

Capítulo 5

Preparación de reactivos de laboratorio

Los principales reactivos que necesita un servicio de transfusión de sangre son los utilizados en la determinación normal de los grupos sanguíneos y la compatibilidad (cruce de la sangre), así como en las pruebas de detección de anticuerpos. El precio comercial de esos reactivos es alto y hay países donde la escasa disponibilidad de divisas dificulta su importación.

Uno de los objetivos del servicio de transfusión será preparar la mayor cantidad posible de reactivos a nivel nacional o regional, según la estructura orgánica del servicio (véase el capítulo 1) y suministrarlos a sus propios bancos de sangre y a otros usuarios del país. Deben tomarse las disposiciones oportunas para recuperar los gastos de producción.

Cuando el material básico para la preparación de los reactivos sea de origen humano es preciso que esté exento de agentes infecciosos, como el virus de la hepatitis B y el de la inmunodeficiencia humana. Por consiguiente, es preciso seleccionar a los donantes (véase lo que sigue) antes de proceder a las pruebas serológicas para determinar si su plasma o suero son adecuados para la preparación de reactivos. El producto final se someterá a pruebas determinativas de la especificidad, la eficacia, la inexistencia de anticuerpos anómalos y la presencia de crioglobulinas o las propiedades de coagulación.

Los reactivos para clasificación de la sangre se pueden preparar a partir de plasma o suero humano. La preparación con suero es más fácil pero, en cambio, el uso de plasma evita la pérdida de concentrado de eritrocitos transfundible a un paciente o —en la plasmaféresis— retornable al donante. La plasmaféresis tiene la ventaja suplementaria de que se puede tomar plasma del mismo donante con más frecuencia de lo que sería el caso si se le extrajese sangre entera.

Algunos reactivos para la clasificación de la sangre se pueden

también preparar económicamente a partir de material no humano o no inmune, por ejemplo semillas o animales. El reactivo de origen vegetal más utilizado es el anti-A₁, que se obtiene de la semilla de *Dolichos biflorus*. El anti-A de la glándula productora de albúmina de los moluscos *Helix pomatia* y *H. aspersa* es un ejemplo de reactivo de origen animal. Los reactivos preparados a partir de material no inmune se denominan lectinas.

REACTIVOS PARA LA DETERMINACION DE LOS GRUPOS SANGUINEOS ABO¹

Los reactivos anti-A, anti-B y anti-A,B se pueden preparar a partir de: plasma humano «natural» de alta titulación; plasma de donantes artificialmente inmunizados; y animales (anti-A solamente) o hibridomas de ratón (preparación de reactivos monoclonales mediante cultivo *in vitro* de hibridomas de ratón que segregan IgM). Sólo uno de los tres reactivos es obtenible de animales y ha de tenerse en cuenta que no siempre se dispone del equipo ni de los conocimientos técnicos necesarios para la preparación de reactivos monoclonales. En consecuencia, la mayoría de los servicios de transfusión habrán de preparar los reactivos a partir de plasma de donantes artificialmente inmunizados o sin inmunizar.

Los reactivos preparados a partir de plasma de donantes artificialmente inmunizados son superiores a los obtenidos de plasma «natural» porque su titulación suele ser bastante más alta y tienen mayor reactividad. Además, como son reactivos inmunes tienen una escala de tolerancia térmica más amplia que los reactivos provenientes de plasma «natural». Estos últimos suelen ser crioaglutininas capaces de reaccionar a temperaturas ambiente inferiores; esta propiedad las puede hacer inadecuadas para uso en laboratorios donde, debido a las condiciones climáticas o a la calefacción artificial, la temperatura es relativamente alta. Sin embargo, en algunos países, los reactivos obtenidos con plasma de personas que no han sido artificialmente inmunizadas son satisfactorios, por lo que antes de empezar el programa de inmunización vale la pena evaluar las titulaciones de la población local de donantes.

¹ Para más detalles véase

MOORE, B P L. *Serological and immunological methods*. 8ª ed. Toronto Sociedad Canadiense de la Cruz Roja. 1980.

Quality control in blood transfusion services Estrasburgo, Consejo de Europa. 1986

Selección de voluntarios para inmunización y plasmaféresis

El material básico se puede obtener por plasmaféresis de hombres o de mujeres tras la menopausia. A las mujeres en edad fecunda no se las incluye debido al mayor riesgo de enfermedad hemolítica ABO del recién nacido. Son aplicables los criterios de selección enunciados en el capítulo 3 (páginas 30-36), excepto las condiciones para reducir el riesgo de transmisión del paludismo, que no son pertinentes.

Inmunización y plasmaféresis

Es preciso obtener el consentimiento informado del donante y la aprobación de las autoridades sanitarias nacionales de las que depende el servicio de transfusión de sangre. Las razones de esos requisitos son a la vez éticas y jurídicas, pese a que las reacciones al procedimiento son raras.

La inmunización se efectúa por inyección intramuscular de sustancias con especificidad de grupo sanguíneo A, B o AB (dependiendo del grupo a que pertenezca el donante), que pueden ser de origen humano o animal. Las sustancias de origen animal pueden obtenerse comercialmente, mientras que las de origen humano se pueden preparar a partir de la saliva de los sujetos. Se administra una inyección inicial y sólo está indicada otra de refuerzo cuando disminuyen los niveles de anticuerpos, ya que las inyecciones repetidas pueden causar reacciones anafilácticas. Aunque las reacciones adversas se dan más a menudo con las preparaciones de origen animal que con las de origen humano, la respuesta inmune a las primeras es superior a la de las segundas. Si hay que usar material de origen humano habrá que someter a los donantes a pruebas determinativas del antígeno superficial de la hepatitis B (AgsHB), los anticuerpos anti-VIH y anti-VHC, el anticuerpo contra el antígeno del núcleo de la hepatitis B (anti-cHB) y la aminotransferasa de alanina. El material obtenido se congela durante seis meses como mínimo; sólo se utilizará si todas las pruebas iniciales y una segunda prueba anti-VIH con otra muestra tomada al final de ese periodo son negativas.

La primera plasmaféresis se debe realizar a las 2—3 semanas de la inmunización, cuando la respuesta de anticuerpos suele ser máxima. El intervalo entre las ulteriores donaciones de plasma, el volumen máximo que se puede extraer en cada donación y el total de donaciones al año se ajustarán a lo que dispongan las normas o reglamentos nacionales de sangre o, en los países donde éstos no existan, a lo que decida el director del servicio de transfusión.

El método preferido para la toma de plasma de donantes es la aféresis. Sin embargo, cuando el elevado costo del equipo desechable y del equipo básico resulte excesivo, puede usarse un método manual; las dobles bolsas de sangre que se necesitan no representan gasto adicional, pero el método es más tedioso para el donante y para el personal de transfusión.

Cada donación de plasma inmune se analizará para determinar los niveles de anticuerpos, las crioadglutininas, los anticuerpos anómalos y las propiedades de coagulación. Las unidades de plasma que no se ajusten a las especificaciones previstas (véase el capítulo 8, páginas 112-116) se desecharán. Las unidades de plasma seleccionadas por grupos se mezclarán en lotes (unos 2,5 litros por lote) y serán desfibrinadas utilizando trombina de bovinos (2000—3000 unidades NIH por litro de plasma) o cloruro de calcio (1,3 g/litro de plasma). El método de la trombina es más seguro y rápido pero, cuando los fondos son limitados, es aceptable el uso del cloruro de calcio.

La descalcificación es necesaria sólo si se utilizó cloruro para desfibrinación. Los métodos disponibles son: incorporación de oxalato sódico (2 g/litro de suero); uso de resina de intercambio catiónico; y diálisis mediante membrana tubular con el suero inmerso en una solución de cloruro sódico (9 g/litro). El método del oxalato sódico es el preferido para los países en desarrollo, debido a su bajo costo y su sencillez. El de diálisis es complicado y largo, y el de resina de intercambio catiónico resulta oneroso. Sin embargo, cuando se utiliza el método del oxalato el reactivo se enturbia tras un almacenamiento prolongado. Para evitarlo se puede guardar el reactivo a granel y volver a filtrarlo justo antes de su distribución.

Se inactiva el complemento, se incorpora azida sódica y se añaden colorantes para que los sueros anti-A y anti-B tengan el color que se les ha fijado. Se determina la potencia del producto final (titulación y reactividad) con muestras de referencia de reactivo, utilizando las células de prueba recomendadas, así como la presencia de anticuerpos extraños, utilizando preparados de eritrocitos para análisis, de origen comercial o de laboratorio (véase el capítulo 8, página 123). La reactividad se aumenta incorporando cloruro sódico, cuando es necesario.

El reactivo se clarifica y esteriliza por filtración a través de una membrana adecuada. Los lotes se envasan en frascos estériles de 500 ml que se congelan una vez rotulados (véase lo que sigue); llegado el momento, los lotes se descongelan y se distribuyen en frascos estériles incoloros de 5 ó 10 ml. También se pueden distribuir en pequeñas ampollas en el momento de la preparación y almacenarlas congeladas o a 2—8 °C (véase más adelante).

El almacenamiento a granel es preferible cuando se ha utilizado cloruro de calcio para desfibrinación, porque la turbidez se elimina mediante nuevo filtrado antes de repartir los lotes en pequeñas ampollas. El reparto inmediato es preferible cuando se usa trombina, y entonces no hace falta volver a filtrar.

Los niveles de anticuerpos se conservan durante por lo menos 24 meses cuando el reactivo se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos y durante 12 meses cuando se almacena a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. En las ampollas se deben anotar las correspondientes fechas de caducidad.

Preparación de suero anti-A de moluscos

El suero anti-A puede prepararse a partir de la glándula de albúmina de los moluscos *Helix pomatia* y *Helix aspersa*; el primero proporciona reactivo más potente. Como el material anti-A obtenido de moluscos tiene una titulación muy alta, con un solo molusco pueden obtenerse hasta 2,5 litros de reactivo potente. Por causas desconocidas, la reacción de esa sustancia con las células A_2B es bastante más débil que con otras células de pruebas (A_1 , A_2 y A_1B); afortunadamente, la reactividad de las células A_2B es fácil de mejorar mediante incorporación de una enzima cuando se diluye el reactivo. Como éste es un método económico de preparar suero anti-A, resulta apropiado para los países donde existen las precitadas especies de molusco.

Reactivo anti- A_1

El reactivo anti- A_1 es necesario para la distinción sistemática entre las células A_1 y las A_2 pero tiene un precio comercial elevado. Se puede preparar mediante absorción del elemento anti-A del suero de un donante del grupo B (que tiene anti-A + anti- A_1) usando células A_2 . Esto deja sólo anti- A_1 que se denomina «anti-A (anti- A_1) absorbido».

La lectina anti- A_1 se puede obtener a partir de semillas de *Dolichos biflorus*, una planta de países tropicales y subtropicales; tanto las semillas como las plantas son baratas. El reactivo preparado a partir de la semilla es potente y estable. Las semillas maceradas en agua se trituran en un mortero o batidor y el reactivo se extrae usando cloruro sódico, con centrifugación y precipitación prolongada en frío ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 meses). También se puede usar 0,31 mol/litro (23 g/litro) de glicina y 0,31 mol/litro (18 g/litro) de cloruro sódico. En este caso el extracto filtrado se vuelve a diluir con la misma solución de glicina, si ello es necesario. Luego se

procede a calentamiento a 56 °C durante 30 min., congelado durante la noche, descongelado y precipitación en frío a 4 °C durante 3 semanas.

La reactividad con células A₂, que se produce con diluciones más altas del extracto obtenido por cualquiera de esos dos métodos, se puede remediar mediante nueva dilución del extracto o por absorción con células A₂.

SUERO ANTI-D

El suero anti-D se puede obtener del plasma de mujeres donantes rhesus-negativas que hayan sido inmunizadas después de un embarazo con un feto Rh-positivo o después de una transfusión de sangre Rh-positiva. Ese es el método óptimo y el más sencillo cuando se tienen donantes en esas condiciones. A veces, a las donantes se las reestimula intencionadamente porque la concentración de anticuerpos está por debajo de los niveles aceptables; ese es el segundo de los mejores métodos porque la inmunización ya se ha producido y sólo hacen falta inyecciones de refuerzo.

La inmunización intencionada de donantes Rh-negativos con el fin específico de producir el reactivo es un tercer método, seguido con más frecuencia por los fabricantes comerciales y también a veces por los servicios de transfusión de sangre. Este entraña para el servicio de transfusión una obligación moral más patente de asegurar la disponibilidad de sangre compatible Rh-negativa, si el donante necesita una transfusión.

Hay un cuarto método, la producción de anti-D monoclonal, pero resulta inasequible para la mayoría de los servicios de transfusión.

Los criterios a seguir en la selección de voluntarios para inmunización primaria, o para reestimulación si ya están inmunizados, son los ya descritos para la producción de reactivos ABO. Es preciso obtener el consentimiento informado del donante y la aprobación de la autoridad sanitaria nacional competente. En contraste con la preparación de reactivos ABO, en la que se usan para inmunización sustancias purificadas (generalmente de origen animal), el reactivo anti-D se prepara mediante inmunización con eritrocitos humanos lavados. Por ello, es esencial que los eritrocitos procedan de un sujeto exento de enfermedades transmisibles por la sangre. Se empieza por evaluar al donante de eritrocitos a partir de su historia clínica y de los resultados del examen físico; seguidamente se procede al análisis riguroso de muestras de su sangre para determinar la presencia de A_gs^HB, anticuerpos anti-

VHC y anti-cHB, aminotransferasa de alanina, anticuerpos anti-VIH y parásitos del paludismo. Los eritrocitos se mantienen congelados (en glicerol) durante seis meses y luego los glóbulos lavados se utilizan para inmunización sólo si todas las pruebas iniciales, incluso la del VIH, repetidas en el donante al terminar el periodo resultan negativas. Los eritrocitos escogidos para inmunización deben ser del genotipo más cercano posible al de la persona que vaya a ser inmunizada, excepto en lo que se refiere al antígeno D. Eso reduce el riesgo de formación de anticuerpos Rh distintos del anti-D que contaminarían el producto final. Por ejemplo, si el futuro donante de plasma (es decir, la persona que va a ser inmunizada) tiene un genotipo *dce/dce*, las células para inmunización deben ser del genotipo *Dce/Dce* o *Dce/dce* y además tendrán compatibilidad ABO con el donante de plasma. Es conveniente emplear eritrocitos del mismo sujeto para inyecciones sucesivas al mismo donante de plasma.

ANTIGLOBULINA HUMANA

La antiglobulina humana sólo se puede preparar en un laboratorio de referencia que tenga personal especializado e instalaciones de bioterio. Aunque se han utilizado varios tipos de animales (ovejas, cabras, caballos y pollos) para producir el reactivo, el de uso más frecuente es el de conejo.

La mayoría de los alo-anticuerpos de eritrocitos son IgG y no requieren complemento para reacción. Por ello, el factor anti-IgG es un componente esencial del reactivo de antiglobulina humana. También es necesaria la presencia en el reactivo de anticuerpos anticomplemento porque algunos anticuerpos (por ejemplo los específicamente anti-Kell y anti-Kidd) son detectados sólo por los anticomplemento y no por las técnicas normales anti-IgG empleadas en la mayoría de los laboratorios. Una ventaja más de incluir anticuerpos anticomplemento en el reactivo de antiglobulina humana es que algunas variedades como los anti-Jk^a, que tienen poca reactividad cuando se los analiza por separado con reactivos anti-IgG o anticomplemento, producen fuertes reacciones cuando los dos reactivos se usan en combinación. Los anticuerpos anticomplemento recomendados para inclusión en el reactivo de antiglobulina humana son los anti-C3c y anti-C3d, o anti-C3c y anti-C3g, porque esas combinaciones refuerzan la reacción. El anti-C3g es superior al anti-C3d para uso con anti-C3c porque produce menos reacciones falsamente positivas; ahora bien, de momento sólo se puede obtener como anticuerpo monoclonal y sólo se

ha llegado a preparar un reactivo potente. Aunque también existe un problema de falsas reacciones positivas con anticuerpos monoclonales anti-C3d, anti-C3g, e incluso con anti-C3c, existe uno monoclonal anti-C3d, el BRIC-8, que proporciona un reactivo satisfactorio cuando va combinado con anti-IgG policlonal sin anti-C3c.

El suero anti-IgG es relativamente fácil de preparar, mientras que los anti-C3c y anti-C3d son más difíciles y llevan más tiempo. La solución óptima en muchos casos es preparar el anti-IgG y comprar una pequeña cantidad de anti-C3d (por ejemplo, BRIC-8, que sólo se tiene que diluir al 1:320 para lograr el reactivo de antiglobulina humana).

PANELES DE ERITROCITOS

(véase también el capítulo 6, página 85)

En los países se pueden preparar dos paneles de eritrocitos (para detección y para identificación de anticuerpos) que se facilitarán a los bancos de sangre del servicio nacional de transfusión. También se puede distribuir el panel para detección y enviar al centro nacional muestras positivas para la identificación.

Habrá que reunir alrededor de 20 ó más muestras de sangre del grupo O para conseguir un perfil de antígenos que permita detectar e identificar la mayoría de los anticuerpos que se encuentran comúnmente en una población. Deben incluirse como mínimo los antígenos de los siguientes sistemas de grupo sanguíneo:

Sistema de grupo sanguíneo	Antígenos
Rhesus	D, C, E, c, e
Kell	K k
Duffy	Fy ^a , Fy ^b
Kidd	Jk ^a , Lk ^b
Xg (según sexo)	Xg ^a
Lewis	Le ^a , Le ^b
MNS	M, N, S, s
P	P ₁

Si se dispone de reactivos eficaces y de personal experto la labor se debe hacer en un laboratorio de referencia del país de que se trate. Cuando eso no es posible, el panel se puede enviar a un laboratorio extranjero donde existan esos medios.

Las células escogidas para el panel de detección (generalmente

dos muestras) deben abarcar todos los antígenos de los ocho sistemas de grupo sanguíneo mencionados. El panel de identificación (generalmente diez muestras) también se debe escoger de manera que el perfil permita identificar los anticuerpos correspondientes a todos esos antígenos. Las muestras de sangre para los paneles se pueden tomar de personal del banco de sangre por grupos sanguíneos o de donantes a intervalos regulares de 3–4 semanas, o de unidades de sangre donada, debidamente clasificada y congelada, en las porciones necesarias para el número de paneles de detección e identificación, que también se prepararán a intervalos de 3–4 semanas. Los eritrocitos, congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o temperatura inferior en glicerol, se descongelan cuando es necesario y a continuación se dializan en solución salina tampón.

Los paneles de eritrocitos preparados por el servicio de transfusión de sangre se pueden utilizar para los trabajos normales de laboratorio. Los paneles comerciales, que son caros, se deben reservar para casos en que se necesita un espectro más amplio de antígenos que quizá no existan en el panel del laboratorio.

REACTIVOS NO INMUNOHEMATOLOGICOS UTILIZADOS EN LA SEROLOGIA DE GRUPOS SANGUINEOS

Solución isotónica (0,154 mol/litro; 9 g/litro)

Para preparar una solución isotónica se pesan exactamente 180 g de cloruro sódico (NaCl) y se disuelven en 20 litros de agua destilada (si la cantidad que se necesita es menor se pueden utilizar 90 g de NaCl y 10 litros de agua destilada). Se mezcla bien la solución con una paleta y se reparte en recipientes de 1 ó 2 litros.

Si la concentración no es correcta se producirá la lisis de los eritrocitos. El pH debe ser de entre 5,5 y 8,0; en caso de que sea inferior a 5,3, durante el lavado para la prueba de antiglobulina se producirá la elución de anticuerpos de los eritrocitos, con lo que los resultados serán falsamente negativos.

Solución salina con tampón fosfato

Se pesan exactamente las cantidades indicadas de los siguientes compuestos químicos:

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	137,0 g
KH_2PO_4	40,8 g
NaN_3	2,0 g
NaCl	126,0 g

Se disuelve cada compuesto químico en el orden indicado (1 de cada vez) en 10 litros de agua destilada. Seguidamente se completa el agua hasta 20 litros.

El pH debe ser de entre 7,09 y 7,14. Hay muchos que prefieren utilizar la solución con tampón fosfato en vez de la isotónica en las suspensiones de eritrocitos para uso en el lapso de 12–24 horas y para almacenamiento a 4 °C. Además, la primera retrasa la lenta hemólisis observada en los eritrocitos.

Solución hipotónica (0,03 mol/litro)

Para preparar un litro de solución hipotónica hay que disolver primero 18 g de glicina en 500 ml de agua destilada. El pH se ajusta a 6,7 añadiendo gota a gota una solución de hidróxido de sodio de 1,0 mol/litro; seguidamente se incorporan 20 ml de tampón fosfato (0,15 mol/litro, pH 6,7). El tampón se prepara añadiendo 0,15 mol/litro de fosfato monosódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 25 ml de 0,15 mol/litro de fosfato disódico (Na_2HPO_4) hasta conseguir un pH de 6,7. Se incorporan 1,79 g de cloruro sódico disuelto en 100 ml de agua destilada a la solución, que se completa hasta 1 litro con agua destilada, se mezcla bien y se reparte en lotes de 100-ml. Para evitar la proliferación bacteriana se pasa por filtro estéril y se almacena a 4 °C o se congela a –20 °C.

La solución hipotónica se utiliza mucho en la serología de grupos sanguíneos porque aumenta en un factor de 2 a 4 la velocidad de detección de anticuerpos de diferente especificidad, por comparación con la solución isotónica.

CONCLUSIONES

Al planificar un servicio de transfusión de sangre es importante prever también la preparación de la mayor cantidad posible de reactivos esenciales inmunohematológicos y de otra índole, así como la disponibilidad de personal capacitado. Los reactivos se deben preparar en pequeña escala, inicialmente a nivel central; luego se puede ampliar la producción para atender las necesidades de los centros regionales a medida que se desarrolla el servicio. De esa forma no sólo se garantizará la disponibilidad de los reactivos, sino que se evitarán gastos en moneda extranjera.