncionante, los valores en sí no son buenos indicadores de la severidad de la EHPN.

### **Estudios de inmunidad celular**

Los ensayos funcionales que miden la interacción entre eritrocitos sensibilizados y las células mononucleares humanas parecen ser útiles en predecir la evolución de la enfermedad hemolítica. Los más ampliamente conocidos son:

- Prueba de monocapa de monocitos (MM).
- Prueba de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La prueba de MM se demostró que predice la significación clínica de los anticuerpos en casos potenciales de enfermedad hemolítica. Serviría como prueba *in vitro* de la afinidad del anticuerpo materno por los eritrocitos fetales. Cuando la reactividad de esta prueba es mayor o igual al 20 %, se asocia con EHPN que requiere transfusión.

La prueba de ADCC puede arrojar falsos positivos, cuando existen en la madre anticuerpos bloqueadores para el receptor Fc presentes en segundos embarazos y siguientes. Los glóbulos rojos sensibilizados *in vivo* con IgG se adhieren a los

fagocitos mononucleares por medio de receptores Fc. La interacción entre el receptor y la célula blanco viene determinada por la subclase de IgG. Sólo las IgG1 e IgG3 son capaces de permitir la adhesión del glóbulo rojo a la célula efectora y de estos las IgG3 tienen la mayor actividad de adherencia. Las subclases IgG2 e IgG4 no lo hacen o es muy escasa. Se ha observado que la prueba de MM tiene similar utilidad que la prueba de ADCC; actualmente un gran número de investigadores le confieren mayor credibilidad a la prueba de MM

### **Pruebas de titulación mediante la dilución del suero antiglobulinico IgG1 e IgG3**

El uso de pruebas de titulación y de antiglobulina directa, mediante el revelado de IgG1 / IgG3 en diluciones permite la diferenciación entre bajo y alto riesgo de hemólisis. Una reacción positiva con la primera dilución tiene una sensibilidad de aproximadamente 1000 IgG1 y 125 moléculas anti-IgG3 / células respectivamente. Una reacción positiva con la segunda dilución indica una alta concentración de anti-IgG1 y / o anticuerpos IgG3<sup>40, 41, 42, 43, 44, 45, 46</sup>.

### **Diseño metodológico**

La presente investigación no experimental, se inscribe en un tipo de estudio transeccional correlacional con enfoque cuantitativo (Hernández Sampieri 2004), analizando las causales efectoras en la relación de diferentes procesos participes de la semicuantificación idiotípica implicadas en la predicción de eritropenias fetales-neonatal de origen inmune en un grupo de pacientes gestantes aloinmunizadas que asistieron al Servicio de Medicina Transfusional de una Maternidad de Vicente López durante el período Octubre 2015 - Julio 2016 en forma ambulatoria. El presente estudio analiza los datos aportados por la primera cohorte (Octubre 2015-Abril 2016). Aportando valor explicativo<sup>47</sup> a la construcción de una hipótesis de relación sobre las variables de origen de los sesgos procedimentales en la práctica de titulación de anticuerpos.

### **Población y muestra**

La población bajo análisis corresponde a todas las gestantes que ingresan de manera ambulatoria desde la cuarta semana de embriogénesis hasta la etapa parto en la unidad de observación del Servicio de Obstetricia de una Maternidad de Vicente López en el período Octubre 2015 - Julio 2016; en tanto que la Unidad de Observación corresponde solo a aquellas gestantes sin historia de transfusiones con eritrocitos o plaquetas, que durante el transcurso de la gestación desarrollen anticuerpos no idiotipo heterófilo, solo de naturaleza IgG, caracterizado como implicado en eritropenias fetal-neonatal.

Criterios de selección para la población muestral

### Criterios de exclusión

Pacientes con múltiples aloanticuerpos, aquellas que se encuentren en programa de profilaxis anti-D antenatal o hayan desarrollado anticuerpos de naturaleza autoinmune

### Criterio temporo-espacial

Gestantes donde no sea posible la evaluación de al menos dos muestras consecutivas en el proceso de evaluación.

### Criterio de eliminación

Gestantes que, incluidas en la evaluación por cumplir con los anteriores criterios de aceptación, desarrollen más de un idiotipo, rasgos serológicos de autoinmunidad o reciban profilaxis anti-D antenatal durante el período de evaluación u otros estímulos inmunológicos como transfusiones de eritrocitos o plaquetas.

**Tabla I- Criterios para la conformación de la población bajo estudio**

Criterios			
Inclusión	Exclusión	Temporo-espaciales	Eliminación
Gestante adulta	Aborto	Primer ejemplar 12-14 semanas de gestación	Transfusiones
Detección de anticuerpos positiva	Heterofilia Idiotípica	Cronobiología tres ejemplares consecutivos períodos 28-30 días.	Desarrollo de Autoanticuerpos
Identificación de idiotipo único implicado en EHRN	Heterofilia Isotípica		Reciban profilaxis anti-D
Firma de consentimiento			Perdida de variables de inclusión

### Muestreo

Para la selección de las pacientes de la Primer cohorte Octubre 2015-Abril 2016 plausibles de participar en la unidad de análisis, se introduce un instrumento de selección muestral no probabilístico, dirigido por la siguiente secuencia de eventos (Categorías del I al VII)

### Categorías

Gestante adulta (I) de al menos cuatro semanas o más de embriogénesis (II) con prueba de detección de anticuerpos positiva cursando las 14 a 17 semanas de gestación (III), con pruebas de identificación de idiotipo único (IV), de isotipo IgG exclusivo (V), implicado en eritropenias fetal-neonatal que (VI), que asiste al menos a tres eventos de extracción de espécimen sérico en el período de evaluación (VII) y no recibe otros estímulos antigénicos (VIII).

### **Métodos de recolección de información empírica**

Se establece como instrumento para la recolección de los datos que orienten la decisión de incorporación de la paciente a la evaluación, las entrevistas médicas, se encuentran en el **ANEXO I** del presente trabajo, conteniendo las atribuciones que establecen las categorías señaladas (I al VIII) dentro del período de evaluación.

### **Instructivo para la recolección de datos**

#### **La entrevista médica**

El lugar y las circunstancias donde se desarrollará la entrevista médica es el sector de acceso de pacientes ambulatorios de una Maternidad de Vicente López – Hemoterapia luego de validar las variables: privacidad, silencio e iluminación.

Recomendaciones: No serán aceptadas entrevistas del tipo “consultas de pasillo”. Se debe programar un tiempo razonable para atender bien a cada paciente. La citación de los enfermos debe estar debidamente planificada.

Cuidado: Se deben respetar las medidas de aislamiento bacteriológico. Los pacientes están incluidos en riesgo de padecimiento potencial de infecciones, que también de ser enfermos, se puede transmitir al operador de la entrevista (ej.: tuberculosis pulmonar, meningitis meningocócica, SIDA, etc.) durante la entrevista. Precauciones: lavarse las manos, usar mascarillas, delantal, vacunarse Hepatitis Viral B. El lavado de manos entre cada paciente es muy importante para evitar transmitir infecciones.

### **Notificación a las participantes - Consentimiento informado<sub>48</sub>**

*Estamos invitando a todas las embarazadas adultas, dentro de las 12-14 semanas de gestación que son atendidas en un Maternidad de Vicente López, para participar en la investigación sobre protocolos de laboratorios estándares que creemos mejorarán la calidad de nuestras prácticas.*

*Trabajaremos con los datos de tres entrevistas (cada 28-30 días), una serie de preguntas sobre su embarazo y algunos antecedentes de su salud. En cada ocasión le extraeremos una muestra de sangre, las muestras de sangre son del tamaño de una cucharada de sopa. Al participar en esta investigación es posible que experimente molestias como el que le preguntes varias veces lo mismo*

sanguínea o pincharle las venas y el posterior desarrollo de un pequeño hematoma.

Su participación está indicada por el médico tratante, pero usted puede elegir participar o no hacerlo, igual recibirán todos los servicios que generalmente recibe participe o no. Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes

Si está de acuerdo firma este consentimiento.

## Tabla II Hoja de recolección de datos

### MATERNIDAD DE VICENTE LÓPEZ - INMUNOHEMATOLOGÍA

Protocolo Vigente 12.01.2014

## HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Tache lo que no corresponde – Complete los datos vacíos

<b>ID</b>	<b>Margarita Benites</b>										
<b>FN</b>	<b>Edad</b>	<b>Raza</b>			<b>FUM</b>			<b>FPP</b>			
	35	A	C	AF							
Hijos	1	2	3	4	5	6	Abortos	1	2	3	No sabe
Transfusiones	SI	No	No sabe	GR	PQ	PF					No sabe
Detalles: No conoce si ha recibido transfusiones en una cirugía laparoscópica de vesícula hace dos años											
<b>Pruebas Inmuno hematológicas</b>											
ABO:	RhD:	Lote:		Fenotipo:							
DAI	Fecha: 20.05.2014	LOTE PANEL 2020u3					Negativo		Positivo		
AGHD Lote:	Negativo		Positivo		Ig G	C3d	Ig A	IgM			
<b>Pruebas de identificación anticuerpos positiva</b>											
Patente:											
● <b>Primer Titulación</b>							<b>Fecha:</b>				
ID	F Muestra		T	PF	SS		Valida				
							SI NO				
<b>Nuevo panel identificador anticuerpo</b>							Fecha:				
Conserva especificidad	Negativo		Nueva especificidad:								
● <b>Segunda Titulación</b>											
ID	F Muestra		T	PF	SS		Valida				

ID2-					SI	NO
• Tercer Titulación						
Nuevo panel identificador anticuerpo				Fecha:		
Conserva especificidad	Negativo	Nueva especificidad:				
ID	F Muestra	T	PF	SS	Valida	
ID3-					SI	NO

FN: Fecha nacimiento. F.U.M.: Fecha ultima menstruación. F.P.P.: Fecha probable de parto. T: título. PF: Punto Final. SS: Sumatoria del Score. AGH: Prueba Directa antiglobulina. DAI: Detección Anticuerpos Irregulares

**Figura I - Ejemplo Hoja de recolección de datos completa**

MATERNIDAD SANTA ROSA DE VICENTE LOPEZ - INMUNOHEMATOLOGIA

Protocolo Vigente: 12.01.2014

**HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Tache lo que no corresponde – Complete los datos vacíos

<b>ID98979-14</b>		<b>Margarita Benites</b>										
<b>FN</b>	<b>Edad</b>	<b>Raza</b>			<b>FUM</b>			<b>FPP</b>				
<b>12-04-1979</b>	35	<del>A</del>	C	<del>AF</del>	<b>12-03-2014</b>			<b>17-12-2015</b>				
Hijos	1	<del>2</del>	<del>3</del>	<del>4</del>	<del>5</del>	<del>6</del>	Abortos	<del>1</del>	<del>2</del>	<del>3</del>	<del>No sabe</del>	
Transfusiones	<del>SI</del>	No		<del>No sabe</del>		<del>OR</del>	<del>PO</del>	<del>DE</del>	<del>No sabe</del>			
Detalles: No conoce si ha recibido transfusiones en una cirugía laparoscópica de vesícula hace dos años												
<b>Pruebas Inmunoematológicas</b>												
ABO: <b>A</b>		RhD: <b>(o)</b>		Lote: <b>x8756</b>		Fenotipo:		<b>ce</b>				
DAI	Fecha: 20.05.2014	LOTE PANEL 2020u3					<del>Negativo</del>	Positivo				
AGHD Lote: <b>878457</b>	Negativo		<del>Positivo</del>		<del>IgG</del>	<del>C3d</del>	<del>IgA</del>	<del>IgM</del>				
<b>Pruebas de identificación anticuerpos positiva</b>												
Patente: <b>Anti-D (IgG)</b>												
• <b>Primer Titulación</b>						<b>Fecha:</b>						
ID	F Muestra	T	PF	SS	Valida							
<b>ID1-0289876</b>	<b>22-05-2014</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>21</b>	SI	<del>NO</del>						
<b>Nuevo panel identificador anticuerpo</b>						<b>Fecha:</b>						
Conserva especificidad		Negativo			Nueva especificidad:							
• <b>Segunda Titulación</b>												
ID	F Muestra	T	PF	SS	Valida							
ID2-					SI	NO						
• <b>Tercer Titulación</b>												
<b>Nuevo panel identificador anticuerpo</b>						<b>Fecha:</b>						
Conserva especificidad		Negativo			Nueva especificidad:							
ID	F Muestra	T	PF	SS	Valida							
ID3-					SI	NO						

FN: Fecha nacimiento. F.U.M.: Fecha última menstruación. F.P.P.: Fecha probable de parto. T: título. PF: Punto Final. SS: Sumatoria del Score. AGH: Prueba Directa antiglobulina. DAI: Detección Anticuerpos Irregulares

## **Estratificación**

Primer Cohorte distribuido en tres grupos por fechas de extracción de muestras

### **Proceso de inclusión y exclusión de ejemplares**

Sobre un total de 287 pacientes evaluadas, según Criterio I, quedaron incluidos veinticuatro (24) ejemplares en la primer etapa (8,36%) y luego de que la pesquisa de anticuerpos irregulares resultara positiva, según indica el criterio II.

Un ejemplar **(1)** fue excluido por desarrollar más de un anticuerpo en la segunda etapa (ID1075) aplicando el criterio III.

Un ejemplar **(1)** excluido por poseer concomitantemente isoforma IgM (ID1000) aplicando el Criterio V en la segunda etapa.

En la tercer etapa por incumplimiento del criterio VII tuvieron que ser excluidos cuatro **(4)** ejemplares de muestra (ID1041, ID1004, ID1002, ID1124) y un **(1)** ejemplar excluido ID1170 por criterio VIII - (Ver ANEXO II) -

Resultando como sustrato de análisis **17 pacientes** (5,9 %) incluidos con tres ejemplares cada uno (51 muestras).

La recolección de muestras de otros estratos continuó hasta Julio 2016, los datos aún se encuentran en revisión.

Los datos recolectados se ilustran en

**Tabla I** – Datos de los ejemplares, criterios de inclusión y eliminación

**Tabla VI, VII y VIII** – Resultados comparados de Título, Sumatoria de Score y Puntaje Final

## **Variables**

### **Mediciones**

Para la estandarización, se estudiaron los resultados de las variables asociadas a la potencia de reacción de los anticuerpos demostradas in vitro, éstas vinculadas con la biogénesis y la concentración en idénticos volúmenes de suero son:

- 1) **Título**
- 2) **Sumatoria del Score de Reacción**
- 3) **Puntaje final del Título**

Las mediciones se obtienen a partir de la lectura macroscópica, sobre aglutinación en tubo, a tras luz en un aglutinoscopio, el reactivo revelador conteniendo IgG (humana) + C3d Mo109-b (Monoclonal) Marca BioRad (EUA) Lote: 1123-9. El suero antiglobulina poliespecífico humano (SAGPH) actúa inmovilizando las inmunoglobulinas ligadas a los antígenos tras la etapa de incubación. Los resultados negativos se validan mediante el agregado de células sensibilizadas con anti-D humano, siendo en todos los casos el resultado esperado (reactivo).

El ejemplar de suero se enfrenta a un volumen medio de eritrocitos reactivo de fenotipo conocido -blanco para el idiotipo analizado- sometiéndose por el término de 30 minutos a incubación húmeda de 37°C. La prueba se lee tras una centrifugación a 1000 rpm 30 segundos en medio SAGPH.

- 1) El **título**, consiste en indicar la última dilución donde se produjo aglutinación de potencia una cruz de reacción, según una tabla de potencias (1+)
- 2) La **sumatoria del score** de reacción, consiste en sumar los puntajes obtenidos en todas las reacciones a las que se sometieron las diferentes diluciones de suero.
- 3) El **puntaje final del título** se calcula como la última dilución que ha resultado reactiva la prueba (w).

**Tabla III - Valores incluidos en la tabla de potencia**

<b>Score</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Puntaje</b>
++++	Un aglutinato completo fondo limpio	12
+++	Varios aglutinados grandes fondo limpio	8
++	Varios aglutinados medianos fondo limpio	5
+	Múltiples aglutinados (fondo microaglutinados)	2
w	Microaglutinados (fondo completo)	1 (débil)
H	Hemolisis parcial	Reactivo
CM	Cualquier mezcla de los aspectos mencionados	Campo mixto

En la escala ordinal, el 12 asume el mayor puntaje (corresponde a 4+) pero en el caso de repetirse el valor tras diluciones seriadas, deberá asumir el valor menor de 11 hasta llegar a (3+) que tendrá un puntaje de 10, 9, siendo el mínimo 8. El máximo para las (2+) de 7 y mínimo de 5 puntos; el máximo de (1+) es de 4 puntos y el mínimo de 2 puntos. W vale siempre 1 punto.

### **Celularidad**

Se considera oferta estable de antígenos al empleo de la misma celularidad, es decir proveniente de un único donador, siendo de predilección el genotipo que posee la misma información a ambos lados del haplotipo Rh. Para ello se conservan los sueros históricos a -18°C y se emplean en pruebas en paralelo.

En este caso se emplearon los siguientes 7 (siete) donadores de perfil fenotípico conocido BioRad Lote: xx.106.2234 en una dilución comercial al 2% en medio estabilizado 7,4pH.

**Tabla IV – Antígenos presentes en las células de prueba**

ID	C	c	E	e	D	K	k	N	S	s	M	Jsb	Jsa	Fya	Fyb
100238	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	nt	+	0
212142	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+
189800	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	nt	nt	+	0
101387	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	nt	nt	0	+
987612	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	nt	nt	0	+
E23447	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	nt	nt	0	+
033778	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	nt	nt	+	+

(nt): No testeado; (0): negativo; (+): positivo.

### **Medio de dilución del suero**

Se empleó suero inerte del tipo 001003 (AB), sin actividad iso-idiotípica confirmada por doble determinación de pesquisa de anticuerpos irregulares negativo en pruebas en Gel Sephadex G100.

**Tabla V - Cronograma de actividades**

Actividad	Año								
	2015				2016				
	Meses								
	Sep	Oc	No	Di	En	Fe	Ma	Ab	Marzo
.	t	v	c	e	b	r	r	2017	
1. Solicitud de acceso a la institución									
2. Diseño del cuestionario									
3. Prueba piloto del instrumento									
4. Ajuste del instrumento									
5. Recolección de datos									
6. Procesamiento de datos									
7. Compulsa teórica									
8. Redacción de informe final									
9. Presentación de la tesina									

**Resultados sobre los 17 ejemplares incluidos**

**Tabla VI Análisis de las variables sobre el Primer ejemplar de muestra**

ID/Dilución	1082	1133	1175	1075	1074	1157	1037	1041	1097	1004	1002	1080	1056	1119	1124	1038	1105	1170	1131	1141	1241	1000	1024	1058
2	x	xx	xx	x	xx	x	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xx	xxx	xxxx	xx	x	x	xx	x	xxx	x	xxx	xx	x
4	x	x	x	o	x	x	xx	xxx	xxx	xx	x	x	xx	xxxx	xx	x	x	x	x	xx	o	xx	x	x
8	o	o	w		w	o	x	xx	xx	x	x	o	x	xxx	x	o	o	x	w	x		x	x	w
16			o		o		w	x	x	x	w		x	xxx	x			o	o	x		x	w	o
32							w	o	w	w	o		w	xx	x					w		w	o	
64							o		o	w			w	xx	o					w		o		
128										o			o	x						o				
512														w										
1024														w										
2048														w										
4096														o										
Título	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,125	0,0625	0,0625	0,0625	0,125	0,25	0,0625	0,0078125	0,03125	0,25	0,25	0,125	0,25	0,0625	0,5	0,0625	0,125	0,25
Puntaje Final	4	4	8	2	8	4	32	16	32	64	16	4	64	2048	32	4	4	8	8	64	2	32	16	8
Título Fracción	4	4	4	2	4	4	8	16	16	16	8	4	16	128	32	4	4	8	4	16	2	16	8	4
Sumatoria Score	5	7	8	2	10	5	17	26	27	24	13	7	20	56	21	5	5	10	6	20	2	19	11	6

**Tabla VII Análisis de las variables sobre el Segundo ejemplar de muestra**

ID /Dilución	1082	1133	1175	1075	1074	1157	1037	1041	1097	1004	1002	1080	1056	1119	1124	1038	1105	1170	1131	1141	1241	1000	1024	1058
2	x	xx	xx		xx	x	xxxx	xxx	xxx	xxx	xx	xx	xxx	xxxx	xx	x	x	xx	x	xxxx	x		xx	x
4	x	x	xx		x	x	xxx	xxx	xxx	xx	x	x	xx	xxxx	xx	x	x	x	x	xxx	o		x	x
8	o	o	x		w	o	xx	xx	xx	x	x	w	x	xxx	x	o	o	x	w	xx			x	w
16			w		o		x	x	x	x	w		x	xxx	x			w	o	x			w	o
32							w	o	w	w	o		w	xx	x			w		w			o	
64							o		o	w			w	xx	o					w				
128										o			o	x						w				
512														w						w				
1024														w										
2048														w										
4096														o										
Título	0,25	0,25	0,125		0,25	0,25	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,125	0,25	0,0625	0,0078125	0,03125	0,25	0,25	0,125	0,25	0,0625	0,5		0,125	0,25
Puntaje Final	4	4	16		8	4	32	16	32	64	16	4	64	2048	32	4	4	32	8	512	2		16	8
Título Fracción	4	4	8		4	4	16	16	16	16	8	4	16	128	32	4	4	8	4	16	2		8	4
Sumatoria Score	5	9	14		10	5	23	26	27	24	13	8	20	56	21	5	5	12	6		2		11	6

**Tabla VIII Análisis de las variables sobre el Tercer ejemplar de muestra**

ID /Dilución	1082	1133	1175	1075	1074	1157	1037	1041	1097	1004	1002	1080	1056	1119	1124	1038	1105	1170	1131	1141	1241	1000	1024	1058
2	x	xx	xxx		xx	x	xxxx		xxx			xx	xxx	xxxx		x	x		x	xxxx	x		xx	x
4	x	x	xx		x	x	xxx		xxx			x	xx	xxxx		x	x		x	xxx	o		x	x
8	o	o	x		w	o	xx		xx			w	x	xxx		o	o		w	xx			x	w
16			w		o		x		x			w	x	xxx					o	x			w	o
32			w				w		w			w	xx							x			o	
64			w				w		o			w	xx							w				
128							w					o	x							w				
512							w						w							w				
1024							w						w											
2048													w											
4096														o										
Título	0,25	0,25	0,125		0,25	0,25	0,0625		0,0625			0,25	0,0625	0,0078125		0,25	0,25		0,25	0,03125	0,5		0,125	0,25
Puntaje Final	4	4	32		8	4	1024		32			4	64	2048		4	4		8	64	2		16	8
Título Fracción	4	4	8		4	4	16		16			4	16	128		4	4		4	32	2		8	4
Sumatoria Score	5	9			10	5			27			9	20	56		5	5		6	32	2		11	6

**Tabla IX - Valorización de los resultados discrepantes**

Casos discrepantes	Título	Puntaje Final	Sumatoria de Score
1175	NO Corrimiento	Corrimiento	Significativo
1037	NO Corrimiento	Corrimiento	Significativo
1080	NO corrimiento	NO Corrimiento	No significativo
1170	NO corrimiento	Corrimiento	No significativo
1141	NO Corrimiento	Corrimiento	Significativo

**Análisis de los datos clínicos de casos discrepantes**

1175 -Paciente en la semana 15 de gestación (09/10/2015) conteniendo idiotipo exclusivo Anti-C de isotipolgG 1, cuya fecha probable de parto es (30/04/2016)

1037 -Paciente en la semana 16 de gestación (30/10/2015) conteniendo idiotipo exclusivo Anti-D de isotipolgG1, 3. Cuya fecha probable de parto (24/04/2016)

1080 -Paciente en la semana 16 de gestación (06/10/2015) conteniendo idiotipo exclusivo Anti-C de isotipolgG1, 3. Cuya fecha probable de parto(09/04/2016)

1170 - Paciente en la semana 15 de gestación (06/11/2015) conteniendo idiotipo exclusivo Anti-D de isotipolgG1, 3. Cuya fecha probable de parto (18/04/2016)

1141 -Paciente en la semana 16de gestación (13/11/2015) conteniendo idiotipo exclusivo de isotipo Anti-E IgG1. Cuya fecha probable de parto (23/04/2016)

## Descripción

- 1175 Existe una valoración del corrimiento del **Título** entre primer y segundo ejemplar histórico, pero no se advierte esta modificación respecto del tercer ejemplar, en cambio sí se modifica el **Puntaje Final** entre el primer y último ejemplar de modo significativo.
- 1037 Existe una valoración del corrimiento del **Título** entre primer y segundo ejemplar histórico, pero no se advierte esta modificación entre el segundo y el tercer ejemplar a pesar de cambiar el **Puntaje Final** y la **Sumatoria del Score** entre esos ejemplares.
- 1080 Observamos cambios en la **sumatoria de score** sin cambios en el título.
- 1170 Advertimos cambios en el **Puntaje Final** sin modificaciones en el título.
- 1141 Se valora el corrimiento de la **Sumatoria del Score** producido en el primer y segundo ejemplar sin cambios en el título.

## Conclusiones

Con la estandarización de las pruebas de titulación y el agregado del análisis de las dos variables bajo estudio: Puntuación final del título y Sumatoria del score de reacción se consigue la obtención de resultados más precisos, poniendo en evidencia que la ponderación exclusiva de la variable: **Título**, no alcanza para predecir tempranamente la magnitud de desarrollo -monto o potencia- de algunos ejemplares de anticuerpos (20%), no pudiendo establecerse con exactitud el riesgo de enfermedad hemolítica del recién nacido.

La valoración de los rasgos “sumatoria del score y puntuación final” en las pruebas de titulación configuran rasgos que junto al título, predicen la importancia clínica de los anticuerpos implicados en la enfermedad hemolítica fetal-neonatal.

## Bibliografía

- 1- Bowman JM. Immune hemolytic disease. En: Nathan DG, Orkin SH, ed. Hematology of infancy and childhood. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1998:53-78.
- 2- Clóvis P. Enfermedad hemolítica perinatal. En: López Borrasca A. Enciclopedia iberoamericana de hematología. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca, 1992:424-38.
- 3- De Palma L, Luban NLC. Alloimmune hemolytic disease of the newborn. En: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, ed. Williams Hematology. 5th ed. New York: Mc Graw Hill, 1995:697-704.
- 4- Foerster J. Alloimmune hemolytic anemias. En: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, eds. Wintrobe's clinical hematology. 10a ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1998:1210-32.
- 5- Zipursky A, Bowman JM. Isoimmune hemolytic diseases. En: Nathan DG, Oski FA, eds. Hematology of infancy and childhood. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 1993:44-73.
- 6- Zupanska B, Brojer E, Richards Y. Serological characteristics of maternal anti-Rh (D) antibodies in predicting the severity of haemolytic disease of the newborn. Vox Sang 1989; 56:247-9.

- 7- Garratty G, Nance SJ. Correlation between in vivo haemolysis and the amount of red cell-bound IgG measured by flow cytometry. *Transfusion* 1990; 30:617-20.
- 8- Pollock JM, Bowman JM. Anti.Rh (D) IgG subclasses and severity of Rh disease of the newborn. *Vox Sang* 1990; 59:176-8.
- 9- Brekke OH, Michaelsen TE, Sandlie I. The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge? *Immunol Today* 1995; 16:85-7.
- 10-Michaelsen TE, Frangione B, Franklin EC. Primary structure of the hinge region of human IgG3. Probable quadruplication of a 15-amino acid residue basic unit. *J BiolChem* 1977; 252:883-5.
- 11-Abrahamson N, Schur PH. The IgG subclasses of red cell antibodies and relationship to monocyte binding. *Blood* 1972; 40:500-9.
- 12-Engelfriet CP, De Lange GG, Zijdeveld M, Maas N. The determination of the IgG subclass of red cell antibodies. *Biotest Bull* 1986; 1:2-5.
- 13-Liatsis M, Kanariou M, Petridou E, Moraloglou O, Revinthi K, Mandalenaki-Lambrou K, et al. Serum immunoglobulin G subclasses in healthy infants and children in Greece. *Eur J Epidemiol* 1997; 13(2):151-5.
- 14-Hadley AG. A comparison of in vitro tests for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 1998;74:375-83
- 15-Kaushansky K, Lichtman MA, Kipps TJ, et al. *Williams hematología*. 8. Nueva York: McGraw-Hill; 2010. aloinmune enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido.
- 16-Guideline for blood grouping and antibody testing, British Committee for Standards in Haematology([en línea](#) revision 04-11-2016)
- 17-Sally V. Rudmann. *Textbook of Blood Banking and Transfusion Medicine Standardization The titer of the maternal serum*. Cap VI, pp430; Elsevier Health Sciences; 2005.
- 18-S.G. Sandler and S. Sathiyamoorthy, Laboratory methods for Rh immunoprophylaxis: a review, *Immunoematology*; Volume 26, Number 3, pp 110, 2010.
- 19-Klemperer MR. Anemia hemolítica: defectos inmunes. En: Miller DR, Pearson HA, Baehner RL, McMillan CW, eds. *Hematología pediátrica*. 3ra ed. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1986:291-320.
- 20-Linares J. Enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad ABO (EH-ABO). *Rev Argent Transf* 1996; 12(1):11-21.
- 21-Contreras M. Antenatal tests in the diagnosis and assessment of severity of haemolytic disease (HD) of the fetus and newborn (HDN). *Vox Sang* 1994; 67:207-9.
- 22-Lubenko A, Contreras H, Rodeck CH, Nicolini U, Savage J, Chana H. Transplacental IgG subclass concentrations in pregnancies at risk of haemolytic disease of the newborn. *Vox Sang* 1994; 67:291-8.

- 23-American Association of Blood Bank, Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunología. Manual Técnico. 12a ed. Buenos Aires: Edigraf, 1997:443-60.
- 24-Queenan JT. Eritroblastosis fetal. En: Fanaroff AA, Martin RJ, Merkatz IR, eds. Behrman. Enfermedades del feto y del recién nacido. La Habana: Editorial Científico-Técnica, 1986:58-68.
- 25-Bromilow IM, Duguid JKM. Measurement of feto-maternal haemorrhage: a comparative study of three Kleihauer techniques and two flow cytometry methods. ClinLabHaematol 1997; 19:137-42.
- 26-Catalán MA. Conceptos actuales en diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica del recién nacido. Rev Argent Transf 1996; 22:23-37.
- 27-Lo Y, Bowel PJ, Selinger M. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. Lancet 1993; 341:1147-8.
- 28-Lee D, Contreras M, Robson SC, Rodeck CH, Whittle MJ. Recommendations for the use of anti-D immunoglobulin for Rh prophylaxis. Transf Med 1999; 9:93-7.
- 29-Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 8 ed. Oxford: BlackwellScientific, 1987.
- 30-Hadley AG, Turner C. Pathophysiology of the alloimmunocytopenias. En: Hadley A, Sorthill P, eds. Alloimmune disorders of pregnancy. Cambridge: University Press; 2004. p.1-20.
- 31-Hulett MD, Hogarth PM. Molecular basis of Fc receptor function. AdvImmunol 1998; 57:1-127.
- 32-Deo YM, Graziano RF, ReppR, Van de Winkel JGJ. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gammaR-directed immunotherapies. Immunol Today 1997; 18:127-35.
- 33-Kumpel BM, Hadley AG. Functional interactions of red cells sensitised by IgG1 and IgG3 human monoclonal anti D with enzyme- modified human monocytes and Fc R-bearing cell lines. MollImmunol 1990; 27:247-56.
- 34-Woodrow JC. Rh immunization and its prevention. Series Haematologica 1970; 3:1-151.
- 35-Kohler PF, Farr RS. Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin:evidence for an active placental IgG transport. Nature 1966; 210:1070-1.
- 36-Steiner EA, Judd WJ, Oberman HA. Percutaneous umbilical blood sampling and umbilical vein transfusions: rapid serologic differentiation of fetal blood from maternal blood. Transfusion 1990; 30:104-8.
- 37-Rossiter JP, Blakemore KJ, Cickler TS, Kasch LM, Khouzami AN, Pressman EK, et al. The use of polymerase chain reaction to determine fetal Rh-D status. Am J ObstetGynecol 1994; 171:1047-51.

- 38-Le Van Kim C, Mouro I, Brossard Y, Charine J, Cartron JP, Colin Y. PCR-based determination of Rh c and Rh E status of fetuses at risk of Rh c and Rh E haemolytic disease. *Br J Haematol* 1994; 88:193-5.
- 39-Zupanska B. et al; Phagozytosis of erythrocytes sensitized with known amounts of IgG1 and IgG3 anti-Rh antibodies. *Vox Sang* 53 (1987) 96-101.
- 40-Lynen R. et al; Flow cytometric analyses of the subclasses of red cell IgG antibodies. *Vox Sang* 69 (1995) 126-130.
- 41-Lynen R., B.Bernbeck et al: Flow cytometric determination of IgG subclasses and quantitation of red cell allo- and autoantibodies. p.49-58 in: Gutensohn
- 42-K, Sonneborn H-H, Kühnl P (eds.): *Aspects of the Flow-Cytometric Analysis of Red Blood Cells*. Clin Lab Publications, Heidelberg 1997.
- 43-Lynen R, Bernbeck B, Legler TJ, Köhler M: Studies on the sensitivity of IgG red-cell antibody determination using the gel centrifugation test and flow cytometry.
- 44-New Dimensions for Gel Test Procedures; Satellite Symposium during the ISBT Meeting in Frankfurt, October 1st 1997.
- 45-Lynen R. et al; ISBT Meeting in Vienna July 9-14 2000
- 46-Hernández Sampieri R. *Metodología de la Investigación*, Mc Graw Hill, pp 108. 2004.
- 47-Organización Mundial de la Salud (OMS). Comité de Evaluación Ética de la Investigación. (CEI) Modelo de Consentimiento Informado ([on line](#) revisado 0.-11-2016)