

Editorial

La posibilidad de que la transfusión sanguínea se pueda utilizar como terapia de apoyo para un sinnúmero de padecimientos inicia con el descubrimiento de los grupos sanguíneos por Karl Landsteiner en 1900. Desafortunadamente la epidemia del SIDA, durante la década de los 90, modificó ostensiblemente sus parámetros para obtención, estudio y uso. De entonces a la fecha se han mejorado de manera notable los estudios para aumentar su seguridad y progresivamente se han sentando las bases de la especialidad de Medicina Transfusional. En la actualidad la colección, almacenamiento y estudio de la sangre son procesos complejos que operan de manera muy parecida a la manufactura o producción de cualquier tipo de fármaco. La Medicina Transfusional es, por tanto, una disciplina compleja con tecnología médica muy avanzada, que involucra a un sinnúmero de especialidades no sólo médicas, sino también de otros campos del conocimiento, las cuales tienen repercusiones en el mundo de la ciencia y la tecnología, con sus respectivas implicaciones éticas.

Conscientes de estos hechos, el grupo profesional médico y paramédico dedicados a la transfusión en México, crea en el 2001 la *Asociación Mexicana de Medicina Transfusional A.C.*, cuya misión es propiciar la capacitación y actualización continua del personal involucrado en la Medicina Transfusional por medio de actividades educativas de alto nivel, consensos y foros de discusión que permitan el intercambio de ideas, el desarrollo científico, tecnológico y académico de sus asociados, para poder elevar la seguridad transfusional en México. Por tal razón, el año pasado la Mesa Directiva 2006-2008 de la

Asociación Mexicana de Medicina Transfusional A.C., inició con gran entusiasmo y esfuerzo la publicación del primer número de la *Revista Mexicana de Medicina Transfusional*, como *Órgano Oficial de la Asociación Mexicana de Medicina Transfusional A.C.*

Para la Mesa Directiva actual y el Comité Editorial dignamente dirigido por el Dr. Jorge Espinosa Turcott, dar la continuidad con este segundo número representa un gran avance y pretende a mediano plazo que la Revista se constituya en el principal vehículo de comunicación a nivel nacional e internacional de los profesionales mexicanos y latinoamericanos, dedicados a las diferentes ramas de la Medicina Transfusional, logrando de esta manera la posibilidad de transmitir sus experiencias, logros, retos y proyectos con el reconocimiento y solidificación de esta novel especialidad.

Hemos seleccionado para este número una serie de artículos muy interesantes, relacionados con avances científicos en el área transfusional, escritos por distinguidos científicos nacionales, a los cuales les reiteramos nuestro agradecimiento por compartir sus experiencias y apoyo desinteresado. Así mismo, agradecemos el trabajo del Comité Editorial y Científico que es una parte vital de la integración y solidificación de cualquier revista de divulgación científica médica.

Por último, les invitamos a seguir colaborando con sus artículos, logrando de esta manera la continuidad y periodicidad en la publicación de nuestra Revista.

Dra. Amalia Gpe. Bravo Lindoro
Presidenta 2008-2010
Asociación Mexicana de Medicina
Transfusional, A.C.

Artículo de revisión

Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la determinación del antígeno Diego^b utilizando iniciadores de secuencia específica (SSP)

Martínez-Álvarez JC,* Alcaraz-López JL,* Arrazola-García A,*
Suárez-Cruz A,* Pérez-Rodríguez M,** Rivera-López R,*
Ambriz-Fernández R*

Resumen

Los anticuerpos anti-Di^a y anti-Di^b son generalmente IgG que causan hemólisis postransfusional y enfermedad hemolítica del recién nacido que pueden ir desde leves hasta muy severas. El anti Diego-b es un anticuerpo pocas veces encontrado, reportado no más de 15 veces en la literatura internacional. En el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS se han detectado 4 casos en los últimos 10 años. La solución que se presenta ahora con las nuevas tecnologías es estudiar a la población por biología molecular, para lo cual contamos con dos donadores clasificados Diego-b negativos, que servirán de controles, y con 154 donadores fenotipados como Diego-a positivos, de los que desconocemos su antígeno Diego-b y que serán el objeto de estudio de este trabajo. Las sondas de

Abstract

The anti-Di^a and anti-Di^b antibodies are generally anti-IgG type. They cause hemolysis post-transfusion and hemolytic disease of the newborn from mild to severe. The anti-Diego^b is an antibody rarely found and reported no more than 15 in world literature and the Blood Bank of National Medical Center Century XXI, IMSS, have been detected 4 in the last 10 years. The solution is now presented with new technologies to study the population by molecular biology, for which we have two donors classified Diego^b negative controls, and we serve with 154 donors phenotyped Diego^a positive for these we don't know his Diego^b antigen. Oligonucleotide probes for the polymorphisms of Di1 and Di2 were designed according to the published sequence for human chromosome 17 and the report made by the group of

Abreviaturas:

Di: Sistema Diego

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SSP: Iniciadores de secuencia específica

* Laboratorio de Histocompatibilidad y HLA, Banco Central de Sangre, IMSS, México, D.F.

** Unidad de Investigación en Inmunología, UMAE Hospital de Pediatría, IMSS, México, D.F.

oligonucleótidos correspondientes a los polimorfismos de Di¹ y Di² fueron diseñadas de acuerdo a la secuencia publicada para el cromosoma humano 17 y el reporte hecho por el grupo del Instituto de Medicina Transfusional Ni Gang Xi Road de China.

Palabras clave: Ácido desoxirribonucleico, reacción en cadena de la polimerasa, iniciadores de secuencia específica.

the Institute of Transfusion Medicine Ni Gang Xi Road of China.

Key words: Desoxirribonucleic acid, polymerase chain reaction, sequence specific primers.

Introducción

El primer anticuerpo anti Diego-b fue reportado por Thompson y cols. en 1967 en un paciente latinoamericano politransfundido. Según estudio realizado por Grumbaun y cols.,³ en la población mestiza de la ciudad de México la frecuencia del antígeno Di^a positivo es de 4.8 y 99.7% del Di^b; en la población caucásica el antígeno Diego^b es de alta incidencia y para fines prácticos se considera como 100%.

Forma parte de la banda 3 de la membrana del eritrocito. Este sistema mantiene la integridad celular por unión con la espectrina y es mediador de intercambio de los aniones C. Algunas de las anomalías en la estructura de los eritrocitos se asocian con mutaciones en el gen de la banda 3: ovalocitosis del sudeste asiático⁵ y la resistencia de ellos a la malaria,⁶ esferocitosis autosómica dominante⁷ y acidosis renal de túbulos distales.⁸

Hasta ahora se conocen 17 antígenos de este sistema (Cuadro I)⁹ y dos más que no han sido clasificados. Los anticuerpos anti-Di^a y anti-Di^b son generalmente IgG que causan hemólisis postransfusional y enfermedad hemolítica del recién nacido, y que pueden ir desde un grado leve hasta uno muy severo. El anti Diego^b es un anticuerpo pocas veces encontrado y reportado, no más de 15 veces en la literatura internacional. En el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS se han detectado 4 en los últimos 10 años.

Los dos primeros casos fueron pacientes politransfundidos y con anticuerpos que estuvieron activos más de 13 y 17 años respectivamente. Se corre el riesgo de confundir como auto anti Sistema Rh/Hr los aloanticuerpos en pacientes recientemente transfundidos que tengan este anticuerpo.

Hasta ahora no se han encontrado anti-Kell 2 en nuestra población, por lo que se debe pensar primero en un anti-Diego^b y no en el

Cuadro I: Antígenos del sistema Diego.

Número ISBT*	Grupo sanguíneo	Amino-ácido	Mutación	Epítipo banda 3	
010001	Di ^a	854	Pro	Leu	7
010002	Di ^b	854	Pro		7
010003	Wr ^a	658	Glu	Lis	4
010004	Wr ^b	658	Glu		4
010005	Wd ^a	557	Val	Met	3
010006	Rb ^a	548	Pro	Leu	3
010007	WARR	552	Tr	Ile	3
010008	ELO	432	Arg	Trp	1
010009	Wu	565	Gly	Ala	3
010010	Bp ^a	569	Asn	Lys	3
010011	Mo ^a	656	Arg	Hys	4
010012	Hg ^a	656	Arg	Cys	4
010013	Vg ^a	555	Tyr	Hys	3
010014	Sw ^a	646	Arg	Gln	4
010015	BOW	561	Pro	Ser	3
010016	NFLD	429	Glu	Asp	3
010017	Jn ^a	566	Pro	Ser	3
010018	KREP	566	Pro	Ala	
010019	Tra	551	Lys	Asn	

*Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea.

«anti-cellano», como se catalogaron inicialmente estos 4 anticuerpos.

Es recomendable tener una base de datos con la información de donadores de fenotipos raros para resolver estos casos que pueden ser más comunes de lo que pensamos, pero que no los detectamos por faltar esta información.

El problema al que nos enfrentamos es que no hay antisuero comercial anti-Di^b en ninguna parte del mundo y por lo tanto no es posible fenotipar a los donadores y pacientes para este antígeno.

La solución que se presenta ahora con las nuevas tecnologías es estudiar a la población por biología molecular,¹⁰ para lo cual se contó con dos donadores clasificados Diego^b negativos que sirvieron de controles.

Este primer estudio abre la puerta a las posibilidades de trabajar por métodos moleculares otros sistemas que están implicados en reacciones transfusionales en pacientes politransfundidos y con diagnóstico de anemia hemolítica con Coombs directo positivo, a los que no es posible realizar los fenotipos eritrocitarios por la mezcla de células transfundidas y anticuerpos pegados a los eritrocitos; en estos pacientes es muy difícil dilucidar si la hemólisis es causada por autoanticuerpos o por aloanticuerpos y al transfundir sangre potencialmente compatible *in vitro* puede poner en peligro la integridad del paciente por aloanticuerpos no clasificados. Para resolver estos problemas que muchas veces son muy complicados se podrán realizar los fenotipos por métodos moleculares de los sistemas Rh/Hr, Duffy y Kidd, que son los más peligrosos, cuidando así al 100% a nuestros pacientes politransfundidos, como también a los de trasplante de médula ósea con terapia transfusional previa y a los que es necesario realizar sus fenotipos para llevar a cabo trasplante alogénico.

Material y métodos

El grupo sanguíneo Di (Diego) se determinó utilizando suero comercial policlonal anti-Di^a (Gamma-Biologicals, Houston, Tx.) para los controles Di^a.

Determinación del genotipo utilizando PCR-SSP (Reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores de secuencia específica): Antes de 1995, se asignaron 2 pares de antígenos antitéticos para el sistema Di, el Dia (DI1) y Dib (DI2) (Figura 1).

Las sondas de oligonucleótidos fueron diseñadas de acuerdo a la secuencia publicada para el cromosoma 17 (GeneBank) (Cuadro II). La PCR inicial se realizó con 1 µL de DNA muestra, 1 µL de la enzima Taq DNA polimerasa y 8 µL de mezcla o master mix para tipificar Di (Tris-HCl, MgCl₂, dNTP's y cada uno de los iniciadores forward y reverse). Se sometieron al estudio dos pacientes para los controles positivos, los cuales son Di^b y controles negativos de donadores Di^a. Las muestras se llevaron a 30 ciclos de PCR en un termociclador. Seguidos de una extensión final, los productos de PCR fueron analizados por corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidium,

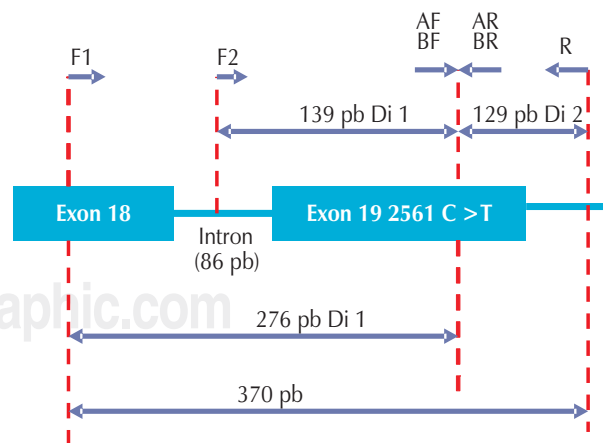


Figura 1. Diseño de los iniciadores.

Cuadro II. Iniciadores utilizados para genotipificación de Di.

Inciador	Secuencia (5'-3')	Posición del nucleótido*	Mezcla de iniciadores	Alelo detectado	Tamaño del producto pb
F1	GGTCACGTCGCTCAGCGG	137075-137092	F1/AR	Di 1	276
F2	GTGCTGGGGTGTGATAGGC	137212-137230	F2/AR	Di1	139
AR	CAGGGCCAGGGAGGCCA	137350-137334			
BF	GGTGGTGAAGTCCACGCC	137317-137334	BF/R	Di 2	129
R	CCAGGCAGCCACTCACAC	137444-137427			
HGHF	GCCTCCCCAACCATTCCTT	893-912	HGHF/HGHR	HGH	427
HGHR	TCACGGATTCTGTTGTGTTTC	1319-1298			

*Datos del Gene Bank

para finalmente ser observados con luz ultravioleta.

Resultados

Las amplificaciones fueron de acuerdo a los iniciadores utilizados y las bandas de dichos productos se pudieron determinar visiblemente en los corrimientos electroforéticos (Figura 2); las bandas se compararon con los marcadores de peso molecular; el tamaño de los productos pudo ser establecido de acuerdo al marcador de peso molecular, siendo estos productos de 139 para DI1 y 129 para DI2 en pares de bases; la especificidad y sensibilidad del método molecular basado en la secuencia específica de iniciadores por PCR fue la esperada de acuerdo a lo observado y a lo publicado por otros grupos de trabajo. La determinación de la PCR-SSP duró 4 horas a partir de la obtención del DNA.

Discusión

El problema al que nos enfrentamos es que no hay antisuero comercial anti-Dib en ninguna parte del mundo y por lo tanto no es posible fenotipar a los donadores y pacientes para este antígeno.

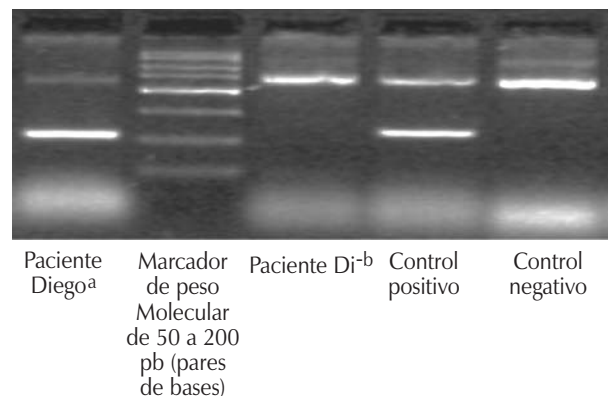


Figura 2. Gel de agarosa al 2%. Corrimiento electroforético.

Este estudio abre la puerta a las posibilidades de trabajar por métodos moleculares otros sistemas que están implicados en reacciones transfusionales en pacientes politransfundidos y con diagnóstico de anemia hemolítica con Coombs directo positivo, a los que no es posible realizar los fenotipos eritrocitarios por la mezcla de células transfundidas y anticuerpos pegados a los eritrocitos; en estos pacientes es muy difícil dilucidar si la hemólisis es causada por autoanticuerpos o por aloanticuerpos y al transfundir sangre potencialmente compatible *in vitro* puede poner en peligro la integridad del paciente por aloanticuerpos no clasificados. Para resolver estos problemas que

muchas veces son muy complicados se podrán realizar los fenotipos por métodos moleculares de los sistemas Rh/Hr, Duffy y Kidd, que son los más peligrosos, cuidando por consecuencia al 100% a nuestros pacientes politransfundidos, así como a los de trasplante de médula ósea con terapia transfusional previa y a los que es necesario realizar sus fenotipos para llevar a cabo trasplante alogénico. Este método resulta barato y rápido y puede realizarse a gran escala.

Conclusión

La realización de métodos moleculares aplicados a la inmunohematología abre la posibilidad de resolver problemas transfusionales en pacientes a los cuales no se les puede clasificar aloanticuerpos por métodos convencionales.

La realización de metodologías basadas en la biología molecular resulta barata y rápida, tomando en cuenta su alto grado de sensibilidad y especificidad.

Este primer estudio abre la puerta a las posibilidades de trabajar por métodos moleculares otros sistemas que están implicados en reacciones transfusionales en pacientes politransfundidos y con diagnóstico de anemia hemolítica con Coombs directo positivo. Se podrán realizar los fenotipos por métodos moleculares de los sistemas Rh/Hr, Duffy y Kidd, que son los más peligrosos en los servicios de transfusión, y el contar con los iniciadores diseñados baja el costo de este tipo de pruebas, además de poder realizar este estudio a gran escala, optimizando reactivos y

tiempo con la certeza de tener un resultado rápido y preciso.

Referencias

1. Laryssem N, Arends T, Domínguez SR. Nuevos grupos sanguíneos encontrados en descendientes de Indios. *Acta Med Venez* 1955; 3: 132-132.
2. Thompson PR, Childers DM, Hatcher DE. Anti-Dib. First and second examples. *Vox Sang* 1967; 13: 314.
3. Gorodezky C, Loon J, Moliterno R. HLA in some Latin American populations. 11th International Histocompatibility Workshop in Yokohama, Japan. 1991.
4. Grunbaum, B.W., Selvin, S., Mhyre B.A., and Pace N. Distribution of gene frequencies and discrimination probabilities for 22 human blood genetic systems in four racial groups. *Journal of Forensic Sciences*. 25: 428-444.
5. Booth PB, Serjeantson S, Woodfield DG, Amato D. Selective depression of blood group antigens associated with hereditary ovalocytosis among Melanesians. *Vox Sanguinis* 1977; 32: 99-110.
6. Hadley TA, Saul G, Lamont DE, Hudson LH. Resistance of Melanesian erythrocytes (ovalocytes) to invasion by *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vitro. *J Clin Invest* 1983; 71: 780-782.
7. Jarolim PHL, Rubin SC, Liu MR, Cho V, Brabec LH, Derick SJ, Yi ST, Saad S, Alper C, Brugnara DE, Golan, Palek J. Duplication of 10 nucleotides in the erythroid band 3 (AE1) gene in a kindred with hereditary spherocytosis and band 3 protein deficiency (band 3 prague). *J Clin Invest* 1994; 93: 121-130.
8. Bruce LJ, Cope DL, Jones GK, Schofield AE, Burley MS, Poverly RJ, Unwin O, Wrong, Tanner MJA. Familial distal renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (band 3, AE1) gene. *J Clin Invest* 1997; 100: 1693-1707.
9. Jarolim P, Rubin HJ, Zakova D, Reid ME. Characterization of seven low incidence blood group antigens carried by erythrocyte band 3 protein. *Blood* 1998. (In Press).
10. Guo-Guang Wu, Yu-Qing Su, Qiong Yu et al. Development of a DNA-based genotyping method for the Diego blood group system. *Transfusion* 2002; 42: 1553-1556.

Correspondencia:

Martínez-Álvarez JC

Banco Central de Sangre.

Av. Cuauhtémoc Núm. 330

Col. Doctores, México, D.F.

Delegación Cuauhtémoc. 06720.

Teléfono: 5 6 27 69 00 Ext. 21727.

Fax: 54 40 05 04.

Correo electrónico: juliocesar_ma@yahoo.com.mx

www.medigraphic.com

Artículo de revisión

Sistema Rh como marcador evolutivo

Héctor A Baptista González,^{*,**} Fany Rosenfeld Mann,^{*} Rocío Trueba Gómez^{*}

Resumen

Las proteínas del Rh en el humano constituyen el sistema eritrocitario más polimórfico que existe. Consta aproximadamente de 48 antígenos y el antígeno Rh D presenta más de 30 epítopes distintos. Se conocen por lo menos 100 haplotipos, pero hay muchísimos más fenotipos similares coexistiendo con diferentes alelos. En su propuesta filogenética, el gen RHD presenta cuatro principales racimos: euroasiático RHD, racimo DAU, racimo de la variante D, débil tipo 4, y racimo DIVa (Cuadro I). En esta revisión se describen, brevemente, los aspectos filogenéticos más relevantes reportados a la fecha en términos del acompañamiento entre la evolución de la vida, los genes y proteínas del Rh.

Palabras clave: Proteínas Rh, antígenos, genes, sistema eritrocitario.

Abstract

In the human body the Rh proteins system, has the most important polymorphism that can exist. It has closely 48 antigens and the Rh D antigen system, presents more than 30 different epitopes. It know about 100 haplotypes, but there are anymore, at the same time with many phenotypes but with different alels. In own theory the RhD gen, presents four different trees: euroasiatic RHD tree, DAU tree, variant D and DIVa tree (Table I). We describe the most important phylogenetic aspects. By genes and Rh proteins.

Key words: Rh proteins, antigens, genes, erythrocytic system.

En el inicio de la vida

La familia Rh contiene un gran número de homólogos que conforman una rama única en el dominio de las células eucariotas. El origen antiguo y su amplia distribución implican un papel central de las diferentes proteínas del Rh para mantener las condiciones homeostáticas y funcionales celulares. Los genes homó-

logos del RH, son el RHAG, RHBG, RHCG y RH30, así como RHP1 y RHP2. La expresión de la proteína RhP2 ocurre en las algas verdes y la estrella de mar. El RhP1 se presenta en el pez cebra y en la rana, mientras que el resto de las proteínas se encuentran en organismos desde el pez cebra, la rana, las aves, hasta los mamíferos primates y el hombre. Los genes primitivos del Rh varían ampliamente

* Hematología Perinatal. Instituto Nacional de Perinatología.

** Medicina Transfusional y Banco de Sangre. Médica Sur.

Cuadro I. Racimos filogenéticos del gen RHD y sus alelos representativos.

Racimo	Alelos de RHD
DIVa D-débil tipo 4	Ccde ^s . DIVa. DIII tipo 4, DIII tipo 5 D-débil tipo 4.0. D-Débil tipo 4.1. DAR. D-débil tipo 4.2.1. D-débil 4.2.2. RHD(T201R;F223V). RHD(F223V). DOL, RHD ψ
DAU D Euroasiático	DAU4. DAU3. DAU0. DAU1. DAU2 RHD (in cDe). RHD (W 16X). D-débil tipo 1. DVII, DVI tipo 3. RHD (in Cde). RHD deleído (in CDE). RHD deleído (in cE). RHD (in cDE). DVI tipo 1, DHMI. D-débil tipo 2. RHD-CE(4-7)-D

en el diseño de sus intrones y exones; en los mamíferos muestran un diseño similar en su organización genómica. La comparación de secuencias revela un consenso de 12 características transmembranales de la familia del Rh.¹

La separación entre los genes RH y RH50, ocurrió hace aproximadamente 510 millones de años, en el Periodo Cámbrico.² La evolución de la familia de los genes del RH presenta dos eventos mayores de duplicación. El primero ocurrió hace aproximadamente 250-346 millones de años, y originó los genes RH50 y RH30, mientras que el segundo ocurrió hace más o menos 8.5 (5.1-12) millones de años y fue la generación de los genes RHD y RHCE,³ en un antecesor común a los primates. Este evento coincide con la aparición en esas especies de la mutación G por T en el gen RH50 que generó un codón de paro del transcrito correspondiente. Esto condujo a que el dominio citoplasmático de la proteína Rh50 se acortara más de lo encontrado en el orangután y otros primates tempranos.³

Debido a que el gen RH expresa las proteínas del sistema Rh, pero no la proteína Rh50, que es la más conservada de las del Rh, la tasa evolucionaria del gen RH50 es 2.6 veces más lenta que en el gen RH30; esto implica que la proteína Rh50 tiene el significado funcional de una proteína con distancia evolutiva entre la esponja y el humano.

El gen RH50 humano presenta una homología del 46 y 39% con sus antecesores RHAG de los nematodos y esponja marina, respectivamente.

Presencia en organismos unicelulares primitivos

Las proteínas del Rh son homólogas a las proteínas transportadoras de amonio (*Amt*). La evidencia fisiológica y estructural muestra que las proteínas *Amt* son canales para el NH₃, pero el sustrato de las proteínas del Rh lo son para el CO₂, como ocurre en el alga verde o para NH₃/NH₄, como ocurre en las células de mamíferos. Finalmente, el Rh se separó de *Amt* mediante un salto que ocurrió en especies arcaicas, que las llevó a funciones distintas. La duplicación del antecesor del Rh es una señal de especialización que conduce a nuevas funciones y subfunciones de la familia del Rh. Las proteínas Rh y *Amt* coexisten en microorganismos y otros invertebrados, pero no en los hongos, plantas vasculares o vertebrados.⁴

La duplicación del gen RH fue muy evidente en los vertebrados, mientras que las proteínas epiteliales RhBG/RhCG presentaron una fuerte presión de purificación. La identificación bioquímica y expresión epitelial de las proteínas RhBG y RhCG en tejido de mamíferos como riñón, hígado, piel, testículo y cerebro, sugieren una relación evolutiva con la familia de las proteínas del Rh, como transportadores en la ho-

meostasis del amonio. La proteína eritroide Rh30 y el RhAg (Rh50) experimentaron diferentes episodios de selección positiva en cada una de sus etapas evolutivas en ciertos momentos, en ciertos codones. Estos cambios en la evolución adaptativa llevaron al aumento de la relación superficie/volumen del eritrocito biconcavo y esto facilitó la difusión de gases, como una señal de ganancia en especialización, a diferencia de las proteínas *Amt*, en el transporte de CO_2/HCO_3 , con un importante papel en la regulación del pH sistémico.⁴

Los genes del RH en el suborden anthropoidea

Los dos genes del Rh, RHD y RHCE, son altamente homólogos, probablemente promovido por el intercambio genético (doble entrecruzamiento o conversión de genes). Esto ha quedado demostrado a nivel genómico del gen RHD, el cual codifica variantes cualitativas de RhD, que codifican a los alelos de baja frecuencia del gen RHD, los cuales muestran simultáneamente los mismos cambios en los exones correspondientes del gen RHCE. La evidencia señala que los cuatro alelos principales del gen RHCE se derivan del recambio intergénico y recombinaciones interalélicas que se presentaron en antecesores comunes al resto de los primates. En el humano, el ejemplo característico es el reemplazo en el exón 2 del RHCE por su contraparte del RHD, llevando a la aparición del alelo que codifica al antígeno C.

En términos evolutivos, sólo tres especies de primates contienen más de un gen del RH: chimpancé, gorila y el humano. Es decir, los genes del RH experimentaron una serie de eventos complejos de recombinación en un ancestro común al humano, chimpancé, gorila, monos del viejo y nuevo mundo.⁵ El evento más distintivo es la inserción del elemento *Alu*-

Sx en el intrón 4 de los genes RH. El gorila posee dos tipos de intrón 3 del RH (el intrón RHCE 289 pb es mayor que el intrón 3 del gen RHD) y dos tipos de intrón 4 (intrón 4 RHCE 654 pb es más largo que el intrón 4 del RHD). Es decir, el elemento *Alu*-Sx, está presente en los humanos en el gen RHCE intrón 4.⁶ El gen RHD humano difiere del gen RHCE por la ausencia del *Alu*-Sx.⁵ Adicionalmente, el exón 7 presenta una tasa evolucionara de sustituciones en el humano, que fue introducida después de la duplicación.²

El gen RHCE codifica para los polipéptidos que presentan a los antígenos C, c, E y e. Comparando los alelos RhC y Rhc, hay diferencia en seis nucleótidos, cuatro de los cuales resultan de la sustitución de aminoácidos en los polipéptidos correspondientes (W16C exón 1 C178A, A203G y C307T), que conducen a L60I, N68S y P103S, respectivamente. En primates no humanos se sugiere que sólo P103S es crítica para la expresión de Rhc, que es un sitio polimórfico extracelular. Para la expresión del antígeno C, esta situación es más compleja, pues aunque P103S es crítica, también lo es W16C.

La evolución del género homo

El origen del hombre ocurrió en África, presentando características de desarrollo distintivas que le permitieron adaptarse al medio ambiente. De los primates prehumanos *Australopithecus*, se tiene registro fósil de su existencia desde hace más de 4 millones de años; éstos fueron evolucionando en etapas sucesivas hasta hace aproximadamente un millón de años, cuando apareció una de sus últimas especies: el *Australopithecus/Paranthropus robustus*. Los antecesores de los primates humanos, a la fecha identificados en el *Homo rudolfensis*, vivieron hace aproximadamente 2.5 millones de años y el último pariente evoluti-

vo, pero no directo del hombre fue el *H. neanderthalensis*, que existió hace aproximadamente 330-100,000 años. Nuestra especie, *Homo sapiens* se dispersó en los últimos 50-100 mil años, como resultado de la acelerada evolución en la complejidad tecnológica, económica, social y conducta cognitiva de ciertos grupos *H. sapiens* africano que permitieron la expansión demográfica favorable.⁷ El análisis filogenético sugiere que los alelos de los grupos sanguíneos A y B son antiguos, con divergencia de al menos 3 millones de años, mucho antes del establecimiento de la agricultura, como pregonan la teoría de grupos sanguíneos y tipo de alimentación.

Los primeros pobladores de América

El conocimiento de cuándo y cómo llegaron los primeros pobladores americanos es un tema de teorías variadas, que incluye las migraciones sucesivas de tribus del norte de Asia por el estrecho de Bering (Beringia), desde hace más de 30,000 años; también aquéllas a través de la costa de Alaska, de migrantes del sudeste asiático e inclusive de las islas del norte del continente australiano, hace más de 10,000 años, pero también de grupos que abordaron directamente la costa oeste del hemisferio norte del continente y de los grupos polinesios que llegaron hacia la costa atlántica de Sudamérica e inclusive hay evidencias de emigración negra en Sudamérica de hace aproximadamente 11,500 años. Esto sin dejar de mencionar el acceso de grupos nórdicos por la Península del Labrador. Mediante el estudio del DNA mitocondrial se sabe que los indígenas americanos provienen de una reserva genética común dominante, con combinación de intensidad variable de más de una mezcla (migración) asiática. Es interesante que los restos óseos de la mujer del Peñón (localizado en la zona del Peñón de los

Baños, en la ciudad de México), no tenga rasgos mongoloides.

Diversos estudios de morfología craneofacial han demostrado claras diferencias entre los modernos indígenas americanos y los pobladores del Este de Asia, donde supuestamente son descendientes los primeros americanos. Recientemente se han encontrado evidencias en México,⁸ a partir de restos humanos fechadas en el pleistoceno tardío al holoceno temprano. Los resultados iniciales tienden a demostrar la asociación entre los primeros pobladores de México, con los paleoamericanos de Brasil o Colombia, pero sin semejanza con los indígenas americanos modernos, generando la hipótesis de que los paleoamericanos (no descendientes de las tribus migrantes del noreste asiático) entraron inicialmente a América por el continente y luego se dispersaron de Norte a Sudamérica. Es interesante la importancia que ha cobrado la participación de los grupos polinesios en la población de América. En la Isla de Pascua hay evidencia de su origen polinesio, pero con evidencia de contribución de genes de Sudamérica.⁹

El origen de la humanidad residió en el continente africano y de ahí, mediante una serie de eventos moleculares, de recombinaciones y mutaciones puntuales, se generaron evolutivamente los demás fenotipos. Así, el fenotipo ancestral es cDe (Ro) y por ende más frecuente en la población negroide (> 60%), que en la asiática, europea o mesoamericana. Mediante un evento de recombinación no recíproca de secuencias del exón 2 de RHD hacia el alelo ce del gen RHCE se formó el haplotipo CDe (R1), frecuente en la población asiática, pero también en la mesoamericana. Mediante un evento de mutación puntual en el alelo ce, se generó el haplotipo cDE (R2), frecuente en Mesoamérica y en menor medida en el resto de poblaciones. Finalmente está el fenotipo CDE (Rz), común en pobla-

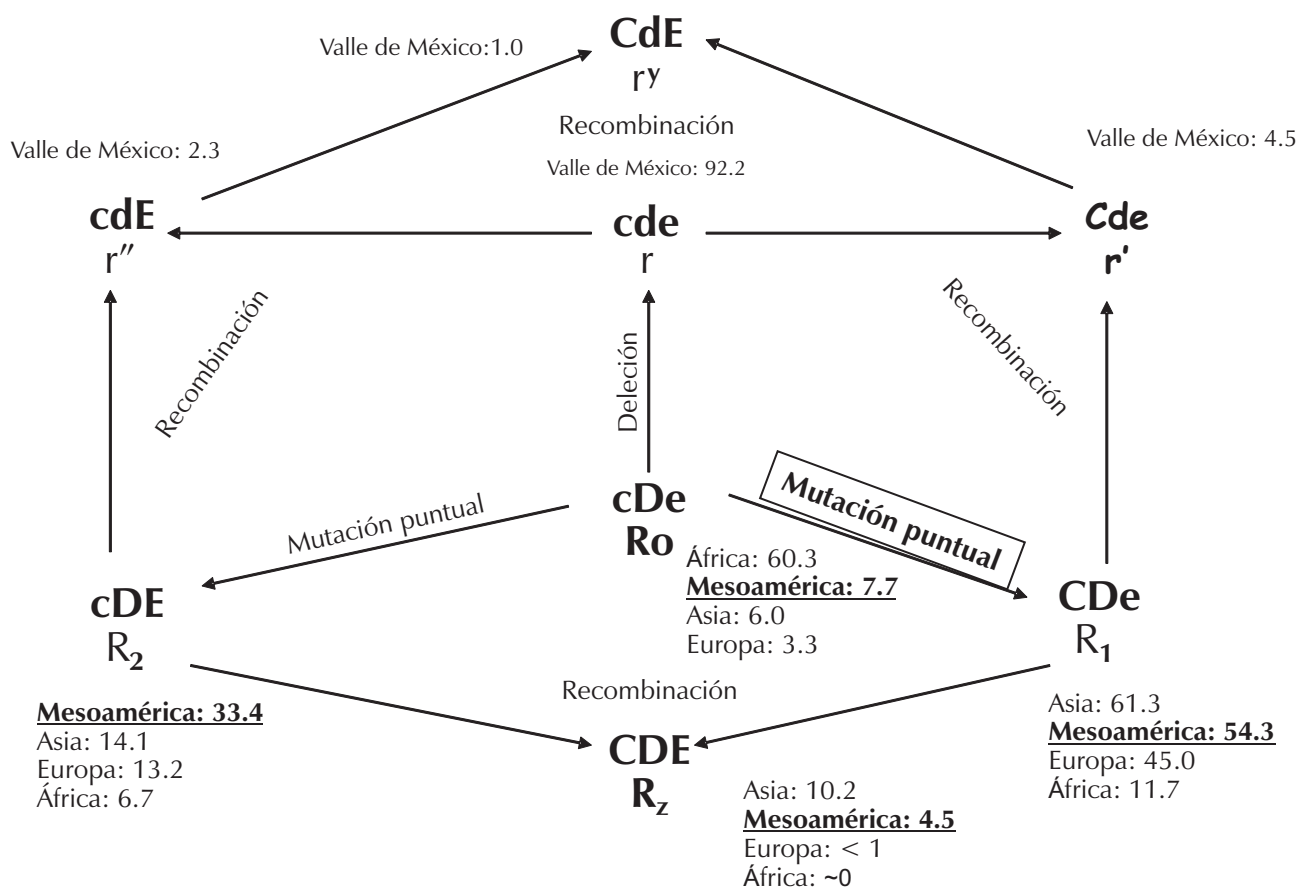


Figura 1. Evolución de los haplotipos del sistema Rh en diferentes grupos poblacionales.

ción asiática, seguido de la mesoamericana y extremadamente raro en europeos y negros (Figura 1).

Los indígenas mesoamericanos

Existen al menos dos teorías sobre el origen de los grupos que conformaron la sociedad azteca o mexica. La primera señala que los aztecas provienen de la reorganización social de los grupos indígenas previamente asentados en el Valle de México después de la caída de los centros y ciudades más importantes del Periodo Clásico (Teotihuacán, Tollan), mientras que la segunda señala que el reemplazo de la población del Valle de México ocurrió por

grupos migrantes provenientes del norte. Sin embargo, los cambios de morfometría facial y craneal de los restos humanos aztecas ocurrieron en la transición del Periodo Clásico a Postclásico. Es decir, que ya se encontraban desde el inicio del Postclásico y sin presentar un patrón de pobladores del norte de Mesoamérica. Más aún, la fuente de población para los grupos del Postclásico podría situarse en alguna parte de Mesoamérica Occidental, puesto que los grupos del Norte de México y mesoamericanos del Periodo Preclásico y Clásico son claramente divergentes unos de otros. La semejanza entre los grupos del Preclásico y del Clásico y éstos de Aridoamérica podría reflejar el patrón genotípico caracte-

rístico de los grupos que inicialmente colonizaron Mesoamérica.¹⁰

El mestizaje

Durante los últimos 5 siglos, tres poblaciones más o menos diversas: amerindios (un grupo relativamente homogéneo derivado de la población asiática), europeos (mayormente españoles y portugueses) y africanos (que fueron traídos como esclavos), entraron en contacto, interactuaron y se mezclaron. Los datos muestran que casi toda la población mestiza es dihíbrida o trihíbrida. Esto significa que el mestizaje es el principal agente microevolutivo en la mezcla de genes del mexicano.¹¹

Los indígenas mesoamericanos actuales presentan características generales predominantes en términos de grupos sanguíneos: son ABO, predominantemente O, RhD, Cellano (k), Fya y Dia. La presencia de los antígenos Lutheran y Kp sugiere que el ambiente pudiera haber contribuido a la selección en estos grupos poblacionales.¹² Es difícil estudiar a grupos indígenas sin intercambio de genes con grupos mestizos. Sin embargo, se tiene la experiencia de diferentes autores que han estudiado el fenotipo del sistema Rh en poblaciones indíge-

nas contemporáneas. De ello resaltan la extremadamente baja prevalencia de la condición Rh negativo, invariablemente menor a la unidad porcentual. Mediante el empleo de la clasificación lingüística se han estratificado cuatro regiones de los indígenas mesoamericanos, compilados por Lisker¹³ y que al compararse con una muestra de mestizos donadores de sangre en un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo, se puede observar que los fenotipos CCDee, CcDEe, CcDee, ccDEe, ccDEE, están incluidos dentro de los cinco más frecuentes en la población indígena y en la mestiza. Los fenotipos que presentan una frecuencia global menor al 5%, denominado de baja frecuencia, muestran una amplia variabilidad para cada grupo indígena como una evidencia de mestizaje (*Cuadro II*).

El mexicano actual

La frecuencia alélica de los polimorfismos de distintos locus de HLA entre las poblaciones de diversas ciudades de la república muestra una distribución relativamente homogénea, con variaciones menores.¹⁴ En términos de composición genética, la población mestizo-mexicana muestra una contribución genética

Cuadro II. Frecuencia fenotípica en diversos estratos indígenas y mestizos en la República Mexicana.

Grupos	Baptista (n 5,271)	Macromixteco (n 733)	Mixes (n 128)	Macronahua (n 915)	Macroyuma (n 737)	Macromaya (n 968)
CCDee	27.6 (1)	27.3 (2)	37.1 (1)	32.6 (1)	29.8 (2)	23.1 (2)
CcDEe	26.6 (2)	34.7 (1)	33.7 (2)	30.8 (2)	35.9 (1)	41.6 (1)
CcDee	24.3 (3)	6.6 (5)	0.0	7.4 (4)	14.3 (3)	5.2 (5)
ccDEe	10.8 (4)	6.1 (6)	2.2 (5)	4.7 (6)	6.5 (4)	5.7 (4)
ccDEE	5.7 (5)	11.2 (3)	19.1 (3)	14.3 (3)	6.1 (5)	17.8 (3)
ccdee	3.5 (6)	0.3 (10)	0.0	1.7 (9)	1.6 (9)	0.2 (10)
CCDEe	3.1 (7)	8.2 (4)	5.6 (4)	5.2 (5)	2.9 (6)	3.6 (6)
ccDee	0.9 (8)	1.0 (9)	0.0	2.0 (8)	2.3 (7)	1.4 (7)
CcDEE	0.9 (9)	4.0 (7)	2.2 (6)	2.7 (7)	1.6 (8)	1.4 (8)
CCDEE	0.1 (10)	4.0 (8)	0.0	0.5 (10)	0.8 (10)	0.8 (9)

predominantemente española-europea (50-60%), amerindia (37-49) y africana (1-3%), demostrando un origen pluriétnico de la población.

Esta población ha sido ampliamente analizada, aunque existen abundantes reportes en la literatura nacional; probablemente la ciudad de México refleja la mayoría de la población.¹⁵⁻¹⁷ Se estiman contribuciones de 41% europea, 56% amerindia y 3% africana. Sin embargo, en la costa del Caribe, la contribución africana aumenta; en Veracruz alcanza 26%, y en Tamiahua, en el mismo estado de Veracruz, el valor estimado es de 40%, similar a lo observado en países africanos (*Cuadro III*). Es en la población del Valle de México, con toda su riqueza étnica, donde se han efectuado diversos estudios sobre frecuencia fenotípica a lo largo de los últimos 30-40 años.^{18,19} Nuestro grupo de investigación también ha llevado a cabo esta actividad con tamaños muestrales significativos. Los resultados para la población del Valle de México no son diferentes en términos de que las combinaciones alélicas R1/R1 y R1/R2, son las más frecuentes. Sin embargo, aparecen los efectos del mestizaje, pues el alelo cde (r) es más común que lo reportado para poblaciones amerindias (*Cuadro IV*). En la identificación genotípica basada en secuencias

del gen RHC se emplean los polimorfismos del exón 1 (v. gr. G48C), un inserto de 109 bp del intrón 2 (únicamente expresado, en RHC). Mientras que para el gen RHc, se emplean los polimorfismos del exón 2. Sin embargo, las secuencias del RHCE pueden variar de acuerdo al origen étnico de la población estudiada. En población blanca con el alelo RHc, ocurre principalmente por la mutación G48C y muy eventualmente el alelo RHce ocurre con G48C. En población negra la mutación G48C en el exón 1 del alelo RHc, en ausencia del alelo RHC, se presenta con frecuencia del 41.9-67.3%. La complejidad entre fenotipos similares pero diferentes alelos, así como las diferencias muestrales explican cómo las frecuencias alélicas en población de la ciudad de México son relativamente similares en la muestra de sujetos Rh positivo, pero distinta en el caso de los sujetos Rh negativo (*Cuadro V*).

Finalmente, estas diferencias en las frecuencias fenotípicas y alélicas, indican la necesidad de recolectar la información nacional y adicionar los estudios genotípicos y poder caracterizar, en su mayor aproximación posible, a la población mexicana, pluriétnica y pluricultural, relativamente similar en la muestra de sujetos Rh positivo, pero distinta en el caso de los sujetos Rh negativo (*Cuadro V*).

Cuadro III. Compilación de la distribución de antecedentes étnicos.

Ubicación	Negro-Africano (%)	Amerindia (%)	Europea (%)
Tlaxcala, Tlaxcala	30	59	11
Veracruz, Ver	26	39	35
Tamiahua, Ver	40	31	29
León, Guanajuato	8.0	51	41
Mérida, Yucatán	6	51	43
Oaxaca, Oaxaca	2	68	30
Saltillo, Coahuila	3.0	52	45
Puebla, Puebla	11	56	33
Ciudad de México	3.0	56	41
Promedio	14.3	51.4	34.5

Cuadro IV. Comparación de frecuencias fenotípicas para individuos Rh positivo y Rh en diferentes estudios.

Autor Rh positivo	Tiburcio	Grunbaum	Lisker	Long	Baptista
Fenotipo	(n 431)	(n 1170)	(n 2608)	(n 570)	(n 5707)
CCDee	0.255	0.277	0.283	0.239	0.275
CcDEe	0.237	0.270	0.373	0.223	0.259
CcDee	0.267	0.184	0.068	0.271	0.244
ccDEe	0.128	0.078	0.053	0.144	0.104
CCDEe	0.023	0.039	0.044	0.023	0.026
ccDEE	0.065	0.072	0.140	0.065	0.062
CcDEE	-	0.040	0.024	0.005	0.011
ccDee	0.025	0.016	0.007	0.028	0.018
CCDEE	-	0.024	0.008	0.002	0.001
Rh Negativo					
Fenotipo	(n 43)	(n 42)	(n 8)	(n 49)	(n 2,559)
ccdee	0.930	0.761	1	0.918	0.925
CCdEE	-	0.095	0	-	0.001
ccdEe	0.023	0.048	0	-	0.022
Ccdee	0.047	0.048	0	0.082	0.046
CcdEe	-	-	-	-	0.005
ccdEE	-	0.048	-	-	< 0.001
CCdee	-	-	-	-	< 0.001

Cuadro V. Frecuencia alélica en sujetos RhD positivo y RhD negativo en diferentes estudios.

Autor	Rh positivo				Autor	Rh negativo			
	C	c	E	E		C	C	E	e
Tiburcio (431)	0.530	0.470	0.259	0.741	Tiburcio (43)	0.023	0.977	0.012	0.988
Grunbaum (1,170)	0.587	0.413	0.329	0.671	Grunbaum (42)	0.119	0.881	0.166	0.833
Lisker (2,608)	0.594	0.406	0.407	0.593	Lisker (8)	0	1	0	1
Long (570)	0.513	0.487	0.266	0.733	Long (49)	0.041	0.959	0	1
Baptista (5,707)	0.559	0.441	0.269	0.731	Baptista (2,559)	0.027	0.973	0.015	0.985

Referencias

1. Van Kim CL, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev* 2006; 20: 93-110.
2. Kitano T, Umetsu K, Tian W, Yamazaki K, Saitou N. Tempo and mode of evolution of the Rh blood group genes before and after gene duplication. *Immunogenetics* 2007; 59: 427-431.
3. Matassi G, Chérif-Zahar B, Pesole G, Raynal V, Cartron JP. The members of the RH gene family (RH50 and RH30) followed different evolutionary pathways. *J Mol Evol* 1999; 48: 151-159.
4. Peng J, Huang CH. Rh proteins vs Amt proteins: an organismal and phylogenetic perspective on CO₂ and NH₃ gas channels. *Transfus Clin Biol* 2006; 13: 85-94.
5. Apoil PA, Blancher A. Rh gene evolution in primates: study of intron sequences. *Mol Biol Evol* 2000; 17: 127-136.
6. Blancher A, Apoil PA. Evolution of RH genes in hominoids: characterization of a gorilla RHCE-like gene. *J Heredity* 2000; 91: 205-210.
7. Mellars P. Why did modern human populations disperse from Africa ca. 60,000 years ago? A new model. *PNAS* 2006; 103: 9381-9386.
8. González-José R, Neves W, Lahr MM, González S, Pucciarelli H, Hernández Martínez M, Correal G. Late Pleistocene/Holocene craniofacial morphology in Mesoamerican Paleoind-

- dians: implications for the peopling of the New World. *Am J Phys Anthropol* 2005; 128: 772-780.
9. Lie BA, Dupuy BM, Spurkland A, Fernández-Viña MA, Hagelberg E, Thorsby E. Molecular genetic studies of natives on Easter Island: evidence of an early European and Amerindian contribution to the Polynesian gene pool. *Tissue Antigens* 2007; 69: 10-18.
 10. González-José R, Martínez-Abadías N, González-Martín A, Bautista-Martínez J, Gómez-Valdés J, Quinto M, Hernández M. Detection of a population replacement at the Classic-Postclassic transition in Mexico. *Proc Biol Sci* 2007; 274: 681-688.
 11. Martínez-Abadías N, González-José R, González-Martín A, Van der Molen S, Talavera A, Hernández P, Hernández M. Phenotypic evolution of human craniofacial morphology after admixture: a geometric morphometrics approach. *Am J Phys Anthropol* 2006; 129: 387-398.
 12. Gorodezky C. Genetic difference between Europeans and Indians: tissue and blood types. *Allergy Proc* 1992; 13: 243-250.
 13. Lisker R. Estructura genética de la población mexicana. Aspectos médicos y antropológicos, Ed. Salvat, 1981: 1-8, 49-66.
 14. Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres MC, Barrera-Saldaña HA, Cortés-Prieto LM, Barajas LO, Rivas F, Carracedo A, Zhong Y, Barton SA, Chakraborty R. Genetic admixture in three Mexican Mestizo populations based on D1S80 and HLA-DQA1 loci. *Am J Hum Biol* 2002; 14: 257-263.
 15. Lisker R, Pérez BP, Granados J, Babinsky V, de Rubens J, Arrendares S et al. Gene frequencies and admixture in a four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990; 62: 791-801.
 16. Lisker R, Pérez BP, Granados J, Babinsky V, de Rubens J, Arrendares S et al. Gene frequencies and admixture in a México City population. *Am J Phys Anthropol* 1986; 71: 203-207.
 17. González-José R, Martínez-Abadías N, González-Martín A, Bautista-Martínez J, Gómez-Valdés J, Quinto M, Hernández M. Detection of a population replacement at the Classic-Postclassic transition in Mexico. *Proc Biol Sci* 2007; 274: 681-688.
 18. Grumbaum BW, Selvin S, Myhre BA, Pace N. Distribution of gene frequencies and discrimination probabilities for 22 human blood genetic systems in four racial groups. *J Forensic Sci* 1980; 25: 428-444.
 19. Tiburcio V, Romero A, De Garay AL. Gene frequencies and racial intermixture in a mestizo population from Mexico City. *Ann Human Biol* 1978; 5: 131-138.
 20. Long JC, Williams RC, McAuley JF, Medis R, Partel R et al. Genetic variations in Arizona Mexican Americans: estimation and interpretation of admixture proportions. *Am J Phys Anthropol* 1991; 84: 141-157.

Correspondencia:

Héctor A Baptista-González

Hematología-Perinatal, Subdirección de Investigación Clínica. Montes Urales Núm. 800, Lomas Virreyes, Delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, D.F., 11000, E-mail: baptista@infosel.net.mx

Artículo de revisión

Validación y verificación de métodos de laboratorio aplicados al Banco de Sangre

Baptista González HA,* Santamaría-Hernández MC,* Martínez-Reyes CS,* Muñoz-Carmona M*

Resumen

La validación y verificación son una serie de actividades indispensables de la fase preanalítica que forman parte del aseguramiento de la calidad e impactan en el resultado, que desde la perspectiva del laboratorio clínico se realiza en un examen solicitado y estos conceptos están migrando a los Bancos de Sangre, impactando en la calidad de los productos sanguíneos y resultados del paciente o disponente. La validación permite confirmar, mediante el análisis y evidencia objetiva, el cumplimiento de las especificaciones de desempeño del método o equipo, mientras que la verificación es la comparación de los resultados del método en las mismas condiciones del propio Banco de Sangre contra el método del fabricante. Se presentan los requisitos para la validación que incluye: Linealidad (intervalo analítico), precisión, veracidad, límite de detección, selectividad, sensibilidad analítica, intervalo de trabajo, especificidad analítica e incertidumbre. En la verificación, el laboratorio debe evaluar: Linealidad (intervalo analítico), precisión, veracidad e incertidumbre.

Palabras clave: Sistemas de gestión de calidad, control de calidad, Banco de Sangre, acreditación, certificación.

Abstract

Validation and verification of methods of a laboratory applied to Blood Bank. The validation and verification are a series of indispensable activities on pre-analytical phase that comprise the securing of quality and hit in the result, that from the point of view of the clinical laboratory is in an asked for examination and these concepts are migrating to a Blood Bank, hitting on blood products quality and results of the patient or arranger. The validation allows to confirm by the analysis and demonstrates objective, the fulfillment of specifications of performance of the method or equipment, whereas the verification is a comparison of method's results in same the conditions of the own Blood Bank against of the manufacturer method's. The requirements for the validation included: Linearity (analytical interval), precision, veracity, detection limit, selectivity, analytical sensitivity, interval of work, analytical specificity and uncertainty. In the verification process, the laboratory must evaluate: Linearity (analytical Interval), precision, veracity and uncertainty.

Key-words: Quality assurance, quality control, Blood Bank, accreditation, certification.

* Medicina Transfusional y Banco de Sangre. Médica Sur.

Introducción

Los conceptos de validación se comenzaron a aplicar en la industria farmacéutica a finales de los setenta. Para ese entonces, su objetivo era proporcionar mayor seguridad en la esterilidad de productos de administración parenteral y posteriormente los requisitos se extendieron a otros procesos críticos en la fabricación. Después surgió la necesidad de validar los procesos con la implementación de otras regulaciones como las buenas prácticas de manufactura (GMP, por sus siglas en inglés) y en los países europeos con las directivas europeas emitidas por el Consejo Europeo y la aplicación de las Normas ISO para acreditación (17025 y 15189).

La validación es una parte integral del sistema de aseguramiento de la calidad de los componentes sanguíneos y servicios que ofrece un banco de sangre o servicios de medicina transfusional. En nuestro país, este término ha tomado importancia recientemente, con el desarrollo y aplicación de sistemas de gestión de la calidad y la evolución de estos sistemas, desde la certificación hacia la acreditación.

Validación en sistemas de gestión de calidad

La validación es una serie de acciones o actividades mediante el análisis y evidencia objetiva del cumplimiento de las especificaciones de desempeño del método o equipo que declara el fabricante. La diferencia principal entre un sistema acreditado y un certificado es la competencia técnica y el aseguramiento de la calidad en las fases: preexamen, examen y post-examen. Durante estas etapas, juega un papel de vital importancia el equipo técnico y computarizado, así como el material y métodos analíticos que intervienen en todas las fases y que durante el complejo proceso de obtención, preparación y estudio de

un componente sanguíneo, presentan múltiples factores potenciales de variación, que comprometen la calidad del producto si no están controlados. Por este motivo, la validación se convierte en un requisito obligatorio de aquellas normativas que acreditan sistemas de calidad ISO-17025, ISO-15189, Programa de acreditación de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB), Guías para la Acreditación con el Colegio de Patólogos Clínicos (CAP).

¿Por qué validar?

La validación proporciona confianza y seguridad. Por esta razón, los métodos de validación en cada prueba, equipo y procedimientos, durante el proceso, debieran realizarse rutinariamente y no sólo por exigencias internacionales de la normatividad adoptada.

Algunos de los beneficios incluyen:

- a) Aumento en los índices de satisfacción de los clientes al otorgar productos sanguíneos, y servicios de medicina transfusional basados en certidumbre y confiabilidad.
- b) Dar confianza en los resultados de estudios inmunohematológicos y los relacionados con la seguridad sanguínea.
- c) Optimizar los procesos, como resultado de una disminución en los costos, desperdicios, repetición de pruebas, gastos extras de insumos y reactivos.
- d) Satisfacer las demandas del cliente en tiempos de atención y nivel de servicio.
- e) Inducir a que los proveedores de servicios, equipos y reactivos aumenten sus estándares de calidad en servicio, atención y producto e ir fomentando una cultura de calidad global y no aislada.³

La validación de un sistema analítico debe realizarse cuando:

- a) Llega el equipo por primera vez al Banco de Sangre previo a su uso.
- b) Se modifica el método de la prueba en un instrumento ya validado.
- c) Se incorpora un nuevo protocolo a un instrumento previamente instalado.

Terminología

Es importante familiarizarse con los términos asociados en los procesos de validación. Los términos confirmar, evaluar, verificar... son frecuentemente confundidos o usados erróneamente como sinónimos de la validación. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés), establece como definición de validación la siguiente: «Validar es establecer evidencia documentada de que un proceso específico cumple en alto grado de desempeño con las especificaciones predeterminadas y atributos de calidad.»

Los siguientes son términos fundamentales para el proceso de validación, obtenidos de la Norma NMX-Z-055-1997-IMNC- Metrología.³

Calibración. Para un material de referencia, es la determinación de uno o más valores de las propiedades físicas, químicas, biológicas o técnicas que son relevantes para su propósito final de uso.

Corrección. Valor que agregado algebraicamente al resultado no corregido de una medición, compensa un error sistemático supuesto.

Desviación. Valor menor que su referencia. Desviación en el resultado de una medición menos el valor (convencionalmente) verdadero de la magnitud medida.

Equipo de medición. Instrumento de medición, software, patrón de medida, material de referencia o aparato auxiliar, o una combinación de éstos, necesario para llevar a cabo un proceso de medición.

Estabilidad. La capacidad de un material de referencia, cuando se almacena bajo con-

diciones especificadas para mantener un valor de una propiedad declarado dentro de los límites específicos por un periodo de tiempo especificado.

Error. Resultado de una medición menos un valor verdadero del mensurando. Como el valor verdadero no puede ser determinado, en la práctica se utiliza un valor convencionalmente verdadero.

Error sistemático. Media que resultaría de un infinito de mediciones del mismo mensurando efectuada bajo condiciones de repetibilidad menos un valor verdadero del mensurando.

Error aleatorio. Resultado de una medición menos la media de un número infinito de mediciones del mismo mensurando, efectuadas en condiciones de repetibilidad.

Exactitud de medición. Proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor verdadero del mensurando. Este concepto es cualitativo.

Exactitud de un instrumento de medición. Aptitud de un instrumento de medición para dar respuesta próxima al valor verdadero. Este concepto es cualitativo.

Incertidumbre de medición. Estimación que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se encuentra el valor verdadero de la magnitud medida. La incertidumbre de medición comprende, en general, muchos componentes. Algunos de éstos pueden ser estimados sobre la base de la distribución estadística de los resultados de series de mediciones y pueden estar caracterizados por desviaciones normales experimentales. La estimación de otros componentes puede estar basada solamente en la experiencia u otra información.

Instrumento de medición. Dispositivo destinado para hacer mediciones, solo o en conjunto con dispositivos complementarios.

Magnitud. Atributo de un fenómeno, cuerpo o sustancia susceptible de ser distinguido

cualitativamente y determinado cuantitativamente. La distinción cualitativa del atributo de un fenómeno, cuerpo o sustancia está definida por la incertidumbre de su medición.

Material de referencia (MR). Material o sustancia para el cual el valor de una (o de varias) de sus propiedades es lo suficientemente homogéneo y bien establecido para ser usado en la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición o para la asignación de valores a los materiales.

Material de referencia certificado (MRC). Material de referencia, acompañado de un certificado, para el cual el valor de una (o de varias) de sus propiedades se ha certificado por medio de un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en que se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel de confianza declarado.

Medición. Conjunto de operaciones que tiene por objeto determinar el valor de una magnitud.

Mensurando. Magnitud particular sujeta a medición.

Método de referencia. Método ampliamente investigado que describe clara y exactamente las condiciones y procedimientos necesarios para la medición de uno o más valores de la propiedad que han demostrado tener exactitud y precisión de acuerdo con su propósito de uso y que puede, por lo tanto, ser usado para evaluar la exactitud de otros métodos por la misma medición, permitiendo en particular la caracterización de un MR.⁴

Muestra. Cantidad representativa de un material extraído de un lote de referencia.

Nivel de confianza. En estadística, el intervalo de incertidumbre es conocido como el intervalo de confianza y los límites de incertidumbre son conocidos como los límites de confianza. En términos simples, no matemáti-

cos, el nivel de confianza puede ser definido como el porcentaje de las veces cuando el promedio, el «valor verdadero» de una propiedad, cae dentro de la incertidumbre declarada.

Patrón. Medida materializada, instrumento de medición, material de referencia o sistema de medición, destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o varios valores conocidos de una magnitud para utilizarse como referencia.

Precisión. La concordancia más estrecha entre los resultados independientes de una prueba obtenidos bajo condiciones prescritas.

Procedimiento de medición. Conjunto de operaciones descrito, específicamente, para realizar mediciones particulares de acuerdo a un método determinado.

Repetibilidad (de los resultados de mediciones). Proximidad de concordancia entre los resultados de las mediciones sucesivas del mismo mensurando, efectuadas con la aplicación de la totalidad de las condiciones siguientes:

- Mismo método de medición,
- Mismo observador,
- Mismo instrumento de medición,
- Mismo lugar,
- Misma condición de uso,
- Repetición en periodos cortos de tiempo.

Reproducibilidad (de los resultados de mediciones). Proximidad de concordancia entre los resultados de las mediciones del mismo mensurando, con las mediciones realizadas haciendo variar las condiciones de medición.

Trazabilidad. Propiedad de un resultado de medición o del valor de un patrón, de tal forma que pueda ser relacionada con las referencias determinadas, generalmente como patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones, teniendo todas las incertidumbres determinadas.

Valor verdadero. Valor compatible con la definición de una determinada magnitud particular. Este es un valor que se obtendría de una medición perfecta.

Valor de referencia aceptado. Un valor que sirve como una referencia en concordancia para comparación y el cual se deriva como:

- a) Un valor teórico establecido, basado en principios científicos;
- b) Un valor asignado, basado en un trabajo experimental de alguna organización nacional o internacional;
- c) Un valor de consenso, basado en un trabajo experimental de colaboración bajo el auspicio de un grupo científico o de ingeniería.
- d) De diseño o metodológicos apropiados.

Linealidad. Medida con la que una curva se aproxima a una línea recta. Un grupo de datos es lineal si la recta ajustada no difiere significativamente de la recta ideal ($r^2 > 0.990$). Este resultado se obtendrá en el análisis estadístico de los datos aplicando ecuaciones de 1er grado para el modelo predictivo en el comportamiento de los datos (logarítmico, exponencial o multiplicativo), donde r es el coeficiente de regresión.

Validación en equipos de medición

En un sistema de *gestión de calidad* acreditado, es indispensable asegurar que el equipo y los procesos de medición son adecuados para su uso y cumplen con las especificaciones que ofrece el fabricante. Hay ocasiones en que, durante el proceso de medición, se pueden producir resultados incorrectos que afectan la calidad del producto, o en los casos de una decisión diagnóstica o terapéutica, y a través de la validación, ese riesgo es medible.

Una pregunta común, antes de validar un equipo, es: ¿quién debe hacerlo? Generalmente, los laboratorios creemos que el proveedor; los auditores técnicos externos, consideran conveniente que sea el personal operativo de los mismos; en nuestra experiencia, ambos deben estar involucrados, con actividades definidas e igualmente comprometidos y conscientes de la importancia de validar un equipo previo a su uso.

La respuesta más común del proveedor, es argumentar la validación de origen del equipo o hacer referencia de artículos o estudios comparativos en otros países, con diferentes tipos de población (edad, género, y generalmente con pacientes) y en condiciones ambientales (temperatura, humedad altitud) muy diferentes a las nuestras. Lo correcto sería que el proveedor entregue un protocolo con las condiciones en que fue validado su equipo o método analítico o ante la carencia de éste, y que incluya la propuesta del fabricante de «cómo debe hacerse», además de información y documentación solicitada por el Banco de Sangre para llevar a cabo la validación. Pero debido a que la validación no se ha implantado como un requisito obligatorio, la mayoría de los representantes o distribuidores no cuentan con un protocolo establecido o desconocen si se tiene y en el último de los casos presentan protocolos de otros países, quedando como única opción que el personal de laboratorio identifique los procedimientos de examen o equipos que se deben validar y diseñe sus protocolos estableciendo los criterios para cada método o equipo.

Requisitos documentales

Antes de iniciar la validación, se solicita la siguiente documentación sobre el equipo:

- a) Ficha técnica del equipo que incluya, además de nombre, marca, número de serie, tipo de instrumento, etc. También los requisitos ambientales y eléctricos.
- b) Manual o procedimiento documentado para el usuario de solución de problemas.
- c) Verificación de instalación: cumplimiento de las especificaciones de voltaje que solicite el fabricante, contar con un regulador de energía y el área recomendada.
- d) Condiciones de temperatura y humedad requeridas por el fabricante.
- e) Programa de mantenimiento preventivo, especificando las actividades realizadas durante el mantenimiento y el tipo de verificación de funcionamiento del equipo.
- f) Definir el mecanismo de notificación y el personal específico en caso de que el equipo requiera un mantenimiento correctivo.
- g) Que esté bien definido el procedimiento de controles estandarizados de calidad y condiciones de entrega de los mismos y que incluya temperatura de recepción, para el control de calidad del equipo.
- h) Precauciones de manejo o uso contenidas en el manual de procedimientos.
- i) Capacidad instalada del equipo. Especificado en número de pruebas por hora y el máximo de pruebas continuas en una jornada de trabajo sin sobrepasar la capacidad del equipo.
- j) Contrato de convenio por equipo a comodato.
- k) Carta de resguardo o alta del equipo.
- l) Procedimiento de la empresa para llevar a cabo el mantenimiento correctivo; cuando sea necesario, que contenga forma o mecanismo para reportar una falla; en qué casos se requiere este mantenimiento y el tiempo de respuesta por parte del proveedor.
- m) Si el equipo utiliza reactivos o células calibradoras, deberá presentar certificado de

calibración con valores trazables a un patrón de calibración primario.

- n) Si el equipo requiere calibración de sistema (determinación de masa, temperatura o densidades ópticas) deberán realizarse verificaciones con material calibrado.
- o) Recomendaciones del control de calidad interno diario, tipo de control, material de control y frecuencia.
- p) En el caso de especificaciones como precisión del equipo, comparada con un método de referencia enviar evidencias de ese estudio o documento que avale los resultados.
- q) La linealidad que el fabricante reporta del equipo y método para verificarla.
- r) En los equipos que reportan precisión y sensibilidad, solicitar los métodos y estudios realizados por el fabricante como evidencia.

El protocolo de validación del equipo lo llevará a cabo el proveedor al ingreso del equipo a las instalaciones del Banco de Sangre. Las posteriores validaciones se llevarán a cabo anualmente o de acuerdo a las especificaciones y a los procedimientos documentados por el laboratorio. Una vez aceptado el equipo, se solicita programa de capacitación para el personal, evidencia de la misma y evaluaciones.

Protocolo de validación de un equipo de citometría hemática

Después de revisar que el equipo cumpla con la documentación solicitada, se realizan las siguientes determinaciones: a) Calibración, b) Linealidad, c) Precisión y d) Exactitud.

Calibración

Esta actividad es realizada por el asesor técnico del equipo y se utilizan 2 viales, uno para

calibrar y el segundo para la verificación de la calibración, los cuales son proporcionados por el proveedor. La frecuencia de la calibración la establece el usuario, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del equipo, al manual de operaciones, a las necesidades de uso detectadas y determinadas por el número de mantenimientos correctivos realizados al equipo, cuando ocurra un cambio de equipo, se traslade por cambio de ubicación del laboratorio o por mantenimiento fuera de la institución. Previo a la calibración se llevan a cabo las siguientes actividades:

- a) Realiza la limpieza para cámaras o baños de plaquetas, serie roja y serie blanca, de acuerdo a su procedimiento de mantenimiento diario, semanal y mensual.
- b) Verifica temperatura ambiental (16 a 35 °C).
- c) Revisa las condiciones del reactivo y volúmenes necesarios para completar el procedimiento.
- d) Lleva a cabo una prueba de reproducibilidad, que puede ser con una muestra de sangre total anticoagulada o el control celular comercial normal. Realiza mínimo 20 determinaciones con la misma muestra o las que indique el manual de operaciones del equipo y determina desvío estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

La muestra seleccionada debe entrar en los siguientes parámetros:

- Leucocitos 6.0 a 15.0 x10³ células/uL
 - Eritrocitos 3.00 a 6.00 x 10⁶ células/uL
 - Volumen corpuscular medio VCM 80.0 a 100.0 fL
 - Plaquetas 200 a 500 x 10³ células/UL
- a) Determina el acarreo del equipo. Este paso no debe realizarse si no es aceptada la reproducibilidad. Utiliza una muestra de

sangre total anticoagulada o el control celular comercial normal, con los mismos valores establecidos para la muestra que se utilizaron en la reproducibilidad. Realiza con la muestra seleccionada 2 determinaciones consecutivas y para la 3^a, 4^a y 5^a determinación utiliza solución fisiológica al 0.9%. La mayoría de los equipos de citometría hemática, cuenta con los programas para realizar estas determinaciones y emitir los resultados y conclusiones de aceptación o rechazo, así como las determinaciones estadísticas.

Una vez realizado lo anterior, introduce al equipo los calibradores y compara los resultados en cada parámetro de acuerdo al inserto que corresponda al lote y número de serie del calibrador utilizado; si éstos no están dentro de los rangos de aceptación descritos, modifica los valores de acuerdo al inserto y con el segundo vial lleva a cabo la verificación de la calibración, y realiza los registros en los formatos correspondientes que incluyen: fecha de realización, operario, número de serie, lote y fecha de caducidad del calibrador utilizado, y anexa todos los impresos de cada actividad realizada como evidencia.

Linealidad

Para esta determinación, normalmente, el fabricante proporciona controles de linealidad con su gráfico de concentraciones para determinarla en nuestro equipo.

Se siguen las recomendaciones generales:

- a) Mantener los controles de linealidad a temperatura de refrigeración controlada entre 1 y 6 °C.
- b) Retirar los controles de linealidad del refrigerador 10 minutos previos a su uso.
- c) Homogeneizar de acuerdo a la técnica descrita en el inserto. Revisar visualmen-

te si los controles están completamente homogéneos.

Analiza los controles de linealidad 6 veces, y registra los resultados de las 6 determinaciones para los parámetros de leucocitos, eritrocitos, hemoglobina y plaquetas en la hoja de trabajo que incluye generalmente el reactivo. Para realizar los cálculos, deberá obtener valores numéricos; en caso contrario, repetir las muestras. Desecha el primer resultado de los 6 parámetros y toma únicamente los últimos 5 datos y calcula la media de las 5 determinaciones para cada parámetro. Registra el valor medio obtenido en la gráfica de linealidad de cada parámetro que incluye el reactivo y compara el valor medio de los controles de linealidad con la amplitud de valores enlistados en la tabla de resultados esperados de linealidad, y de acuerdo a éstos, establece sus criterios de aceptación y rechazo en su procedimiento.

Precisión

La precisión sólo depende de la distribución de los errores aleatorios y no se relaciona con el valor verdadero ni con el valor especificado. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión a través de la reproducibilidad y se calcula como desviación típica de los resultados del ensayo. En el equipo de citometría hemática se puede determinar a través de 2 métodos:

- I. Precisión intracorrida, que es la variabilidad obtenida cuando se analizan en una misma corrida una serie de muestras o controles. Esta variación se determina a través del método ya descrito anteriormente para determinar reproducibilidad.
- II. Precisión intercorrida: La variabilidad obtenida cuando se analizan las muestras o

controles en diferentes corridas en días diferentes. Esta evaluación se realiza a través del control de calidad diario, analizando el comportamiento de los controles comerciales en los 3 niveles (alto, bajo y normal) para los parámetros de hemoglobina, leucocitos y plaquetas.

Método:

1. Se evalúan los controles proporcionados por el fabricante por lo menos en dos niveles, incluyendo siempre un control normal y el otro podrá ser alto o bajo o positivo, de acuerdo al tipo de prueba que se esté manejando. Para donadores se recomienda el normal y bajo.
2. Se analiza cada nivel de control 20 veces en una corrida, para obtener un total de 20 resultados.
3. Se calcula la media, desviación estándar y coeficiente de variación de los resultados obtenidos para cada nivel de control, y con estos datos se construye la gráfica de referencia para ver reproducibilidad intercorrida.
4. El coeficiente de variación deberá ser igual o menor al informado en la ficha técnica que proporciona el proveedor.
5. Para los casos de interpretación se aplicará lo siguiente: Cuando la presencia de una regla de rechazo de acuerdo a los criterios de Westgard ocurre en el control normal y alto se traducirá como una señal de aviso.
6. Cuando la presencia de una regla de rechazo de acuerdo a los criterios de Westgard ocurre en el control normal y control bajo se anula la corrida.

Exactitud

La determinación de la exactitud del equipo de citometría hemática será determinada a

través del análisis de los resultados en un programa de comparación interlaboratorio, es decir, para conocer el grado de concordancia entre el resultado notificado y el valor de referencia aceptado. Este método de medición de la exactitud es a través de la repetibilidad, la cual nos indica el grado de acuerdo entre resultados mutuamente independientes de un ensayo obtenidos utilizando el mismo método, en idénticos materiales, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y en un intervalo corto de tiempo.

Método:

- I. Se selecciona el programa de comparación de resultados interlaboratorio, que reúna los requerimientos normativos de la NMX-EC-043/1-IMNC-2000 – Ensayos de aptitud por comparaciones interlaboratorios–, norma equivalente a la Guía Internacional ISO/IEC 43-1:1997.
- II. Se envían los resultados del análisis diario de los controles en los 3 niveles, de acuerdo a lo establecido en los procedimientos operativos.
- III. Para la interpretación de resultados, se compara para cada parámetro y para cada nivel el coeficiente de variación obtenido contra el coeficiente de variación obtenido por todos los participantes.
- IV. Al 100% se le resta el CVI y se obtiene la precisión para cada parámetro. El valor de CVI no deberá ser mayor al 3%.
- V. En caso de presentarse un resultado de precisión menor al 97% se realizará una acción preventiva y no se invalida la prueba si estos valores corresponden a los controles bajo y alto, por manejarse muestras de donadores sanos.

Generalmente, los programas de control externo y control interlaboratorios envían, además de los resultados, análisis y gráficos de

los mismos. Es recomendable que el laboratorio participante analice esta información, interprete las gráficas, la distribución de los datos reportados y establezca la causa-raíz de las fallas a través de círculos de calidad, diagramas de Ishikawa «causa-efecto», o alguna otra herramienta de calidad, con el objetivo de proponer acciones de mejora y aplicarlas en las subsecuentes evaluaciones.

Validación en métodos de medición

Muy pocos Bancos de Sangre validan sus procedimientos de examen, y esto representa el riesgo de no identificar los puntos críticos del proceso, para aplicar controles o filtros para prevenir los errores durante el desarrollo del mismo.

A diferencia de la validación de equipos, validar métodos no se enfoca únicamente a la técnica analítica y las especificaciones de la misma, sensibilidad, especificidad, avidez, entre otras; debe considerarse, además, la habilidad y competencia del personal de laboratorio y con el que se relaciona a lo largo del proceso: enfermeras, secretarias, médicos, mensajeros, etc., es decir, el cliente interno. De igual manera, intervienen las condiciones ambientales (esterilidad, polvo, interferencias electromagnéticas, radiaciones, humedad, electricidad, temperatura, ruido, niveles de vibración).

La metodología de la validación puede ser principalmente de diseño, para demostrar que el desarrollo de un nuevo método de medición o la modificación de uno ya establecido, es suficientemente exacto para los requerimientos especificados; o a través del control de calidad, de forma rutinaria, para demostrar que el método de medición implementado en el laboratorio, en condiciones normales, cumple con los parámetros establecidos en la etapa de diseño y tiene la capacidad para realizar la medición correctamente.

Al igual que en la validación de equipos, se deben cumplir los siguientes requisitos documentales:

1. Procedimiento documentado por el laboratorio del Banco de Sangre para cada técnica tomando en cuenta las recomendaciones del fabricante.
2. Describir la metodología del control de calidad diario para reactivos y células utilizados en cada examen, así como criterios de aceptación y rechazo.
3. Definir las interferencias, reacciones cruzadas y situaciones fuera de control y soluciones para las mismas de cada método de examen.
4. Demostrar la competencia del personal operativo para cada prueba. Evidencia y evaluación de capacitación.
5. Participar en programas de control de calidad externo para cada determinación analítica, en cumplimiento de la Guía ISO/IEC 43-1:1997.
6. Determinar el grado de afectación, si existe, de los factores ambientales, para cada prueba o método.

En las pruebas inmunohematológicas, que son cualitativas se aplicó lo siguiente:

- a) Realizar la técnica como lo indica el fabricante.
- b) Comprobar los resultados de acuerdo a lo reportado. Ejemplo: avidez, especificidad, potencia, etc.
- c) Si se realizan modificaciones del método, se deben realizar determinaciones con muestras verdaderas positivas y verdaderas negativas, que funcionarán como estándares de oro y se hará la concordancia con

los resultados obtenidos de la técnica modificada.

Se realiza un análisis estadístico a través de la prueba de concordancia para variables nominales mediante la prueba de *phi*. El grado de concordancia se evaluará bajo los siguientes criterios:

Resultado	Grado de acuerdo
< 0	
0 – 0.2	Insignificante
0.2 – 0.4	Bajo
0.4 – 0.5	Moderado
0.5 – 0.8	Bueno
0.8 a 1.0	Muy bueno

Referencias

1. Holliman SM. Validation in blood establishments and transfusion services. AABB 1996: 1-10; 67-73.
2. Martínez RR. Validación de métodos de medición. Entidad Mexicana de Acreditación, EMA 2006: 2-20.
3. NMX-Z-055-1997-IMNC-Metrología. Vocabulario de términos fundamentales y generales. International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM). BIMP/IEC/ISO/OIML/IFCC/IUPAC/IUPAP, Second Edition). México.
4. BT-NMX-CH-030-IMNC-2003. Términos y definiciones usados en relación con materiales de referencia.
5. NMX-CC-10012-IMNC-2004. Sistemas de gestión de las mediciones. Requisitos para los procesos de medición y los equipos de medición-ISO 10012:2003. COPANT/ISO 10112-2003.
6. NMX-EC-15189-IMNC-2006 / ISO-15189:2003. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y competencia.
7. World Health Organization Regional Office for Africa. WHO. Guidelines for appropriate Evaluations of HIV Testing Technologies in Africa. 2004: 27-29.

Correspondencia:

Héctor A Baptista-González

Hematología-Perinatal, Subdirección de Investigación Clínica. Montes Urales Núm. 800, Lomas Virreyes, Delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, D.F., 11000, E-mail: baptista@infosel.net.mx

Artículo de revisión

Lo que no sabemos y lo que debemos saber acerca de las pruebas moleculares en el tamiz de infecciones transmitidas por infección en donadores de sangre en México

Héctor A Baptista-González*

Resumen

Los algoritmos para el tamiz de los donadores de sangre se basan principalmente en estudios serológicos mediante técnicas inmunoenzimáticas, principalmente ELISA, forman parte del esquema más racional y con mejor resultado costo-efectividad, por lo que es la metodología más empleada. Para poder incluir una nueva prueba en el tamiz de los donadores de sangre, se deben cumplir obligadamente, ciertos criterios epidemiológicos y técnicos para poder lograr un impacto favorable en la modificación de la historia natural de la enfermedad, lograr la factibilidad y viabilidad de la intervención con el menor costo económico posible, evaluado mediante un estudio integrativo de costo-eficiencia favorable. Las pruebas suplementarias (p24, anti-HBc) o moleculares, que han generado un valor agregado en este proceso de escrutinio con resultados variables. No existe información suficiente que demuestre en términos técnicos científicos, al igual que otras intervenciones en salud, las ventajas de los estudios moleculares mediante una estrategia universal en el tamiz de donadores de sangre. El conocimiento del proceso del escrutinio de donadores y los reportes per-

Abstract

The algorithms to screening the blood donors are based primarily on serologic tests by immunoenzyme techniques, mainly ELISA, comprise of the most rational scheme and with a better result cost-effectiveness reason why using is the methodology more. In order to be able to include a new test in the screening of blood donors, we must complete compulsorily, certain epidemiologists and technicians criteria to be able to obtain a favorable impact on modification of natural history of the disease, to obtain the feasibility and viability of intervention evaluated by an integrative study of favorable cost-efficiency. The additional tests (p24, anti-HBc) or molecular techniques have generated an added value in this process of screening with variable results. Sufficient information that does not exist it demonstrates in scientific technical terms, like other interventions in health, the advantages of the molecular studies by a universal strategy in testing blood donors. The knowledge of the process to study blood donors, and the persistent reports of the high seroprevalence, indicate to evident faults in tactically important points of education for the health, promotion of blood donation and medical evaluation in the selec-

* Hematología Perinatal. Instituto Nacional de Perinatología. Medicina Transfusional y Banco de Sangre, Médica Sur.

sistentes de la elevada seroprevalencia, señala evidentes fallas en los puntos críticos de educación para la salud, promoción de la donación y evaluación médica en la selección de donadores, en un marco legal ineficiente que inhibe el desarrollo de donador seguro, para que en conjunto con sus resultados de costo-eficiencia, se establezca una secuencia coherente entre donador seguro y sangre segura en beneficio de la salud de la población.

Palabras clave: Virus transmitidos por transfusión, donador de sangre, banco de sangre, transfusión sanguínea.

tion of blood donors, in an inefficient legal frame that inhibits the development of safe donor, so that altogether with his results of cost-efficiency, it settles down a coherent sequence between safe donor, and safe blood to the benefit of population health.

Key words: Transfusion transmitted virus, blood donors, blood banks, blood transfusion.

Para incluir una nueva prueba en el tamiz de los donadores de sangre se deben cumplir, obligadamente, ciertos criterios epidemiológicos y técnicos para lograr un impacto favorable en la modificación de la historia natural de la enfermedad, así como la factibilidad y viabilidad de la intervención con el menor costo económico posible, evaluado mediante un estudio integrativo de costo-eficiencia favorable (Cuadro I). Si es-

tos criterios no son tomados en cuenta en el contexto local de cada banco de sangre o institución, se tenderán a repetir errores históricos, los cuales constan en los antecedentes de la medicina mexicana.

Los distintos reportes sobre la prevalencia de reactividad entre los marcadores serológicos de enfermedades infecciosas, en donadores de sangre, representan un sesgo de auto-selección, pues la probabilidad de acudir a

Cuadro I. Variables que intervienen en el perfil de una prueba de escrutinio.

Criterios epidemiológicos:

- Prevalencia de la enfermedad (si la frecuencia de detección es demasiado baja, el costo por caso podría ser elevado, consecuentemente con una escasa reducción de la morbilidad y mortalidad)
- Tasa de incidencia de la enfermedad
- Duración promedio de la fase preclínica
- Tamiz previo en los donadores (donador voluntario o reposición, de primera vez o repetición, con selección médica o con serológica dirigida, etc.)

Criterios técnicos:

- Evaluación de desempeño de la prueba (pruebas diagnósticas, esperando obtener la máxima sensibilidad e ideal, pero no obligadamente, también una máxima especificidad, que genere una tasa baja de falsos positivos, pues los valores predictivos dependen de la prevalencia de la enfermedad)
 - Validez interna y externa comprobada
 - Puntos claros de corte
 - Disponibilidad opcional de prueba suplementaria
 - Disponibilidad de prueba confirmatoria
 - Estrategia de tamiz en pruebas en paralelo o en serie
- Criterio de integración:
- Documentación sobre la evidencia de costo-eficiencia

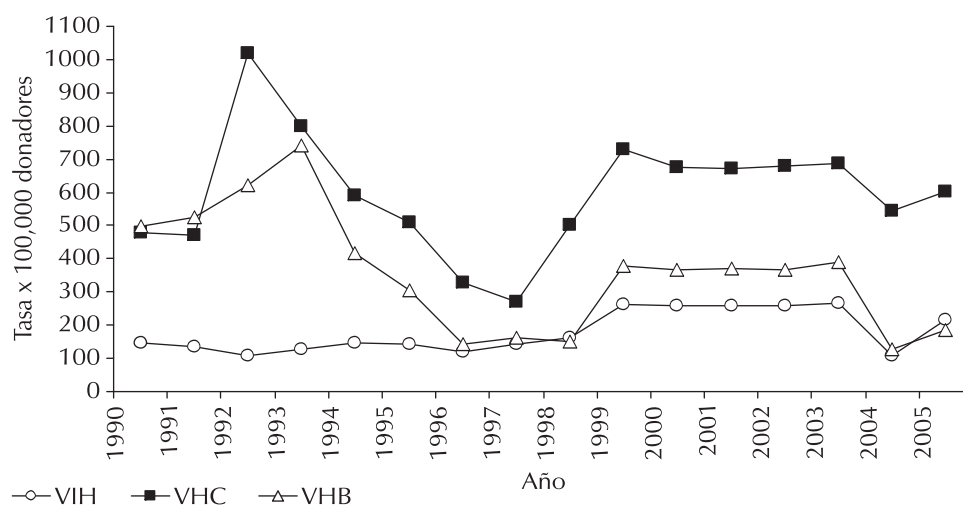


Figura 1. Dinámica en la tasa de seroprevalencia reportada en donadores de sangre 1990-2005.

tamiz (participar) es mayor en sujetos más saludables y con menor riesgo de enfermedad. Sin embargo, frecuentemente se emplea la seroprevalencia de donadores para referirse al comportamiento poblacional de un marcador, como se muestra en la compilación de los reportes presentados sobre la prevalencia serológica de diversos estados de la República Mexicana, en el periodo 1990-2005, expresados en tasa por 100,000 donaciones (Figura 1).

Los marcadores para anti-VHC, son entre 4 y 5 veces más frecuentes que anti-VIH y el Ags-HB. Es decir, a pesar de que existe una serie de filtros que selecciona y elimina posteriormente a más del 50% de los sujetos que se presentan a donar, algunos quedan sin detectar; por ejemplo, en el caso de VIH se adquirieron mediante prácticas sexuales de riesgo. Las pruebas moleculares se desarrollaron para integrarse a una estrategia de estudio en la población de donadores de sangre. Las políticas institucionales o nacionales han sido distintas, con resultados ampliamente variables, debido a que la identificación de virus transmitidos por transfusión también se engloba en el esquema «Norte-Sur». Los países industrializados han hecho un gran esfuerzo por identi-

ficar el riesgo de transmisión del VHC, VHB y VIH. Con la introducción de las técnicas moleculares el riesgo residual se limita a un caso entre 2,135,000 donaciones (tasa cero para VIH-2), 1:1,935,000 para VHC y para VHB es de un caso entre 205,000-488,000 donaciones, y comparados con otros países latinoamericanos el riesgo residual actual varía de 1:4,957, 1:496,712 y 1:24,179, para cada marcador respectivamente.¹ Así pues, en esta revisión presentaremos algunos de los aspectos biológicos, epidemiológicos y técnicos que sirven de marco en este análisis.

Los algoritmos para el tamiz de los donadores de sangre se basan fundamentalmente en estudios serológicos. Las pruebas inmunoenzimáticas, principalmente ELISA, forman parte del esquema más racional y con mejor resultado costo-efectividad, por lo que es la metodología más empleada, aunque se tienen pruebas suplementarias (p24, anti-HBc), o moleculares, que han generado un valor agregado en este proceso de escrutinio con resultados variables. En la comparación entre diferentes metodologías y reactivos de diferentes fabricantes, en triple detección molecular, evaluando panel de seroconversión, existen diferencias significativas en la sensibi-

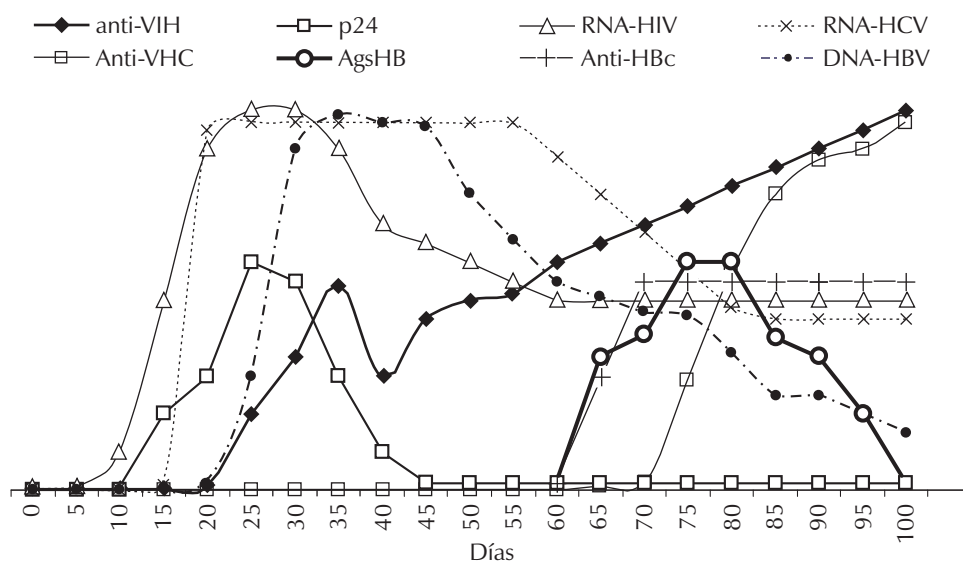


Figura 2. Cinética en la detección serológica y molecular en la infección aguda de VIH, VHC, VHB.

lidad y eficiencia en la detección de periodos de ventana (Figura 2). Esto significa que la presencia de RNA o DNA viral no es detectado inmediatamente después del inóculo, tiempo que varía entre 7, 11 y 21 días promedio para VIH, VHC y VHB, respectivamente. En el mismo sentido, la respuesta serológica es relativamente temprana para VIH, 22 días, pero más prolongada para VHB y más aún para VHC.

Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

A la inoculación del virus, sigue una etapa de replicación viral, que puede ser detectada hacia el día 10-11 de la infección, mediante la identificación del VIH-RNA en el plasma del donador. Entre los días 10-16 es posible identificar en el laboratorio la presencia sérica del antígeno p24 del VIH. La etapa sin detección de anticuerpos o periodo de ventana serológica, se extiende hasta el día 21-22 del inóculo donde el anti-VIH aumenta paulatinamente su concentración hacia el día 40, para posteriormente seguir una rampa rápida de ascenso. El escrutinio legal y práctico de los

donadores es mediante la búsqueda de anticuerpo anti-VIH en suero. La prueba suplementaria para detectar una etapa previa es mediante la detección de p24 y la prueba confirmatoria tradicional es la inmunoelectrotransferencia (Western blot), misma a la que puede adicionarse la detección molecular del VIH-RNA. Esto significa que para el escrutinio de VIH se puede emplear la estrategia de pruebas paralelas (anti-VIH, p24, VIH-RNA) o en serie, que puede ser de una sola prueba o en combinaciones.

Virus de la hepatitis B (VHB)

La mejoría tecnológica para la identificación en los donadores de sangre del VHB, ha disminuido significativamente el riesgo de transmisión por transfusión de la infección por el VHB: un evento por cada 153,000 a 500,000 donaciones. Sin embargo, esta mejoría es aparente, pues el riesgo es de 10 a 100 veces mayor al compararse con la probabilidad de infección transfusional del VIH o VHC.² Existen propuestas sobre agregar al tamiz con AgsHB, la detección del anticuerpo contra la porción central del VHB (anti-HBc), la amplifica-

ción de los ácidos nucleicos del VHB o VHB-DNA o diferentes combinaciones de las tres pruebas.^{4,5} Se han efectuado diferentes estudios para la validación de las pruebas moleculares en el periodo de ventana serológica de la infección aguda de la enfermedad y el estado de portador crónico o infección oculta por el VHB.⁶ La relevancia de estos hechos se debe a que la infección crónica por el VHB se presenta en cerca del 90% de los donadores AgsHB. El criterio para definir al portador inactivo del VHB debe incluir la persistencia serológica del AgsHB, con negatividad para el AgeHB pero sí con su anticuerpo correspondiente, anti-HBe, con valores normales de ALT y niveles séricos de VHB DNA menores a 10,000 copias/mL o < 2,000 IU/mL, para unos y < 1.5 veces el límite superior de ALT y < 100,000 copias/mL para VHB-DNA.⁷ La comparación entre los diversos valores de VHB-DNA se genera con las diferentes metodologías o técnicas disponibles. Las causas por las que no es posible identificar mediante NAT para VHB-DNA, incluyen la presencia de los genotipos A (56%) y D (4%), sujetos AgsHB identificados mediante pruebas ultrasensibles, periodos de ventana con muy baja carga viral, sujetos con patrón fluctuante de VHB-DNA y anti-HBs (infección recuperada) y sujetos con anti-HBc pero sin anti-HBs o portador crónico asintomático.⁸

Virus de la hepatitis C (VHC)

Luego de la inoculación, la detección del VHC-RNA tiene un periodo silente de aproximadamente 12 días, para posteriormente generar un efecto de ascenso muy rápido para una carga viral elevada hacia los días 18-20. Posteriormente, y hacia el día 60, ocurre una caída significativa de la carga viral para mantenerse en efecto de meseta durante un periodo prolongado. El desarrollo del anticuerpo ocurre

hacia el día 70 luego del inóculo, obteniéndose un efecto de meseta con máxima concentración de anti-VHC hacia los días 85-90.

Junto con la aparición de seroconversión en sujetos receptores de sangre negativa en pruebas moleculares para marcadores virales, es indicado que la transmisión del VHC puede ser causada por donaciones que escapen a la detección de ácidos nucleicos, a pesar de estudiarse en muestras individuales.⁹ La comparación con diferentes pruebas nos lleva a resultados que no necesariamente reflejan la sensibilidad esperada e implica la necesidad de emplear material y reactivos estandarizados que representen a todos los genotipos del VHC.⁹

Treponema pallidum

Es una bacteria del grupo de las espiroquetas, un organismo helicoidal cuyo genoma fue secuenciado por completo en 1998 y consta de 44 secuencias de tRNA organizado en 8 racimos de 25 genes y 19 genes sencillos y dos operones de rRNA. La virulencia de la espiroqueta está incluida en 12 proteínas de membrana.

La infección adquirida por transmisión sexual presenta un periodo de incubación promedio de tres semanas, para aparecer las lesiones luéticas de la sífilis primaria. En la lesión secundaria se tiene disponible en nuestro medio pruebas no treponémicas (VDRL, RPR) y treponémicas, con amplia variabilidad en términos de especificidad. Sin embargo, en legislaciones como la nuestra no se hace diferencia en aceptación o rechazo de un donador que es reactivo a pruebas no treponémicas, pero negativo a las treponémicas. La preparación biológica de referencia (PBR) propuesta por la OMS para *T. pallidum* (WHO 1st IS (#HS), de 47 UI por ampula y establecida en 1957, está próxima a agotarse y existen

propuestas para reemplazarla con una preparación de IgG a partir de una mezcla de plasmas de pacientes con sífilis latente.

Infecciones por *Plasmodium* (Paludismo)

Las situaciones particulares en las pruebas basadas en DNA del parásito están relacionadas en lo peculiar de su ciclo vital que afecta la expresión clínica de la enfermedad. El periodo de latencia, de la inoculación hasta la parasitemia, se estima en 9-21 días, dependiendo de multitud de factores, como la especie de *Plasmodium*. Luego del inóculo, el parásito permanece en el hígado durante 7-9 días, mientras los sujetos permanecen asintomáticos. Al periodo entre la estancia en el hígado (parasitemia) hasta la producción de anticuerpos se deben agregar de 4-7 días más. No se tiene claro el significado de la presencia de anticuerpos contra el *Plasmodium* en el donador sin parasitemia, recordando una etapa de recuperación. La dosis infectante se estima de 1 a 10 parásitos por unidad de sangre, dosis que puede ser difícil de detectar en las técnicas de PCR. Su punto de corte varía en los 90 parásitos por unidad, dependiendo del reporte consultado. No queda claro aún el confirmar o descartar la existencia de parasitemia en sujetos asintomáticos, situación que ocurre en otras condiciones como leishmaniasis o toxoplasmosis. Las investigaciones sobre paludismo en las pruebas basadas en DNA del parásito se han orientado hacia la farmacovigilancia, genotipaje, variación de las variaciones antigénicas en la población de estudio y, recientemente, la eficacia de la vacuna. Sin embargo, las pruebas moleculares no han mostrado el impacto esperado, debido a que se tiene escasa experiencia al respecto. La OMS tiene una PBR (1st IS p. *Falciparum* DNA, #047176 ECBS 2006), aún con dificultades para definir su mejor estrategia de detección

basado en la identificación del RNA o DNA del parásito. La metodología de PCR en tiempo real puede detectar una sola copia del parásito en una uL de sangre, (alrededor de 250 parásitos/unidad) pero también está muy por encima de la dosis infectante, aunque estas técnicas muestran la ventaja de poder identificar al parásito al menos 5-7 días antes de que pueda verse en el microscopio. Las técnicas de microarreglos, aunque ya en proceso, no están accesibles para el campo clínico, pero diferencian claramente a cada especie de *Plasmodium*. Los donadores asintomáticos que hayan viajado a zonas endémicas, presentan una parasitemia extremadamente baja (< 90 parásitos por unidad) que escapa a la detección molecular. La identificación directa, realizada por verdaderos expertos, puede identificar entre 5 a 50 parásitos/uL. Otra limitante es que los estudios se han dirigido hacia la especie *Falciparum* y con menor intensidad al ovale, pero prácticamente sin información en las especies *knowlesi* o *malariae*. No se recomienda que la metodología de PCR sustituya a la detección sexológica.⁴

Trypanosoma cruzi

La enfermedad de Chagas es propia de la marginación y pobreza que afecta aproximadamente a 11 millones de latinoamericanos y se extiende en estimaciones superiores a los 100,000 inmigrantes ilegales seropositivos en USA y Canadá. En estos países, la FDA liberó en el 2006 los reactivos para efectuar la detección de la respuesta inmunológica en *T. cruzi* en donadores de sangre y órganos. A pesar del inicio reciente del tamiz en donadores y de la gran población serológicamente reactiva que pudieran convertirse en donadores de sangre, son realmente aislados los casos documentados de infección postransfusional (siete casos) o con donación de órganos

(cinco casos). En México no existe registro alguno que proporcione siquiera una aproximación sobre el riesgo real de transmisión o casos comprobados de infección postransfusional de *T. cruzi*; solamente se cuenta con casos esporádicos reportados en la literatura de esta asociación.¹⁰

La prueba aprobada por la FDA se basa en la captura del anticuerpo anti-*T. cruzi*, empleando lisado del epimastigote¹⁰ y debido a la escasa experiencia en esta prueba, si se compara con sífilis por ejemplo, su validación aún es inconsistente, además de no existir paneles de seroconversión de *T. cruzi* y las pruebas iniciales se efectuaron en lotes de muestras de seroteca hasta con 10 años de conservación y más de una sesión de descongelamiento. La recomendación de la AABB y FDA es dar destino final a las unidades y excluir a los donadores repetidamente reactivos. Rastreo de los receptores de las unidades previamente donadas de los sujetos repetidamente reactivos. Adicional a las pruebas de tamiz, se debe efectuar la confirmación con pruebas de radioinmunoprecipitación (RIPA), inmunofluorescencia indirecta (IFA) u otras disponibles que han sido evaluadas con pruebas suplementarias como las técnicas de inmunomancha.¹⁰ Aunque ninguna de ellas tiene aprobación de la FDA como tal o está en proceso la validación de los algoritmos.

Un problema no resuelto en el estudio de los donadores de sangre es la reactividad cruzada de los anticuerpos contra *T. cruzi* y contra *Leishmania*. La AABB está empleando un sistema de rastreo basado en una página de Internet para la enfermedad de Chagas, que incluye el resultado serológico del donador y los datos demográficos, especialmente en aquellas instituciones que no están aplicando este tamiz serológico. Es decir, existen diversas estrategias para generar seguridad sanguínea respecto a la ITT por *T. cruzi*, que inclu-

ye el tamiz en todos los donadores, tamiz en la primera donación y de acuerdo al resultado serológico y factores de riesgo, no efectuar subsecuentes pruebas, identificación de la procedencia o residencia del donador en zonas endémicas y factores ambientales que favorecen la transmisión de la enfermedad.

Virus del Oeste del Nilo (VON)

El VON se transmite por artrópodos y pertenece al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae* y está relacionado con los virus de la encefalitis japonesa, encefalitis de San Luis y encefalitis del Valle Murray. Hasta el 18 de julio de 2007, se reportó la CDC, 23 presuntos casos de infección por VON en humanos, más de la mitad localizados en los estados fronterizos de California y Texas. En México se cuenta con un programa especial para la atención de la infección por VON, tanto en animales como en humanos (www.cenave.gob.mx/von/), y hasta el mes de diciembre de 2006 se reportan 203 casos evaluados, pero uno solo en ser humano se identificó con la infección por VON. Por supuesto que no existe a la fecha reporte alguno de la adquisición postransfusional de esta infección en nuestro medio. La infección del VON no ha tenido el impacto epidémico debido a que son esporádicos los reportes de enfermedad equina, humana y aviar en América Latina y el Caribe,¹¹ pero sin tener un comportamiento epidémico mundial, como ha ocurrido en otros casos.

El estudio serológico del VON incluye la detección de anticuerpos específicos IgG e IgM, así como la detección del RNA viral. Hasta el día 2-3, luego del inóculo, se documentan las concentraciones máximas del RNA viral, para disminuir hacia el día siete. La producción de anticuerpos inicia desde el día 5 y alcanza su punto máximo el día siete. El periodo de ventana del VON es muy corto, no

más de dos días. El problema con las pruebas serológicas es su inespecificidad, pues presenta reactividad cruzada en aquellos sujetos con infección por virus del dengue, debido a que las estructuras de ambos virus son muy semejantes y es posible la existencia de inmunidad cruzada. Bajo distintos sistemas de detección del VON, se encuentra que la sensibilidad analítica del 95% varía entre 8.2 a 9.8 copias/mL (PROCLEIX y TIGRIS), con reproducibilidad superior al 99%. Aun cuando existen pruebas serológicas y moleculares, las características propias de la enfermedad (viremia muy temprana y periodo de incubación corto), no existe algún estudio clínico (no patrocinado por la industria) que demuestre las supuestas bondades de la prueba molecular.

Limitaciones en las características de las pruebas

La detección del laboratorio de VHC en muestras de plasma bajo un programa de control externo de calidad tiene una variación hasta del 18% en la cuantificación de concentraciones bajas de VHC, fuera del valor medio de 0.5 logaritmos.¹² La transmisión del VHC puede ser causada por donaciones que escapan a la detección de ácidos nucleicos, a pesar de estudiarse en muestras individuales.⁹ La comparación con diferentes pruebas nos lleva a resultados que no necesariamente reflejan la sensibilidad esperada e implica la necesidad de emplear material y reactivos estandarizados que representan a todos los genotipos del VHC.⁹ La metodología para PCR en tiempo real muestra más ventajas en términos de mayor precisión, sin subestimar o sobreestimar la carga viral,¹³ además de mantener linealidad para VHC entre 10 a 10,000,000 de UI/mL para los genotipos 1-6 y con mayor eficiencia para detectar concentraciones de HVC-RNA < 6,000 UI/mL que otros sistemas.¹⁴

En la validación de nuevos calibradores de referencia para VIH, VHC y DNA-VHB en la prueba de amplificación de ácidos nucleicos contra estándar internacional, ambos sometidos a diluciones seriadas, se ha podido establecer adecuada concordancia en la detección de VIH y HVC, pero no así en VHB, como material de referencia.¹⁵ Para el caso de VIH-RNA la estabilidad de la carga viral en la muestra de plasma es adecuada, almacenándose a temperatura de 4-22 GC hasta por una semana. En el mes de junio del presente año, la OMS presentó su plan estratégico para el desarrollo de PBR donde se incluye a los patógenos con impacto en la seguridad sanguínea. Esto surge como una necesidad urgente para atender el problema de control de calidad en el escrutinio serológico o molecular de los disponentes. Se espera que estos consensos sobre PBR sean efectivos en términos de validación y sensibilidad analítica, para lograr la armonización en estudio y diagnóstico de la enfermedad.

Linearidad de la carga viral

Una situación problemática es la dificultad técnica que representa el emplear técnicas o metodologías en el Banco de Sangre o laboratorio clínico que presenten linealidad con la eficiencia suficiente para detectar a sujetos en la etapa de tolerancia inmune, con niveles muy elevados de ADN-VHB (> 10⁸-10⁹ UI de partículas virales) o bien en la etapa de control inmune con valores extremadamente bajos del ADN-VHB (< 10⁵). Los reactivos comerciales disponibles presentan rango de linealidad desde 2.3 x 10³-1 x 10⁸, 1.4 x 10⁵-1.7 x 10⁹, 2 x 10²-2 x 10⁵ hasta 1.7 x 10²-6.4 x 10⁸, según del fabricante que se trate.⁵ Las diferencias en la sensibilidad analítica se combinan con los cambios dinámicos y la habilidad para mantener la linealidad en

variabilidad extrema en la concentración de partículas virales e identificar a los diferentes genotipos entre las diferentes metodologías. Mediante la prueba Procleix WNV Assay, comparando el método semiautomatizado contra el completamente automatizado, se muestran límites de detección del 95% de 8.2 copias/mL 9.8 copias/mL, respectivamente. Con especificidad del 99.9% en muestras de plasma y reproducibilidad > 99.1% a tres concentraciones diferentes (0, 30 y 100 copias/mL). Se han desarrollado pruebas de microarreglos múltiples para la detección del VHB, VHC y VIH, con secuencias variables de oligonucleótidos. Con esta prueba se detecta 1, 10 y 20 IU de VHB, VHC y VIH-1, respectivamente, permitiendo discriminar la presencia de 2 ó 3 virus en una sola muestra.¹⁶

¿Pruebas individuales, dos o tres en uno?

La evaluación de la eficiencia y eficacia de las diferentes estrategias y metodologías, se ha evaluado empleando distintos paneles de seroconversión o en el estudio de donadores de sangre. En ambas situaciones, los resultados son distintos. El riesgo postransfusional del VHB, a pesar de las medidas de control ampliamente conocidas, es más alto que para el caso del VHC o VIH. El agregar la detección de ácidos nucleicos (NAT) en donadores individuales podría reducir el riesgo de ITT más allá de lo que se obtiene con la prueba más sensible disponible para AgsHB. Sin embargo, en los grupos con baja prevalencia del VHB se ha demostrado que el NAT en minipool podría ser más eficiente para

Cuadro II. Sensibilidad analítica en sistema de triple detección.²¹

Sistema	VIH-1-RNA	VHC-RNA	VHB-DNA
Procleix Ultrio (Katsoulidou A, 2007)	100%: > 50 copias/mL 41%: < 50 copias/mL	100 %: > 520 UI/mL 11%: < 50 UI/mL	96%: > 250 copias/mL 80%: < 250 copias/mL
Procleix Ultrio (McCormick K, 2006)	> 95%: 100 copias/mL	> 95%: 30 UI/mL	> 95%: 15 UI/mL
Procleix Ultrio Koppelman MH (2005)	95%: 26 (16-58) UI/mL	95%: 4.6 (3.7-6.5) UI/mL	95%: 11 (7.3-22) UI/mL

Cuadro III. Estrategia molecular en el tamiz de donadores. Variables relacionadas.

- Marcador único o combinado con dos o tres más
- Pruebas en serie: sólo incluir aquéllos con estudio serológico negativo. Con o sin pruebas suplementarias previas
- Pruebas en paralelo: Correr simultáneamente molecular y serológico
- Ajustes a la endemidad local del marcador
- Evaluación de inmunoensayos de alta sensibilidad
- Técnicos
 1. Metodología
 2. Técnica de concentración viral
 3. Muestras sencillas
 4. Tamaño del minipool, igual o distinto para cada marcador
 5. Sensibilidad analítica
 6. Tipo de calibrador

detectar la viremia del VHB.¹⁷ Adicionalmente, la detección de VHB-DNA en muestras individuales es más efectiva que en minipool. El empleo del NAT en muestras individuales debería ser más efectivo para detectar la infección del VHB en periodo de ventana, aunque aún no está disponible comercialmente un equipo totalmente automatizado para tal efecto.¹⁸ La capacidad mejorada de detectar el antígeno p24 AG sugiere que estos nuevos análisis combinados para la detección de antígenos y anticuerpos del VIH podrían sustituir al análisis del antígeno p24 solamente en las situaciones para el tamiz de donadores cuando las pruebas moleculares no sean factibles ni comparables.¹⁹ Empleando panel de seroconversión: Cobas ((R)) TaqScreen MPX: se evalúan dos paneles distintos con sensibilidad para VIH-1 y VHC de 100 y 95%, mientras que para VHB varía entre el 90-95%.²⁰ Los límites de detección del 95 y 50% con metodología de triple identificación (Procleix Ultrio.®) son de 53.7 (32.9-117.2) y 8.6 (6.2-12.1) geq/mL para VIH-1 RNA, 30.3 (19.0-62.4) y 5.2 (3.7-7.2) geq/mL para VHC RNA y de 393.7 (147.9-6978) y 54.5 (22.4-143.8) geq/mL para VHB DNA, señalando variabilidad en la sensibilidad analítica, especialmente en los casos con carga viral baja (*Cuadro II*). La habilidad de este triple sistema para detectar VHB-DNA cuando se presenta un sujeto con carga viral baja y generar resultados falsos negativos, puede ser mejorada al procesar los sujetos en muestras individuales de plasma.²¹

No existe información suficiente que demuestre en términos técnicos científicos, al igual que otras intervenciones en salud, las ventajas de los estudios moleculares mediante una estrategia universal en el tamiz de donadores, aunque en la literatura existen diversas variantes de esta actividad (*Cuadro III*).

Costo-beneficio

No está determinada la evaluación del costo-beneficio al emplear metodologías inmunoenzimáticas ultrasensibles comparada con la identificación molecular.¹⁸ No se tiene información sobre la comparación del efecto de las técnicas de inactivación de patógenos, como una alternativa novedosa a una metodología de primera elección.

El conocimiento del proceso del escrutinio de donadores y los reportes persistentes de la elevada seroprevalencia, señala evidentes fallas en los puntos críticos de educación para la salud, promoción de la donación y evaluación médica en la selección de donadores, en un marco legal ineficiente que inhibe el desarrollo de donador seguro, para que en conjunto con sus resultados de costo-eficiencia, se establezca una secuencia coherente entre donador seguro y sangre segura en beneficio de la salud de la población.

Referencias

1. Schmunis G, Cruz RJ. Safety of the blood supply in Latino America. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 12-29.
2. Schmidt M, Nubling CM, Scheiblauber H, Chudy M, Walch LA, Seifried E, Roth WK, Hourfar MK. Anti-HBc screening of blood donors: a comparison of nine anti-HBc tests. Vox Sang 2006; 91: 237-243.
3. Allain JP. International collaborative study proposal for the characterization of occult hepatitis B virus infection identified by nucleic acid or anti-HBc screening. Vox Sang 2007; 92: 254-257.
4. Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. Vox Sang 2006; 90: 77-84.
5. Kessler HH. Comparison of currently available assays for detection of hepatitis B virus DNA in the routine diagnostic laboratory. Expert Rev Mol Diagn 2005; 5: 531-536.
6. Yoshikawa A, Gotanda Y, Itabashi M, Minegishi K, Kanemitsu K, Nishioka K et al. HBV NAT positive [corrected] blood donors in the early and late stages of HBV infection: analyses of the window period and kinetics of HBV DNA. Vox Sang 2005; 88: 77-86.
7. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. Hepatology 2007; 45: 507-539.
8. Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, Mikulska M, Allain JP, Letowska M. Polish Blood Transfusion Service Viral Study Group. Characterization of HBV DNA+/HBsAg- blood donors in Poland identified by triplex NAT. Hepatology 2006; 44: 1666-1674.

9. Kretzschmar E, Chudy M, Nübling CM, Ross RS, Kruse F, Trobisch H. First case of hepatitis C virus transmission by a red blood cell concentrate after introduction of nucleic acid amplification technique screening in Germany: a comparative study with various assays. *Vox Sang* 2007; 92: 297-301.
10. Cheng KY, Chang CD, Salbilla VA, Kirchhoff LV, Leiby DA, Schochetman G et al. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 355-361.
11. Komar N, Clark GG. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica* 2006; 19: 112-117.
12. Chalker VJ, Rossouw A, Mee Z, Patel P, Vaughan H, James VL. External quality assessment for the molecular detection of Hepatitis C virus. *J Clin Virol* 2007; 39: 141-144.
13. Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlotsky JM. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reaction-based method. *Hepatology* 2007; 46: 22-31.
14. Fytily P, Tiemann C, Wang C, Schulz S, Schaffer S, Manns MP et al. Frequency of very low HCV viremia detected by a highly sensitive HCV-RNA assay. *J Clin Virol* 2007; 39: 308-311.
15. Pisani G, Marino F, Cristiano K, Bisso GM, Mele C, Luciani F, Wirz M et al. Collaborative study for the calibration of HCV RNA, HBV DNA and HIV RNA reference preparations against the relative international standards. *Ann Ist Super Sanita* 2007; 43: 69-76.
16. Hsia CC, Chizhikov VE, Yang AX, Selvapandian A, Hewlett I, Duncan R et al. Microarray multiplex assay for the simultaneous detection and discrimination of hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency type-1 viruses in human blood samples. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 1017-1023.
17. Comanor L, Holland P. Hepatitis B virus blood screening: unfinished agendas. *Vox Sang* 2006; 91: 1-12.
18. Kuhns MC, Busch MP. New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: nucleic acid testing versus immunoassay methods. *Mol Diagn Ther* 2006; 10: 77-91.
19. Ly TD, Ebel A, Faucher V, Fihman V, Laperche S. Could the new HIV combined p24 antigen and antibody assays replace p24 antigen specific assays? *J Virol Methods* 2007; 143: 86-94.
20. Wiedmann M, Kluwick S, Walter M, Fauchald G, Howe J, Bronold M et al. HIV-1, HCV and HBV seronegative window reduction by the new Roche cobas ((R)) TaqScreen MPX test in seroconverting donors. *J Clin Virol* 2007; 39: 282-287.
21. Katsoulidou A, Moschidis Z, Sypsa V, Chini M, Papatheodoridis GV, Tassopoulos NC et al. Analytical and clinical sensitivity of the Procleix Ultrio HIV-1/HCV/HBV assay in samples with a low viral load. *Vox Sang* 2007; 92: 8-14.

Correspondencia:

Héctor A Baptista-González

Hematología-Perinatal, Subdirección de Investigación Clínica. Montes Urales Núm. 800, Lomas Virreyes, Delegación Miguel Hidalgo, Ciudad de México, D.F., 11000, E-mail: baptista@infosel.net.mx