



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

HACIA LA INCLUSIÓN DE LA PRUEBA DE
AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS (NAT), COMO
UN PROCEDIMIENTO DE RUTINA EN EL BANCO DE
SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL EN MÉXICO (CordMX)
PARA FORTALECER LA SEGURIDAD TRANSFUSIONAL.

T E S I S:

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:
VÍCTOR LÓPEZ SÁNCHEZ



México, 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

H. Jurado asignado

Presidente	Prof. Marisol López López
Vocal	Prof. Bertha Resendiz Vázquez
Secretario	Prof. Eva Delia Calderón Garcidueñas
1er. Suplente	Prof. Mónica Berenice Heras Chavarria
2º. Suplente	Prof. Sonia Mayra Pérez Tapia

Sitio donde se desarrollo el tema:

Banco de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, SS.

Asesor del tema

EBC Eva Delia Calderón Garcidueñas

Sustentante

Víctor López Sánchez

Agradecimientos

A mis padres, por que gracias a ellos tuve la oportunidad de estudiar. Gracias por esta gran herencia.

A mi tutora Eva Calderón Garcidueñas, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias por la confianza y el apoyo.

A mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México y su grandiosa Facultad de Química, por que de esta gran institución obtuve mi formación académica y personal. Es un honor ser de sangre azul y de piel dorada.

Al Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, SS, por el apoyo en la realización de esta tesis.

A todas y cada una de las personas que siempre confiaron en mi.

Dedicatorias

Este trabajo esta dedicado principalmente a mis padres, Laurita y Chulín, por que gracias a muchos sacrificios y esfuerzos me han heredado lo más maravilloso de esta vida, las herramientas para continuarla. Gracias, nunca los decepcionare. Los quiero mucho.

A mi hermanito, Cocoshito, esperando tomes este trabajo como una inspiración a seguir adelante. Te quiero mucho.

A mi champiñoncito, Ingrid, por el apoyo incondicional, por los consejos y por que siempre estas a mi lado motivando mi vida. Gracias amorcito.

A mi familia, amigos, compañeros y maestros, por que cada uno me ha regalado una experiencia que recordar en cada etapa de mi vida. Gracias.

Índice

I. Antecedentes

A) Introducción.....	1
B) Bancos de Sangre del Cordón Umbilical	
1. Bancos de Sangre de Cordón Umbilical	2
2. Banco de sangre de cordón umbilical (cordMex): Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, SSA	5
3. Objetivos del Banco de Sangre del Cordón Umbilical (cordMex)	7
C) Sangre de Cordón Umbilical	
1. Sangre de cordón umbilical: Fuente de células madre hematopoyéticas	8
D) Células madre hematopoyéticas	
1. Células madre hematopoyéticas: Función	10
2. Características fenotípicas de las células madre	11
3. Perspectivas y uso actual de las células madre hematopoyéticas	13
4. Aspectos éticos en el uso de células madre	15
E) Técnica de amplificación de ácidos nucleicos (NAT)	
1. Generalidades	17
2. Fundamentos	18
3. Captura selectiva	18
4. Amplificación	21
5. Detección	23

F) Hacia la inclusión de la prueba de NAT en el Banco de sangre de cordón umbilical (cordMex)

1. Seguridad transfusional: Inclusión de la prueba de NAT	25
2. Impedimentos logísticos: Implementación de la prueba de NAT	27
3. Beneficios de la inclusión de la prueba de NAT: Banco de Sangre de Cordón Umbilical	28

G) Técnica de ELISA.

1. Fundamentos	30
----------------------	----

II. Justificación del protocolo33

III. Objetivos37

IV. Metodología

1. Donadores	38
2. Recolección de muestras.....	38
3. Muestras.....	38
4. Prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT)	39
a. Preparación de las muestras (Captura selectiva)	39
b. Amplificación selectiva.....	40
c. Detección de los productos de amplificación	
i. Hibridación	40
ii. Selección	41
iii. Detección	41
d. Procedimientos de control de calidad.....	41
5. Hojas de resultados.....	43

V. Resultados

- a.** Validación por ELISA45
- b.** Validación de unidades de sangre de Células:
Progenitoras Hematopoyéticas por la prueba de NAT.....45
- c.** Cálculo de probabilidad del árbol de decisión para la elección de incluir la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) para el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la hepatitis B (VHB).....47
- d.** Análisis de decisión.....48

VI. Discusión

- a.** Validación por ELISA52
- b.** Validación de unidades de sangre de Células
Progenitoras Hematopoyéticas por la prueba de NAT.....52
- c.** Análisis de decisión.....53
- d.** Inclusión de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos NAT en el Banco de Sangre de cordón Umbilical (cordMX) del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, SSA.....54

VII. Conclusiones58

VIII. Bibliografía59

IX. Apéndice.....64

I. Antecedentes

A) Introducción

Durante los últimos años, el uso de la sangre extraída del cordón umbilical y de la placenta ha ido en aumento, como una fuente importante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) debido a las ventajas en su recolección, procesamiento, almacenamiento (criopreservación) y uso en la terapéutica en comparación con las células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de médula ósea y sangre periférica.

En México, la Secretaría de Salud desarrolló el primer banco de sangre de cordón umbilical gubernamental a cargo del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (CNTS), iniciando el Programa Nacional de Sangre Placentaria, cuyo objetivo principal es brindar a los servicios de salud pública unidades de células progenitoras hematopoyéticas perfectamente validadas y disponibles a los centros de trasplantes en los que sean requeridas dichas unidades.

Actualmente el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (CordMX) del CNTS evalúa la inclusión de nuevas tecnologías para la detección de los virus de mayor importancia clínica en nuestro país, VIH, VHC y el VHB, con el fin de disminuir el riesgo de transmitir estos virus al realizar un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

El riesgo de transmisión de estos virus a través de un trasplante de una unidad de sangre de cordón umbilical es muy bajo debido a los análisis serológicos realizados rutinariamente, pero el incluir una nueva tecnología de la biología molecular como la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT), permite disminuir el riesgo de transmisión viral transfusional casi a cero, debido a la detección directa del virus en el periodo de ventana serológico. Con los ensayos serológicos se detecta la mayoría de las donaciones seropositivas, sin embargo, en el periodo de ventana, es decir el intervalo de tiempo transcurrido desde la infección hasta la detección del virus, se tiene

un riesgo residual de transmisión viral por transfusión, el cual reduciría considerablemente con el uso de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos.

La prueba de NAT permite la detección directa del virus debido a que se pone en manifiesto el material genético del virus, por lo que nos provee de una muy buena especificidad, la sensibilidad de este método se consigue en el proceso de amplificación de los ácidos nucleicos virales. Esta tecnología consta de tres pasos fundamentales: 1) extracción de los ácidos nucleicos virales; 2) amplificación y 3) detección de los amplicones de ARN.

Para implementar la prueba de amplificación de ácidos nucleicos en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (CordMX), el ensayo debe cumplir ciertos requisitos tanto económicos (costo) como de estandarización de la técnica, además de aportar una sensibilidad y especificidad adecuadas que permitan una logística de trabajo compatible con los objetivos del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea de la Secretaría de Salud en cuanto a cubrir las necesidades de los pacientes candidatos a un trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (beneficio) en los diferentes centros de salud pública del país.

B) Bancos de Sangre de Cordón Umbilical

1. Bancos de Sangre de Cordón Umbilical

En los últimos años, se ha considerado con especial atención el estudio de ciertos padecimientos hematológicos los cuales han impulsado el estudio detallado de la capacidad de las células madre hematopoyéticas presentes en la sangre de cordón umbilical. ^(1, 2) Esta línea celular es utilizada actualmente para trasplantes alogénicos en numerosos padecimientos genéticos, inmunitarios y sanguíneos; por ejemplo: leucemias, linfomas, síndromes mielodisplásicos, enfermedad de Hodgkin y enfermedades autoinmunes, por mencionar algunos. ^(3, 4)

A partir de numerosos estudios y por la necesidad de tener sangre de cordón umbilical disponible para trasplantes de células madre hematopoyéticas, aparecieron los primeros bancos de sangre de cordón umbilical (BSCU), que en la actualidad son centros de salud dedicados a la recolección, procesamiento, estudio, criopreservación y validación de sangre de cordón umbilical para su óptimo uso clínico, principalmente en trasplantes para restaurar las funciones hematopoyéticas de la médula ósea.^(1, 5)

Existen actualmente poco más de 100 bancos de sangre de cordón umbilical en el mundo. Estos bancos se encuentran principalmente en países de primer mundo, distribuidos geográficamente de la siguiente manera: 40% se encuentran en los países de la Unión Europea, el 30% en los Estados Unidos de América y Canadá, otro 20% en los países Asiáticos (Japón principalmente) y el otro 10% de estos bancos se encuentran en Australia. Los países de América Latina cuentan con muy pocos bancos de células madre hematopoyéticas en comparación con los antes mencionados y en los países africanos no existen estos centros de criopreservación celular.^(6, 7)

Las ventajas de los Bancos de Sangre de Cordón Umbilical son muchas, de las cuales podemos mencionar entre las más importantes: la fácil obtención de unidades de sangre de cordón umbilical, la estandarización de los procedimientos realizados a dicha unidad hasta su criopreservación, los rigurosos controles de calidad a los cuales son sometidas estas unidades, la disponibilidad inmediata; la posibilidad de encontrar grupos HLA poco frecuentes debido al gran número de unidades almacenadas y el bajo riesgo de transmitir agentes infecciosos por medio del uso de la unidad de sangre de cordón umbilical.^(1, 8, 9)

En el mundo se han creado redes y registros de bancos de células madre hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical para mostrar, comparar e intercambiar unidades almacenadas disponibles. Es necesario que exista una estrecha relación y cooperación entre los bancos de sangre de cordón umbilical mundiales para tener mayor probabilidad de localizar unidades de sangre de cordón umbilical de un donante, compatibles con un paciente con indicaciones terapéuticas de trasplante.^(9, 10)

Uno de los marcos de gran importancia de los BSCU en el mundo, es que estos difieren entre si en las diversas metodologías empleadas en el procesamiento de la sangre de cordón umbilical, por lo tanto, se realizan esfuerzos de estandarización que contribuyan a mejorar la calidad de las unidades almacenadas en dichos centros. ⁽¹¹⁾ Con este propósito se fundó **NETCORD**, organización conformada por los bancos de sangre de cordón umbilical con mayor experiencia en el mundo como son: EUA, Europa, Japón y Australia. La fundación NETCORD fue establecida en el año de 1998, con el propósito de promover la estrecha relación y cooperación entre los bancos de sangre de cordón umbilical y el uso de las células madre hematopoyéticas en trasplantes alogénicos, es decir, en pacientes no relacionados. ^(1, 6, 7, 10, 11)

La fundación NETCORD es una organización no lucrativa y promueve el establecimiento de los estados de nivel de la calidad de los bancos de células madre hematopoyéticas de cordón umbilical y placenta. NETCORD está conformada por numerosos institutos y directrices que promueven estudios de investigación sobre la colecta, procesamiento, caracterización, criopreservación y actualmente la expansión *ex vivo* de las células madre hematopoyéticas, con el objetivo de promover y proveer la calidad de la terapia celular en la clínica a nivel internacional. ^(1, 6, 10)

Actualmente se lleva una estrecha cooperación entre bancos haciendo promoción de las unidades almacenadas, para esto, NETCORD ha establecido un programa de búsqueda avanzada *on-line*, llamado *Virtual Office*, para facilitar la búsqueda de unidades de células madre almacenadas en los bancos mundiales, para su uso en pacientes solicitantes.

Para la obtención de un nivel de calidad elevado y uniforme de todas las unidades de sangre de cordón umbilical en el inventario de NETCORD, esta organización ha establecido los estándares de calidad utilizados actualmente en los bancos de sangre de cordón umbilical en el mundo. En colaboración con FAHCT (*Foundation for Accreditation of Hematopoietic Cell Therapy*) ha trabajado en la elaboración de los estándares de calidad de todos y cada uno de los procesos a los cuales son sometidas

las células madre. Por tanto todos los bancos que formen parte de NETCORD deben obtener la acreditación de FAHCT y además complementarlo con los estándares de calidad impuestos por NETCORD/FAHCT. ^(10, 11)

2. Banco de sangre de cordón umbilical (CordMX)

Debido a la gran necesidad de contar con unidades de sangre de cordón umbilical disponibles para el tratamiento de pacientes en nuestro país, que no cuentan con los recursos necesarios para pagar la localización y transporte de una unidad compatible en los bancos mundiales, se creó en México, en el año 2003, el primer y único Banco de Sangre de Cordón Umbilical gubernamental, el cual se encuentra dentro del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea (SSA), que permite brindar atención y apoyo a pacientes de instituciones de salud, públicas y privadas que requieran trasplante autólogo o alogénico de células progenitoras hematopoyéticas para reestablecer las funciones de la médula ósea. ⁽¹¹⁾

Este Banco de células progenitoras hematopoyéticas del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea fue creado con el propósito de brindar servicio a todos los sectores de la población mexicana antes mencionados, además de establecer los modelos para la realización de la normativa de calidad que deben seguir los bancos de sangre de cordón umbilical particulares, que se encuentran brindando el servicio de criopreservación autólogo dentro del territorio nacional, ya que en el mes de Diciembre del año 2004 el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (**CordMX**) del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea se certificó dentro del sistema ISO9001:2000 y en el año del 2006 se pretende el ingreso al sistema de **NETCORD/FAHCT** (*Foundation for Accreditation of Hematopoietic Cell Therapy*).

Algo que se debe destacar de este Banco de Células Progenitoras Hematopoyéticas, del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, SSA, es que además de trabajar bajo los estándares internacionales impuestos por NETCORD/FAHCT,⁽¹⁾ realiza los

procedimientos de obtención, procesamiento y criopreservación de las células madre hematopoyéticas mediante metodologías totalmente automatizadas, lo que permite el desarrollo de controles que verifiquen, tanto la calidad funcional del producto (calidad hematopoyética de las células madre), como la seguridad del receptor de dicha unidad (seguridad transfusional del paciente). ^(1, 11)

Así mismo, el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea labora en forma conjunta con las unidades maternas afiliadas al **BSCU** de los diferentes hospitales de México, facilitando la recolección y captura de las unidades de sangre de cordón umbilical. Cabe mencionar que todos y cada uno de los hospitales inscritos al programa de obtención de sangre de cordón umbilical, cumplen satisfactoriamente con la función de informar a las futuras madres los beneficios de la donación y la correcta recolección de las unidades de sangre de cordón umbilical. ^(1, 11, 12)

México también cuenta con un marco jurídico, en la Reforma de la **Ley General de Salud** que se realizó en el año de 1997, documento en el cual se incluyen los términos de “*célula*” y “*células progenitoras hematopoyéticas*”, sólo en referencia a aspectos terapéuticos en casos de trasplante. Es importante señalar que las disposiciones de la Ley General de Salud de México no prevén explícitamente algún control sobre el uso de las células troncales humanas con fines de investigación hasta el momento. ^(6, 7, 13)

Debido a la inclusión de estos términos fue necesario modificar y actualizar el reglamento de la Ley General de Salud en materia de disposición de órganos, tejidos, células y productos humanos, lo que permite tener congruencia entre los instrumentos jurídicos y los avances científicos y técnicos de los trasplantes de progenitores hematopoyéticos a pacientes dentro del territorio nacional. ^(13, 14)

3. Objetivos del Banco de Sangre del Cordón Umbilical (CordMX)

Dentro de los objetivos del Banco de Sangre del Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, se encuentra principalmente brindar un servicio de calidad y confiabilidad a los pacientes que requieran unidades de sangre de cordón umbilical en nuestro país, lo que genera un gran compromiso a la Secretaría de Salud.

⁽¹¹⁾ Este nuevo servicio de salud permite que nuestro país se encuentre a la vanguardia con lo que respecta a salud pública mundial, heredando a la población mexicana un servicio que genera un impacto en la salud incalculable, ya que con este banco de células madre hematopoyéticas se amplían las posibilidades terapéuticas en pacientes con ciertos padecimientos, principalmente hematológicos.

Otro de los objetivos fundamentales del BSCU del CNTS es alcanzar un inventario de 5,000 unidades de sangre de cordón umbilical en los próximos cuatro años, lo que permitirá además de tener una variedad rica de HLA, cubrir más del 80% de las necesidades de trasplante de células madre hematopoyéticas en México, es decir, cubrir casi en su totalidad el Programa Nacional de Sangre Placentaria del país. Esto conforme el BSCU del CNTS incremente el número de unidades maternas (unidades de gineco-obstetricia de los Hospitales de México) para poder captar un mayor número de unidades de sangre de cordón umbilical diariamente. ^(4, 11, 15)

El Banco de Sangre de Cordón Umbilical considera a corto plazo el inicio del proyecto de expansión de las células madre hematopoyéticas *ex vivo*, lo que permitirá un mayor conocimiento de las propiedades de estas células para incrementar y potenciar su uso terapéutico. Este proyecto permitirá beneficiar tanto a pacientes pediátricos como a pacientes adultos, además de generar importantes líneas de investigación con un futuro prometedor para la ciencia en México. ^(11, 12, 16)

C) Sangre de Cordón Umbilical

1. Sangre de cordón umbilical: Fuente de células madre hematopoyéticas

Desde el descubrimiento de los progenitores linfohematopoyéticos circulantes en la sangre contenida en el cordón umbilical y la placenta humana, en el año de 1974 y durante la década de los ochenta y principio de la década de los noventa, la demostración de que estas células tienen la capacidad de ser progenitoras linfohematopoyéticas tanto mono, como multi-potenciales, el conocimiento de las funciones biológicas ha ido en aumento, lo cual permite que el uso de dichas células madre hematopoyética (Stem cells) en trasplantes indicado para pacientes con algún desorden de los tejidos hematopoyéticos, sean más seguros y cada vez en mayor número. ⁽⁷⁾

A la sangre del cordón umbilical la podemos definir como la sangre periférica fetal que se encuentra dentro de la vena de la sección del cordón umbilical y que el contenido medio residual de sangre que puede ser colectada varía de 80 a 150 mL. ^(6, 17) Se ha demostrado que la principal característica de la sangre de cordón umbilical es el contenido suficiente de células progenitoras hematopoyéticas y subpoblaciones de células formadoras de colonias mixtas (CFC) para llevar a cabo la reconstitución de las funciones de la médula ósea, cuando ésta se encuentra alterada en ciertos padecimientos. ^(4, 7)

Las principales ventajas de utilizar la sangre contenida en el cordón umbilical como una fuente de obtención alternativa de células madre hematopoyéticas son:

- a. El alto número de células madre hematopoyéticas en la sangre de cordón umbilical, con la capacidad de proveer un injerto medular de larga duración en los pacientes trasplantados.

- b.** la facilidad de su obtención, ya que se colecta durante el parto y directamente por punción de la vena del cordón umbilical.
- c.** ausencia de riesgo para el donante, ya que la colecta de sangre no involucra directamente a la madre ni al bebé.
- d.** posibilidad de obtención de muestras provenientes de grupos étnicos minoritarios.
- e.** baja prevalencia de ciertas enfermedades transmisibles, principalmente virales, los cuales pueden generar una gran morbilidad y mortalidad de los pacientes que reciben un trasplante.
- f.** disponibilidad casi inmediata de las unidades de sangre de cordón umbilical ya almacenadas, lo que permite realizar trasplantes de urgencia.
- g.** inmediata disponibilidad de unidades para trasplante, ya que estas se encuentran almacenadas en gran cantidad y por tiempos prolongados (criopreservadas).
- h.** y una muy baja incidencia de enfermedad injerto contra huésped (EICH), debido a la poca diferenciación de linaje de estas células y la supuesta posible tolerancia de diferencia en el sistema HLA. ^(4, 7, 11, 17)

En comparación con otras fuentes de células madre hematopoyéticas, ya sea células de la médula ósea o células movilizadas de sangre periférica, donde se requiere una identidad HLA completa tanto para los antígenos clase I y II, el trasplante de células madre hematopoyéticas captadas de la sangre de cordón umbilical se ha realizado con uno, dos y hasta tres grados de disparidad HLA, permitiendo así que el donante y el paciente receptor sean no emparentados. ^(4, 8, 11, 12, 15)

Uno de los problemas que plantea el uso de sangre de cordón umbilical como fuente de células madre hematopoyéticas (CMH's) es que el trasplante está limitado a pacientes pediátricos o adultos que no excedan los 50 Kg de peso corporal, debido a que el número de células madre captadas de esta fuente es insuficiente, lo que ha generado interés prioritario en el diseño de métodos que permitan la expansión *ex vivo* de las CMH's. (1, 7, 12, 15)

Las ventajas de expansión de CMH's *ex vivo* permitirán una notable disminución del tiempo de recuperación de todos los elementos sanguíneos, que incluyen los de la serie mieloide y linfoide, tras la quimioterapia y el trasplante. También permitirá eliminar toda posibilidad de trasplantar una célula con tendencias carcinogénicas que puedan en un futuro generar serios problemas en el paciente trasplantado. (6)

D) Células madre hematopoyéticas

1. Células madre hematopoyéticas: Función

Las Células Madre Hematopoyéticas son definidas como células con capacidad de perpetuar por si mismas por medio de un proceso de autorenovación, lo cual resulta en progenies con las mismas características de célula madre (fenotípicamente primitiva) y células comprometidas a diferenciarse hacia una línea celular hematopoyética definida, ya sea mieloide o linfoide (Fig. 1). (17, 18, 19)

En condiciones normales estas células se localizan en el estroma medular dentro de la médula ósea. El estroma medular es un complejo funcional al cual se le conoce como Microambiente Inductivo Hematopoyético (MIH), el cual está constituido por fibroblastos, células reticulares, así como por colágena I, III y IV, fibronectina, hemonectina, trombospondina y factores de crecimiento (factores hemolinfopoyéticos). Los componentes del MIH son necesarios para la estimulación de la autorenovación y diferenciación de las células madre hematopoyéticas, además de la maduración de células comprometidas a un linaje celular, ya sea por interacciones célula-célula o interacciones célula-factor de crecimiento. (17, 18)

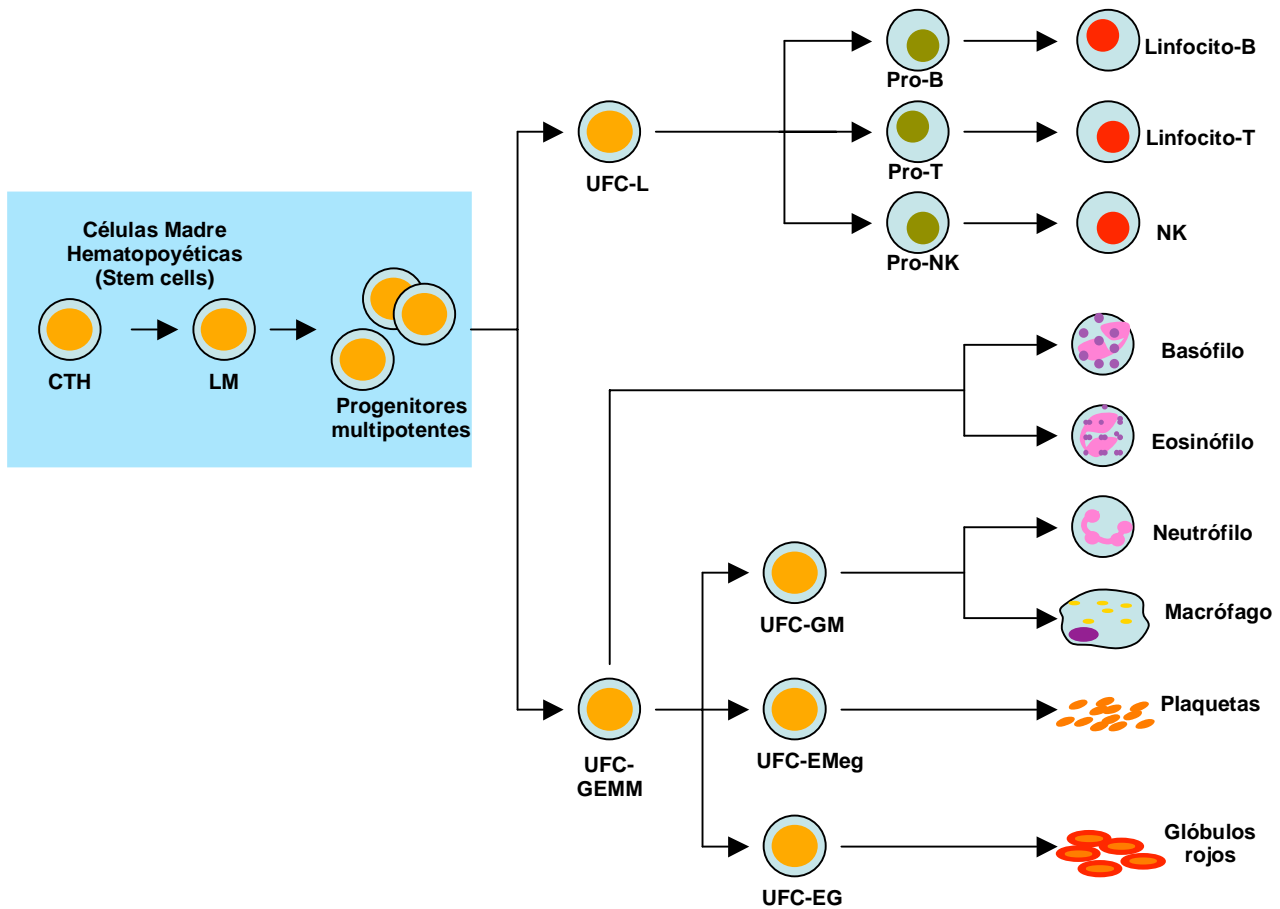


Fig. 1 Esquema de la Hematopoyesis. CTH: Célula Totipotencial Hematopoyética; LM: Linfoide-Mieloide; UFC: Unidad Formadora de Colonias; L: Linfoide; GEMM: Granulocitos, Eritrocitos, Monocitos, Macrófagos; GM: Granulocitos, Monocitos; EMeg: Eritrocitos, Megacariocitos; EG: Eritrocitos, Granulocitos, Megacariocitos; NK: *Natural Killer*.^(17, 18, 20)

2. Características fenotípicas de las células madre

Las células madre hematopoyéticas están caracterizadas principalmente por proteínas de superficie de membrana, metabolismo y su ciclo celular, por lo que podemos usar estas propiedades para purificarlas y aislarlas, tanto para estudios de investigación como para su criopreservación y así poder potenciar su capacidad de diferenciarse y proliferar para generar una progenie funcional en el paciente trasplantado.⁽¹⁸⁾

La mayoría de las células madre hematopoyéticas en humanos expresan el antígeno **CD34⁺** una proteína integral de la membrana celular, también expresada en

progenitores comprometidos. La caracterización de las células de la sangre del cordón umbilical basada en la co-expresión de marcadores moleculares (antígenos de membrana) ha permitido desarrollar sistemas de selección positiva de poblaciones celulares con un gran contenido de progenitores primitivos, entre éstas, las células madre hematopoyéticas **CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻** (linaje), considerado este tipo celular como la más primitiva subpoblación de células **CD34⁺** de todas las fuentes de células madre hematopoyéticas. ^(4, 6)

Por estudios previos, se ha probado la caracterización funcional del antígeno **CD34** de poblaciones celulares de sangre de cordón umbilical y se han determinado subpoblaciones de células primitivas que enriquecen la funcionalidad de la células madre hematopoyéticas, como son el caso de las células definidas fenotípicamente como **CD34⁺ CD38⁻** que se encuentran en un porcentaje relativamente bajo en comparación con otras fuentes de progenitores hematopoyéticos, como son el caso de la médula ósea y sangre periférica movilizada. ^(19, 21, 22)

A pesar de este porcentaje relativamente bajo de células **CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻** en la sangre de cordón umbilical, se ha demostrado que estas contribuyen a una generación prolongada de Unidades Formadoras de Colonias (**UFC**), en medios de cultivo (*long term stromal cultures, Agar cultures and methylcellulose cultures*), además la eficiencia de clonación y la capacidad generativa de la células **CD34⁺ CD38⁻ Lin⁻** de la sangre de cordón umbilical es mucho mayor que en células de la médula ósea. ^(24, 25, 26)

Con lo que respecta a las subpoblaciones celulares **CD34⁺ CD38⁺**, cabe mencionar que se encuentran frecuentemente asociados a la co-expresión de antígenos que marcan una línea de diferenciación celular comprometida. ^(26, 27) Estos marcadores de linaje distinguen la línea celular con la cual se encuentra comprometida dicho progenitor hematopoyético, como son el caso de la co-expresión de los marcadores **CD10, CD19, CD20, CD21** y **CD22** que indican una diferenciación dirigida de los progenitores a células pre-linfocitos B. Los antígenos **CD1, CD2, CD5, CD6** y **CD7** se co-expresan en progenitores de células pre-linfocitos T, así como los marcadores **CD71** y **CD36** en

progenitores de células eritroides, los marcadores **CD13** y **CD33** en progenitores de células de la línea mieloide y los marcadores **CD41** y **CD61** para los progenitores de las células de la serie megacariocítica. ^(17, 18, 22)

La co-expresión de los antígenos **HLA-DR** y **HLA-DQ**, junto con los antígenos **CD34** y **CD38** tiene gran importancia en el éxito del trasplante, ya que dichos antígenos HLA se encuentran dentro de las proteínas expresadas por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (**MHC**), es decir controla la compatibilidad entre los tejidos. En el caso de los trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas, es factor determinante dicha co-expresión de antígenos, ya que estas proteínas se encuentran en la superficie de todas las células nucleadas. La expresión del marcador **HLA-DR**, depende más del ciclo celular que del estadio de maduración, expresándose mayormente durante la fase G2 y M. ^(20, 21, 22)

Los antígenos del **MHC** presentes en las células progenitoras hematopoyéticas que son tipificados rutinariamente, son: **HLA-A**, **HLA-B**, **HLA-DR** y **HLA-DQ** los cuales presentan más de 750 000 combinaciones debido al gran polimorfismo que presenta la región del Complejo Mayor de Histocompatibilidad localizado en el en el brazo corto del cromosoma 6. ^(11, 17)

Las células madre hematopoyéticas también expresan el marcador **CD133** (AC133), el cual es utilizado actualmente como uno de los marcadores de selección positiva de progenitores hematopoyéticos, permitiendo realizar diferentes estudios antes del trasplante; ⁽²⁾ el antígeno **CD90**, que presumiblemente está involucrado en la regulación de la diferenciación y de la proliferación de las células madre y una muy baja o nula expresión del antígeno **CD117**, el cual es un receptor de factores de crecimiento. ^(27, 28)

3. Perspectivas y uso actual de las células madre hematopoyéticas

Actualmente, en lo relacionado a las células contenidas en la sangre de cordón umbilical, se continúa con los estudios que harán posible practicar procedimientos

adecuados de expansión *ex vivo* de las células progenitoras hematopoyéticas contenidas en cordón umbilical, principalmente para su uso en pacientes adultos con padecimientos indicados para el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas ^(4, 6, 7). Las ventajas que nos brinda la expansión *ex vivo* de las células madre, son: a) la disminución del tiempo de recuperación de las funciones de la médula ósea después de la quimioterapia o trasplante; b) la eliminación de las células potencialmente carcinogénicas de una unidad a trasplantar; c) La manipulación del estroma para generar un ambiente inductivo hematopoyético apropiado para acortar los periodos de recuperación de neutrófilos y plaquetas, entre otros. ⁽²⁹⁾

Se ha observado que para expandir *ex vivo* las células madre hematopoyéticas, estas células deben experimentar repetidas divisiones celulares simétricas, es decir, que una sola célula sea capaz de originar a dos células hijas que contengan las mismas características tanto fenotípicas como genotípicas que la célula precursora. ^(17, 18) Como se ha demostrado, el efecto de ciertas citocinas sobre los progenitores hematopoyéticos está modulado por componentes de la matriz extracelular, por lo que la co-localización selectiva de citocinas y progenitores es crucial para la regulación de la diferenciación y proliferación de las células madre hematopoyéticas, aunque todavía no es posible recrear este microambiente inductivo hematopoyético ni tales interacciones en cultivo. ⁽⁵⁾

Actualmente se trabaja en la creación de bioreactores, con el objetivo de encontrar las interacciones entre células y ambiente, para poder llevar a cabo la diferenciación a ciertas líneas celulares de interés terapéutico. ⁽¹⁷⁾ La importancia de la búsqueda de la diferenciación de las células madre hematopoyéticas en tipos celulares específicos, los cuales podrían usarse en el tratamiento de ciertos padecimientos crónicos degenerativos donde se necesite la inclusión de estas líneas celulares buscadas para regeneración de los tejidos afectados, como el tejido cardíaco y el tejido neuronal. Otros sistemas en desarrollo tienen como objetivo de estudio la expansión UFC-Meg (Unidades Formadoras de Colonias de Megacariocitos), esto con el fin de disminuir en un futuro la

necesidad de transfusión de plaquetas y en un futuro de todos los componentes de la sangre. ^(6, 17, 18)

También, desde hace dos décadas se ha propuesto que la transferencia génica en las células madre hematopoyéticas puede ser de gran importancia en el tratamiento de las enfermedades genéticas, neurodegenerativas, autoinmunes, cáncer, el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA) y ciertas irregularidades del sistema inmunitario. El problema de realizar estos estudios, se debe a que se requiere que las células madre hematopoyéticas se encuentren en estado “quiescente” y se repliquen, por tanto, se requieren estrategias de expansión *ex vivo*, que con las dificultades que presentan dichas estrategias, se ha retrasado el uso de esta línea terapéutica.

Otras estrategias estudiadas, son las denominadas “*transcriptional targetting*” (blanco de transcripción), la cual consiste en la inserción de secuencias reguladoras en el genoma de las células madre hematopoyéticas, para poder así controlar la transcripción y confinar la expresión del transgen a una estirpe celular específica después de la diferenciación, lo que puede brindar a la terapéutica resultados prometedores. ^(6, 29)

4. Aspectos éticos en el uso de células madre hematopoyéticas

A pesar de los beneficios potenciales del empleo de células madre hematopoyéticas para la investigación y el tratamiento de numerosas enfermedades, distintos sectores sociales se han pronunciado enfáticamente en contra de toda investigación sobre las células madre hematopoyéticas y la transferencia nuclear. ⁽³⁰⁾

La investigación con células madre hematopoyéticas humanas plantea un sin número de cuestiones éticas debido al conflicto que surge entre diversos valores socioculturales y económico, entre los derechos y las obligaciones, y entre los intereses de los centros de captura de tales células. Entre los conflictos importantes, surgen: el valor de la libertad y del espíritu libre con los principios de solidaridad y justicia, de acuerdo a los cuales el acceso a los datos de los involucrados tanto en la donación como en la

recepción de células madre hematopoyéticas, debe ser basada en necesidades reales.
(5, 16, 30)

Las implicaciones éticas que corresponden a los bancos de sangre de cordón umbilical y placenta en el caso de donaciones simples para trasplantes alogénicos o para su uso en investigación son los mismos que para los bancos de tejidos, debido a que la sangre como tal es considerada un tejido. (7, 13, 14, 16)

En los Estados Unidos, organizaciones científicas como la *American Association for the Advancement of Science* (AAAS) ha incorporado en el estudio de los temas éticos a organizaciones civiles (como el *Institute for Civil Society*), con el fin resolver las preocupaciones sociales con respecto a trasplante de tejidos, desarrollado una guía para la investigación de las células madre hematopoyéticas, con el objetivo de garantizar una conducta ética en el desarrollo de los proyectos de investigación. (30)

Por otra parte, en la Unión Europea, el *Grupo Europeo sobre Ética en la ciencia y en las nuevas tecnologías* (GEE) han adoptado posturas muy diversas con respecto a la regulación de la investigación con células madre hematopoyéticas humanas. En Europa el Tratado de la Unión Europea en su 6° Artículo hace énfasis en los principios éticos fundamentales, el cual hace referencia a la protección de la dignidad y la vida humana. (7)

Hay varios principios éticos y valores los cuales pueden ser considerados relevantes en el funcionamiento correcto del uso de las células progenitoras hematopoyéticas, dentro de las cuales destacan:

- *El respeto a la dignidad y la integridad humanas, el cual defiende el principio de la no comercialización del cuerpo humano.*
- *El principio de la autonomía individual, que implica el consentimiento informado del donante y el respeto de la intimidad y confidencialidad de los datos personales.*

- *Los principios de justicia y solidaridad, como respetar el acceso a los servicios de salud.*
- *El principio de la beneficencia, la obligación de dar un trato humano y de calidad, especialmente en el área de la salud.*
- *El principio de no maleficencia, donde la obligación es no hacer daño, protegiendo a grupos e individuos vulnerables, para respetar la privacidad y la confidencialidad.*
- *El principio de proporcionalidad, el cual implica un balance entre recursos y objetivos.* ^(7, 16, 30)

E) Técnica de amplificación de ácidos nucleicos (NAT)

1. Generalidades

La tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (**NAT**) es una herramienta innovadora de la biología molecular empleada en el diagnóstico de agentes patógenos (principalmente virus), ya que permite la detección e identificación del material genético mediante la amplificación de los ácidos nucleicos de las regiones más conservadas del genoma viral. ⁽³¹⁾

Actualmente esta nueva tecnología ha sido implementada a nivel mundial como medida de control de calidad en numerosos laboratorios dentro de bancos de sangre, debido a que permite determinar tempranamente el agente de diferentes patologías de la sangre como son el caso de infecciones por VIH, VHC y el VHB; reduciendo drásticamente el periodo de ventana (WP). ^(32, 33, 34)

En los últimos meses dentro del Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, (SSA) se ha puesto especial atención a esta nueva tecnología como una prueba más en el control de la calidad de las unidades de sangre de cordón umbilical, es por eso que se propone un análisis que permita valorar las razones por las cuales se deba implementar esta nueva tecnología.

2. Fundamentos del ensayo de amplificación de ácidos nucleicos

El fundamento de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos esta basada en la extracción del material genético de partículas virales por medio de la lisis celular y una captura selectiva. El plasma de la muestra es tratado con un detergente que solubiliza la envoltura viral, desnaturaliza las proteínas y libera el material genético viral. ^(31, 35)

Posteriormente se híbridan oligonucleótidos de captura a porciones altamente conservadas del HIV-1 y del HCV, que se capturan con micropartículas magnéticas separando la selección hibridada del ARN viral del plasma mediante un campo magnético. ⁽³⁶⁾

En seguida se amplifica el ARN seleccionado por un método de amplificación basado en transcripción, empleando una MMLV transcriptasa inversa y una ARN polimerasa, obteniéndose una copia de ADN de la secuencia de ARN y varias copias de amplicón de ARN a partir de la copia de ADN.

La detección se lleva a cabo utilizando sondas quimioluminiscentes complementarias al amplicón. La señal generada por la sonda hibridada se mide en un luminómetro, detectándose así la presencia de los virus HIV-1, HCV y HBV en la muestra de plasma. ^(33, 34, 35, 36)

3. Captura selectiva.

Inmediatamente después la degradación de la membrana viral (cápside) por la cual queda liberado el material genético viral (Fig. 2), se adiciona el oligonucleótido de captura. En el ensayo de captura selectiva son utilizados oligonucleótidos específicos de captura los cuales se híbridan al ARN del HIV-1 y del HCV, así como al ADN del HBV y al control interno (Fig. 3). ^(34, 35, 36)

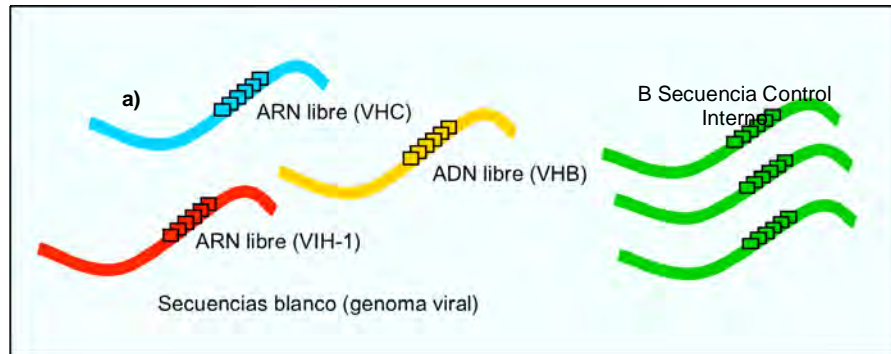


Fig. 2 a) Degradación de envoltura viral y liberación del material genético.
 b) Adición del Control Interno CI.⁽³⁶⁾

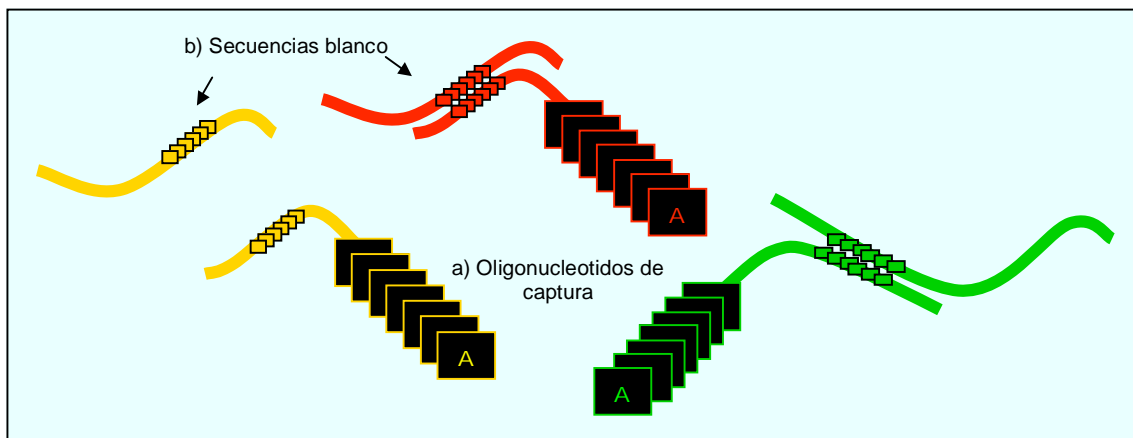


Fig. 3 a) Adición de los oligonucleótidos específicos de captura.
 b) Hibridación del material genético viral a los oligonucleótidos de captura

Los oligonucleótidos de captura que son homólogos a regiones altamente conservadas del material genético viral, por lo tanto se hibridan para la selección específica del ARN del VIH-1 y del VHC, así como del ADN del VHB. Este oligonucleótido de captura contiene una secuencia Poly-A, la cual se hibrida posteriormente a los oligonucleótidos complementarios Poly-T que se encuentran unidos a la superficie de las micropartículas magnéticas (Fig. 4).^(44, 45, 59)

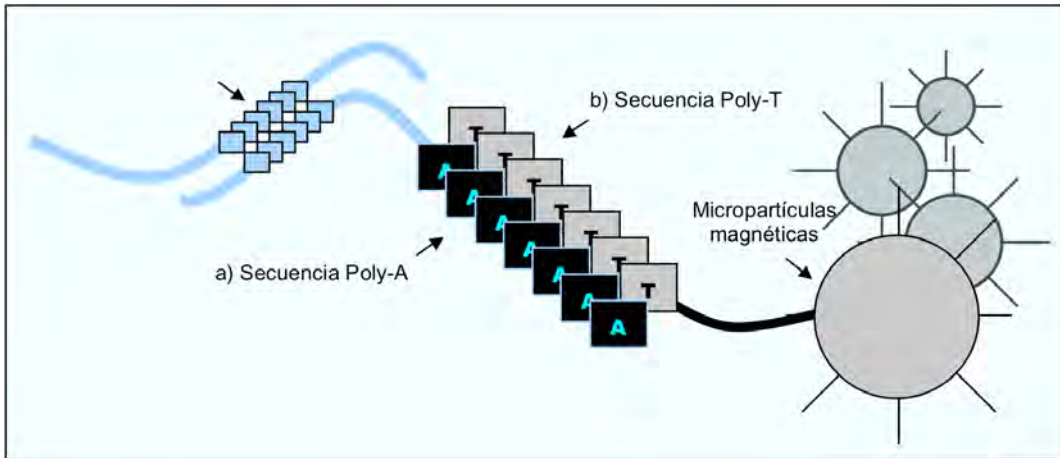


Fig. 4 a) El oligonucleótido Poly-A del oligonucleótido de captura, b) se hibrida con las secuencias Poly-T de las superficie de las micropartículas magnéticas.

Los imanes que se encuentran en el sistema de captura selectiva (TCS) forman un campo magnético permitiendo así, separar los ARN's y ADN's virales, así como el ARN del control interno previamente capturado de los componentes superfluos de la muestra, los cuales son eliminados por medio de una serie de lavados sucesivos para reducir la interferencia de estas sustancias contenidas en el plasma (Fig. 5).⁽⁵⁹⁾

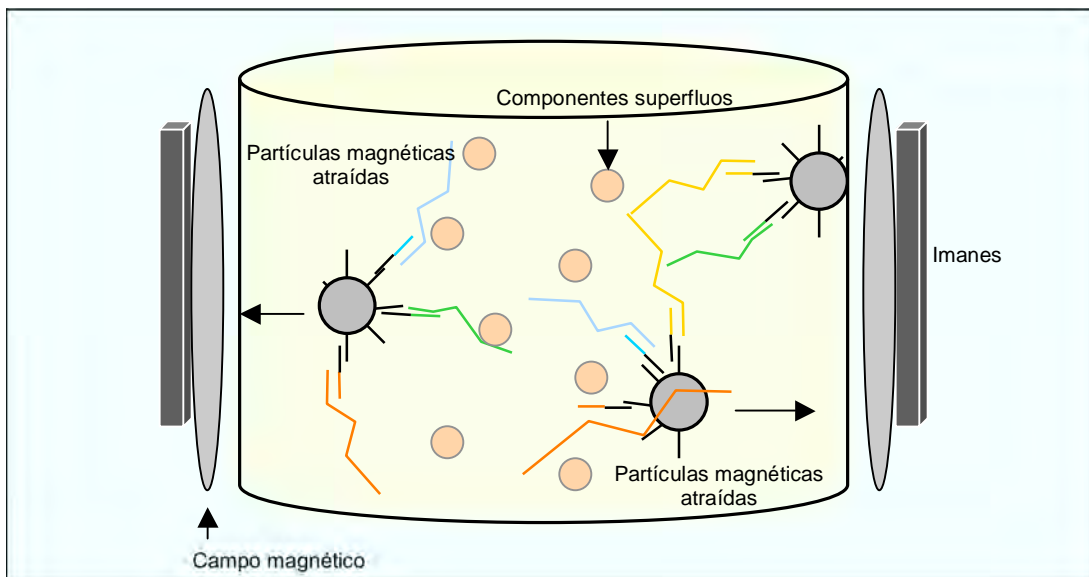


Fig. 5 El campo magnético generado por los imanes permite separar los ARN's y ADN's virales capturados de otros componentes superfluos del plasma, los cuales son eliminados por una serie de lavados.

4. Amplificación.

La amplificación se realiza a través de un método de amplificación de ácidos nucleicos basado en transcripción (Fig. 6) que emplea dos enzimas, MMLV transcriptasa inversa y T7 ARN polimerasa. La transcriptasa inversa genera una copia del ADN de las secuencia de la selección (que contiene un promotor para T7 ARN polimerasa). La enzima T7 ARN polimerasa produce copias de amplicón de ARN a partir de la copia de ADN (Fig. 7).⁽⁵⁹⁾

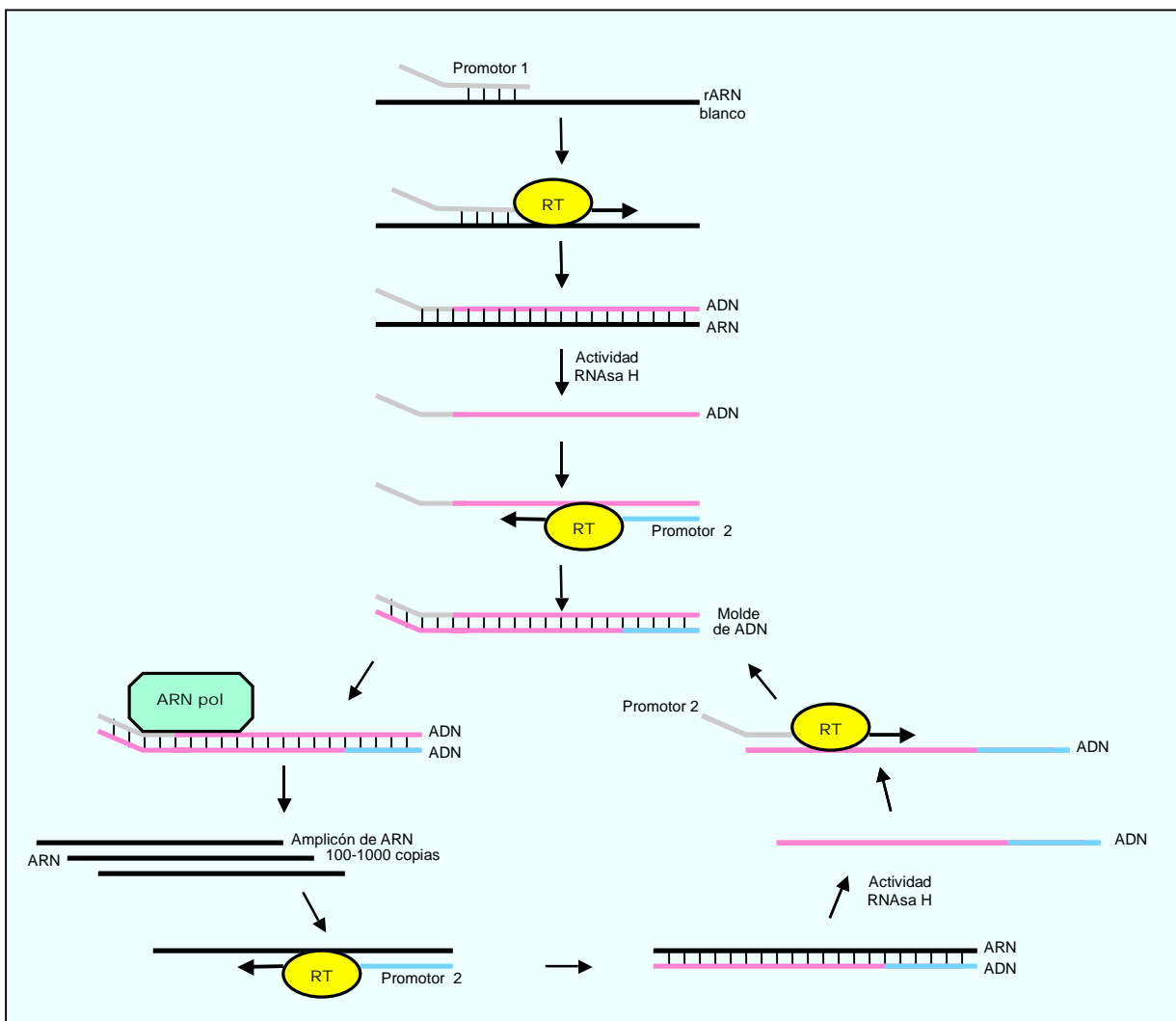


Fig. 6 Amplificación mediada por transcripción (TMA), produce amplicones de ARN a partir del ARN blanco (viral).⁽³⁶⁾

Para realizar el ensayo de amplificación es necesario que la muestra que contiene el material de estudio de esta prueba, no contenga contaminantes ya sean sólidos o aerosoles y que el volumen de la muestra sea constante; además se requiere de la desnaturalización de las estructuras secundarias de ARN por medio de un choque térmico. ⁽⁵⁹⁾ En el ensayo de amplificación se requiere de dos oligonucleótidos (*primers*) de amplificación. El primer oligonucleótido esta compuesto de dos porciones; la primera se híbrida a la porción blanco del ARN y ADN capturados y la segunda es la porción del promotor que se une a la enzima T7 ARN polimerasa. ^(33, 59) El segundo oligonucleótido se une a la copia de ADN de la secuencia de ARN o ADN, además se une a cada cadena de amplicón de ARN para reiniciar el ciclo de amplificación.

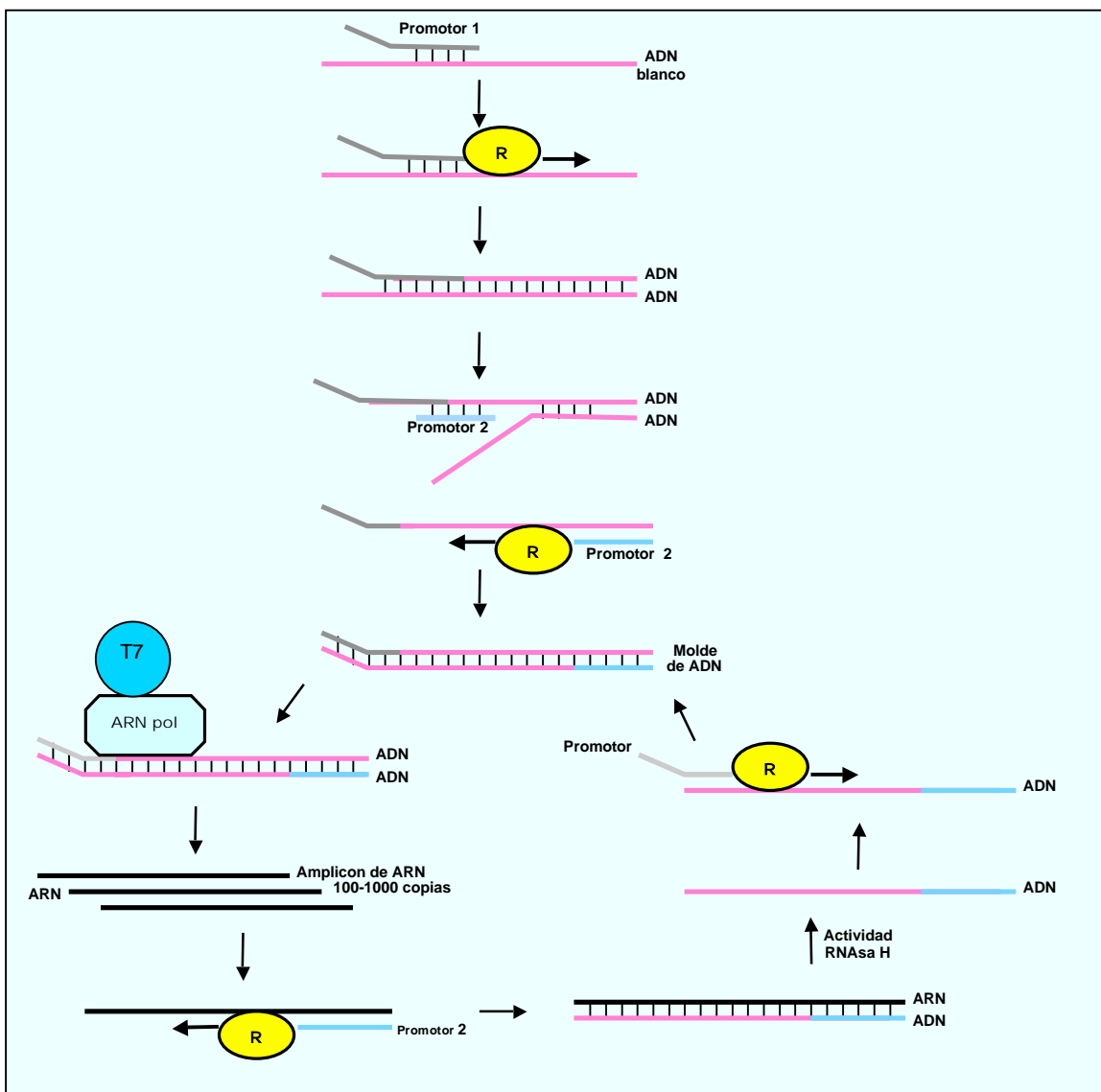


Fig. 7 Amplificación mediada por transcripción (TMA), produce amplicones de ARN a partir del ADN blanco (viral). ⁽³⁶⁾

5. Detección.

La detección se logra mediante el ensayo de protección hibridación usando sondas de ácidos nucleicos monocatenarios con marcadores quimioluminiscentes que son complementarios al amplicón de ARN producido en la etapa de amplificación. Estas sondas de ácidos nucleicos marcadas híbridan específicamente al amplicón (Fig. 8).

En el ensayo de detección, el reactivo de selección hidroliza rápidamente las moléculas de éster de acridinio que se encuentran sobre las sondas de ADN no hibridadas (monocatenarias).⁽³⁶⁾

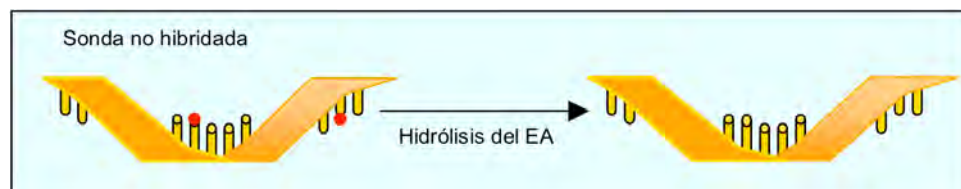


Fig. 8 El éster de acridinio (EA) de las moléculas no hibridadas hidroliza rápidamente, lo que permite detectar específicamente la señal por la sonda hibridada.⁽³⁶⁾

La distinción entre la sonda hibridada y la sonda no hibridada permite detectar específicamente la señal generada por dicha sonda hibridada, ya que el éster de acridinio se encuentra protegido de la hidrólisis dentro de la estructura de doble cadena (Fig. 9).⁽⁵⁹⁾

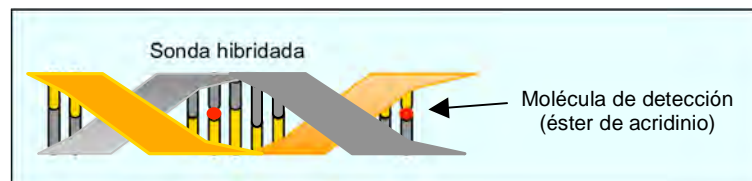


Fig. 9 La sonda hibridada protege dentro de su estructura de doble cadena al éster de acridinio, por lo que la hidrólisis es más lenta.⁽³⁶⁾

Posteriormente se realiza el ensayo de cinética doble (DKA), en el cual es necesario enfriar los tubos de prueba hasta una temperatura que va de los 19°C a los 27°C

(condiciones óptimas) ya que altas temperaturas inducen emisiones de luz de la señal del éster de acridinio tempranamente, en contraste con el retardo de la emisión a temperaturas muy bajas. ⁽³⁶⁾

Los reactivos de autodetección 1y 2 de la prueba de **Procleix^R UltrioTM** son aportados sucesiva y rápidamente por el luminómetro **Procleix HC+**. Así, el éster de acridinio es oxidado por el peróxido de hidrógeno, después hidrolizado por hidróxido de sodio para emitir luz, la cual es captada, medida y expresada en Unidades Relativas de Luz (RLU's). ⁽³⁶⁾

El control interno es detectado mediante una sonda (Ortho-fluoro-AE) de emisión rápida de luz llamada señal *Flasher*, en comparación con la detección del amplicón de HIV-1, HCV y HBV que se detecta mediante sondas (1-metil-AE) de emisión de luz con cinética relativamente más lenta llamada señal *Glower* (Fig. 10). El luminómetro por tanto detecta la cinética diferencial de emisión de luz de las sondas con marcadores diferentes. NOTA: el programa del sistema Procleix analiza los datos de RLU y calcula los resultados automáticamente. ⁽³⁶⁾

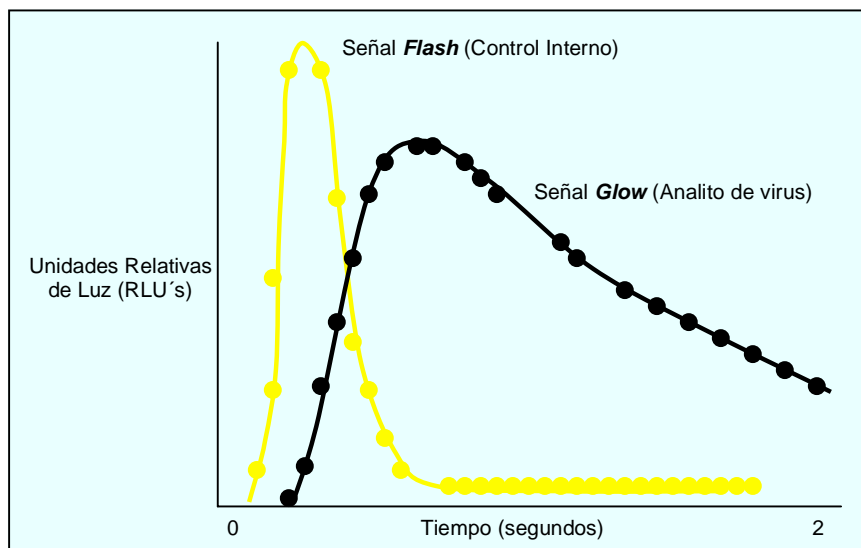


Fig. 10 El luminómetro detecta la cinética diferencial de emisión de luz de las sondas con marcadores diferentes y el programa *Procleix System Software* analiza los datos de RLU's y calcula los resultados. ⁽³⁶⁾

F) Hacia la inclusión de la prueba de NAT en el Banco de sangre de cordón umbilical (cordMex)

1. Seguridad transfusional: Inclusión de la prueba de NAT

En los últimos 20 años, todos los donadores de sangre o de sus componentes han sido tamizados de una forma muy extensa, ya sea por pruebas para diferentes marcadores infecciosos por medio de inmunoensayos (prueba de ELISA) y por medio de entrevistas en la cual los donadores tienen que responder “exactamente” a las preguntas referentes a las prácticas de riesgo que puedan ser un factor para adquirir enfermedades transmisibles como son las causadas por los virus VIH, VHB y el VHC; o bien tener la posibilidad de autoexcluirse. ⁽³⁷⁾

En años anteriores a 1985, en los bancos de sangre mundiales sólo se realizaban transfusiones de componentes sanguíneo, si estos eran seronegativos para sífilis y para el antígeno HBsAg virus de la hepatitis B (VHB). A partir de 1985 y hasta 1989, se inició la búsqueda serológica para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de Linfocitos-T humano (HTLV), debido a la gran transmisión de estos por medio de la transfusión de componentes de la sangre contaminados. También en estos años se incluyen a las entrevistas de donadores preguntas relacionadas directamente con la participación de prácticas de riesgo de infección por virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y el virus de la hepatitis B (VHB). ^(37, 38, 40, 41)

Ya en la década de los noventa se incluye la búsqueda del antígeno *core* del virus de la hepatitis B (anti-HBc) y marcadores de virus causa de hepatitis no-A y no-B; implementándose además las pruebas serológicas para la detección de VIH-2, HTLV-2 y el virus de la hepatitis C (VHC). Posteriormente se implementó en donadores la prueba serológica que detecta el antígeno p24 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y las pruebas serológicas de tercera generación para la determinación de VIH, VHB y VHC, lo que disminuyó considerablemente el riesgo de trasfudir componentes sanguíneos seropositivos para estos virus. ⁽³⁷⁾

A pesar de la implementación de ensayos de escrutinio a la sangre y a sus componentes, cada vez más sensibles y específicos, y la realización de cuestionarios usados en las entrevistas cada vez más completos acerca de la participación en prácticas de riesgo de infección a los virus ya mencionados, en la actualidad existe un riesgo residual de infección post-trasfusional para el virus de la inmunodeficiencia humana y los virus de la hepatitis B y C adquiridos a través de donadores que se encuentran en el periodo de ventana o con la infección latente. Además los donadores seropositivos pueden cometer fallos al responder las preguntas de los cuestionarios de escrutinio, obteniendo información falsa e infección post-trasfusional para el receptor de los componentes sanguíneos donados por dicha persona. ^(35, 37, 40)

Los riesgos actuales de infección post-trasfusional por el virus de la inmunodeficiencia humana y los virus de la hepatitis B y C, aunque bajos, pueden ser reducidos aun más por medio de la utilización de nuevas tecnologías de la biología molecular, capaces de amplificar y detectar el material genético (genoma) virales. El uso de estas técnicas provee un mayor nivel de sensibilidad y especificidad en comparación con los inmunoensayos enzimático. Por tal motivo la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT), es un ensayo utilizado actualmente en los bancos de sangre de países del primer mundo, para garantizar la calidad de la sangre y sus componentes, fortaleciendo la seguridad trasfusional. Estos países son principalmente: los países de la Unión Europea, Estados Unidos, Japón y Australia. ^(7, 32, 41, 42)

La utilización de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) en los bancos de sangre, puede ser incluida para minimizar aún más el riesgo residual, ya que esta prueba tiene la capacidad de detectar directamente la presencia del agente infeccioso, debido a que detecta el material genético viral, y no indirectamente la presencia de los anticuerpos: anti-VIH-1, anti-VHI-2, anti-VHB y anti-VHC. ^(31, 35, 43, 44, 45)

2. Impedimentos logísticos para la implementación de la prueba de NAT

Las limitaciones que implica el uso de la prueba de NAT, son principalmente técnicas y económicas, lo cual impone ciertas cargas a los bancos de sangre; de estas, las más comunes son:

- La relación “*costo-efectividad*”, ya que la introducción de una nueva técnica requiere de una evaluación detallada en las políticas de seguridad transfusional, en los costos y los beneficios de su aplicación en los institutos de salud pública del país.⁽⁴⁶⁾
- La prueba de NAT requiere de personal altamente calificado en técnicas de biología molecular.⁽⁴⁵⁾
- Esta técnica requiere de equipo poco común en bancos de sangre, por tanto implica un costo, la compra o la renta de dicho equipo.⁽⁴²⁾
- La prevención de la contaminación de amplicones entre muestras requiere que la preparación de los reactivos usados en el ensayo, manejo de las muestras, amplificación, y detección, se realicen en cuartos separados y especiales, imponiendo limitaciones de espacio en los centros de sangre.⁽³⁶⁾
- Los ensayos de NAT que se encuentran disponibles comercialmente, requieren un tiempo de realización mayor, que las pruebas actualmente utilizadas, lo cual introduce un esquema que significa una carga en los escrutinios de rutina de la sangre y liberación.^(45, 46)
- El trabajar con mezclas de plasma será más económico en la práctica; sin embargo, se deben tomar en cuenta las consideraciones técnicas, por ejemplo, el VHC circula a concentraciones de 10^4 a 10^5 genomas equivalentes por mililitro (eg/mL), para lo cual se ha propuesto una ultracentrifugación previa al ensayo de amplificación de ácidos nucleicos (NAT), pero diversos virus

incluyendo al virus de la hepatitis C (VHC), pueden no concentrarse en el botón después de dicha centrifugación. Otro problema que presenta el manejo del VHC en la muestra, es que este virus se puede unir a los lípidos presentes en el plasma y ser eliminado durante la decantación y las etapas de lavado de la muestra.⁽⁴⁷⁾

- Los concentrados de 50 muestras no requieren de una etapa de concentración y no desmejoran la sensibilidad de la prueba de NAT, mientras se utilicen técnicas altamente sensibles y los controles de calidad adecuados.^(44, 48)
- Un problema adicional con el uso de mezcla de muestras es la interpretación de los resultados y la disposición de aquellas muestras positivas en la prueba inicial, pero negativas en las pruebas secundarias de conjuntos más pequeños. Este problema también se aplica a mezclas que son inicialmente positivas y en la prueba secundaria, pero son negativas en los ensayos individuales de dichas muestras. Esto representa una gran carga logística y económica en los centros de sangre mundiales.^(32, 33, 45, 46, 49, 50)
- Además el implementar la prueba de NAT incrementará los costos en los procedimientos de validación de las unidades de sangre de cordón umbilical.^(35, 43, 45, 46, 51)
- La inclusión de la prueba de NAT puede incrementar los precios de unidades de cualquier sangre, así como sus componentes, debido a los tiempos de circulación de las muestras y el costo propio del ensayo.^(35, 43, 45)

3. Los beneficios al implementar la prueba de NAT en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical

Como ya se ha mencionado, la prueba de amplificación de ácidos nucleicos puede acortar los periodos de ventana (WP) que presentan el virus de la inmunodeficiencia

human (VIH), virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC). Este es un factor positivo del implementar la prueba de NAT y fortalecer las políticas de seguridad transfusional ya que reduciría de forma significativa el riesgo de transplantar unidades de Células Madre Hematopoyéticas seropositivas para alguno de estos virus. (31, 32, 42, 50)

En el Banco de Sangre de Cordón Umbilical, el implementar NAT como una prueba de escrutinio complementaria a las ya existentes, es de vital importancia, debido a que las unidades de sangre de cordón umbilical son empleadas en el tratamiento de pacientes con padecimientos genéticos, inmunitarios y sanguíneos. (5, 7,11) Antes de llevar a cabo el trasplante de células madre a los pacientes, es necesario preparar a dicho paciente con procedimientos mieloablativos, el cual nulifica el sistema inmunitario del paciente, dejando a este susceptible a cualquier enfermedad infecciosa. Debido a los procedimientos mieloablativos que sufre el paciente, es necesario proveerle una unidad de sangre de cordón umbilical segura, es decir, libre de patógenos. Al tener los datos de laboratorio positivos, permitirá eliminar aquellas unidades seropositivas que ya se encuentran criopreservadas, lo que genera un alto costo y un alto riesgo para los pacientes que soliciten alguna unidad.

Por otro lado, el impacto en la salud mexicana del uso de células madre hematopoyéticas como tratamiento a los padecimiento antes mencionados tiene un valor incalculable, lo cual es un indicativo de que el uso de “*todos*” los recursos disponibles para brindar un servicio seguro y de calidad es indispensable, pero sin dejar de lado el “*principio de proporcionalidad*”, (9) el cual implica un balance de los recursos con los que cuenta el Banco de Sangre de Cordón Umbilical BSCU del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea en México y los objetivos de implementar la prueba de amplificación de ácidos nucleicos NAT como una prueba más en el control de calidad de las unidades de sangre de cordón umbilical y placenta con fin terapéutico. (35, 43, 44, 45)

G) Técnica de ELISA

1. Fundamento de la prueba de ELISA

En el ensayo de ELISA, el anticuerpo (*donde el espécimen que se busca es el antígeno*) o el antígeno (*donde se busca al anticuerpo*) se fijan a una superficie, conocida como fase sólida del inmunoensayo, ya sea en una placa de microtitulación, una película plástica o un tubo. A este procedimiento se le llama inmovilización del antígeno o anticuerpo, unión que se lleva a cabo por medio de enlaces covalentes y en algunos casos por medio de adsorción sobre la superficie, donde las interacciones son no covalentes, como son el caso de placas y películas de poliestireno donde la fijación se lleva a cabo por medio de interacciones hidrofílicas. Las fases sólidas más comúnmente utilizadas son las de agarosa, celulosa y poliacrilamida, ya que contienen grupos químicos activos que permiten interacciones covalentes con el antígeno o el anticuerpo utilizados. ^(52, 53, 54)

Después de realizar la fijación de nuestros antígenos o anticuerpos dirigidos (**mAg** o **mAc** respectivamente), sobre la fase sólida, prosigue la adición del espécimen del paciente a diferentes diluciones a los contenedores de la fase sólida, se realizan los lavados correspondientes para eliminar excesos ya sean de antígenos o anticuerpos que buscamos (Fig. 11). ^(52, 53)

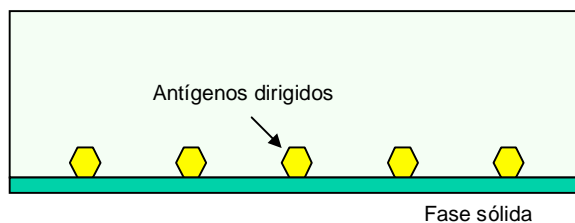


Fig. 11 Preparación de la fase sólida. Unión de los antígenos dirigidos. ⁽⁵³⁾

La muestra a estudiar contiene los anticuerpos a determinar por medio del ensayo. Los antígenos unidos a la fase sólida de la prueba se unen específicamente a los anticuerpos presentes en la muestra. En este caso los anticuerpos Anti-VIH/1, Anti-

VIH/2, Anti-HBsAg y Anti-VHC se unen a los antígenos de la fase sólida (Fig. 12).^(44, 52, 53)

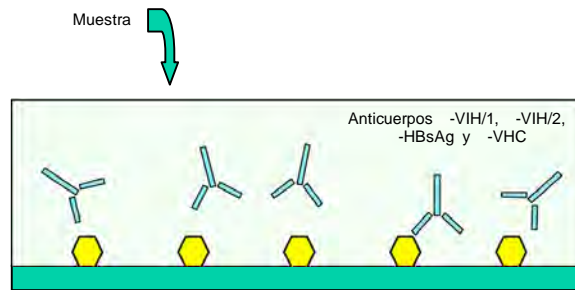


Fig. 12 Los Anticuerpos de la muestra se unen a los antígenos de la fase sólida.⁽⁵³⁾

Posteriormente, se adiciona, ya sea el anticuerpo o antígeno dirigidos contra el espécimen, con una enzima conjugada acoplada covalentemente (Fig. 13). Las enzimas más empleadas para la detección son la peroxidasa de suero de caballo, la fosfatasa alcalina de ternera y la β -galactosidasa de *Escherichia coli*. Estas enzimas se pueden unir a los antígenos o anticuerpos dirigidos sin interferir en la reacción **Ag-Ac**, o bien, sin inhibir la capacidad de la enzima. Las placas se lavan hasta quedar libres de anticuerpos detectores no acoplados y se adiciona el sustrato de la enzima.^(53, 54)

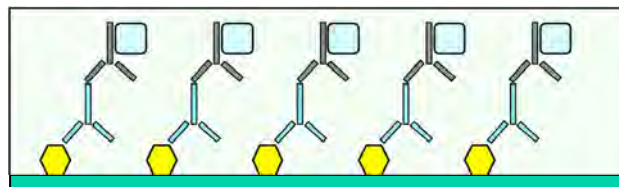


Fig. 13 Adición del anticuerpo detector. La enzima conjugada se representa de color azul.

Al adicionar el sustrato a los contenedores de reacción, se incuba la placa de reacción donde se lleva a cabo una reacción mediada por la enzima, lo cual permite obtener productos de color cuantificables espectrofotométricamente, o bien productos con capacidad quimioluminiscente, detectado en autoanalizadores modernos, lo cual aumenta la sensibilidad de la prueba.^(54, 55, 56)

Dentro de los sustratos más usados tenemos son el fosfato de p-nitrofenil y o-nitrofenil-β-D-galactosidasa, como sustratos de la Fosfatasa alcalina y la β-galactosidasa respectivamente. Para la peroxidasa, se utilizan varios cromóforos, pero el que permite tener una prueba más sensible es el o-fenil diamino, el cual da un color naranja. ⁽⁵³⁾

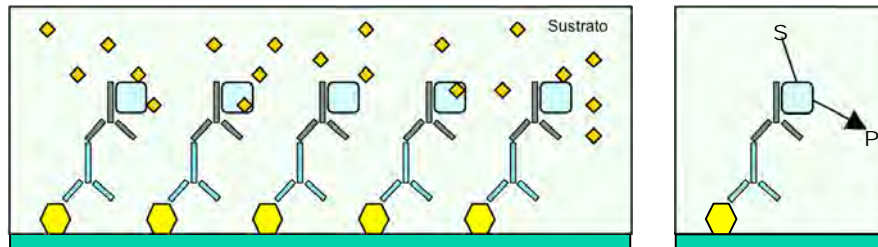


Fig. 14 Adición del sustrato (S), que se representa de color naranja. Formación del producto (P), el cual se detecta por medio de espectrofotometría. ⁽⁵³⁾

La formación del producto final de la reacción enzimática se monitorea por medio de un espectrofotómetro, determinando así la presencia del anticuerpo o antígeno buscado. También podemos cuantificar el espécimen buscado, esto comparando los valores obtenidos en el ensayo contra una curva estándar realizada con concentraciones conocidas del anticuerpo o antígenos buscados. ^(53, 54)

II. Justificación

El Banco de Sangre de Cordón Umbilical (cordMex) del Centro Nacional de la Transfusión de Sangre tiene el gran compromiso desde el año 2003 de proveer unidades de Células Madre Hematopoyéticas de una calidad funcional excepcional (calidad hematopoyética de las células madre) brindando seguridad a los pacientes, receptores de dichas unidades (seguridad transfusional). Esto debido al implemento de modelos cada vez más eficientes en el control de calidad de los procesos realizados para la selección de unidades de sangre de cordón umbilical. ^(1, 11)

Los principales virus conocidos implicados en infecciones transfusionales son los de las hepatitis: VHB, VHC y VHV; virus de la inmunodeficiencia humana: VIH 1 y 2; y citomegalovirus (CMV) y HTLV. Entre estos, el riesgo de transmisión de los virus de mayor relevancia clínica, VIH, VHC y VHB a través de la sangre es muy bajo debido a todas las pruebas de escrutinio dictadas por las políticas de seguridad transfusional, como son las pruebas de serología. ⁽³⁴⁾ Estas pruebas de escrutinio serológico se basan en la detección de proteínas virales (HbsAg, Ag p24) y anticuerpos frente a estas proteínas virales (Anti-VIH 1 y 2, Anti VHC y Anti VHB. ⁽⁵³⁾ Actualmente la realización de estas pruebas ha permitido disminuir la transmisión de estos virus, pero existe un riesgo residual debido a donaciones en periodo de ventana, preseroconversiones, variantes virales, seroconversiones atípicas y errores en el manejo de muestras dentro de los laboratorios. ^(45, 54) Por este motivo la creación de nuevos modelos diagnóstico de virología, principalmente métodos de biología molecular han permitido la detección directa del material genético viral lo que ha permitido disminuir el riesgo residual de transmisión transfusional a niveles cercanos a cero. ^(32, 42, 49, 35, 43)

Al implementar estos nuevos modelos de validación a las unidades de células progenitoras hematopoyéticas, se tiene como objetivo principal proveer unidades de sangre de cordón umbilical de alta calidad a la población mexicana, por tanto, se ha propuesto el uso de nuevas tecnologías de diagnóstico virológico, principalmente técnicas de biología molecular utilizadas en el análisis molecular de virus, como la

prueba de Amplificación de Ácidos Nucleicos (NAT).^(31, 45) Esta nueva técnica se ha añadido a las políticas de calidad de los bancos de sangre e institutos de investigación de componentes sanguíneos en diferentes países como una medida más para evitar infecciones transfusionales, causadas principalmente por los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la hepatitis B (VHB).^(35, 41, 43, 45)

El Departamento de investigación, desarrollo y control de calidad del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, ha propuesto el uso de la tecnología de Amplificación de Ácidos Nucleicos en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (cordMX), debido a que se ha demostrado que esta prueba disminuye de manera importante el periodo de ventana a comparación de los ensayos serológicos empleados. Es importante mencionar que la literatura mundial señala que el uso de NAT implementado en los bancos de sangre de EUA, Europa, Japón y Australia, ha sido utilizado con gran éxito, para la detección de donadores infectados por el virus de inmunodeficiencia humano (VIH), virus de hepatitis C (VHC) y el virus de hepatitis B (VHB), ya que el uso de esta tecnología de la biología molecular ha logrado disminuir el riesgo residual de 1 en 493,000 a 1 en 2.5 millones de casos para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de 1 en 760,000 a 1 en 5 millones para el virus de la hepatitis C (VHC) y 1 en 270,000 a 1 en 2 millones para el virus de la hepatitis B (VHB).^(32, 38, 42, 45)

La disminución del riesgo residual se debe principalmente a que en comparación con los ensayos serológicos de rutina, la prueba de NAT disminuye el periodo de ventana (WP), es decir, el tiempo que transcurre desde el momento de adquirir la infección, hasta la detección, ya sea de los antígenos virales como el p24 del VIH y el antígeno de superficie del VHB (HbsAg), o de los anticuerpos: Anti VIH-1, Anti VIH-2, Anti-VHC y Anti VHB,^(36, 37, 44, 47) debido a la búsqueda directa del material genético del agente infeccioso en esta fase de ventana serológica.^(43, 45)

La prueba de amplificación de ácidos nucleicos empleado en este protocolo es el Procleix^R UltrioTM Assay de detección simultánea la cual es una prueba cualitativa *in vitro* que detecta el ARN de los virus de la inmunodeficiencia humana y el virus de la hepatitis C (VHC) y/o el ADN del virus de la hepatitis B (VHB) en plasma humano. ⁽³⁶⁾

En el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1/2) usando la detección del anticuerpo por los ensayos de ELISA, se ha estimado un periodo de ventana de hasta 42 días, el cual es disminuido de 6 hasta 14 días con el uso de un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) Procleix^R UltrioTM. Para el virus de la hepatitis C (HCV) la reducción del periodo de ventana es de hasta de 26 días, es decir, de un periodo de ventana estimado de 70 días por pruebas serológicas a 44 días por el ensayo de NAT. En la detección del ADN del virus de la hepatitis B (HBV) el periodo de ventana disminuye de 11 hasta 20 días por el ensayo de NAT Procleix^R UltrioTM. ^(35, 37, 38, 50, 58)

Debido a estos datos, en el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, (SSA) de México se realizó la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) a todas las unidades criopreservadas en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (cordMX) para determinar los beneficios y los impedimentos que implica el uso de la prueba NAT Procleix^R UltrioTM Assay, como una prueba más en el control de calidad de las unidades de sangre de cordón umbilical, aplicando un modelo estadístico de análisis de decisión que permita valorar el implemento de esta nueva tecnología de diagnóstico molecular en virología. ^(43, 45, 47) El modelo de toma de decisiones aplicado en este protocolo permite determinar las utilidades de implementar ó no implementar la prueba de NAT por medio de un árbol Bayesiano de cálculo de probabilidades. ^(59, 60)

Por otro lado, este protocolo se plantea exclusivamente como un estudio piloto, con el fin de realizar una comparación del uso de los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) utilizados como prueba de rutina de seguridad transfusional, en los bancos de sangre en todo el mundo, con el uso de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos de forma conjunta, ⁽⁴²⁾ con la finalidad de implementar esta última como una prueba más de

escrutinio de unidades de sangre de cordón umbilical, reforzando así las políticas de seguridad transfusional en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical de México por medio de un análisis de decisión que permite evaluar un método diagnóstico. (35, 43, 45, 59, 60)

III. Objetivos

Objetivo general:

Realizar un análisis de decisión que evalúe la capacidad de un método diagnóstico por medio del cual se tome la elección de incluir el ensayo de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) como una prueba más de validación de unidades de sangre de cordón umbilical, con el fin de fortalecer la política de seguridad transfusional en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (CordMX) del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, (SSA).

Objetivos particulares:

1. Demostrar por medio del ensayo de amplificación de ácidos nucleicos (NAT), la ausencia de el virus de inmunodeficiencia adquirida tipo 1 (VIH-1), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la hepatitis B (VHB) en el suero del donador (suero materno) y suero de sangre de cordón umbilical (CPH).
2. Demostrar la utilidad de incluir NAT como una prueba más de validación de unidades de sangre de cordón umbilical, por medio de un modelo estadístico de análisis de decisiones, el cual permita evaluar la utilidad de procedimientos diagnóstico.
3. Proponer un esquema de validación ideal a partir de la inclusión del ensayo de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) como un ensayo alternativo que fortalezca la política de seguridad transfusional en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (cordMX) del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, (SSA).

IV. Metodología

1. Donadores

La sangre de cordón umbilical se recolectó en la etapa de parto de mujeres que fueron informadas previamente del programa de donación del Banco de Sangre de Cordón Umbilical del CNTS, SS y de la utilidad de la sangre de cordón umbilical. Posteriormente se informó a las posibles donadoras de la carta de consentimiento informado (interrogado antes de la primera etapa de parto) y los cuestionarios de seguridad transfusional, los cuales cumplieron satisfactoriamente.

2. Recolección de muestras

La sangre de cordón umbilical es colectada en las unidades maternas de los hospitales afiliados al Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, bajo la estricta supervisión del médico gineco-obstetra. La muestra materna es recolectada en un tubo el cual no contiene anticoagulante para poder obtener el suero de dicha muestra. Este suero materno es dividido en dos criotubos y congelados a -80°C para su almacenamiento.

Por otra parte, la sangre de cordón umbilical es colectada por el método de punción de la vena del cordón umbilical en una bolsa plástica Grifols de 150 mL, la cual contiene 25 mL de CPD. Antes del proceso de criopreservación de la sangre de cordón umbilical, se toman tres alícuotas de plasma de dicha muestra para su posterior análisis genético y serológico utilizados en este protocolo.

3. Muestras

Todos los sueros maternos y el plasma de cordón umbilical colectados por el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (cordMX) fueron analizados por serología para los marcadores VIH-1, VHC y VHB por medio del ensayo de ELISA (Vitros Immunodiagnostic Products by Ortho-Clinical Diagnostics). Un análisis que resulte

reactivo inválida la unidad de sangre de cordón umbilical recolectada, y una prueba positiva es seguida por un ensayo confirmatorio.

Para la realización del ensayo de amplificación de ácidos nucleicos NAT se emplea la prueba de NAT Procleix^R UltrioTM Assay (Chiron Corp.) utilizando muestras únicamente validadas serológicamente. El total de sueros maternos utilizados para realizar el ensayo de NAT fueron 298, además de 318 muestras de plasma de sangre de cordón umbilical, lo que da en total 616 muestras.

4. Prueba de amplificación de ácidos nucleicos

El ensayo de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) de la muestras recolectadas fue realizado por el método de **Procleix^R UltrioTM** que es una prueba cualitativa *in vitro* de amplificación de ácido nucleico para la detección del ARN del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), el ARN del virus de la hepatitis C (HCV) y/o el ADN del virus de la hepatitis B (HBV) en plasma humano.

Este ensayo de **Procleix^R UltrioTM** consta de tres etapas principales que se llevan a cabo dentro del mismo tubo:

1. Preparación de la muestra.
2. Amplificación selectiva del ARN del HIV-1 y del HCV, así como del ADN del HBV mediante amplificación mediada por transcripción.
3. Detección de los productos de amplificación (amplicón) por el ensayo de protección de hibridación.

a. Preparación de las muestras (Captura Selectiva)

La preparación de la muestra consiste en aislar el material genético (ARN y ADN) viral de las muestras de plasma mediante una captura selectiva. Dicha muestra es tratada con el reactivo de captura el cual contiene una solución de tampón HEPES con detergente, oligonucleótidos de captura y micropartículas magnética. Los oligonucleótidos de captura que son homólogos a regiones altamente conservadas del

VIH-1 y del VHC, se híbridan para la selección del ARN de estos virus. El material hibridado se captura mediante las micropartículas magnéticas y es separado del plasma por medio de un campo magnético.

Se realizan lavados de la muestra para separar los componentes superfluos del plasma contenido en el tubo de reacción.

b. Amplificación selectiva

En esta etapa se adiciona el reactivo de amplificación el cual contiene los dos oligonucleótidos de amplificación. Antes del paso de amplificación se adiciona aceite al tubo de reacción ya que este reduce la contaminación por aerosoles, además de la evaporación de la muestra y la contaminación cruzada. Para llevar a cabo la hibridación de los dos primers se realizan dos incubaciones a baño María a 60°C +/- 1°C por 10 minutos y a 41.5°C +/- 1°C durante 9 y 20 minutos respectivamente.

Posteriormente se adiciona el reactivo de enzima, con el cual se lleva a cabo la amplificación selectiva del ARN del HIV-1 y del HCV, así como al ADN del HBV y el control interno mediante la amplificación mediada por transcripción. Para llevar a cabo la amplificación se incuban los tubos de reacción a 41.5°C +/- 1°C durante 60 minutos +/- 5 minutos.

c. Detección de los productos de amplificación

Este procedimiento se realiza en una zona separada del área de preparación de la muestra y la amplificación ya que se minimiza la contaminación por amplicones.

i. Hibridación

Una vez finalizada la etapa de amplificación selectiva se adiciona al tubo de reacción el reactivo de sonda, se homogeniza la solución y se incuba a baño María a 62°C +/- 1°C

por 15 minutos con el fin de facilitar la hibridación de las sondas marcadas con éster de acridinio (EA) con los amplicones producto de la amplificación selectiva.

ii. Selección

En esta etapa de la detección se añade el reactivo de selección al tubo de reacción el cual hidroliza las moléculas de éster de acridinio de las sondas de ADN no hibridadas. Se homogeniza la solución y posteriormente se incuba a $62^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, enfriando $23^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ durante un mínimo de 10 minutos, en los cuales se prepara la detección.

iii. Detección

Durante esta fase la señal de quimioluminiscencia generada por la sonda hibridada se mide en un luminómetro y se expresa en unidades relativas de luz (RLU)

Las lecturas de los tubos deben realizarse en los 75 minutos posteriores a la reacción de selección debido a la hidrólisis de las moléculas de éster de acridinio sobre las sondas de ADN hibridadas.

d. Procedimientos de control de calidad

Criterios de validación para el ensayo de Procleix^R UltrioTM y los ensayos discriminatorios Procleix^R HIV-1, HCV y HBV

Validación de ciclos

Los criterios de validación del ensayo **Procleix^R UltrioTM** se realizan por medio del programa del luminómetro al realizarse un ciclo del ensayo, al menos siete de las nueve réplicas de calibradores empleados deben ser válidos. Al menos dos de las tres réplicas de calibradores negativos y cinco de las seis réplicas de calibradores positivos deben ser válidas.

Para el ensayo discriminatorio de VIH-1, dos de las tres réplicas del calibrador positivo de VIH-1 deben ser válidas.

Para el ensayo discriminatorio de VHC, dos de las tres réplicas del calibrador positivo de VHC deben ser válidas.

Para el ensayo discriminatorio de VHB, dos de las tres réplicas del calibrador positivo de VHB deben ser válidas.

El equipo imprimirá una alerta en el informe del ciclo cuando más del 10% de los calibradores y las muestras de un ciclo resulten inválidas.

Los criterios de validación y el resumen de cálculos de valor de corte para el ensayo **Procleix^R UltrioTM** se pueden revisar en el apéndice.

5. Hojas de resultados

a. Ensayo de NAT



Secretaría de Salud
Coordinación General de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales
Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea



Biología Molecular

Reporte de Resultados de Prueba de Acidos Nucleicos (NAT) en BSCU

No. Registro

Fecha de Reporte

AgsHB	VIH	VHC

AgsHB	VIH	VHC

OBSERVACIONES:

b. Ensayos de serología



Secretaría de Salud
Coordinación General de los Institutos Nacionales de Salud y Hospitales
Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea



CENTRO NACIONAL DE LA TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA BANCO DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL

Fecha:

ESPACIO PARA LA ETIQUETA DE IDENTIFICACIÓN
NUMERO DE MUESTRA:

SOLICITUD DE EXAMENES DE SEROLOGÍA:

AgsHB

H.C.V.

V.I.H.

R.P.R

OBSERVACIONES:

V. Resultados

a. Validación por ELISA

El número de muestras totales que se validaron en el presente estudio fue 616, de las cuales 298 fueron sueros del donador (maternos) y 318 muestras de plasma de cordón umbilical de unidades validadas serológicamente. El total de muestras serológicamente positivas en este protocolo fue de 7, las cuales fueron inicialmente reactivas (IR) y/o repetidamente reactivas (IR/RR), lo cual representa el 1.14%.

b. Validación de unidades de sangre de células progenitoras hematopoyéticas por amplificación de ácidos nucleicos NAT

Al realizar el ensayo de amplificación de ácidos nucleicos NAT Procleix^R UltrioTM Assay, el total de las 616 muestras analizadas no indican la presencia de VIH, VHC y/o VHB en las unidades de células progenitoras, lo que indica una diferencia de especificidad y sensibilidad entre la prueba de ELISA y la prueba de amplificación de ácidos nucleicos debido a los fundamentos teóricos de cada ensayo.

Tabla 1. Unidades de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) seropositivas por ELISA.

Unidad	Marcador serológico	Muestra	Ensayo de ELISA	Ensayo de confirmación
010169	HBAGs	SM	Positivo IR/RR	Positivo 75.35 por ensayo de neutralización
		PC	Negativo	
		2 ^{da} muestra de SM ELISA IR/RR indeterminada por prueba de confirmación		
010196	HCV	SM	Positivo IR/RR	Indeterminado
		PC	Positivo IR/RR	Negativo
010236	HCV	SM	Positivo IR	Negativo
		PC	Positivo IR	Negativo
010251	HCV	SM	Negativo	No realizado
		PC	IR	Negativo
010294	HCV	SM	Positivo IR/RR	Negativo
		PC	Positivo IR/RR	Negativo
010335	HIV-1	SM	Positivo IR/RR	Negativo por WB
		PC	Negativo	No realizado
010359	HCV	SM	Positivo IR/RR	Negativo
		PC	Negativo	No realizado

Tabla 2. Unidades de CPH que por ensayo de ELISA fueron IR o IR/RR, no muestran la presencia del VIH, VHC y/o el VHB por la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT).

Unidad	Muestra	NAT
010169	SM	Negativo
	PC	Negativo
010196	SM	Negativo
	PC	Negativo
010236	SM	Negativo
	PC	Negativo
010251	SM	Negativo
	PC	Negativo
010294	SM	Negativo
	PC	Negativo
010335	SM	Negativo
	PC	Negativo
010359	SM	Negativo
	PC	Negativo

c. Cálculo de probabilidad del árbol de decisión para la elección de incluir la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) para el virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la hepatitis B (VHB).

En el análisis de decisión para la inclusión de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (**inNAT**) para la determinación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la hepatitis B (VHB), se obtiene lo siguiente:

- **rama pV^+ / T^+ (inNAT)** una probabilidad de determinar positivos verdaderos :
 0.9937 (99.37%) para el VIH
 0.9989 (99.89%) para el VHC
 0.9965 (99.65%) para el VHB
- **rama pV^- / T^- (inNAT)** una probabilidad de determinar negativos verdaderos:
 0.9981 (99.81%) para el VIH
 0.9944 (99.44%) para el VHC
 0.9983 (99.83%) para el VHB
- **rama pV^- / T^+ (noNAT)** una probabilidad de determinar positivos falsos:
 0.0063 (0.63%) para el VIH
 0.0011 (0.11%) para el VHC
 0.0035 (0.35%) para el VHB
- **rama pV^+ / T^- (noNAT)** una probabilidad de determinar negativos falsos:
 0.0019 (0.19%) para el VIH
 0.0056 (0.56%) para el VHC
 0.0017 (0.17%) para el VHB

d. Análisis de decisión

El cálculo de probabilidades para el desarrollo del árbol de decisión se realiza de forma individual para cada uno de los tres virus: VIH-1, VHC y el VHB; utilizando la sensibilidad y la especificidad de la prueba ⁽³⁶⁾ y la prevalencia de cada uno de los virus obtenidos en el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, SSA (Apéndice I). (Tabla 3, 4 y 5).

El árbol de decisión muestra cada una de las probabilidades calculadas por medio del modelo estadístico de toma de decisiones (Apéndice) ^(59, 60, 61, 62), a la cual se le asignaron las utilidades de incluir la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (inNAT) y la de no incluirla (noNAT). Además se muestra la prevalencia de cada uno de los virus (pV), que es la probabilidad de contraer el virus al no realizarse la prueba de NAT (Enf) y la probabilidad de no contraer el virus al no realizarse la prueba de NAT (San).

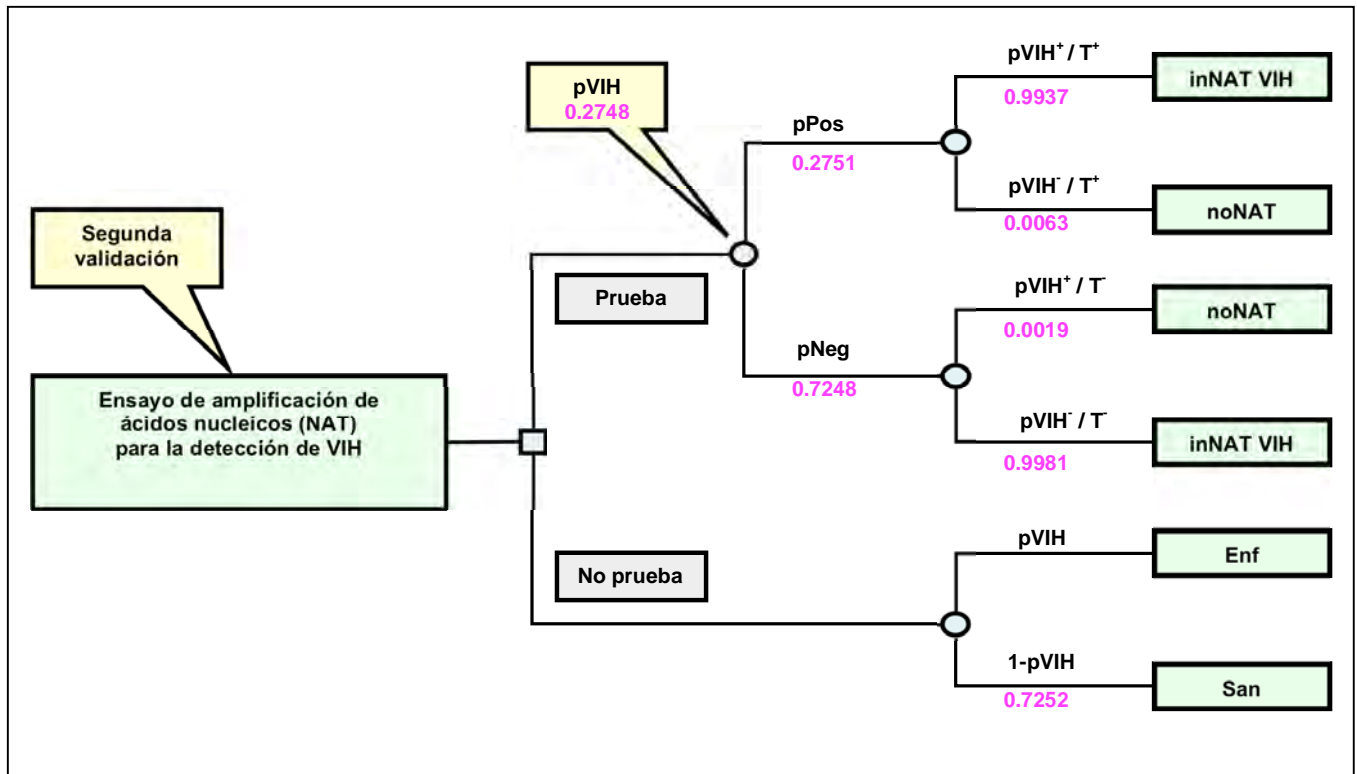


Fig. 1 Árbol de decisión para la elección de incluir NAT para determinar el VIH-1 en el BSCU del CNTS, SSA. ^(59, 60, 61)

Tabla 3. Cálculo de probabilidad y utilidades del árbol de decisión para la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Valoración de la utilidad de incluir NAT para VIH en el BSCU (cordMX) del CNTS, SS.					
Decisión	VIH	Resultado		Utilidad	Inclusión de NAT
Realizar NAT	+	pVIH + / T+	0.9937	inNAT	Sí
		pVIH - / T+	0.0063	noNAT	No
	-	pVIH + / T-	0.0019	noNAT	No
		pVIH - / T-	0.9981	inNAT	Sí
No realizar NAT	+	pVIH	0.2748	Enf	-
	-	1-pVIH	0.7252	Sano	-

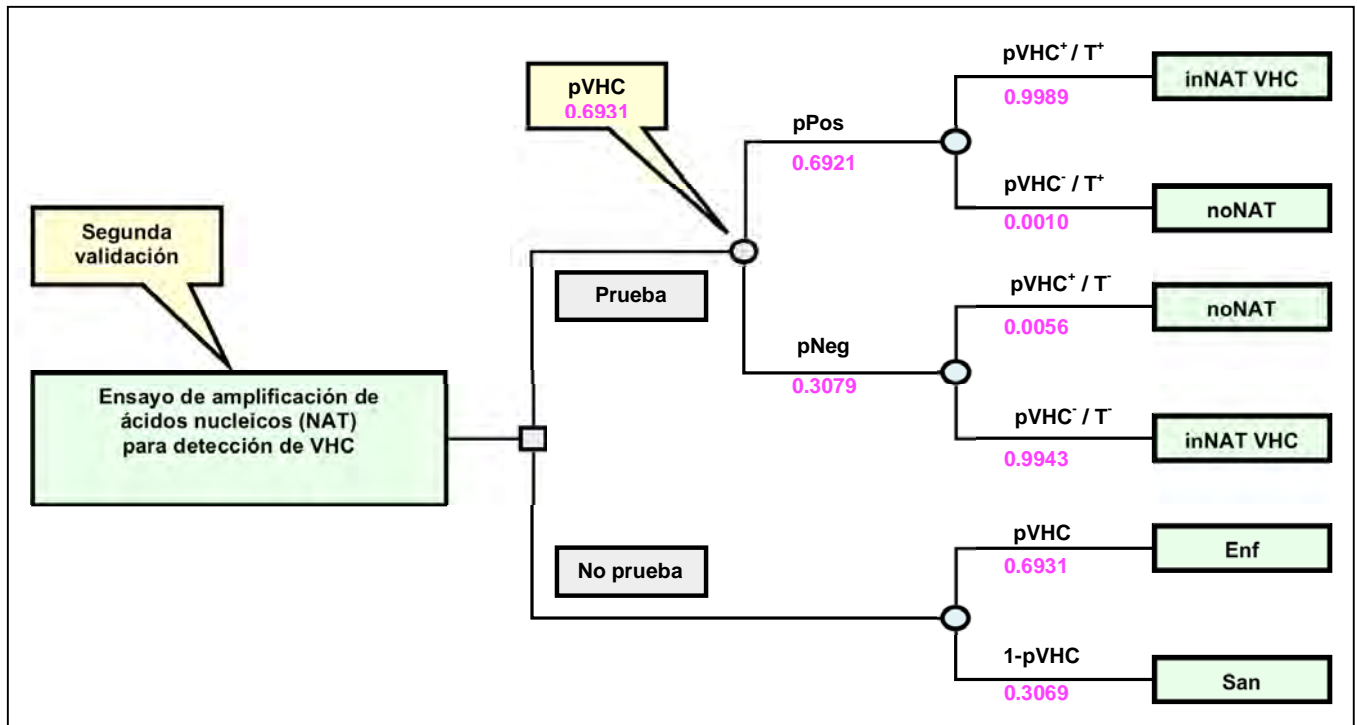


Fig. 2 Árbol de decisión para la elección de incluir NAT para determinar el VHC en el BSCU del CNTS, SSA. ^(59, 60, 61)

Tabla 4. Cálculo de probabilidad y utilidades del árbol de decisión para la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) para el virus de la hepatitis C (VHC).

Valoración de la utilidad de incluir NAT para VHC en el BSCU (cordMX) del CNTS, SS.					
Decisión	VHC	Resultado		Utilidad	Inclusión de NAT
Realizar NAT	+	pVHC + / T+	0.9989	inNAT	Sí
		pVHC - / T+	0.0011	noNAT	No
	-	pVHC + / T-	0.0056	noNAT	No
		pVHC - / T-	0.9944	inNAT	Sí
No realizar NAT	+	pVHC	0.6931	Enf	-
	-	1-pVHC	0.3069	Sano	-

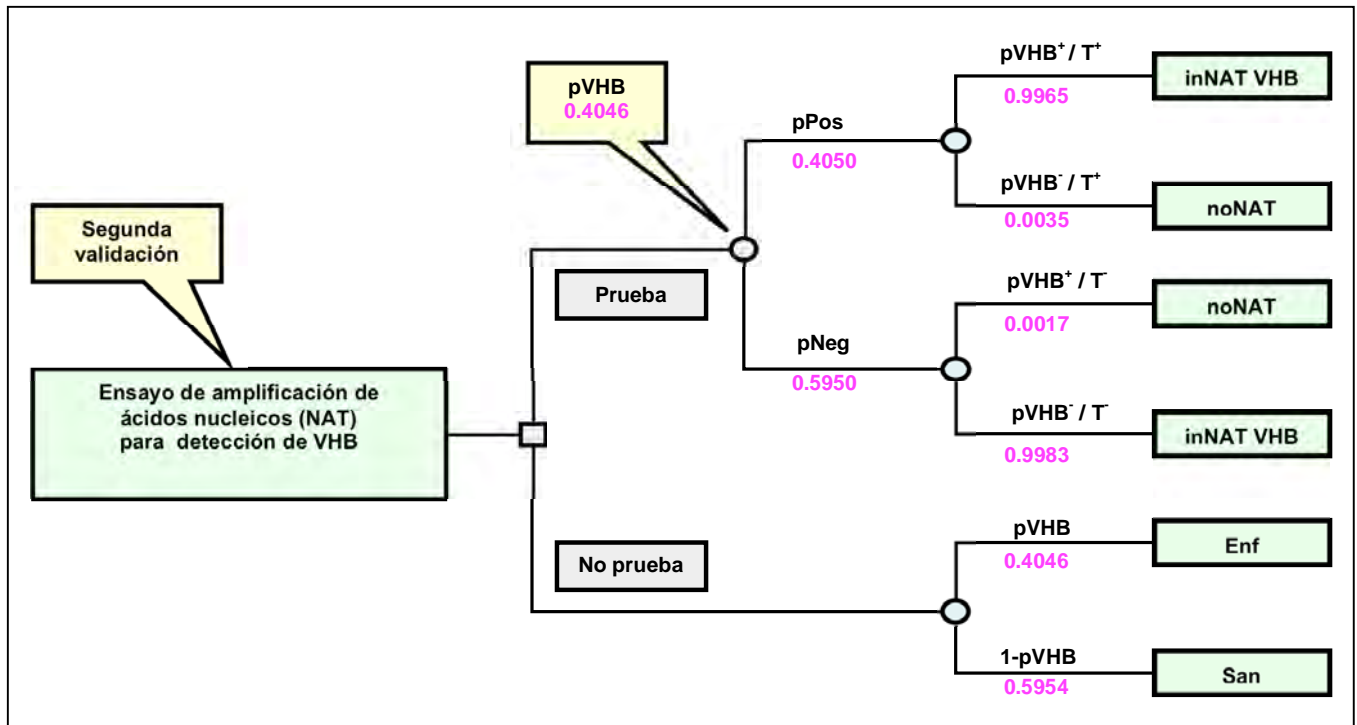


Fig. 3 Árbol de decisión para la elección de incluir NAT para determinar el VHB en el BSCU del CNTS, SSA. ^(59, 60, 61)

Tabla 5. Cálculo de probabilidad y utilidades del árbol de decisión para la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) para el virus de la hepatitis B (VHB).

Valoración de la utilidad de incluir NAT para VHB en el BSCU (cordMX) del CNTS, SSA.					
Decisión	VHB	Resultado		Utilidad	Inclusión de NAT
Realizar NAT	+	pVHB + / T+	0.9965	inNAT	Sí
		pVHB - / T+	0.0035	noNAT	No
	-	pVHB + / T-	0.0017	noNAT	No
		pVHB - / T-	0.9983	inNAT	Sí
No realizar NAT	+	pVHB	0.2748	Enf	-
	-	1-pVHB	0.7252	Sano	-

VI. Discusión

a. Validación por ELISA

El número de muestras totales que se validaron en el presente estudio fueron 614, de las cuales 298 fueron sueros del donador (maternos) y 318 muestras de plasma de cordón umbilical de unidades validadas serológicamente. El total de muestras serológicamente positivas en este protocolo fue de 7, las cuales fueron inicialmente reactivas (IR) y/o repetidamente reactivas (IR/RR), lo cual representa el 1.14%.

El 1.14% de muestras que por ensayos serológicos fueron positivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC) y/o el virus de la hepatitis B (VHB) indica una muy baja frecuencia de estas patologías debido a las políticas de seguridad transfusional implementadas en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (BSCU) del CNTS con respecto a la selección de unidades de células progenitoras hematopoyéticas captadas en las unidades maternas.

Al tener 7 muestras IR o IR/RR por ELISA indican el posible contacto del donador con el virus, más no la enfermedad, ya que esta prueba detecta anticuerpos en el caso del virus de inmunodeficiencia humana y el virus de la hepatitis C. En el caso del virus de la hepatitis B se lleva a cabo la detección del antígeno HBsAg raramente persistente hasta los seis meses debido a la aparición del anti-HBsAg.

b. Validación de unidades de sangre de células progenitoras hematopoyéticas por amplificación de ácidos nucleicos NAT

Al realizar el ensayo de amplificación de ácidos nucleicos NAT **Procleix^R UltrioTM**, el total de las 614 muestras analizadas no indican la presencia de VIH, VHC y/o VHB en las unidades de células progenitoras, lo que indica una diferencia de especificidad y

sensibilidad entre la prueba de ELISA y la prueba de amplificación de ácidos nucleicos debido a los fundamentos teóricos de cada ensayo.

Con respecto a los resultados obtenidos en este estudio, se ha observado que las unidades positivas al VIH, VHC y/o VHB por la prueba de ELISA se han desechado por los requisitos que exigen los protocolos de validación del BSCU, al realizar la prueba de amplificación de ácidos nucleicos NAT a las mismas muestras no se determinó la presencia del VIH, VHC y el VHB en ninguna de éstas.

c. Análisis de decisión

El modelo estadístico de toma de decisiones, el cual tiene como utilidades la inclusión de NAT (**inNAT**) y la no inclusión (**noNAT**) depende de los valores de sensibilidad y de especificidad del método diagnóstico, además de las prevalencias del **VIH**, **VHC** y el **VHB** obtenidas en el Centro Nacional de la transfusión Sanguínea.

Al realizar el árbol de decisión (**fig. A**) la utilidad de incluir la prueba de NAT (**inNAT**) se encuentran ubicada en las ramas pV^+ / T^+ que determina la probabilidad de obtener el ensayo positivo (T^+) siendo que el virus se encuentra presente (pV^+), positivas verdaderas y pV^- / T^- que determina la probabilidad de obtener el ensayo negativo (T^-) siendo que el virus no se encuentra presente (pV^-), negativas verdaderas.

La utilidad de no implementar la prueba de NAT en este modelo estadístico se encuentra representada como **noNAT** y se encuentra ubicada en las ramas pV^- / T^+ que nos determina la probabilidad de obtener el ensayo positivo (T^+) siendo que el virus no se encuentra presente (pV^-), las positivas falsas y pV^+ / T^- la probabilidad de obtener el ensayo negativo (T^-) siendo que el virus se encuentra presente (pV^+), las negativas falsas.^(59, 60, 61, 62)

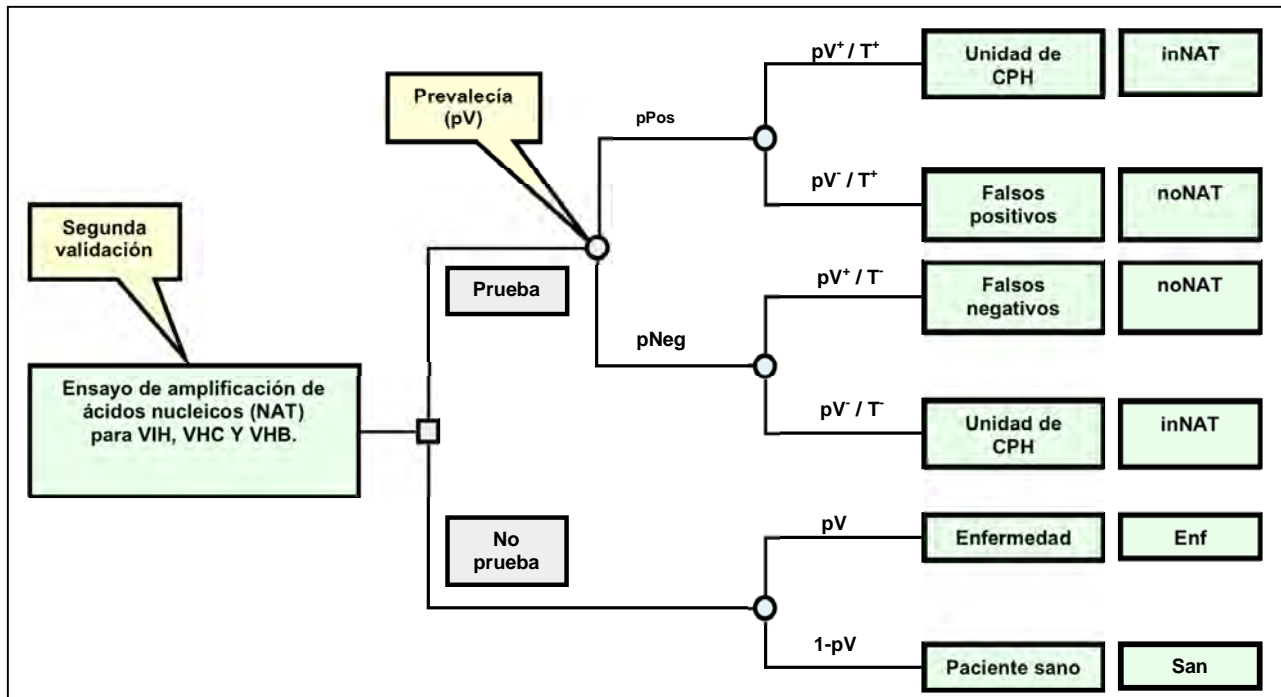


Fig. A. Árbol de decisión utilizado en el modelo estadístico de toma de decisión de incluir la prueba de NAT en el BSCU, el cual tiene como utilidades la inclusión de NAT (**inNAT**) y la no inclusión de NAT (**noNAT**), además de presentar las probabilidades de presentar la enfermedad al no realizar la prueba diagnóstico en dichos pacientes. ^(59, 60, 61)

Las probabilidades obtenidas en el árbol de análisis de decisión para la inclusión de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) es alto en el análisis de los tres virus (VIH, VHC y VHB) lo cual nos indican una utilidad favorable al implementar este ensayo en la estrategia de validación de las unidades de células progenitoras hematopoyéticas.

d. Inclusión de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos NAT en el Banco de Sangre de cordón Umbilical (cordMX) del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, SSA.

La liberación de unidades de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) validadas, está avalada por los resultados de las pruebas de rutina actualmente requeridas por las políticas de seguridad transfusional.

Estos resultados se deben a que la prueba de NAT tiene la capacidad para detectar la presencia del agente etiológico de la infección, es decir, el virus, porque detecta directamente ácidos nucleicos genómicos virales y no, indirectamente, la presencia de anticuerpos. Debido a los fundamentos de la prueba de NAT provee un mayor nivel de sensibilidad y especificidad que los métodos de rutina ya implementados (inmunoensayos enzimáticos).

En el análisis de decisión la sensibilidad y la especificidad de la prueba de **Procleix^R UltrioTM** para la detección del VIH, VHC y/o VHB, nos brindan resultados satisfactorios con respecto a incluir definitivamente la prueba de NAT (inNAT) como una prueba de rutina más en el protocolo de validación de las unidades de sangre de cordón umbilical captadas en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (cordMX), lo cual permitirá una disminución inminente del riesgo residual de transfundir una unidad de células progenitoras hematopoyéticas (CPH).

La introducción de NAT requiere de una reestructuración de la estrategia de búsqueda del VIH, VHC y el VHB, ya que de ello depende el éxito de la liberación de un mayor número de unidades seguras en un lapso corto de tiempo, en el cual se pueden requerir dichas unidades para su uso terapéutico de urgencia. Esta reestructuración se sugieren la figura B de la siguiente forma:

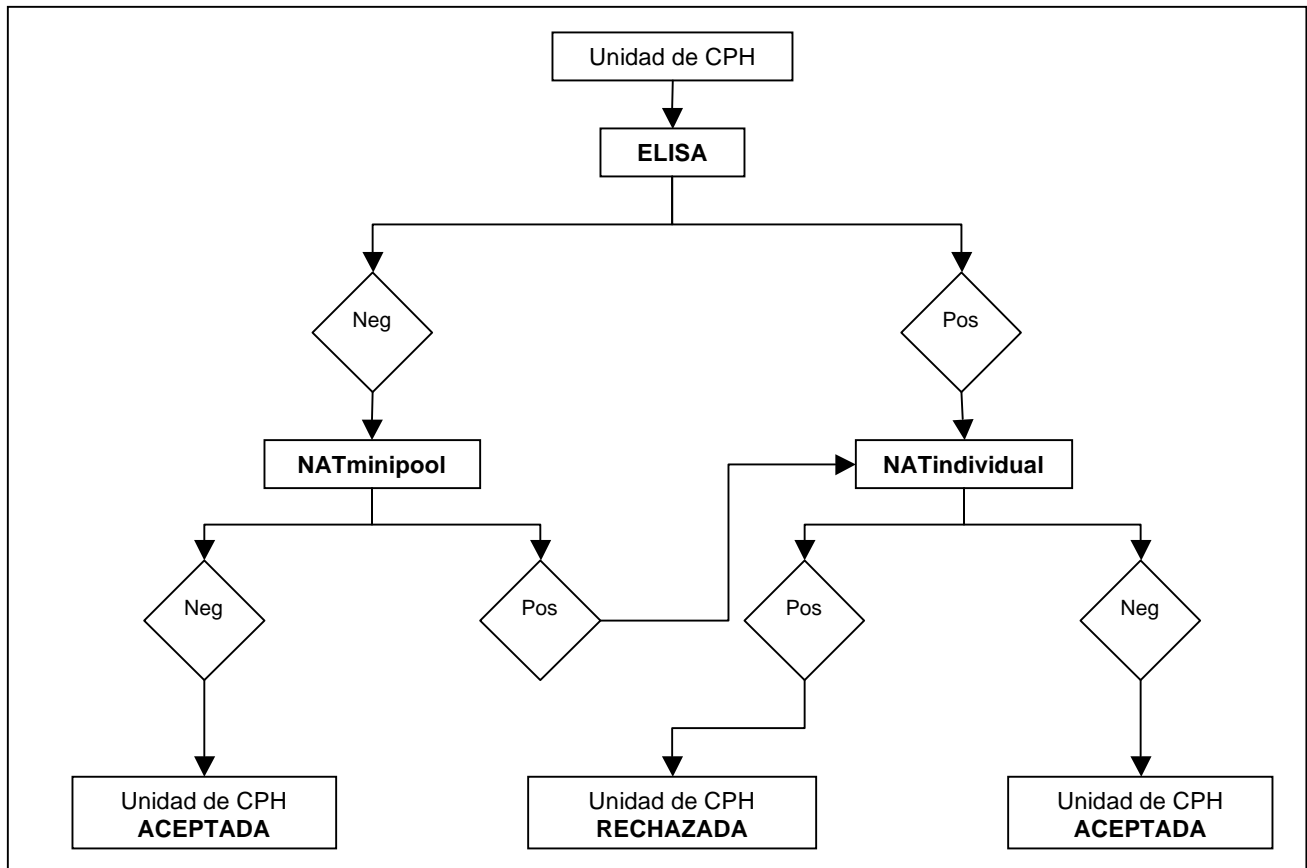


Fig. B Esquema de validación propuesto en el banco de sangre de cordón umbilical del CNTS, SSA al implementar la prueba de NAT en el protocolo de validación de unidades de células progenitoras hematopoyéticas. **Pos:** Ensayo positivo; **Neg:** Ensayo negativo; **CPH:**Células progenitoras hematopoyéticas.

En el diagrama propuesto se muestra una detallada logística en la validación de las unidades de sangre de cordón umbilical. Este esquema nos permite realizar una serie de ensayos a cada una de las unidades de células progenitores hematopoyéticas con el fin de captar el mayor número de unidades sanas para su almacenamiento. Esta secuencia de validación permite realizar análisis cada vez más sensibles, por lo que podemos aceptar una unidad que por serología (ELISA) nos indique una contaminación viral por medio de NAT minipool, si esta es negativa para los marcadores, además podemos aumentar la sensibilidad de la prueba de NAT al realizar una prueba NAT individual, por tanto el riesgo residual se disminuye casi a cero, obteniendo un mayor

número de unidades de sangre de cordón umbilical, más seguras para su uso terapéutico.

Con respecto al costo que implica la inclusión de la prueba NAT, el beneficio supera el aspecto económico debido a que el riesgo de transmisiones por trasplantes de células progenitoras hematopoyéticas será casi cero, brindando unidades de sangre de cordón umbilical más seguras a los pacientes que requieran dicho trasplante. El incremento de los costos no es drástico si se maneja de manera adecuada la logística de validación y se toman en cuenta todos los aspectos de la política de seguridad transfusional. En la siguiente tabla se muestran los costos de cada una de las estrategias a seguir en el esquema de validación de unidades de sangre de cordón umbilical.

Prueba	Costo (USD)
SS	\$ 15
SS + NAT minipool	\$ 33
SS + NAT individual	\$ 32

Tabla. 6 Este cálculo esta basado en un modelo de incidencia de periodo de ventana realizado por D. A. Marshall, válido únicamente para la infraestructura de los servicios de salud de los Estados Unidos. ⁽⁴⁶⁾ SS: Serología; NAT minipool: prueba de NAT en concentrados de muestras de donadores; NAT individual: prueba de NAT por donador; USD: dólar americano.

El implemento de NAT incrementará el costo del proceso de validación de las unidades de sangre de cordón umbilical en el CNTS, SSA. En contraste con el aumento de costos, el impacto positivo en la salud de la población mexicana es incalculable ya que las unidades requeridas en la terapéutica serán más seguras, brindando así un mayor número de trasplantes exitosos de células progenitoras hematopoyéticas, es decir el beneficio será mayor.

VII. Conclusiones

- I. La evaluación de la inclusión de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos NAT para fortalecer la política de seguridad transfusional del Banco de Sangre de Cordón Umbilical (cordMX) del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, SSA, es favorable debido a que queda demostrada la capacidad de esta técnica de biología molecular para determinar resultados verdaderos positivos y verdaderos negativos por medio de la sensibilidad y especificidad de la prueba, disminuyendo así el riesgo de transmisión viral por medio de trasplantes de unidades de células progenitoras hematopoyéticas infectadas.
- II. La ausencia de los virus de inmunodeficiencia adquirida tipo 1 (VIH-1), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la hepatitis B (VHB) en el suero del donador (suero materno) y de unidades de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) utilizadas para este protocolo se confirmó por medio del ensayo de amplificación de ácidos nucleicos.
- III. Por medio del modelo de toma de decisiones queda demostrado que la utilidad de incluir la prueba de NAT (inNAT) en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical (cordMX) es indispensable para fortalecer la seguridad transfusional y brindar unidades de células progenitoras hematopoyéticas más seguras a pacientes mexicanos que requieran de su uso terapéutico.
- IV. La propuesta del esquema de validación de unidades de sangre de cordón umbilical muestra una estrategia que permite manipular las pruebas realizadas a las unidades de CPH para aceptar una mayor cantidad de unidades de células progenitoras libres de virus.

VIII. Bibliografía.

- 1) Banco de Sangre de Cordón Umbilical del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea, SSA, de:
http://www.salud.gob.mx/unidades/cnts/publi_cordon.htm
- 2) Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED. AC133, a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood*. 1997; 90 (12): 5002-5012.
- 3) AAP (American Academy of Pediatrics). Cord Blood Banking for Potential Future Transplantation: Subject Review. Work Group on Cord Blood Banking. *Pediatrics*. 1999; 104 (1): 116-118.
- 4) Ballen K K. , et al. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood*. 2005; 105 (10): 3786-3792.
- 5) García J, Querol S., Los bancos de sangre de cordón umbilical: una nueva contribución al tratamiento de las enfermedades hematológicas. *Acta Científica y Tecnológica*. 2001; 3: 10-13.
- 6) Miñana M, Carbonell F. : SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL COMO FUENTE DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS PARA TRASPLANTE. En: Palacios J. CLONACIÓN Y TRASPLANTE. Serie Científica. Madrid 2003: 73-89.
- 7) The European Group of Ethics in Science and New Technologies to the European Commission. OPINION ON THE ETHICALS ASPECTS OF UMBILICAL CORD BLOOD BANKING. Opinion n° 19. Mayo 16 de 2004.
- 8) Gluckman E, et al. Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors. *N Eng J Med*. 1997; 337: 373-381.
- 9) JACIE (Joint Accreditation Committee of ISHAGE European and EBMT). Manual de acreditación para la extracción, procesado y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas; 1999.
- 10) NETCORD-FAHCT. International Standards for Cord Blood Collection, Processing, Testing, Banking, Selection and Release; 2002.
- 11) Calderón G, Evaluación del programa nacional de sangre placentaria CordMX: logros y expectativas. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2005; 43 (Supl 1): 127-129.
- 12) Sánchez V, Gómez M., Trasplante de progenitores hematopoyéticos de cordón umbilical, una realidad en adultos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2005; 43 (Supl 1): 131-134.
- 13) Ley General de Salud. México, de:

<http://cenids.insp.mx/leysalud/t01-c01.html>

- 14) Ley General de Salud. México. Leyes y Reformas (1997-2004), de:
<http://www.cddhcu.gob.mx>
- 15) Bautista-Juárez. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. Cinco años de experiencia. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2005; 43 (Supl 1): 123-126.
- 16) The European Group of Ethics in Science and New Technologies to the European Commission. "Aspectos éticos de la investigación y el uso de células madre humanas". Dictamen n° 15. 2003.
- 17) Williams Hematology. Sexta Ed. Mc Graw-Hill. Medical Publishing Division. NY 2001. Caps: 7, 13, 14 140 y 141.
- 18) Ruiz-Argüelles GJ. Fundamentos de Hematología. Editorial Médica Panamericana. México. 1994: 16-24.
- 19) Mayani H, Lansdorp PM. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells.* 1998; 16 (3): 153-165.
- 20) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001; 414: 105-112.
- 21) N. J. Chao, et al. Stem Cell Transplantation (Cord Blood Transplants). *Hematology.* January 1, 2004; 2004 (1): 354-371.
- 22) Belvedere O. et al. Phenotypic Characterization of Immunomagnetically Purified Umbilical Cord Blood CD34+ Cells. *Blood Cells Mol Dis.* 1999; 25 (9): 140-145.
- 23) Ichinohe T. C. et al. Feasibility of HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation between noninherited maternal antigen (NIMA)-mismatched family members linked with long-term fetomaternal microchimerism. *Blood.* 2004; 104 (12): 3821-3828.
- 24) Oh I-H, Lau A, Eaves CJ. During ontogeny primitive (CD34+CD38-) hematopoietic cells show altered expression of a subset of genes associated with early cytokine and differentiation responses of their adult counterparts. *Blood.* 2000; 96 (13): 4160-4168.
- 25) Hansen JA, et al. Treatment of leukemia by marrow transplantation from HLA incompatible donors. Effect of HLA disparity on GVHD, relapse and survival. *Bone Marrow Transpl.* 1990; 6 (Supl. 1): 108-111.
- 26) Huang S, Terstappen LWMM. Lymphoid and Myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells. *Blood.* 1994; 83: 1515-1526.

- 27) Hao Q-LH, et al. A functional Comparison of CD34+CD38- Cells in Cord Blood and Bone Marrow. *Blood*. 1995; 86 (10): 3745-3753.
- 28) Official Poster of the 7th International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, de:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/prow>
- 29) Emerson SG. Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: The next generation of cellular therapeutics. *Blood*. 1996; 87: 3082.
- 30) National Institute of Health. Update on Existing Human Embryonic Stem Cells. 2001, de:
<http://www.nih.gov/news/stemcell/082701list.htm>
- 31) Vernet G. Molecular diagnostics in virology. *J Clin Virol*. 2004; 31: 237-247.
- 32) Mine H, et al. High throughput screening of 16 million serologically negative blood donors for hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type-1 by nucleic acid amplification testing with specific and sensitive multiplex reagent in Japan. *J Virol Methods*. 2003; 112: 145-151.
- 33) Cardoso MS, et al. Mini-pool screening by nucleic amplification for hepatitis B virus, hepatitis C virus and HIV: preliminary results. *Transfusion*. 1998; 38: 905-907.
- 34) Kleinma SH, et al. Comparison of preliminary observed yield of HCV and HIV minipool nucleic acid testing with predictions from the incidence/window period model. *Transfusion*. 2000; 40: 4S (abstract).
- 35) González-Díez R. NAT y seguridad de la transfusión sanguínea. *Gac Méd Méx*. 2004; 140 (Supl. 3): S86-S89.
- 36) Procleix^R UltrioTM Assay. Proceeding Manual. Gen-Probe Incorporated. Chiron Corporation. 2003: 1-25
- 37) <http://www.aidsmap.com>
- 38) Pillonel J, et al. Etablissement français du sang. Trend in risk of transfusion-transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and impact of Nucleic Acid Testing (NAT). *Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France. Institut national de la transfusion sanguine, Paris, France*.
- 39) Lewin B. GENES VIII. Pearson Prentice Hall. Eight Ed. USA. 2004. Chap. 9.
- 40) Marín-López. Del Banco de Sangre a la medicina transfusional. *Gac Méd Méx*. 2002; 138 (Sup 1): 26-28.

- 41) Dood RY, Stramer SL, Notari EP. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion*. 2002; 42: 975-979.
- 42) Assal A, et al. Application de la biologie moléculaire à la sécurité virale transfusionnelle: le dépistage génomique viral. *Transfus Clin Biol*. 2003; 10: 217-226.
- 43) González-Fraile I, Barbolla L. Implantación de técnicas NAT en un centro de transfusión. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2005; 43 (Supl 1): 147-150.
- 44) Seed CR, et al. Assessing the accuracy of the three viral risk models in predicting the outcomes of implementing HIV and HCV NAT donor screening in Australia and the implications for the future HBV NAT. *Transfusion*. 2002; 42: 1365-1372.
- 45) Trejos M, Chacón V. Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) en Banco de Sangre. *Rev. Col. De MQC de Costa Rica*. 2002; 8 (3): 62-68.
- 46) Marshall DA, et al. Cost-effectiveness of nucleic acid test screening of volunteer blood donations for hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus in the United States. *Vox Sang*. 2004; 86: 28-40.
- 47) Shyamala V, et al. Detection and quantitation of HBV DNA in the WHO International Standard for HIV-1 RNA (NIBSC code: 97/656). *J Virol Methods*. 2004; 118: 69-72.
- 48) Busch MP, et al. Risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by blood transfusions before the implementation of HIV-1 antibody screening. The transfusion safety study group. *Transfusion*. 1991; 334: 1685-1690.
- 49) Valentine-Thon E. Quality control in nucleic acid testing – where do we stand?. *J Clin Virol*. 2002; 25: S13-S21.
- 50) Stramer SL, et al. Detection of HIV-1 and HCV Infections among Antibody-Negative Blood Donors by Nucleic Acid-Amplification testing. *N Engl J Med*. 2004; 351: 760-768.
- 51) Jackson BR, Busch MP, Stramer SL, AuBuchon JP. The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV and HBV in whole-blood donations. *Transfusion*. 2003; 43 (6): 721.
- 52) Jackson BR, et al. The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV and HBV in whole-blood donations. *Transfusion*. 2003; 43 (6): 721.
- 53) Lowel C. : MÉTODOS DE LABORATORIO CLÍNICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS. En: Parslow TG, Stites DP. INMUNOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA. 10ª Ed. Manual Moderno. México. 2002: 247-267.

- 54) Roitt I. INMUNOLOGÍA. Salvat Editores. 2ª Ed. México. 25.6-25.7.
- 55) HbsAg Reagent Pack (Kit de Reactivos HbsAg). *Vitros Immunodiagnostic Products*. Ortho-Clinical Diagnostics. Johnson & Johnson. 2003.
- 56) Anti-HIV 1+2 Reagent Pack (Kit de Reactivo Anti-HIV 1+2). *Vitros Immunodiagnostic Products*. Ortho-Clinical Diagnostics. Johnson & Johnson. 2003.
- 57) Anti-HCV Reagent Pack. (Kit de Reactivo Anti-HCV). *Vitros Immunodiagnostic Products*. Ortho-Clinical Diagnostics. Johnson & Johnson. 2003.
- 58) Schreiber GB, et al. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med*. 1996; 334: 1685-1690.
- 59) Roberts MS, Sonnenberg FA, : DECISIÓN MODELING TECHNIQUES. In: Chapman GB, Sonnenberg FA. DECISION MAKING IN HEALTH CARE. THEORY, PSYCHOLOGY, AND APPLICATIONS Cambridge Series on Judgment and decision Making, New Jersey, USA. 2000: 20-64.
- 60) Beth Dawson-Saunders, Robert G. Trapp. BIOESTADÍSTICA MÉDICA. Manual Moderno. 1997. Caps 13-14.
- 61) Hazen GB. Stochastic trees: a new technique for temporal medical decision modeling. *Med Decis Making*. 1992; 12 (3): 163-178.
- 62) McCarthy BD, et al. Who should be screened for HIV infection? A cost-effectiveness analysis. *Arch Inter Med*. 1993; 153 (9): 1107-1116.

IX. Apéndice.

Pasos del procedimiento en el banco de sangre de sangre de cordón umbilical

Apéndice A.

Información al donador

El primer requerimiento es informar a los donadores acerca del programa que se lleva a cabo en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del CNTS, SSA; brindando información general de la donación y la utilidad que se le da a las unidades de sangre de cordón umbilical.

Adicionalmente, personal calificado del CNTS informa a los donadores, de la carta de consentimiento informado (interrogado antes de la primera etapa de parto) y los cuestionarios de seguridad transfusional.

Los cuestionarios antes mencionados incluyen los criterios de exclusión referentes a las madres donadoras y de admisión de la unidad de sangre de cordón umbilical captada en el BSCU.

Una muestra de sangre de la madre es colectada en el momento del parto con el fin llevar a cabo la búsqueda de patologías infecciosas.

Se recomienda la visita a la madre seis semanas después del parto con el objetivo de llevar un seguimiento tanto de la salud de la madre como la del bebé, además de informar a la madre del resultado del análisis realizado para la búsqueda de patologías infecciosas.

Se llevan a cabo pruebas serológicas (del plasma de la madre) como procedimiento de validación de la unidad de sangre de cordón umbilical:

Aglutinación de RPR
HIV-1/2 ELISA
HCV ELISA
HbsAg ELISA

Al plasma de cordón umbilical se le realizan:

Aglutinación de RPR
HIV-1/2 ELISA
HCV ELISA
HbsAg ELISA

Apéndice B.

- I. La sangre de cordón umbilical es colectada únicamente por personal altamente capacitado para dicha actividad.
- II. El sistema colector y materiales utilizados en la colecta de sangre de cordón umbilical están fabricados bajo la normatividad GMP (Buenas Prácticas de Manufactura).
- III. Dicha colecta se realiza cuando en el parto, la placenta se encuentra todavía en el interior del útero, bajo la supervisión del obstetra.
- IV. Después de realizar la colecta, el reporte debe ser completado y seguido por el médico responsable de la colecta, el cual incluye los criterios de inclusión del donador.

Apéndice C

Criterios

I. De inclusión:

- La madre debe tener por lo menos 18 años de edad.
- La carta de consentimiento informado debe estar firmada.
- El parto debe ser atendido en un organismo de salud local.

II. Criterios de exclusión:

- Parto antes de las 34 semanas de gestación.
- Enfermedades autoinmunes en madre.
- Estrés fetal.
- Fiebre por arriba de 38°C durante el parto.
- Anemia en madre.
- Diagnóstico de patología (de acuerdo con la lista de aprobación).
- Patología autoinmune en madre.
- Padecimientos genéticos de órganos linfohematopoyéticos.
- Patologías neoplásicas en primer grado con respecto al recién nacido.
- Pruebas reactivas a HIV, HBV y HCV durante el parto.
- Anormalidades en cuenta de componentes celulares de la sangre.

Apéndice D

Proceso y criopreservación

I. Conteo de células nucleadas.

- II. La unidad de sangre de cordón umbilical debe tener un volumen de por lo menos 80 mL (sin contar el anticoagulante).
- III. Sólo las unidades que contengan 800×10^6 de células nucleadas (realizado por contador automático) son aceptadas para el proceso y criopreservación celular.
- IV. El proceso consta de la unidad de colecta de sangre de cordón umbilical, reducción del volumen (Sepx-Biosafe), obteniendo así una unidad de almacenamiento pequeño, pero con alta celularidad.
- V. Todos y cada uno de los pasos del proceso y almacenamiento tienen trazabilidad debido al uso de etiquetas con un código de barras único para cada unidad.
- VI. La unidad de sangre de cordón umbilical que cumple con todos los parámetros de calidad es criopreservada en un tanque de nitrógeno líquido a bajas temperaturas, bajo inmersión a -196°C .
- VII. El proceso de criopreservación es completado máximo en las primeras 48 horas después de la colecta de sangre de cordón umbilical.
- VIII. Todos los procedimientos están validados y son revisados bajo un estricto control de calidad.

Apéndice E

I. Análisis que se realizan a la sangre de cordón umbilical

- a. Determinación del volumen y concentración de células nucleadas en la unidad de sangre de cordón umbilical.
- b. Después del procedimiento de reducción de volumen de la unidad, se debe cumplir con un total de recuperación de células nucleadas,

determinado después del proceso de la muestra y antes de la criopreservación.

- c. Determinación de la concentración de células CD34⁺ después del proceso de la muestra y antes de la criopreservación.
- d. Tipificación HLA: Tanto HLA clase I (locus A y B) y HLA clase II por medio de técnicas de biología molecular.
- e. Tipificación sanguínea: ABO y Rh.
- f. Búsqueda de microorganismos: Bacteriológico (aerobios y anaerobios) y fúngico.
- g. Pruebas serológicas para la determinación de patologías infecciosas: HbsAg, Anti-VIH, Anti-VHB, Anti-VHC, PRP y Chagas.
- h. Se almacenan tres viales de contenido celular para posteriores estudios de viabilidad de los progenitores celulares.
- i. Se criopreservan por lo menos dos viales que contienen 2×10^6 células nucleadas de sangre de cordón umbilical colectada, con el fin de realizar futuros ensayos inmuno y virológicos.
- j. Se criopreserva por lo menos un mililitro de plasma de sangre de cordón umbilical.
- k. Se almacena un fragmento de aproximadamente 2 cm del cordón umbilical para futuros análisis de ADN.

II. Dos muestras independientes de ADN, del mismo donador, deben estar disponibles para identificar el trasplante.

III. Sangre de la madre:

- a. El plasma de sangre colectada de la madre es utilizada para los ensayos de búsqueda de HbsAg, Anti-VIH, Anti-VHC y Anti-VHB.
- b. Una muestra de plasma de la madre son utilizados para realizar y tipificación HLA.
- c. Del plasma se realiza la búsqueda de marcadores infecciosos.

Apéndice F

Almacenamiento

- a. El almacenamiento es realizado por un sistema de bioarchivo (Thermogenesis) el cual es empleado para congelar la unidad de sangre de cordón umbilical, dando a ésta una posición única y fácil localización almacenamiento.
- b. El almacenamiento de la unidad de sangre de cordón umbilical y muestras se realiza a -196°C (temperatura alcanzada por el uso de nitrógeno líquido).

Apéndice G

Validación y controles de calidad

El método de validación del proceso, es la determinación de:

Cuenta total de células nucleadas.

Total de leucocitos.

Total de mononucleares.

Total de células CD34⁺.

Total de células progenitoras:

Se realiza en el *Stem Cell Technology Medium* (Methocult H4434)

Todas las unidades de sangre de cordón umbilical requieren como requisito de aceptación el 60% de recuperación de células nucleadas después de extraer dicha unidad de la cámara de criopreservación, es decir antes de ser utilizadas en un trasplante.

Apéndice H.

Marcador viral	Prevalencia (1999-2004) CNTS, SSA.
VIH-1	0.2748
VHC	0.6931
VHB	0.4046

Apéndice I.

Modelo de toma de decisión

El análisis de decisión empleado en este protocolo se describe por medio del teorema de Bayes, por medio de las siguientes formulas para el cálculo de las probabilidades de cada una de las ramas del árbol de decisión, a la cual se le asigna la utilidad o utilidades deseadas. ^(55, 56, 57, 58)

Las formulas son:

$$pPos = (pV \times SENS) + (1-pV) \times (1-SPEC)$$

$$pNeg = 1-pPos$$

$$pV^+/T^+ = (pV \times SENS) / (pV \times SENS) + (1-pV) \times (1-SPEC)$$

$$pV^+/T^- = 1-pV^-/T^-$$

$$pV^-/T^+ = 1-pV^+/T^+$$

$$pV^-/T^- = (1-pV) \times SPEC / SPEC \times (1-pV) + (1-SENS) \times pV;$$

Donde SENS es la sensibilidad y SPEC es la especificidad de la prueba de **Procleix^R UltrioTM** y pV es la prevalencia de cada uno de los virus: VIH-1, VHC y VHB; reportados en el CNTS, SSA.

Apéndice J.

Resumen de los criterios de validación para el ensayo Procleix^R UltrioTM

Criterios de validación:

Calibrador negativo

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Calibrador positivo VIH-1

Analito ≥ 300.000 y $\leq 1.800.000$ RLU

Control Interno ≤ 45.000 RLU

Calibrador positivo HCV

Analito ≥ 200.000 y $\leq 1.000.000$ RLU

Control Interno ≤ 475.000 RLU

Calibrador positivo VHB

Analito ≥ 300.000 y $\leq 1.000.000$ RLU

Control Interno ≤ 475.000 RLU

Resumen de los cálculos de valor de corte para el ensayo Procleix^R UltrioTM

Valor de corte del analito = RLU media analito NC

+ 0.02 x (RLU media analito VIH-1 PC)

+ 0.04 x (RLU media analito VHC PC)

+ 0.02 x (RLU media analito VHB PC)

Valor de corte del control interno = 0.5 x (RLU media del calibrador negativo)

Criterios de validación: ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VIH-1

Criterios de validación:

Calibrador negativo

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Calibrador positivo VIH-1

Analito ≥ 300.000 y $\leq 1.800.000$ RLU

Control Interno ≤ 45.000 RLU

Calibrador positivo HCV y Calibrador positivo VHB

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Resumen de los cálculos de valor de corte para el ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VIH-1

Valor de corte del analito =

$$\text{RLU media analito NC} + 0.04 \times (\text{RLU media analito VIH-1 PC})$$

Valor de corte del control interno = $0.5 \times (\text{RLU media IC calibrador negativo})$

Resumen de los criterios de validación para el ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VHC

Criterios de validación:

Calibrador negativo

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Calibrador positivo VHC

Analito ≥ 400.000 y $\leq 2.700.000$ RLU

Control Interno ≤ 475.000 RLU

Calibrador positivo VIH-1 y Calibrador positivo VHB

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Resumen de los cálculos de valor de corte para el ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VHC

Valor de corte del analito =

$$\text{RLU media analito NC} + 0.04 \times (\text{RLU media analito VHC PC})$$

Valor de corte del control interno = $0.5 \times (\text{RLU media IC calibrador negativo})$

Resumen de los criterios de validación para el ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VHB

Criterios de validación:

Calibrador negativo

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Calibrador positivo VHB

Analito ≥ 300.000 y $\leq 1.800.000$ RLU

Control Interno ≤ 45.000 RLU

Calibrador positivo VIH-1 y Calibrador positivo VHC

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Resumen de los cálculos de valor de corte para el ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VIH-1

Valor de corte del analito =

$$\text{RLU media analito NC} + 0.04 \times (\text{RLU media analito VHB PC})$$

Valor de corte del control interno = $0.5 \times (\text{RLU media IC calibrador negativo})$

Interpretación de los resultados del ensayo Procleix^R UltrioTM

Todos los cálculos descritos se realizan mediante el programa del luminómetro. Existen dos valores de corte: señal glower (analito) y señal flasher (control interno). Se determina un valor de RLU de las señales del analito y una señal de RLU del control

interno. El cociente entre el RLU del analito y el valor de corte del analito se expresa en el informe como Señal/Valor de corte (S/CO) del analito.

Cuando S/CO es < 1 , la señal del CI debe ser mayor o igual al valor de corte del CI para que el resultado sea válido. En este caso, el resultado del CI será informado como válido y la muestra será informada como no reactiva. Cuando S/CO es < 1 y la señal del CI es menor que la señal de valor de corte del CI, el resultado del CI será informado como inválido y el resultado de la muestra como inválido.

IX. Apéndice.

Pasos del procedimiento en el banco de sangre de sangre de cordón umbilical

Apéndice A.

Información al donador

El primer requerimiento es informar a los donadores acerca del programa que se lleva a cabo en el Banco de Sangre de Cordón Umbilical del CNTS, SSA; brindando información general de la donación y la utilidad que se le da a las unidades de sangre de cordón umbilical.

Adicionalmente, personal calificado del CNTS informa a los donadores, de la carta de consentimiento informado (interrogado antes de la primera etapa de parto) y los cuestionarios de seguridad transfusional.

Los cuestionarios antes mencionados incluyen los criterios de exclusión referentes a las madres donadoras y de admisión de la unidad de sangre de cordón umbilical captada en el BSCU.

Una muestra de sangre de la madre es colectada en el momento del parto con el fin llevar a cabo la búsqueda de patologías infecciosas.

Se recomienda la visita a la madre seis semanas después del parto con el objetivo de llevar un seguimiento tanto de la salud de la madre como la del bebé, además de informar a la madre del resultado del análisis realizado para la búsqueda de patologías infecciosas.

Se llevan a cabo pruebas serológicas (del plasma de la madre) como procedimiento de validación de la unidad de sangre de cordón umbilical:

Aglutinación de RPR
HIV-1/2 ELISA
HCV ELISA
HbsAg ELISA

Al plasma de cordón umbilical se le realizan:

Aglutinación de RPR
HIV-1/2 ELISA
HCV ELISA
HbsAg ELISA

Apéndice B.

- I. La sangre de cordón umbilical es colectada únicamente por personal altamente capacitado para dicha actividad.
- II. El sistema colector y materiales utilizados en la colecta de sangre de cordón umbilical están fabricados bajo la normatividad GMP (Buenas Prácticas de Manufactura).
- III. Dicha colecta se realiza cuando en el parto, la placenta se encuentra todavía en el interior del útero, bajo la supervisión del obstetra.
- IV. Después de realizar la colecta, el reporte debe ser completado y seguido por el médico responsable de la colecta, el cual incluye los criterios de inclusión del donador.

Apéndice C

Criterios

I. De inclusión:

- La madre debe tener por lo menos 18 años de edad.
- La carta de consentimiento informado debe estar firmada.
- El parto debe ser atendido en un organismo de salud local.

II. Criterios de exclusión:

- Parto antes de las 34 semanas de gestación.
- Enfermedades autoinmunes en madre.
- Estrés fetal.
- Fiebre por arriba de 38°C durante el parto.
- Anemia en madre.
- Diagnóstico de patología (de acuerdo con la lista de aprobación).
- Patología autoinmune en madre.
- Padecimientos genéticos de órganos linfohematopoyéticos.
- Patologías neoplásicas en primer grado con respecto al recién nacido.
- Pruebas reactivas a HIV, HBV y HCV durante el parto.
- Anormalidades en cuenta de componentes celulares de la sangre.

Apéndice D

Proceso y criopreservación

I. Conteo de células nucleadas.

- II. La unidad de sangre de cordón umbilical debe tener un volumen de por lo menos 80 mL (sin contar el anticoagulante).
- III. Sólo las unidades que contengan 800×10^6 de células nucleadas (realizado por contador automático) son aceptadas para el proceso y criopreservación celular.
- IV. El proceso consta de la unidad de colecta de sangre de cordón umbilical, reducción del volumen (Sepx-Biosafe), obteniendo así una unidad de almacenamiento pequeño, pero con alta celularidad.
- V. Todos y cada uno de los pasos del proceso y almacenamiento tienen trazabilidad debido al uso de etiquetas con un código de barras único para cada unidad.
- VI. La unidad de sangre de cordón umbilical que cumple con todos los parámetros de calidad es criopreservada en un tanque de nitrógeno líquido a bajas temperaturas, bajo inmersión a -196°C .
- VII. El proceso de criopreservación es completado máximo en las primeras 48 horas después de la colecta de sangre de cordón umbilical.
- VIII. Todos los procedimientos están validados y son revisados bajo un estricto control de calidad.

Apéndice E

I. Análisis que se realizan a la sangre de cordón umbilical

- a. Determinación del volumen y concentración de células nucleadas en la unidad de sangre de cordón umbilical.
- b. Después del procedimiento de reducción de volumen de la unidad, se debe cumplir con un total de recuperación de células nucleadas,

determinado después del proceso de la muestra y antes de la criopreservación.

- c. Determinación de la concentración de células CD34⁺ después del proceso de la muestra y antes de la criopreservación.
- d. Tipificación HLA: Tanto HLA clase I (locus A y B) y HLA clase II por medio de técnicas de biología molecular.
- e. Tipificación sanguínea: ABO y Rh.
- f. Búsqueda de microorganismos: Bacteriológico (aerobios y anaerobios) y fúngico.
- g. Pruebas serológicas para la determinación de patologías infecciosas: HbsAg, Anti-VIH, Anti-VHB, Anti-VHC, PRP y Chagas.
- h. Se almacenan tres viales de contenido celular para posteriores estudios de viabilidad de los progenitores celulares.
- i. Se criopreservan por lo menos dos viales que contienen 2×10^6 células nucleadas de sangre de cordón umbilical colectada, con el fin de realizar futuros ensayos inmuno y virológicos.
- j. Se criopreserva por lo menos un mililitro de plasma de sangre de cordón umbilical.
- k. Se almacena un fragmento de aproximadamente 2 cm del cordón umbilical para futuros análisis de ADN.

II. Dos muestras independientes de ADN, del mismo donador, deben estar disponibles para identificar el trasplante.

III. Sangre de la madre:

- a. El plasma de sangre colectada de la madre es utilizada para los ensayos de búsqueda de HbsAg, Anti-VIH, Anti-VHC y Anti-VHB.
- b. Una muestra de plasma de la madre son utilizados para realizar y tipificación HLA.
- c. Del plasma se realiza la búsqueda de marcadores infecciosos.

Apéndice F

Almacenamiento

- a. El almacenamiento es realizado por un sistema de bioarchivo (Thermogenesis) el cual es empleado para congelar la unidad de sangre de cordón umbilical, dando a ésta una posición única y fácil localización almacenamiento.
- b. El almacenamiento de la unidad de sangre de cordón umbilical y muestras se realiza a -196°C (temperatura alcanzada por el uso de nitrógeno líquido).

Apéndice G

Validación y controles de calidad

El método de validación del proceso, es la determinación de:

Cuenta total de células nucleadas.

Total de leucocitos.

Total de mononucleares.

Total de células CD34⁺.

Total de células progenitoras:

Se realiza en el *Stem Cell Technology Medium* (Methocult H4434)

Todas las unidades de sangre de cordón umbilical requieren como requisito de aceptación el 60% de recuperación de células nucleadas después de extraer dicha unidad de la cámara de criopreservación, es decir antes de ser utilizadas en un trasplante.

Apéndice H.

Marcador viral	Prevalencia (1999-2004) CNTS, SSA.
VIH-1	0.2748
VHC	0.6931
VHB	0.4046

Apéndice I.

Modelo de toma de decisión

El análisis de decisión empleado en este protocolo se describe por medio del teorema de Bayes, por medio de las siguientes formulas para el cálculo de las probabilidades de cada una de las ramas del árbol de decisión, a la cual se le asigna la utilidad o utilidades deseadas. ^(55, 56, 57, 58)

Las formulas son:

$$pPos = (pV \times SENS) + (1-pV) \times (1-SPEC)$$

$$pNeg = 1-pPos$$

$$pV^+/T^+ = (pV \times SENS) / (pV \times SENS) + (1-pV) \times (1-SPEC)$$

$$pV^+/T^- = 1-pV^-/T^-$$

$$pV^-/T^+ = 1-pV^+/T^+$$

$$pV^-/T^- = (1-pV) \times SPEC / SPEC \times (1-pV) + (1-SENS) \times pV;$$

Donde SENS es la sensibilidad y SPEC es la especificidad de la prueba de **Procleix^R UltrioTM** y pV es la prevalencia de cada uno de los virus: VIH-1, VHC y VHB; reportados en el CNTS, SSA.

Apéndice J.

Resumen de los criterios de validación para el ensayo Procleix^R UltrioTM

Criterios de validación:

Calibrador negativo

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Calibrador positivo VIH-1

Analito ≥ 300.000 y $\leq 1.800.000$ RLU

Control Interno ≤ 45.000 RLU

Calibrador positivo HCV

Analito ≥ 200.000 y $\leq 1.000.000$ RLU

Control Interno ≤ 475.000 RLU

Calibrador positivo VHB

Analito ≥ 300.000 y $\leq 1.000.000$ RLU

Control Interno ≤ 475.000 RLU

Resumen de los cálculos de valor de corte para el ensayo Procleix^R UltrioTM

Valor de corte del analito = RLU media analito NC

+ 0.02 x (RLU media analito VIH-1 PC)

+ 0.04 x (RLU media analito VHC PC)

+ 0.02 x (RLU media analito VHB PC)

Valor de corte del control interno = 0.5 x (RLU media del calibrador negativo)

Criterios de validación: ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VIH-1

Criterios de validación:

Calibrador negativo

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Calibrador positivo VIH-1

Analito ≥ 300.000 y $\leq 1.800.000$ RLU

Control Interno ≤ 45.000 RLU

Calibrador positivo HCV y Calibrador positivo VHB

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Resumen de los cálculos de valor de corte para el ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VIH-1

Valor de corte del analito =

$$\text{RLU media analito NC} + 0.04 \times (\text{RLU media analito VIH-1 PC})$$

Valor de corte del control interno = $0.5 \times (\text{RLU media IC calibrador negativo})$

Resumen de los criterios de validación para el ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VHC

Criterios de validación:

Calibrador negativo

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Calibrador positivo VHC

Analito ≥ 400.000 y $\leq 2.700.000$ RLU

Control Interno ≤ 475.000 RLU

Calibrador positivo VIH-1 y Calibrador positivo VHB

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Resumen de los cálculos de valor de corte para el ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VHC

Valor de corte del analito =

$$\text{RLU media analito NC} + 0.04 \times (\text{RLU media analito VHC PC})$$

Valor de corte del control interno = $0.5 \times (\text{RLU media IC calibrador negativo})$

Resumen de los criterios de validación para el ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VHB

Criterios de validación:

Calibrador negativo

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Calibrador positivo VHB

Analito ≥ 300.000 y $\leq 1.800.000$ RLU

Control Interno ≤ 45.000 RLU

Calibrador positivo VIH-1 y Calibrador positivo VHC

Analito ≥ 0 y ≤ 45.000 RLU

Control Interno ≥ 75.000 y ≤ 375.000 RLU

Resumen de los cálculos de valor de corte para el ensayo discriminatorio Procleix^R UltrioTM VIH-1

Valor de corte del analito =

$$\text{RLU media analito NC} + 0.04 \times (\text{RLU media analito VHB PC})$$

Valor de corte del control interno = $0.5 \times (\text{RLU media IC calibrador negativo})$

Interpretación de los resultados del ensayo Procleix^R UltrioTM

Todos los cálculos descritos se realizan mediante el programa del luminómetro. Existen dos valores de corte: señal glower (analito) y señal flasher (control interno). Se determina un valor de RLU de las señales del analito y una señal de RLU del control

interno. El cociente entre el RLU del analito y el valor de corte del analito se expresa en el informe como Señal/Valor de corte (S/CO) del analito.

Cuando S/CO es < 1 , la señal del CI debe ser mayor o igual al valor de corte del CI para que el resultado sea válido. En este caso, el resultado del CI será informado como válido y la muestra será informada como no reactiva. Cuando S/CO es < 1 y la señal del CI es menor que la señal de valor de corte del CI, el resultado del CI será informado como inválido y el resultado de la muestra como inválido.