

## Embarazo y transfusión y su asociación con aloanticuerpos inesperados de significancia clínica contra antígenos eritrocitarios

Víctor Hugo Dueñas R., Bact., M.Sc.<sup>1</sup>, Armando Cortés B., M.D.<sup>2</sup>, Pedro Rovetto, M.D.<sup>3</sup>, Paola Andrea Neuta A.<sup>4</sup>

### RESUMEN

Se presenta la incidencia de anticuerpos inesperados con significado clínico en 45,127 donantes de sangre y su relación con antecedentes de transfusión sanguínea y embarazo. Los donantes con anticuerpos inesperados fueron 177 (0.39%), 118 mujeres y 59 hombres donde se identificaron 73 anticuerpos con significado clínico, 82 anticuerpos sin significado clínico y 31 casos que no se identificaron con la técnica usada. Se encontraron anticuerpos inesperados con significado clínico (AISC) con más frecuencia en mujeres que en hombres en una relación de 6:1. El embarazo fue el suceso que más se asoció con la presencia de estos anticuerpos (78.1%), mientras que sólo 4.1% se relacionaban con transfusión y en 17.8% de los casos no se encontró asociación con ninguno de los antecedentes mencionados. El estudio reveló que al considerar la población general hay diferencias significativas estadísticamente entre embarazo y transfusión en cuanto a la eficiencia como eventos inmunizantes (0.4% vs. 0.9%), que se refleja en la incidencia de AISC por transfusión en hombres (0.6%)  $p < 0.05$  y el aumento significativo cuando la transfusión se asocia con embarazo (1.5%). El hallazgo frecuente de anticuerpos anti-D en mujeres Rh negativas en edad reproductiva establece una relación con el inadecuado nivel de profilaxis con anti-Rh; de igual manera alerta sobre el hallazgo de anticuerpos anti-E, anti-C y anti-K, todos asociados con la etiopatogenia de la enfermedad hemolítica del recién nacido y asociados en este estudio con sensibilización por embarazo. También se refleja la vulnerabilidad de la historia de embarazos y transfusión para presumir la ausencia de AISC.

Palabras claves: Embarazo. Transfusión sanguínea. Aloanticuerpos. Donantes de sangre.

Los anticuerpos inesperados son anticuerpos dirigidos contra antígenos eritrocitarios diferentes a los del sistema ABH. Tales anticuerpos pueden ser autoanticuerpos, es decir, se forman como respuesta a un antígeno propio, o aloanticuerpos, que se forman como respuesta a la exposición de hemáties que poseen el antígeno, fundamentalmente a través de embarazos y transfusiones.

La incidencia de anticuerpos inesperados es variable<sup>1,2</sup>, puede ser cero en quienes no se han expuesto nunca a una transfusión o a un embarazo y alta en quienes han recibido múltiples transfusiones o en múltiparas. En Colombia no

existen publicaciones orientadas a determinar la incidencia de estos anticuerpos en la población general ni la intervención de las transfusiones y embarazos en su aparición.

Los anticuerpos naturales anti-A y anti-B son los aloanticuerpos más importantes en la transfusión sanguínea, debido a que están más comúnmente comprometidos en reacciones transfusionales hemolíticas fatales. Los anticuerpos del sistema Rh son los que siguen en importancia, pues aparecen en más de la mitad de las reacciones hemolíticas transfusionales por anticuerpos diferentes de anti-A y anti-B<sup>3</sup>. La frecuencia en la que los

diferentes aloanticuerpos se asocian con reacciones hemolíticas transfusionales es semejante a las frecuencias con que los mismos aloanticuerpos se encuentran en los receptores de transfusión. Así, pues, es importante un acercamiento a la incidencia de aloanticuerpos contra antígenos eritrocitarios en la población, para establecer la posibilidad o riesgo de reacciones transfusionales hemolíticas asociadas con la transfusión, sobre todo cuando se omiten, modifican o no se realizan de modo apropiado las pruebas pretransfusionales pertinentes en las diversas situaciones clínicas. Se hace necesario también determinar la especificidad y frecuencia de los anticuerpos inesperados que se pueden encontrar y su importancia clínica para definir cambios operativos y modificaciones tecnológicas en la

1. Profesor Asociado, Escuela de Bacteriología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.
2. Profesor Titular, Departamento de Patología, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Director Banco de Sangre, Cruz Roja Colombiana, Seccional Valle, Cali.
3. Director Banco de Sangre, Hospital Universitario del Valle, Cali.
4. Estudiante de Bacteriología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.

práctica rutinaria de los bancos de sangre y de la hemoterapia.

El objeto de este estudio es determinar la incidencia y especificidad de anticuerpos inesperados en una muestra de población y establecer su relación con la historia de embarazos y transfusiones.

### MATERIALES Y MÉTODOS

En 45,127 individuos que se aceptaron como donantes en el banco de sangre del Hospital Universitario del Valle (HUV) en Cali, Colombia, entre agosto, 1995 y julio, 1998, se investigó la presencia de anticuerpos inesperados contra antígenos eritrocitarios y su relación con la historia de transfusiones sanguíneas y embarazos.

Al seleccionar los donantes se les interroga acerca de enfermedades previas, condiciones médicas, hábitos y comportamientos de riesgo que impidan la donación. Los donantes deben reunir los siguientes criterios: peso corporal mayor de 50 kg, edad entre 18-65 años, nivel de hemoglobina superior a 12.5 g/dl, buen estado general de salud, y no tener historia de enfermedades transmisibles por transfusión.

La historia de embarazos y transfusiones se obtuvo retrospectivamente al revisar los formatos de entrevista de los donantes seleccionados. En este formato se interroga al donante sobre si ha sido transfundido en el último año o en cualquier período de su vida; en el caso de mujeres, sobre la historia de embarazos y abortos. El presente estudio excluye todos los donantes que se descartaron por haber sido transfundidos en el último año y las mujeres con embarazos o partos en las últimas seis semanas. El banco de sangre del HUV excluye a 27.6% de los donantes potenciales. Los embarazos y la historia de transfusión reciente representan 0.3% y

0.07% de las causas por las que se excluyen los donantes, respectivamente.

La determinación de anticuerpos inesperados y su identificación se realizaron prospectivamente en muestras de suero, mediante la prueba de la antiglobulina indirecta, con albúmina bovina al 22% ó 30% y suero antiglobulina humano poliespecífico (actividad anti-IgG+C3d).

Para determinar los anticuerpos inesperados se utilizaron células eritrocitarias I y II de fenotipo conocido (Panoscreen® I y II, Immucor Inc.). Los sueros que se consideraron positivos, se investigaron a fin de determinar la especificidad de los anticuerpos con un panel de 16 células de fenotipo conocido (Panocell®, Immucor Inc.). La interpretación de los resultados se hizo de acuerdo con los criterios establecidos por la casa comercial (Immucor Inc.) y según las recomendaciones de la Asociación Americana de Bancos de Sangre<sup>1</sup>.

El significado clínico de los anticuerpos se determinó por su comportamiento serológico y su asociación histórica con reacción transfusional hemolítica y/o con enfermedad hemolítica del recién nacido.

### RESULTADOS

La distribución por sexo de los

45,127 donantes investigados fue la siguiente: 27,302 (60.5%) hombres y 17,825 (39.5%) mujeres; 8.3% de los donantes eran Rh negativos. Los donantes con antecedentes de transfusiones fueron 1,064 (2.4%), distribuidos en 618 (2.3%) hombres y 446 (2.5%) mujeres. Las mujeres con antecedentes de embarazos fueron 14,188 (79.6%), de las cuales 397 (2.2%) presentaron además antecedentes de transfusiones (Cuadro 1).

La población total de donantes en estudio por grupos de edad aparece en el Cuadro 2.

Resultaron positivos para anticuerpos inesperados 177 (0.4%) donantes; se identificó la especificidad de los anticuerpos en 146, y hubo 137 donantes con un solo anticuerpo y 9 con mezclas de dos anticuerpos. En 31 donantes positivos para anticuerpos inesperados la especificidad de los anticuerpos no se determinó por el método utilizado. De ellos, 15 tenían panaglutininas inespecíficas y 16 mezclas de dos o más anticuerpos de reactividad aislada o combinada.

De los 73 donantes con AISC, 59 fueron mujeres y 14 hombres, lo que corresponde a 0.3% y 0.05% del total respectivamente; 10 donantes con AISC (6 mujeres y 4 hombres) tenían antecedentes de transfusiones, lo que corresponde a una incidencia

**Cuadro 1**  
**Sexo, Antecedentes de Transfusiones y de Embarazos en la Población Total de Donantes Estudiados y con Anticuerpos Inesperados**

Variables	Población total		Población con AISC*	
	Frecuencia	%	Frecuencia	Incidencia %
Hombres	27,302	60.5	13	0.04
Mujeres	17,825	39.5	62	0.35
Con antecedentes de transfusión	1,064	2.4	4	0.37
Hombres con antecedentes de transfusión	618	2.3	4	0.62
Mujeres con antecedentes sólo de transfusión	446	2.5	0	0.0
Mujeres con antecedentes sólo de embarazos	13,791	77.4	56	0.40
Mujeres con antecedentes de transfusión y de embarazos	397	2.2	6	1.5

\* Anticuerpos inesperados con significancia clínica

**Cuadro 2**  
Distribución del Total de Donantes y con AISC\* por Sexo y Edad

Edad (años)	Población donantes mujeres			Población donantes hombres		
	Total	Con AISC	Incidencia %	Total	Con AISC	Incidencia %
18-28	6,534	15	0.23	11,523	5	0.04
29-39	6,997	27	0.39	9,980	4	0.04
40-50	3,509	11	0.31	4,511	4	0.09
51-60	715	6	0.84	1,127	1	0.09
61-65	70	0		161	0	
Total	17,825	59	0.33	27,302	14	0.05

\* Anticuerpos inesperados con significancia clínica

de 0.9% con respecto al total de donantes AISC con antecedentes de transfusiones y 0% y 0.6% del total de mujeres y hombres con antecedentes sólo de transfusiones, respectivamente (Cuadro 1).

De las 59 mujeres con AISC, 52 tenían historia de embarazos, lo que correspondió a 0.4% del total de mujeres con ese antecedente únicamente; mientras que otras 6 al mismo tiempo informaron embarazos y transfusiones, es decir, 1.5% del total de mujeres que daban ambos antecedentes (Cuadro 1).

Los anticuerpos clínicamente significativos encontrados se distribuyeron por grupos de edad y sexo. La incidencia de anticuerpos clínicamente importantes fue significativa-

mente mayor en mujeres (0.3%), en comparación con la encontrada en hombres (0.05%).

Los anticuerpos identificados ( $p < 0.05$ ) con significado clínico de mayor a menor frecuencia se describen en el Cuadro 3.

Los anticuerpos identificados ( $p < 0.05$ ) sin significado clínico, de mayor a menor frecuencia fueron: 75 anti-Lea (40.3%), de los cuales 29 casos se identificaron en hombres y 46 en mujeres; 5 anti-Leb (2.7%), identificados 2 en hombres y 3 en mujeres y 2 anti-P1 (1.1%) ambos casos en mujeres.

Ninguno de los 29 hombres a los que se les identificó anti-Lea tenía antecedentes de transfusiones y en sólo 3 mujeres de las 46, se encontraron antecedentes de transfusiones y de embarazos. Todas las mujeres a las que se les identificó anticuerpos anti-D, tenían antecedentes de embarazos y 3 de ellas daban al mismo tiempo historia de transfusiones; en el caso de los hombres, 2 de los 5 tenían antecedentes de transfusiones. Para el anticuerpo anti-E, las 9 mujeres en quienes se encontró, habían tenido embarazos previos y 2 de ellas daban al mismo tiempo antecedente de transfusiones; los 4 hombres en los que se encontró este anticuerpo no tenían antecedentes de transfusiones. Un solo hombre de los 4 en los que se identificó anti-K tuvo antecedentes de transfusiones y 3 de las 5 mujeres

en las que se identificó este anticuerpo tenían antecedentes de embarazos, en las otras 2 no había antecedentes de transfusiones ni de embarazos. Las 6 mujeres en las que se identificó anti-C tenían historia de embarazos.

## DISCUSIÓN

Los AISC se encuentran con más frecuencia en mujeres que en hombres en una relación de 6:1. El embarazo es el suceso más comprometido en la aparición de estos anticuerpos, lo que explica que se hayan descubierto 78.1% de AISC. Sin embargo, si se considera la población general, no hay diferencias estadísticas significativas entre embarazo y transfusión en la eficiencia de aloinmunización; con todo, es más significativa la transfusión como proceso inmunizante en hombres y en las mujeres que además tenían antecedentes de embarazo.

Por dos motivos el embarazo constituye un menor estímulo antigénico que las transfusiones: primero, el número de antígenos extraños es limitado a los que posea el padre del feto (pero se debe recordar que algunas madres tienen hijos de diferentes padres) y segundo, en muchos embarazos el volumen de transferencia de glóbulos rojos fetales a la madre es escaso para estimular la respuesta inmune. Además, cuando el antígeno comprometido es de baja frecuencia la oportunidad de hacer un anticuerpo es mucho más baja para embarazo que para transfusión de sangre, si se supone que la mujer tiene un solo compañero sexual y que la transfusión compromete muchos donantes<sup>4</sup>.

Los casos de AISC encontrados sin sucesos inmunizantes aparentes se podrían explicar por las limi-

**Cuadro 3**  
Frecuencia de Anticuerpos Inesperados con Significado Clínico Identificados en Donantes Distribuidos por Sexo

Anticuerpos	Frecuencia en		Total (%)
	Hombres	Mujeres	
Anti-D	5	36	41 22.1
Anti-E <sup>a</sup>	4	9	13 7.0
Anti-K	4	5	9 4.8
Anti-C <sup>b</sup>	0	6	6 3.2
Anti-M <sup>c</sup>	0	2	2 1.1
Anti-s	1	0	1 0.5
Anti-k (Cellano)	0	1	1 0.5

- Se encontró mezclado en un caso con anti-D y en otro con anti-Lea.
- En todos los casos se encontró mezclado con anti-D.
- Pocas veces se ha asociado con reacción transfusional hemolítica y con enfermedad hemolítica del recién nacido.

taciones de la entrevista, al interrogar sobre antecedentes transfusionales en etapas tempranas de la vida y el sesgo de información sobre abortos ocultos o insospechados. Sin embargo, se considera que existen anticuerpos que aparecen naturalmente en algunos individuos. Estos anticuerpos naturales pueden ser inducidos por antígenos o aparecer de manera espontánea, ya sea, como respuesta a sustancias en el ambiente que contienen antígenos similares a los aloantígenos de glóbulos rojos, incluyendo bacterias<sup>5,6</sup>; además, en todos los individuos que carezcan del antígeno respectivo en sus glóbulos rojos por ejemplo, anti-Lea y P1 o generados sin intervención de antígenos<sup>7</sup> dentro de los cuales se encuentran algunos del sistema Rh como anti-E, -C e incluso anti-D y anti-K, -Lea, -Leb. Es también común encontrar en pacientes con anemias hemolíticas autoinmunes anticuerpos contra antígenos de baja incidencia sin una clara exposición<sup>8</sup>.

Casi todos los anticuerpos de ocurrencia natural son IgM y raras veces tienen actividad IgG. Los casos extraordinarios de anti-E y anti-D han sido con actividad IgG; este último se manifiesta como crioanticuerpo en 0.1% a 0.3% de donantes D negativos<sup>9</sup>. Sin embargo, es raro que los anticuerpos demostrables a 37° C en la prueba indirecta de Coombs, como sucedió en este estudio, se encuentren en sujetos previamente no inmunizados<sup>10</sup>.

El anti-E puede aparecer con relativa frecuencia en pacientes no transfundidos o en embarazadas<sup>11</sup>. El anti-K de ocurrencia natural es raro, y se asocia con la presencia de algunas infecciones por *Escherichia coli*, lesiones sugestivas de TBC o por microorganismos no identificados<sup>12-15</sup>, así como en ciertas entidades atribuidas a *Campylobacter jejuni* y *C. coli*, agentes

principales de varias enfermedades gastrointestinales en seres humanos<sup>16</sup>.

La probabilidad de encontrar AISC en donantes masculinos que informan no tener historia de transfusiones es de 4 por cada 10,000, mientras que en mujeres sin este antecedente, embarazos o abortos es de 6 por cada 10,000. De tal forma que si se omite el rastreo de anticuerpos inesperados en donantes sin historia de transfusiones y embarazos y no se realiza la prueba cruzada menor, el riesgo de transfundir pasivamente AISC es relativamente bajo (4 por cada 10,000).

La probabilidad de encontrar AISC en donantes con antecedentes de transfusiones es de 13 por cada 1,000, mientras que la probabilidad de encontrarlos en mujeres con historia de embarazos o abortos es de 4 por cada 1,000.

La historia de transfusión predice con mayor acierto la posibilidad encontrar AISC unas 3 veces más que en embarazos. En una publicación reciente<sup>17</sup> se calculó que la frecuencia de inmunizaciones primarias postransfusión es 3.3%.

En el estudio que se comenta en este artículo, la edad de los donantes pudo influir en la posibilidad de encontrar AISC sólo en hombres, pues fue 2.5 veces más común en mayores de 40 años.

En donantes sanos, la frecuencia de anti-D en este estudio fue bastante alta, 2.5%; y preocupa aún más cuando se vio junto con la sensibilización por embarazo, lo que indica un inadecuado nivel de profilaxis en las mujeres Rho negativas de Cali, pues se calculó en 1 por cada 40 mujeres, la mayoría en edad reproductiva. Se nota aún más el impacto de esta situación al comparar los datos de este trabajo con los de mujeres embarazadas en EE.UU. antes de la introducción de inmunoprofilaxis, pues el anti D

aparecía en 1 de cada 170 mujeres<sup>18</sup> y después de la inmunoprofilaxis en 1960 la frecuencia ha caído progresivamente hasta llegar a 1 por cada 1,600 en 1993<sup>19</sup>.

En pruebas pretransfusionales de posibles receptores de transfusión la incidencia de anti-D fue 0.3% entre 1982 y 1987<sup>20</sup>; en Colombia en el estudio de Zúñiga *et al.*<sup>21</sup>, la incidencia de anti-D fue 0.4%, que correspondió también a 8.2% como tasa de sensibilización por anti-D, cifra muy alta en individuos Rh negativos.

Se alerta sobre la incidencia y riesgo de anti-E, anti-C y anti-K, anticuerpos asociados en este estudio con sensibilización por embarazo y que históricamente están comprometidos con la etiología de la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN). Se debe tener una consideración especial con el anti-K que en los países con programas efectivos de inmunoprofilaxis Rho, es el anticuerpo más común en la EHRN, debido al aumento de personas politransfundidas y a la ausencia de medidas para prevenir la aloinmunización contra antígenos diferentes al D.

La incidencia de EHRN por anti-K es cerca de 1/40,000 nacimientos. La EHRN es más severa en estos casos, aunque la madre no haya tenido un feto afectado antes<sup>22</sup>. La anemia fetal se debe en parte a la supresión de hematopoyesis y también de trombopoyesis, porque los antígenos Kell se hallan en los eritroblastos desde muy temprano.

Se deben considerar algunas limitaciones de este estudio en los aspectos que se relacionan con la incidencia e implicaciones sobre todo al intentar aplicar los resultados a poblaciones distintas, p.e., el alto número de anticuerpos sin significado clínico que se encontró, se puede atribuir a la técnica seguida. Encontrar anti-

cuerpos sin significado clínico ocasiona retardo innecesario de la transfusión y aumento de los costos. Se sugiere el uso de otras técnicas que garanticen poca probabilidad de encontrar anticuerpos sin significado clínico cuando se realice el rastreo e identificación de anticuerpos inesperados en donantes y receptores de sangre.

La frecuencia de anticuerpos del tipo IgM se puede haber subestimado porque su concentración tiende a declinar con rapidez luego del último estímulo y por lo general no son demostrables 1 a 2 años más tarde; además, pasan desapercibidos al excluir los donantes con historia de transfusión o embarazo reciente<sup>23</sup>. La frecuencia de aloanticuerpos en donantes se espera que sea relativamente más baja si se compara con individuos hospitalizados que requirieron transfusión. Los donantes de sangre ofrecen un promedio de edad bajo y tienen menos probabilidad de haber recibido transfusión en el pasado; asimismo, hay variabilidad entre los individuos en la respuesta a un mismo antígeno, por influencias genéticas, madurez y funcionalidad del sistema inmune en enfermedad y normalidad, etc.

El tipo de población en estudio, así como el sesgo de edad son limitantes para extender los resultados de este trabajo a la población general. De igual forma, tampoco son aplicables a otros bancos de sangre en los que se usen otras técnicas y otros potenciadores para rastrear anticuerpos inesperados. La frecuencia con la que se descubre un anticuerpo en particular, depende de la sensibilidad de las pruebas (por lo general baja en las pruebas de filtro de donantes) y en el grupo étnico que se ha probado.

### SUMMARY

This study shows the incidence

of unexpected antibodies clinically significant in 45,127 blood donors and its relationship with the record of blood transfusion and pregnancy. Donors with unexpected antibodies were 177 (0.39%), 118 women and 59 men; 73 clinically significant antibodies and 82 antibodies of no clinical significance were identified, and 31 cases were not identified by the technique. Antibodies clinically significant were found more frequently in women than in men with a ratio of 6:1. Pregnancy is the more implicated event in the appearance of these antibodies, founding that from the 73 cases of unexpected antibodies clinically significant, 57 (78.1%) are associated with history of pregnancy, while 3 (4.1%) are associated only with history of blood transfusion and 13 (17.8%) are associated with neither of the two mentioned antecedents. This study puts on guard about the frequent finding of anti-D antibodies in Rh negative women (one for each 40 women negative Rh) on reproductive age and its relationship with an inadequate level of prophylaxis, as well as puts on guard about the finding of anti-E, anti-C and anti-K antibodies, all of them historically compromised with the etio-pathology of the hemolytic disease of the newborn, and associated in this study with sensitiveness by pregnancy.

### REFERENCIAS

- Vengelen-Tyler (Ed.) *Technical manual*. Identification of alloantibodies to red cell antigens. Bethesda: American Association of Blood Banks, 12th ed., 1996.
- Issitt PD. *The detection and identification of antibodies to red cells antigens*. Texas: AMTEC Diagnostics International Inc. 1990.
- Grove-Rasmussen M, Huggings CE. Selected types of frozen blood for patients with multiple blood group antibodies. *Transfusion* 1973; 13: 124-26.
- Allen FH, Warshaw AL. Blood group sensitization. A comparison of antigens K1 (Kell) and c (hr). *Vox Sang* 1962; 7: 222-23.
- Springer GF, Horton RE. Blood group isoantibody stimulation in man by feeding blood group-active bacteria. *J Clin Invest* 1969; 48: 1280-84.
- Mollinson PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10th. Oxford; Blackwell Science Publications, 1997.
- Avreamas S. Natural antibodies. In *Encyclopedia of immunology*. Vol 3. Roitt IM, Delves PJ (eds.). London: Academic Press, 1992. Pp. 1134-35.
- Cleghorn TE. The frequency of the Wra, By and Mg blood group antigens in blood donors in the South of England. *Vox Sang* 1960; 5: 556-58.
- Lubenko A, Contreras M. A review: low frequency red cell antigens. *Immunohematology* 1989; 5: 7-14.
- Contreras M, De Silva M, Teesdale P, et al. The effect of natural occurring Rh antibodies on the survival of serologically incompatible red cell. *Br J Haematol* 1987; 65: 475-78.
- Tegoli J, Sausais L, Issitt PD. Another example of a naturally-occurring anti-K1. *Vox Sang* 1967; 12: 305-06.
- Kanel GC, Davis I, Bowman JE. Naturally-occurring anti-K1: possible association with mycobacterium infection. *Transfusion* 1978; 18: 472-75.
- Judd WJ, Walter WJ, Steiner EA. Clinical and laboratory findings on two patients with naturally-occurring anti-Kell agglutinins. *Transfusion* 1981; 21: 184-88.
- Marsh WL, Nichols ME, Oyen R, et al. Naturally-occurring anti-Kell stimulated by *E. coli* enterocolitis in a 20-day-old child. *Transfusion* 1978; 18: 149-51.
- Wong KH, Skelton SK, Feeley JC. Interaction of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with lectins and blood group antibodies. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 134-35.
- Redman M, Reagan F, Contreras M. A prospective study of the incidence of red cell alloimmunization following transfusions. *Vox Sang* 1996; 71: 216-20.
- Walker W. The changing pattern of haemolytic disease of the newborn (1948-1957). *Vox Sang* 1958; 3: 225, 336.
- Heddle NM, Klama L, Frassetto R, et al. A retrospective study to determine the risk of red cell alloimmunization and transfusion during pregnancy. *Transfusion* 1993; 33: 217-20.
- Walkers RH, Dong-Tsamn L, Hartrick MB. Alloimmunization following blood transfusion. *Arch Path Lab Med* 1989; 113: 254-61.

20. Zuñiga P, Cortés A, Rosado R, *et al.* Importancia del rastreo de anticuerpos irregulares en pruebas de compatibilidad. *Colombia Med* 1992; 23: 40-1.
21. Pepperell RJ, Barrie JU, Fliegner JR. Significance of red-cell irregular antibodies in the obstetric patient. *Med J Aust* 1977; ii: 453-55.
22. Ramsey G, Smietana SJ. Long-term follow-up testing of red cell alloantibodies. *Transfusion* 1994; 34: 122-24.