

REACTIVOS

UTILIZADOS EN

LA RUTINA

DEL BANCO

DE SANGRE

Docente. Daniel G. Mautor

TP: I 7 de julio de 2005

Reactivos de uso en inmunohematología

El descubrimiento de los grupos sanguíneos ABO, por Karl Landsteiner en 1900, impulsó el desarrollo de la Inmunohematología y la Medicina Transfusional, a este le sucedieron el de numerosos sistemas de grupos sanguíneos, no obstante, el ABO es el más importante en la práctica transfusional.

Los primeros resultados en la producción de anticuerpos se remontan a principios del siglo XX, los reactivos para uso en Inmunohematología se producen después de ciertos avances en el campo de la Inmunohematología y la Hemoterapia aparejados al desarrollo de la Inmunología. Reactivos como el suero antiglobulínico y los sueros hemoclasificadores de grupos sanguíneos, paneles de células reactivas y algunos equipos constituyen la piedra angular para la investigación y la producción en Inmunohematología.

Cuando se habla de producción de anticuerpos se piensa en grandes centros de obtención de anticuerpos, sin embargo, estos reactivos no sólo se obtienen a escala industrial sino también en laboratorios docentes y de investigaciones biomédicas. Los anticuerpos pueden producirse por inmunización *in vitro* o mediante la inmunización o inoculación inducida del inmunógeno *in vivo* en animales y en humanos inmunocompetentes (donantes voluntarios sanos o sensibilización por transfusión sanguínea), por inmunización natural en mujeres sensibilizadas durante el embarazo, por técnicas biotecnológicas y de ingeniería genética.

Después de los años 80 los reactivos hemoclasificadores de los antígenos de los grupos sanguíneos, compuestos por anticuerpos policlonales obtenidos a partir de plasma animal o humano, son desplazados por reactivos que contienen anticuerpos monoclonales (AcMo), producidos por un clon celular

inmortalizado. Los reactivos monoclonales han incrementado considerablemente la calidad de los ensayos inmunohematológicos y en consecuencia la seguridad transfusional.

A continuación se brindará una panorámica referente a la producción y control de la calidad de los principales reactivos usados en Inmunohematología, ellos son los reactivos hemoclasificadores policlonales y monoclonales, los reactivos antiglobulínicos humano y la albúmina sérica bovina.

Reactivos hemoclasificadores policlonales

Karl Landsteiner desarrolló un procedimiento para la determinación del grupo sanguíneo al analizar muestras de sangre de sus colegas, mezcló sueros de unos con suspensiones de hematíes de otros, de esta forma descubrió el sistema de grupo sanguíneo ABO. El hallazgo temprano del sistema ABO se debe al ingenio de este investigador, y a que este es el único sistema en el que los anticuerpos recíprocos se encuentran constante y predeciblemente en el suero de personas normales cuyos hematíes no poseen el o los antígenos correspondientes.

Los restantes sistemas de grupo sanguíneo se descubrieron sucesivamente por anticuerpos obtenidos al inmunizar animales con hematíes humanos (sistemas P y MN), por anticuerpos responsables de la enfermedad hemolítica del recién nacido presentes en el suero de puérparas (sistema Rh, antígeno D; sistema Kell y sistema Kidd antígeno Jk^a) y por anticuerpos responsables de reacciones postransfusionales presentes en el suero de pacientes transfundidos (sistema Rh, antígenos C, c, E, e y sistema Kidd, antígeno Jk^b).

Estos anticuerpos son policlonales y con características heterogéneas, ya que son producidos por diferentes células plasmáticas provenientes de diferentes clones de células B, su heterogeneidad se manifiesta en la naturaleza de los anticuerpos sintetizados, los cuales están dirigidos contra sitios diferentes de la molécula de antígeno y reaccionan con distintos grados de afinidad.

Los reactivos hemoclasificadores policlonales se obtienen mediante un esquema de inmunización en animales o en humanos (donantes voluntarios sanos), con sustancias específicas de grupos, ya sean antígenos solubles humanos o portados por los eritrocitos de humanos, en otros casos el reactivo se produce a partir del suero de pacientes aloinmunizados que pueden ser pacientes politransfundidos o puérparas.

Cuando se ha alcanzado un título conveniente de los anticuerpos dirigidos contra el antígeno en cuestión, se procede a la extracción de sangre para realizar la producción del reactivo, si este se realiza por inmunización en conejos se sacrifica el animal, ya que el volumen de suero que se extrae resulta insuficiente para una producción a gran escala, no así cuando los animales inmunizados son carneros o caballos. En humanos el suero se colecta mediante la exanguinotransfusión cuando se trata de personas politransfundidas, como los pacientes con hemoglobinopatías, o a partir del plasma obtenido en la plasmaféresis si se trata de una puérpara o un donante.

Un título superior a 1/64 es suficiente para decidir la extracción del suero, este debe procesarse ya que puede contener además de los anticuerpos de interés para producir un reactivo hemoclasificador, anticuerpos que reaccionen con otros antígenos eritrocitarios y contra antígenos de otras entidades celulares. Estos anticuerpos indeseables se eliminan tras adsorciones del suero con eritrocitos humanos lavados; una vez terminado el proceso de adsorción y si es necesario el suero se concentra para aumentar su título, en otras ocasiones se debe restituir con diluentes como la albúmina sérica bovina, o el suero humano de grupo AB libre de anticuerpos irregulares, que son aquellos anticuerpos contra antígenos de grupos sanguíneos diferentes al ABO.

La finalidad de la producción de un reactivo de este tipo es su comercialización y uso en los laboratorios de Inmunología e Inmunoematología, Servicios de Transfusiones y Bancos de Sangre; para ello el reactivo debe pasar previamente un riguroso control de calidad que consiste en la demostración de sus características funcionales, estas deben responder al propósito para el cual fue diseñado el producto.

Dentro de los requisitos generales que debe cumplir el reactivo hemoclasificador como producto terminado es su esterilidad, transparencia y ausencia de partículas, debe contener preservativos antimicrobianos, envasarse en frascos apropiados y mantener la actividad biológica y características físico-químicas durante el período de validez declarado, a la temperatura de conservación recomendada por el productor.

En el ensayo funcional deben utilizarse al menos tres muestras, una debe obtenerse del inicio y otra del final del proceso de llenado; el productor debe realizar un estudio de estabilidad, es decir, conservar tres muestras del lote en las condiciones por el recomendadas, como mínimo 6 meses después de la fecha de vencimiento del producto.

Los colorantes usados no deben afectar las características biológicas del reactivo, ni variar significativamente durante el período de validez del mismo,

además deben permitir observar el contenido y la detección de partículas o turbiedad en el preparado durante el uso.

Estos requisitos son extensivos a los reactivos hemoclasificadores monoclonales, antiglobulínicos y albúmina sérica bovina que se tratarán más adelante.

Estas cuestiones sólo se abordarán para los hemoclasificadores policlonales que reconocen los antígenos de los grupos sanguíneos eritrocitarios ABO y Rh por ser los más frecuentemente utilizados en Bancos de Sangre, Servicios de Transfusión sanguínea y laboratorios de Inmunohematología.

Tipificación Ag.D

La naturaleza de la inmunoglobulina Anti-D contenida como reactivo en los antiseros empleadas para la tipificación D (IgG o IgM, Policlonal o Monoclonal) es una cuestión que tiene que ver con la posibilidad o no de emplear esos distintos medios de reacción. Por ejemplo, algunas IgG, si son humanas, podrán emplearse en un Test Antiglobulínico Indirecto y, por otro lado, los anticuerpos monoclonales no requieren el pretratamiento enzimático de los hematíes. En este punto, es clave seguir las instrucciones de uso de cada fabricante.

Teniendo en cuenta que entre las presentaciones comerciales de reactivos Anti-D hay una enorme diversidad (sin hablar de diferentes marcas y sólo considerando aquellos de origen monoclonal, se conocen casi 40 líneas celulares diferentes); esto hace que hablar de la naturaleza del anticuerpo no sea algo accesorio o secundario sino primordial. A veces, también por extensión, se engloba en la misma bolsa de la confusión "especificidad del anticuerpo" con "método de prueba". Para los Anti-D de origen Policlonal Humano debe tenerse en cuenta que cada donante que contribuye a estos pools puede haber sido inmunizado de una variedad de formas y, a su vez, cada uno puede haber respondido de una manera ligeramente diferente al desafío antigénico. Es importante reconocer que los reactivos séricos no son químicos inertes sino más bien materiales biológicos complejos y que, por lo tanto, nunca son "perfectos". El fenotipo DIVa(C)-, es considerado un D Parcial asociado a los antígenos Rh33 (RoHar) y Rh50 (FPTT) que se caracteriza por expresión muy débil de D, que puede no detectarse con la mayoría de los reactivos Anti-D policlonales, ya que presenta reacciones débiles o negativas en la fase antiglobulínica. Algunos reactivos Anti-D monoclonales, particularmente los hechos a partir de material IgM, pueden mostrar aglutinación directa con hematíes RoHar, lo cual resulta en que sean clasificados D+, cuando con reactivos policlonales son comúnmente clasificados D- o como una débil expresión del antígeno D débil. Considerando que los antígenos que reconocen como blancos son heterogéneos no será muy sorprendente, solo entonces, descubrir que el antisero de la marca "X" puede reaccionar más fuertemente con una célula de un fenotipo particular que el de la marca "Z", mientras que, otro día, cuando se prueben células diferentes, ésta marca "Z" puede dar una mejor aglutinación.

Los sueros monoclonales permitieron apreciar la diversidad y complejidad de los epitopes D. Desde 1982 se produce anticuerpo monoclonal Anti-D Humano mediante linfocitos transformados con virus de Epstein-Barr. Los Reactivos Combinados Policlonal/Monoclonal (o Blends) sirven para Prueba salina para detección de D normales, gracias al componente IgM monoclonal.

Los resultados negativos pueden ser convertidos a un Test Antiglobulínico Indirecto, merced el componente IgG policlonal humano. La Cantidad de IgG policlonal suele ser cuidadosamente controlada para asegurar que la reacción de la IgM con D débil no cause prozona (bloqueo), aunque todos adolecen de reducción en su capacidad de aglutinar en forma directa D débil por bloqueo parcial de la IgG destinada a la fase antiglobulínica. Por ese motivo, no deben prolongarse los tiempos de incubación.

En cuanto a los Anti-D Monoclonal, no hay ninguno que pueda detectar todos los tipos de variantes D. Todos los producidos hasta ahora están dirigidos hacia limitados epitopes y, por lo tanto, muestran una especificidad limitada. La mayoría de ellos no pueden detectar el fenotipo D Parcial más frecuente, el DVI. Por consiguiente, los criterios para la selección de Anti-D monoclonales son complejos. Se han adoptado varias estrategias para superar esos escollos. Sin embargo, la introducción de reactivos monoclonales resultó tan deseable como necesaria. Son diferentes a los policlonales, no mejores ni peores. En conclusión, no existe el reactivo Anti-D "perfecto" o "infallible" con capacidad de reconocer absolutamente todas las variantes D y hay que conocer muy bien los reactivos monoclonales que se emplean (direcciones de uso, características relevantes del clon). Como se aprecia, no puede hablarse de Métodos de tipificación Rh sin hacer alusión al tipo de Anti-D empleado.

En muchos países, sobre todo de Europa y América del Norte, han tratado transitoriamente la cuestión disponiendo que la tipificación D deba hacerse con por lo menos 2 fuentes diferentes de reactivo Anti-D. De ahí que las casas comerciales estén poniendo mayor énfasis en tipos de Anti-D con un espectro de especificidad cada vez más amplio, o distintos tipos para distintos fines (p. Ej. distintos tipos de Anti-D para tipificación de: 1. Hemodonantes y Recién Nacidos y, 2. Receptores transfusionales y Embarazadas o Parturientas).

El Test en Gel es un método con una sensibilidad superior al test convencional en tubo para evidenciar reacciones Ag-Ac mediadas por IgGs. A casi 15 años de la aparición del test en gel hay un marco bibliográfico internacional que lo avala.

Este aumento de sensibilidad permite discriminar más objetivamente una menor cantidad de hematíes que hayan sido aglutinados inmunológicamente, evidenciando gracias a las bolas de gel con el antisuero,

aglutinados de aquellos que no han captado anticuerpos (1º mecanismo de acción). Este método posee una característica especial cuando además se permite que esas IgGs reaccionen y sean reveladas en su medio óptimo de reacción, es decir, el antiglobulínico (2º mecanismo involucrado) o el enzimático, para aquellos anticuerpos dirigidos hacia antígenos resistentes a las enzimas proteolíticas o potenciados por ellas (Ags. del Sist. Rh, típicamente).

Las desviaciones de las direcciones del fabricante pueden ser fuente de errores y, muy a menudo, son cometidas no por el principiante sino por un operador experimentado que asume que él puede alterar las condiciones de prueba siempre que realice los controles apropiados. El problema surge porque a veces no es posible diseñar un control "completamente apropiado" porque uno desconoce que más puede esconder el reactivo que está siendo usado, o qué carece.

Si vamos a juzgar la especificidad de un reactivo debemos recordar que ésta es la propiedad por la que logra la aglutinación de los hematíes con un determinado antígeno y no aglutina a los que no lo poseen, pero que sólo deberá ser demostrada probando el reactivo de acuerdo a los métodos descritos por el fabricante, ya que someterlo a otras condiciones de prueba puede alterar su especificidad. Un reactivo es una herramienta diagnóstica y, como tal, debe emplearse la que sea adecuada para el fin deseado, por cuanto hay que saber manejarla. Su empleo inadecuado va más allá de la inutilidad del intento: Puede dar lugar a desapercibidas interpretaciones erróneas de los resultados obtenidos. Es preciso conocer muy bien cómo funcionan, sus alcances y limitaciones, seguir las instrucciones de uso impartidas por el fabricante y controlar su performance. Habrá que recordar que nadie mejor que el fabricante sabe cómo funciona mejor "su" reactivo y que nadie mejor que nosotros debe saber qué tal funciona ese frasco de reactivo en particular. El fabricante es responsable de la calidad de los reactivos, pero el usuario es responsable de las pruebas realizadas con ellos. Por ello es necesario que se compruebe si se ajustan a las especificaciones establecidas.

Puede existir más de 1 tipo genérico de Anti-D con distintas fuentes de anticuerpo y clase, distintos principios y métodos de uso y diferentes ventajas y desventajas. Pensar que todos deben manipularse de la misma manera es una sobre simplificación.

Nuestra interpretación dependerá de que asumamos qué es lo que hemos hecho, cuán puros son esos reactivos y cómo fueron preparados.

El estado D puede ser determinado empleando sueros Policlonales o Monoclonales. Ambos, no arrojan exactamente las mismas divisiones. El uso de Monoclonales permitió apreciar la diversidad y complejidad de los epitopes D. Los Reactivos Combinados Policlonal/Monoclonal (o Blends) sirven para Prueba salina para detección de D normales, gracias al componente IgM.monoclonal.

Los resultados negativos pueden ser convertidos a un Test Antiglobulínico Indirecto, merced el componente IgG policlonal humano. La Cantidad de IgG policlonal suele ser cuidadosamente controlada para asegurar que la reacción de la IgM con D débil no cause prozona (bloqueo), aunque todos

adolecen de reducción en su capacidad de aglutinar en forma directa D débil por bloqueo parcial de la IgG destinada a la fase antiglobulínica. Por ese motivo, no deben prolongarse los tiempos de incubación. En cuanto a los Anti-D Monoclonal, no hay ninguno que pueda detectar todos los tipos de variantes D. Todos los producidos hasta ahora están dirigidos hacia limitados epitopes y, por lo tanto, muestran una especificidad limitada. La mayoría de ellos no pueden detectar el fenotipo D Parcial más frecuente, el DVI. Por consiguiente, los criterios para la selección de Anti-D monoclonales son complejos. Se han adoptado varias estrategias para superar esos escollos. Sin embargo, la introducción de reactivos monoclonales resultó tan deseable como necesaria. Son diferentes a los policlonales, no mejores ni peores. En conclusión, no existe el reactivo Anti-D "perfecto" o "infalible" con capacidad de reconocer absolutamente todas las variantes D y hay que conocer muy bien los reactivos monoclonales que se emplean (direcciones de uso, características relevantes del clon). Como se aprecia, no puede hablarse de Métodos de tipificación Rh sin hacer alusión al tipo de Anti-D empleado. En muchos países, sobre todo de Europa y América del Norte, han zanjado transitoriamente la cuestión disponiendo que la tipificación D deba hacerse con por lo menos 2 fuentes diferentes de reactivo Anti-D. De ahí que las casas comerciales estén poniendo mayor énfasis en tipos de Anti-D con un espectro de especificidad cada vez más amplio, o distintos tipos para distintos fines (p. ej. distintos tipos de Anti-D para tipificación de:

1. Hemodonantes y Recién Nacidos
2. Receptores transfusionales y Embarazadas o Parturientas

PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

ALTERNATIVAS PARA LOS CONTROLES DE CALIDAD

El sistema Rh posee más de 45 antígenos, después de los antígenos A y B el RhD es el de mayor importancia en la práctica transfusional, a diferencia del A y el B los individuos cuyos hematíes carecen del antígeno D no presentan de manera regular anti-D en el suero, su formación se produce por exposición a hematíes que contiene el antígeno D bien por transfusión o embarazos.

El control de calidad, en especial la prueba de potencia, de los hemoclasificadores anti-D varía en dependencia del tipo de anti-D, es decir, si es un reactivo albuminoideo usado para el tipaje Rh₀ (D) y recomendado para la prueba D^u (Grupo I), reactivo de bajo contenido proteico o salino usado para el tipaje Rh₀ (D) (Grupo II), reactivo químicamente modificado usado para el tipaje Rh₀ (D) y recomendado para la prueba D^u (Grupo III), reactivo recomendado únicamente para la prueba D^u (Grupo IV). La clasificación en grupos se utiliza arbitrariamente para diferenciar los reactivos, esta no corresponde a ninguna clasificación establecida internacionalmente.

La potencia se realiza en la prueba de tubo por centrifugación y en todos los casos los eritrocitos se suspenden al 2% en salina con albúmina al 2%, los reactivos del grupo I se diluyen en albúmina bovina del 20 al 22 % y se incuban

15 minutos a 37°C, los del grupo II se incuban 15 minutos a 37°C o de 20 a 30°C en dependencia de lo recomendado por el productor, los del grupo III se incuban 15 minutos a 37°C y los del grupo IV 30 minutos a 37°C (se realiza prueba de Coombs indirecta); el diluyente de los reactivos de los grupos II, III y IV es salina con albúmina al 2%. Los reactivos hemoclasificadores anti-D deben tener una potencia no menor que 32 frente a eritrocitos de fenotipo ccDee (R₀r).

La avidez se efectúa en la técnica de lámina con incubación sobre una lámpara, se utiliza el mismo fenotipo que en la prueba de potencia y deben observarse aglutinados en un intervalo no mayor de 60 segundos, estos no excederán 1 mm de diámetro a los 2 minutos según inspección visual, esta prueba no se le realiza a los reactivos del grupo IV.

En la prueba de especificidad los hemoclasificadores anti-D deben cumplir varios requisitos: reaccionar con al menos 2+ de aglutinación con 2 muestras de eritrocitos de fenotipo CcDee (R₁r) y ccDee (R₀r), no aglutinar eritrocitos de fenotipo Ccddee (r'r), ccddEe (r''r), A₁ccddee, Bccddee, A₁Bccddee y Occddee (rr), no presentar anticuerpos contra los antígenos de grupos sanguíneos H, I, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, Js^b, P₁, C, c, E, e, C^w, M, N, S, s, U, Lu^b, Jk^a, Jk^b, Fy^a, Fy^b, Xg^a y no hemolizar ni provocar fenómeno Rouleaux. Los reactivos del grupo IV deben además reaccionar con al menos 2+ de aglutinación con 3 muestras de eritrocitos de fenotipo D^u y los de reactivos de los grupos II y III no deben aglutinar eritrocitos de grupo Occddee con prueba de Coombs directa positiva con 3+ o 4+ obtenidos de pacientes con AHA1 o preparados *in vitro*.

La reproducibilidad se estudia con un ensayo de al menos 350 muestras de sangre de donantes, en cada uno de los métodos para los que se recomienda el hemoclasificador, el estudio se realiza en paralelo con un suero anti-D de iguales características al obtenido por el productor.

En el control de calidad de los hemoclasificadores anti-D además de la potencia, avidez, especificidad y reproducibilidad del producto, se evalúa el efecto de prozona, término usado para definir la ausencia o presencia de aglutinaciones débiles en exceso de anticuerpos. En este caso los hemoclasificadores anti-D no deben mostrar disminución de la aglutinación, con el incremento del tiempo de incubación al estudiarse con eritrocitos de fenotipo R₁r, en la técnica de tubo y en tiempos de incubación de 15, 30 y 60 minutos. En todos los tiempos debe observarse al menos 2+ de aglutinación.

Reactivos hemoclasificadores monoclonales

La tecnología de hibridoma fue iniciada por George Köhler y Cesar Milstein en 1975, después de describir una producción de anticuerpos *in vitro* de especificidad predeterminada, observaron que por primera vez se podían producir AcMo dirigidos contra un epítipo en particular.

Una línea celular productora de anticuerpos generada por esta vía proviene de la integración física, mediante un agente fusógeno, de células B

productoras de anticuerpos de un animal inmunizado y células de una línea de mieloma (plasmacitoma) con un similar estadio de diferenciación. El hibridoma resultante puede preservar la capacidad de producir y secretar inmunoglobulinas específicas y la posibilidad de reproducirse indefinidamente.

El desarrollo de este tipo de hibridoma fue exitoso con células de ratón y de rata, a diferencia de las células humanas; una vía para la obtención de hibridomas humanos fue la inmortalización de linfocitos de sangre periférica con virus de Epstein-Barr (VEB). Este último procedimiento tenía como desventaja la corta vida de las células en cultivo, como alternativa fusionaron células B inmortalizadas con VEB a células de mieloma de ratón para dar lugar a un heterohibridoma humano-ratón. La hibridación de linfocitos humanos ha sido necesaria para producir determinados anticuerpos contra antígenos eritrocitarios que no son reconocidos por el sistema inmune del ratón (antígenos del sistema Rh).

Esta tecnología y otras modificaciones introducidas subsecuentemente permitirían la producción ilimitada de anticuerpos de singulares especificidades, estos podían prepararse con la eliminación de variabilidades de lote a lote. En todas las disciplinas en las que se utilizan los anticuerpos como rutina y/o investigación, la introducción de la producción de monoclonales *in vitro* modificaron las prácticas de trabajo y los conceptos teóricos.

Los AcMo, a diferencia de los policlonales, son homogéneos ya que son producidos por una célula plasmática proveniente de un clon de células B, su homogeneidad se manifiesta en la naturaleza de los anticuerpos sintetizados, los cuales están dirigidos contra un epítope de la molécula de antígeno y reaccionan con un grado de afinidad determinado.

La aplicación de la tecnología monoclonal desarrollada por Köhler y Milstein a los anticuerpos de grupos sanguíneos, ha devenido en la generación de miles de AcMo dirigidos contra muchos antígenos eritrocitarios, en la actualidad se producen AcMo hemoclasificadores por la tecnología del hibridoma, a partir de sustancias específicas de grupo obtenidas por síntesis química o de los eritrocitos correspondientes, sólo algunos de estos reactivos han mostrado ser mejores que los reactivos convencionales por su excelente especificidad, estabilidad y efectividad de costo.

Los reactivos que detectan los antígenos del sistema ABO son los más ampliamente usados, por ello no sorprende que hayan sido los primeros en producirse por esta tecnología. Algunos reactivos monoclonales anti-A reaccionan fuertemente con el fenotipo A_x , y con otros subgrupos de A de la misma manera que con A_1 y A_2 , estos subgrupos no siempre son detectados con el uso de anti-A policlonal humano. Otros reactivos monoclonales anti-A no producen una aglutinación rápida y completa de células A_1 y A_2 , lo que hace necesaria la utilización del reactivo en forma de mezclas de al menos dos AcMo de la clase IgM, uno que permita detectar con relativa facilidad subgrupos de A y otro que asegure una reacción con avidez de células A_1 y A_2 .

Se han desarrollado muchos AcMo contra el antígeno D, tanto de la clase IgG como de la IgM, la generación de estos reactivos monoclonales han

contribuido significativamente, al estudio de los eritrocitos con antígenos D parciales de personas RhD positivas que pueden aloimmunizarse y producir anti-D.

El reactivo hemoclasificador monoclonal como producto terminado, debe cumplir los requisitos generales del control de calidad descritos para los hemoclasificadores policlonales, también debe cumplir con los requisitos de potencia, avidéz, especificidad, reproducibilidad, y el efecto de prozona para el hemoclasificador anti-D, en este último al evaluar la especificidad se investiga además la reacción con eritrocitos de las categorías D^{IV}, D^V y D^{VI}.

Estos reactivos, como cualquier otro producto, no están exentos de beneficios y riesgos, ventajas y desventajas, ellas son:

Ventajas

- No se producen reacciones positivas indeseadas debidas a la presencia de anticuerpos contaminantes (Anti-HLA, -LFA, -T), proteínas y virus.
- Cada monoclonal es una aglutinina directa, de una sola clase de inmunoglobulina (IgM, IgA o IgG), de una sola especificidad y avidéz.
- Pocos anticuerpos se producen mediante el uso de células B humanas inmortalizadas.
- Se dispone de cantidades de anticuerpos ilimitadas.
- Se producen reactivos estandarizados con poca variación de lote a lote.
- La especificidad de un único epítape puede revelar nueva información acerca de los antígenos de grupos sanguíneos.
- Se desarrollan reactivos altamente confiables aún cuando el AcMo posee una pequeña diferencia de especificidad.
- Se puede hacer una selección de los anticuerpos *a priori* por su potencia, avidéz y especificidad.
- La concentración de anticuerpos es la única fuente de variabilidad y esta puede medirse mediante diferentes métodos estandarizados (ELISA, Citometría...).
- La calidad del material crudo se puede certificar farmacéuticamente.
- El control de calidad es simple, así como, la ejecución de los ensayos en los que esté involucrado.
- No se necesita inmunizar y realizar plasmaféresis a donantes humanos.
- En Inmunoematología la producción de AcMo permitirá el desarrollo de nuevas generaciones de ensayos.

Desventajas

- La especificidad de un único epítape puede ser restrictiva para el tipaje, este problema en ocasiones puede resolverse con el uso de mezclas de AcMo.
- Algunos AcMo pueden fallar al aglutinar eritrocitos.
- Algunos AcMo pueden ser dependientes de la técnica (pH, temperatura, etc.).
- Algunos AcMo pueden tener reacción cruzada (define los epítapes compartidos de diferentes antígenos).
- El uso de sobrenadante de cultivo o fluido ascítico pueden resultar en

aparentes diferencias de especificidad.

- Debido a los dos aspectos antes mencionados algunos AcMo no son apropiados para los ensayos de adsorción-elución.

El desarrollo de métodos para la producción y obtención de AcMo humanos y murinos han permitido resolver, al menos parcialmente, los problemas del suplemento de plasmas ricos en anticuerpos y han mejorado la calidad y la estandarización de los reactivos usados en Inmunoematología.

Los hibridomas y AcMo no se utilizan únicamente para la producción de reactivos hemoclasificadores, ellos se aplican también en la identificación de marcadores fenotípicos únicos de tipos celulares particulares, en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y sistémicas, en el diagnóstico y terapia tumoral, en el control del rechazo de trasplante y en el control funcional de moléculas de superficie celular y secretadas.

Reactivos antiglobulínicos humano

En 1945, Coombs, Mourant y Race describieron una prueba para detectar anticuerpos Rh no aglutinantes en suero, posteriormente se utilizó la misma prueba para demostrar recubrimiento de anticuerpos y componentes del complemento sobre el hematíe *in vivo*. Esta prueba se conoce en la actualidad como prueba de antiglobulina o sencillamente prueba de Coombs en honor al investigador, la misma impulsó el desarrollo de la Inmunoematología y ciencias afines, y permitió el descubrimiento de varios sistemas de grupos sanguíneos.

El reactivo antiglobulínico humano o suero de Coombs, se obtiene al inmunizar animales con globulinas del suero humano, estas pueden ser inmunoglobulinas purificadas (IgG, IgM, IgA) y/o fracciones de complemento (C3b, C3d,...), produciéndose antiproteínas humanas en el suero animal, las que se purifican tras adsorción con eritrocitos humanos lavados que eliminan las aglutininas no deseadas.

Con este reactivo se demuestran anticuerpos eritrocitarios y/o complemento recubriendo hematíes *in vivo*, a esta prueba se le conoce como prueba de antiglobulina directa (PAD) o Coombs directo. Con la utilización de un panel eritrocitario se realiza la prueba de antiglobulina indirecta (PAI) o Coombs indirecto, al demostrar la presencia de anticuerpos libres en suero mediante la reacción antígeno-anticuerpo *in vitro*.

Los sueros antiglobulínicos se obtienen de forma policlonal y mediante la tecnología de hibridomas, ambos pueden ser poliespecíficos o monoespecíficos, los primeros contienen anticuerpos anti-inmunoglobulinas y anti-complemento, los segundos pueden ser monoespecíficos Anti-IgG, Anti-IgA, o Anti-IgM si no tienen actividad anti-complemento, o monoespecíficos Anti-C3d si no tienen actividad anti-inmunoglobulina.

El reactivo de Coombs en su evaluación como diagnosticador, debe cumplir

los requisitos generales descritos para los hemoclasificadores policlonales y con los requisitos de potencia, especificidad y reproducibilidad. Para el control de calidad los sueros antiglobulínicos se dividen en tres grupos, el grupo I está compuesto por los sueros antiglobulínicos poliespecíficos (anti-IgG, -C3 y en ocasiones -IgA), el grupo II lo integra el suero anti-IgG y el grupo III el suero anti-complemento (anti-C3).

Para la prueba de potencia de los reactivos de los grupos I y II deben utilizarse sueros anti-D y anti-Fy^a (clase IgG) de título 16 a 64 en la PAI. Los sueros de estos dos grupos y sus diluciones 1:2 y 1:4 deben aglutinar eritrocitos de grupo RhD positivos, Fy(a+b+) sensibilizados con la dilución 1:16, 1:32 o 1:64 (dependerá del título de los anticuerpos usados) de anti-D y anti-Fy^a. Los reactivos de los grupos I y III deben aglutinar eritrocitos recubiertos con C3b con título no menor que 4 y deben aglutinar eritrocitos recubiertos de C3d con un título no menor que 1 y reacción de 2+ de aglutinación. Los reactivos del grupo I con actividad anti-IgA deben aglutinar eritrocitos recubiertos de IgA con título no menor que 4.

En la prueba de especificidad los reactivos del grupo I no deben aglutinar eritrocitos recubiertos con C4d, los del grupo II no deben aglutinar eritrocitos recubiertos con C3b, C3d, C4d, y los del grupo III no deben aglutinar eritrocitos recubiertos de IgG y C4d. Los sueros antiglobulínicos no deben aglutinar ni hemolizar eritrocitos de los grupos A₁, B y O tratados con papaína, tampoco cuando se incuben muestras de estos grupos durante 30 minutos a temperaturas de 4°C, de 20 a 30°C y 37°C.

Los reactivos antiglobulínicos no deben aglutinar ni hemolizar, suspensiones de eritrocitos en salina y en solución de baja fuerza iónica (LISS), provenientes de 2 donantes de cada uno de los grupos A₁, B y O, las muestras deben colectarse del segmento de las unidades de sangre, que estén almacenadas entre 2 y 8°C durante 10 a 15 días. Así mismo no deben reaccionar en la PAI con los eritrocitos referidos anteriormente y el suero de 6 donantes. Los sueros de los donantes deben obtenerse antes de las 24 horas de realizarse el estudio, deben estar libres de anticuerpos irregulares y ser ABO compatibles con las muestras de los eritrocitos colectados.

La reproducibilidad se determina al realizar la PAI y la PAD en al menos 300 muestras de sangre de donantes, 5 muestras de pacientes AHAI y 5 muestras de pacientes con anticuerpos irregulares. Estos ensayos se deben realizar en paralelo con un producto de referencia.

Los reactivos antiglobulínicos junto a los hemoclasificadores monoclonales y policlonales, se aplican en la detección e identificación de anticuerpos, pruebas de compatibilidad, determinación de grupos sanguíneos, diagnóstico de AHAI, estudios de hemólisis inducida por fármacos, estudios de enfermedad hemolítica del feto y del recién nacido, investigación de reacciones transfusionales hemolíticas y conformación de paneles celulares.

Albúmina sérica bovina

La albúmina constituye el 60% del total de proteína presentes en el plasma, en

ese medio es la proteína de mayor talla (585 aminoácidos), sus funciones en el organismo son el establecimiento de la presión coloidosmótica para regular los volúmenes intra y extracelular, transporta sustancias como hormonas, fármacos, enzimas y toxinas, participa en el secuestro de radicales libres, regula el equilibrio ácido-base y se une a lípidos para formar lipoproteínas.

En Inmunohematología la reacción antígeno-anticuerpo puede medirse *in vitro* por diferentes técnicas como las pruebas de ELISA, de hemólisis, de inhibición de la aglutinación y de aglutinación, estas últimas son las más utilizadas. En las técnicas de aglutinación, si el anticuerpo que participa en la reacción antígeno-anticuerpo es de la clase IgG (molécula monomérica), necesita el concurso de otros agentes que faciliten su acercamiento al antígeno en los eritrocitos, estos agentes potenciadores de la aglutinación son las enzimas proteolíticas, los reactivos antiglobulínicos humano y la albúmina sérica bovina.

La obtención de albúmina a partir del plasma bovino se realiza, por tres vías, electroforésis, purificación por columna y termocoagulación. En la corrida electroforética se toma la banda de la albúmina, que posteriormente se electroeluye y en la purificación por columna de gel se purifica por peso molecular. Estos dos métodos son caros por ello se prefiere la termocoagulación a temperatura controlada de 70°C, a esta temperatura la albúmina termocoagula con un alto grado de pureza. Para su uso en Inmunohematología la albúmina debe polimerizarse con glutaraldehído, para formar un polímero de alto peso molecular.

La Albúmina sérica bovina como producto terminado, debe cumplir los requisitos generales descritos anteriormente. Los requisitos particulares que debe cumplir este tipo de reactivo son: concentración de 200 y 300 g/L para su uso en Inmunohematología, habilidad potenciadora de la reacción de aglutinación, los títulos de anticuerpos anti-D y anti-c obtenidos con la albúmina evaluada deben ser iguales o superiores a los obtenidos con una albúmina de referencia, las reacciones de aglutinación observadas con la albúmina evaluada deben ser iguales o mayores a las obtenidas con la albúmina de referencia y no debe provocar fenómeno de prozona.

En la prueba de falsos positivos la albúmina no debe provocar hemólisis ni fenómenos Rouleaux al ser añadida a eritrocitos de los grupos A₁, B y O; no debe presentar proteínas IgG, su ausencia se investiga por técnicas electroforéticas o por ensayos serológicos de inhibición de la reacción de anticuerpos anti-D, con el reactivo antiglobulínico humano poliespecífico; no debe presentar sustancias de grupos sanguíneos como A, B, Le^a y Le^b, esto se determina al realizar ensayos de inhibición de la aglutinación con eritrocitos y anticuerpos anti- A, -B, -Le^a y -Le^b; por último no debe presentar sustancias con actividad tipo neuraminidasa capaces de exponer el criptoantígeno T en los eritrocitos.

Sueros Raros

Controles positivos y negativos

Controles positivos con expresión heterocigota del antígeno

Debe realizarse el día de su uso

<u>ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPO</u>	<u>TITULO</u>
Anti-K,-k,-Jka,-Fya,-Cw.....	1+ a 1/8
Anti-S,-s,-P1,-M,-I,-e (salino)	
-c (salino),-A1.....	1+ a 1/4
Anti-U,-Kpa,-Jsa,-Fyb,-N,-Lea	
-Dia,-Mg,-Jkb,-Kpb,-Leb	2+ no diluido.

Se recomienda una prueba en porta, debe formarse un grumo de por lo menos 1mm 2, en el suero diluido y en el no diluido 1/2mm 2

Potenciadores y Enzimas

Potenciadores

Control negativo - cada día que se use

Enzimas

Las enzimas proteolíticas que se utilizan normalmente en las pruebas Inmunoematológicas son: **FICINA, PAPAINA, BROMELINA y TRIPSINA** . La mayoría de los laboratorios la comercializan ya lista para su uso, pero también se pueden preparar (en polvo).

Lo fundamental de controlar en una enzima es el pH, que es un factor crítico, y varía de una a otra y dichas alteraciones pueden hacer que una solución enzimática sea sensible o hipersensible.

Las soluciones enzimáticas concentradas listas para diluirse a los hematíes

ya tratados pueden congelarse.

Control positivo y negativo - pH

Anticuerpo Rh diluido

Anticuerpo Duffy

Hematíes Reactivos

Inspección visual

Hemólisis - Hto.

Cambio de color

Reactividad de los antígenos (M, P, Fya, Fyb) por almacenamiento

Cultivo del sobrenadante (alserver)

Pruebas con suero/plasma de pacientes o con un reactivo diluido

11.2 Definiciones

Anticuerpos irregulares. Anticuerpos contra los antígenos de los grupos sanguíneos diferentes al ABO.

Antígeno B adquirido. Eritrocitos de grupo A₁, que expresan el antígeno B por deacetilación del antígeno A; se encuentran en pacientes con antecedentes de carcinoma de colon o de infecciones gastrointestinales.

Avidez. Es el tiempo que media entre la mezcla del reactivo con los eritrocitos y la aparición de la aglutinación.

Categorías D. Variantes del antígeno D que carecen de algunos de los epítopes del antígeno.

Especificidad. La capacidad del producto para identificar correctamente las muestras carentes del antígeno en cuestión.

Fenómeno Rouleaux. Falsa reacción de aglutinación, donde los eritrocitos se agrupan en formación de "pilas de monedas".

Fenotipos A₁ y A₁B. Son los eritrocitos de grupo A y AB que reaccionan con anti-A₁, y no reaccionan con anti-H.

Fenotipos A₂ y A₂B. Son los eritrocitos de grupo A y AB que no reaccionan con anti-A₁ y reaccionan con anti-H.

D débil . Expresión débil del antígeno Rh₀(D), antiguamente conocido como D^u

Monoclonales. Son aquellos diagnosticadores obtenidos a partir de hibridomas secretores de anti-cuerpos monoclonales.

Policlonales. Son aquellos diagnosticadores obtenidos por inmunización a humanos o a animales con antígenos de los grupos sanguíneos.

Potencia. Es el recíproco de la mayor dilución del reactivo que provoca una reacción de aglutinación de 1+.

Prozona. Es el término usado para definir la ausencia o la presencia de aglutinaciones débiles en exceso de anticuerpos.

Reactivos albuminoideos. Son aquellos que requieren de la presencia de albúmina bovina para provocar la aglutinación de los eritrocitos.

Reactivos de bajo contenido proteico o salinos. Son los reactivos formulados con anticuerpos de la clase IgM y recomendados en las pruebas de aglutinación directa sin la adición de potenciadores de la aglutinación.

Reactivos químicamente modificados. Se refieren a anticuerpos de la clase IgG que se han sometido a tratamiento químico para provocar la aglutinación directa de los eritrocitos.

Salina. A los efectos de este documento es una solución isotónica que contiene de 8,5 a 9 g/L de cloruro de sodio y tiene un pH de 7,0 ± 0,2 a temperatura de 22 ± 1 °C.

Solución de baja fuerza iónica. Conocida por sus siglas en inglés LISS, es una solución que contiene 0,003 M de cloruro de sodio en un tampón fosfato 0,003 M de fosfato dibásico de sodio y fosfato monobásico de sodio y 0,2 M de glicina, de pH 6,7 a 22 ± 1 °C.

Sueros antiglobulínicos. Reactivos obtenidos por inmunización a animales con globulinas humanas y conocidos como suero de Coombs.

Suero control albuminoideo Rh-hr. Es un producto elaborado de forma similar a la de los reactivos anti-Rh, pero sin la actividad de anticuerpos. Se utiliza como control negativo.

Sueros hemoclasificadores. Son los productos utilizados en la determinación de los antígenos de los grupos sanguíneos eritrocitarios.

Suero fresco como fuente de complemento: Suero humano obtenido de donaciones de sangre y utilizado para este fin entre las 18 horas después

de la extracción.

Suero inerte: Suero ABO compatible con los eritrocitos que se mezclaran y que muestren reacción negativa en el pesquisaje de anticuerpos.

Pesquisaje de anticuerpos: Es la combinación de pruebas para la detección de anticuerpos eritrocitarios.

Identificación de anticuerpos: Es la combinación de pruebas diseñadas para determinar la especificidad de los anticuerpos

Recomendaciones generales para la realización de las pruebas serológicas

a) Grados de la reacción de aglutinación. Valores numéricos y puntuación que se le asignan a la intensidad de la aglutinación y se expresan de la siguiente forma:

4+: Aglutinación total de los eritrocitos en un sólo cúmulo grande en un fondo claro (Puntuación 12).

3+: Dos o tres aglutinados grandes en un fondo claro (Puntuación 10).

2+: Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo (Puntuación 8).

1+: Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo (Puntuación 5).

±: Pequeños aglutinados no definidos, que pueden resultar dudosos (Puntuación 3).

0: No aglutinación (Puntuación 0).

b) Número de frascos de reactivos a investigar

Para los reactivos se deberán investigar un mínimo de 3 frascos de cada lote. Si la realización de las pruebas excede el volumen de un frasco se mezclarán 2 o más frascos y corresponderán a uno.

c) Para los hematíes reactivos

Los hematíes pueden conservarse es estado líquido por un tiempo de 7 días si no se utiliza un medio especialmente formulado par su conservación. De conservarse en medios recomendados podrán utilizarse en el tiempo que esté validada su conservación en esa solución.

Los hematíes podrán conservarse congelados y después de descongelados se resuspenderán en soluciones conservadoras hasta el tiempo que esté validada su conservación en esa solución.

Los hematíes que se utilizarán para técnicas que requieran la fase de antiglobulina mostrarán reacción negativa en esta técnica.

Los hematíes para todos los ensayos de serología eritrocitaria se lavarán al menos dos veces en salina, a menos que el proceder especifique lo contrario. El sobrenadante del último lavado será transparente y libre de hemoglobina. Para la técnica de LISS se realizará un lavado adicional en LISS antes de

resuspenderse en esa solución. Los hematíes resuspendidos en LISS o salina se utilizarán únicamente hasta las 24 horas.

d) La centrifugación para la lectura de los ensayos serológicos

Después de la adición del reactivo antiglobulínico, se centrifugará el tubo entre los 15-30 segundos después de mezclados los reactantes.

Las centrifugaciones recomendadas son: 110g durante 1 minuto, 200g durante 30 segundos, 500g durante 15 segundos y 100g durante 10 segundos. En todas se obtienen resultados similares.

e) Lectura de los ensayos serológicos

En tubos:

Hemólisis. Se determinará por inspección visual de la hemoglobina en el sobrenadante.

Aglutinación. Se utilizarán estas variantes

Los tubos se ubicarán de forma vertical entre dos dedos y se agitaran suavemente con movimientos vibratorios hasta resuspender el botón.

Los tubos se ubicarán en un ángulo de 70-80° con respecto a la vertical y se rotarán suavemente sin agitación hasta que se resuspenda el botón (método de tip and roll).

En placas o láminas

Los reactantes se mezclarán por espacio de 30 segundos y ocasionalmente en el período de incubación.

En microplacas

En microplacas de fondo en U. Después de centrifugada a 100g durante 40 segundos, se resuspenderá el botón en un agitador . El tiempo óptimo se establecerá por la lectura de los controles.

En microplacas de fondo en V. Después de centrifugada, como se explicó anteriormente, se ubicará la placa en un ángulo de 70° con respecto a la horizontal . La reacción negativa se observa como el corrimiento de los hematíes a lo largo del pocillo y la reacción positiva como un botón en el fondo del pocillo.

CONTROL DE REACTIVOS:

A veces es difícil determinar con que frecuencia debe realizarse un control, teniendo en cuenta que los reactivos mediante su conservación y uso pueden sufrir modificaciones, un reactivo abierto y utilizado muchas veces en el día por distintos operadores debe controlarse mas frecuentemente que otro que se usa poco y/o es utilizado por una sola persona.

LOS PARAMETROS PARA TENER EN CUENTA SON:

- * *Al recibir un lote de reactivos, probar un frasco al azar y anotar su número de identificación.*
- * *Controlar cada día los frascos que tengan mas de 48 Hs. de abierto.*
- * *Si es necesario probar la calidad de un reactivo mientras se usa, si se sospecha contaminación o temperatura elevada.*
- * *Los sueros se deben probar sin diluir y en diluciones seriadas, o con una dilución única signada como punto final.*
- * *Registrar y archivar los resultados obtenidos.*
- * *Respetar las indicaciones de los fabricantes en cuanto a la conservación, duración y manipuleo de los reactivos.*
- * *Realizar controles paralelos entre los hematíes elegidos y su propio suero, para no confundir los resultados con rouleaux, contaminación bacteriana, Etc. no pertenecientes al reactivo en estudio.*

AL CONTROLAR UN REACTIVO HAY QUE TENER EN CUENTA:

ESPECIFICIDAD: Es la cualidad que le permite a un anticuerpo poder reaccionar con un determinado antígeno y no con otro.

AVIDEZ: Se mide por la extensión y rapidez con que un anticuerpo aglutina o reacciona con el antígeno correspondiente.

TITULO: Se determina con diluciones seriadas y corresponde a la Más alta dilución del suero, capaz de dar una aglutinación macroscópica de 1+.