



Últimas técnicas de fraccionamiento y nuevos componentes sanguíneos

Castrillo Fernández, Azucena*

La medicina transfusional se ha convertido en un campo multidisciplinario en el que tienen cabida los más recientes desarrollos tecnológicos, en convivencia con metodologías más clásicas.

El procesamiento de la sangre total (ST), para la obtención de componentes sanguíneos (CS) en el contexto general de la cadena transfusional -del donante al receptor-, ocupa una posición intermedia y, si bien se ha de contemplar como un eslabón más de la cadena, en los últimos años ha adquirido un protagonismo especial dado que se han incorporado algunos sistemas y procesos de modificación y tratamiento que afectan a los CS. Diversos grados de automatización están presentes en este campo, hasta no hace mucho tiempo eminentemente manual, casi artesanal. Este hecho implica que la producción de componentes tiene un matiz dinámico, en el sentido de que cada vez que se introduce o implanta una nueva tecnología o cambio requiere el chequeo de parámetros funcionales, así como una valoración amplia en términos de seguridad transfusional, tema que preocupa a la administración sanitaria y a la sociedad en general.

La capacidad de separar los CS de la sangre total marcó un hito en el tratamiento transfusional, creándose el concepto de "hemoterapia de componentes". Poder obtener tres CS a partir de una sola donación, significa que se pueden beneficiar diferentes pacientes. De este modo se racionaliza el uso de un bien escaso, los pacientes reciben sólo el CS necesario y se reduce el riesgo de reacción transfusional.

Los avances en esta área, tales como procedimientos de leucodepleción, nuevas tecnologías en la preparación de CS o inactivación de patógenos, forman parte de la rutina de trabajo en los centros de transfusión (CT), requiriendo el apoyo de la automatización e informatización debido a que se procesa un gran número de donaciones.

Situándonos en nuestro medio, desde hace más de dos décadas podemos obtener de manera

"semiautomática" tres CS a partir de ST: dos productos finales [concentrado de hemáties (CH) y plasma (PF)] y un producto intermedio [capa leucoplaquetaria o buffy coat (BC)], fuente del concentrado de plaquetas (CP).

Con el fin de establecer una secuencia lógica en la exposición, se comentarán los distintos pasos en la obtención de CS. Se hará referencia a dispositivos, equipos y/o material utilizados que inciden directamente en el objetivo que se persigue, que consiste básicamente en disponer de CS que mantengan la viabilidad y funcionalidad adecuada hasta el momento de la transfusión. Destacar la importancia de que en su procesamiento y potenciales tratamientos no se produzcan cambios físicos o funcionales que afecten a la calidad del CS y no se añadan efectos no deseables.

Sistema de bolsas para la recogida de ST

La elección de la configuración de la bolsa está sujeta a algunos condicionantes como el tipo de fraccionador y la demanda de plaquetas (PQ). Hoy en día se dispone de diseños de bolsas a la carta.

La elección del **tipo de plástico** de las bolsas se basará en el grado de permeabilidad para la difusión de los gases, hecho de gran transcendencia en el almacenamiento de las plaquetas, ya que la falta de O₂ estimula la glicólisis anaerobia, con el consiguiente aumento de ácido láctico y disminución del pH.

Las bolsas están compuestas de láminas de PVC (cloruro de polivinilo) y un plastificante que puede ser: a) DEHP (di-etil-hexil-ftalato), que confiere estabilidad a la membrana del hematíe (GR) y reduce la hemólisis. b) TEHTM [tri-(2-etil-hexil)-trimelitato], que no tiene efecto estabilizante sobre la membrana pero proporciona un buen recambio gaseoso. c) BTHC (butiril-trihexil-citrato), que cumple los dos criterios de buen estabilizador de membrana y facilitador de un óptimo intercambio gaseoso.

*Hematólogo. Responsable de Fraccionamiento. Centro de transfusión de Galicia. Santiago de Compostela. España. Azucena.Castrillo.Fernandez@sergas.es.

Tipo de anticoagulante

El más utilizado y que aporta más ventajas es el CPD (ácido cítrico, citrato de sodio, fosfato y dextrosa). Por una parte, el citrato quela el calcio y evita la coagulación de la ST, mientras que los otros componentes actúan sobre el metabolismo celular; así, el ácido cítrico aporta hidrogeniones, para evitar la alcalinización de los GR a 4°C; la dextrosa aporta energía para mantener las funciones de transporte de la membrana; la concentración de citrato también influye en el valor del pH de los CP. Se ha probado CPD a menor concentración, 0.5 CPD (citrato 8 mM en vez de 20 mM), con el fin de obtener mejores rendimientos en FVIII, y hacer más lento el descenso del 2,3-DPG (metabolito intermedio del metabolismo de la glucosa, que modula la afinidad de la hemoglobina por el O₂). Si la concentración de citrato es menor de 8 mmol, cabe la posibilidad de formación de fibrina en los CS. La formulación de 0.5 CPD no se ha introducido en la rutina, en parte por la no aceptación de las empresas fraccionadoras del plasma. La cantidad de anticoagulante necesaria para extraer un volumen de 450 ml $\pm$ 10% de ST debe guardar una proporción de 1 a 7.

Soluciones aditivas (SA) o nutrientes

Deben incorporarse a los CH o CP cuando se haya completado el fraccionamiento ya que, en caso contrario, la mayor parte se retiraría junto con el plasma.

Las SA empleadas en los CH deben reunir algunas premisas como:

- proporcionar estabilidad a la membrana de los GR y así prevenir la hemólisis
- aportar nutrientes (glucosa, adenina, etc.) y evitar el descenso de 2,3 DPG, y
- que la recuperación postransfusional sea mayor del 75%.

La SA más utilizada en nuestro medio es el SAG-M (solución salina-adenina-glucosa y manitol, 100 mL). Cabe citar otras como AS-1 (Adsol®, con más concentración de adenina y glucosa que el anterior); otras como AS-3 (Nutricel®, que añade fosfato y citrato) o AS-5 (Optisol®), permiten el adecuado almacenamiento de los hematíes durante 42 días. Con el Erythro-Sol 2 se introducen cambios en el pH y en el volumen para mejorar los niveles de ATP y 2,3-DPG.

En cuanto a las SA añadidas a los CP, señalar que desde 1980, se ha ido extendiendo su uso, (platelet additive solution –PAS–). Su utilización aporta algunas ventajas como: a) Evitar la transfusión de grandes volúmenes de plasma y así evitar reacciones adversas y sobrecarga circulatoria. b) Mejorar las condiciones de almacenamiento, manteniendo la viabilidad y función hemostática de las PQ. c) Recuperar plasma para obtener derivados plasmáticos. d) La SA es un medio apropiado para la aplicación de técnicas de reducción de patógenos.

Los componentes clave a considerar en una SA son:

1) **El acetato**, que sirve de sustrato metabólico pero no reemplaza a la glucosa. Otro efecto importante es su capacidad para formar bicarbonato, ayudando a mantener el pH estable durante el almacenamiento.

2) **El citrato**, preferiblemente a concentraciones bajas para evitar la producción de lactato y con ello una caída del pH. El nivel mínimo debe ser 8 mmol/L.

3) **El fosfato**, cuya presencia tiene dos acciones principales. Por una parte actúa como buffer y por otra ayuda a mantener los niveles de nucleótidos de adenina. Es componente del PAS III o InterSol.

4) **Potasio y magnesio**, que tienen una influencia positiva en el metabolismo de las PQ, disminuyendo la activación y mejorando el mantenimiento del pH. La solución PAS III-M (modificado), el Composol y la solución SSP plus, tienen potasio y magnesio en su composición.

La **glucosa** aportada por el plasma es un sustrato insustituible. En el CP final debe estar en una proporción aproximada del 35%, nunca inferior al 30%. Últimamente se ha vuelto a intentar la adición de glucosa a la SA, y ya se han comunicado las primeras experiencias clínicas con la solución M-sol, que parece preservar las PQ a largo plazo.

Filtros. En nuestro entorno está aceptada mayoritariamente la filtración prealmacenamiento, que va a proporcionar CS leucodeplecionados, con menos de 1 millón de leucocitos. Según la configuración de la bolsa, podemos filtrar la bolsa de ST o filtrar los CS individualmente. La mayoría de los filtros de ST que se utilizan retienen las PQ, pero ya existen en el mercado filtros que no lo hacen, permitiendo una recuperación importante de las mismas. La composición física de los filtros suele ser de fibras de celulosa o poliuretano. Tratamientos adicionales (técnicas de inmunoabsorción, ligandos) les va a conferir propiedades peculiares en cuanto a la capacidad de retención.

La temperatura a la que permanece la ST hasta su fraccionamiento es de suma importancia e incluso ha sido tema de algún Forum internacional. La temperatura a la que permanece la ST debe permitir obtener los 3 CS en condiciones óptimas, y poder alargar el periodo de fraccionamiento tiene importantes implicaciones logísticas. En 1989, Pietersz y cols de la Cruz Roja holandesa demostraron que el enfriamiento de la ST en 2-3 horas a 22 $\pm$ 2°C mediante unidades refrigerantes de 1,4 butano diol (cera no tóxica, que se licúa a 20°C) presentadas en contenedores herméticos, permitía diferir el fraccionamiento en 18-24 horas sin efectos negativos en la tasa de FVIIIc ni del ATP intracelular de GR, y los rendimientos de plaquetas eran correctos. La normativa europea admite este tipo de almacenamiento prolongado y ello ha permitido una mejor estrategia de fraccionamiento y una buena estandarización del proceso. Desde 1989 hasta la actualidad ha habido múltiples publicaciones que avalan los buenos resultados alcanzados con esta estrategia, e incluso algunos autores comunican aceptables resultados hasta con 72 horas de demora en el procesamiento de la ST. Los resultados de otros estudios, que procesan la ST sin

enfriamiento activo y la mantienen 24 horas en ambiente de 22°C, señalan la obtención de CS de calidad similar a los obtenidos con la pauta del sobreenfriamiento.

Centrifugación

Aplicar unas condiciones óptimas de centrifugación (fuerza, perfil de aceleración y freno, tiempo, temperatura) va a determinar que la separación de los CS sea la más idónea y aporte la mayor rentabilidad en términos de recuperación. La sedimentación de las células muestra correlación con su tamaño, flexibilidad de la membrana celular y viscosidad del medio (dependiente de la temperatura). Cada centro debe chequear varios procesos por cada centrifuga y establecer el programa más adecuado para conseguir CH con un valor de hematocrito adecuado, cierto volumen de plasma y un buen rendimiento de plaquetas.

Fraccionadores

Existen en el mercado varios tipos, con prestaciones muy similares. Básicamente presentan un diseño con una plataforma principal donde se colocan las bolsas -principal y satélites- y los tubulares. La presión ejercida por una prensa sobre la bolsa principal desplaza el *plasma* a una de las bolsas satélites. La fuerza o los pasos de prensa son configurables. La existencia de sensores o fotocélulas que detectan cambios de color hace que se activen ciertas válvulas que abren o cierran clamps, regulando el flujo del CS desplazado a las diferentes bolsas. Dependiendo de la configuración de la bolsa, la prensa continua exprimiendo el *BC* (en la configuración de salida superior) o el *CH* (en la configuración de salida superior e inferior). Estos dispositivos pueden pesar los CS, sellar los tubulares y hacer registros del número de unidad, la identificación del operador y las incidencias del proceso.

Hay alguna experiencia reciente con un nuevo sistema que procesa unidad a unidad y que combina en un solo paso la centrifugación y separación, obteniendo tres CS finales: plasma, CH y un pequeño volumen de plasma rico en plaquetas (PRP).

Dispositivos de conexión en estéril

Permiten mantener los circuitos cerrados, por lo que el trasvase del contenido de las bolsas no va a afectar a la caducidad final del producto. Sin lugar a dudas, es un dispositivo de gran importancia en los laboratorios de preparación de componentes y en general en la medicina transfusional.

Armario incubador / agitador para plaquetas

Existen diseños que permiten la colocación de nu-

merosas unidades y están dotados de dispositivos que registran continuamente la temperatura, con conexión a sistemas centrales y alarmas que se activan cuando la temperatura está fuera del rango establecido. También aseguran unos parámetros de agitación (aproximadamente 70 ciclos/minuto) durante todo el período de almacenamiento.

Congelador rápido del plasma

Su objetivo es preservar los factores de la coagulación, debiendo conseguir la congelación de todo el cuerpo de la bolsa por debajo de -30°C en menos de 1 hora. Los equipos existentes utilizan sustancias refrigerantes especiales o consiguen un sobreenfriamiento por métodos mecánicos o a través de nitrógeno líquido.

Selladores de tubulares

Consiguen sellados permanentes y bien definidos. Hay selladores de tamaño pequeño para poder desplazarlas a cualquier área.

Equipos automáticos para la obtención de pool de plaquetas [o concentrado de plaquetas mezcla (CPM)] a partir de 4-5 BC

En los últimos 4 años se dispone de manera bastante generalizada en los CT de estos equipos, que llevan a cabo el lavado de los BC con la SA, así como la centrifugación y trasvase del PRP a través del filtro a la bolsa final. La automatización de las fases de este proceso reduce errores de manipulación y permite una mayor reproducibilidad y estandarización. Conviene señalar que la obtención manual del CPM, usando un equipo de bolsas con filtro, un programa de centrifugación adecuado y placas expresoras del PRP, consigue una óptima recuperación de PQ.

Equipos de almacenamiento de los CS

Refrigerador con temperaturas de trabajo de $4 \pm 2^\circ\text{C}$; congelador de almacenamiento a -30°C ; agitador de plaquetas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Cada equipo estará provisto de un registro de temperatura y deberá tener alarmas, que se activarán y serán audibles siempre que la temperatura esté fuera del rango establecido.

Control del equipamiento

Es un aspecto muy importante, ya que en la medida que se lleve a cabo correctamente vamos a disponer de "buenos" CS, tanto desde el punto de vista cuantitativo como del cualitativo. Sin entrar en detalles de

cada equipo y/o dispositivo, como regla general es preciso tener un procedimiento escrito en el que figure la identificación y propósito de los mismos, y deben estar pautados los calendarios de calibraciones, verificaciones, ajustes y otras potenciales actuaciones, según las características y propiedades de los equipos.

Asumiendo que trabajamos en unas condiciones estándar en relación a la metodología y utilización de medios –equipos y otro tipo de material- en la línea que se ha expuesto, los CS que obtenemos cumplen los criterios de calidad establecidos por la normativa estatal (Real Decreto 1088/2005 -BOE 225 del 20/09/2005-) y la Guía del Consejo de Europa (CE) 14ª edición.

Podemos decir que las especificaciones requeridas para cada CS se centran fundamentalmente en valores cuantitativos. Es más difícil chequear los aspectos cualitativos y en ocasiones éstos requieren estudios in vivo –supervivencia y recuperación transfusional-.

En cuanto al chequeo, es importante que cada centro establezca el número de unidades a estudiar, con el fin de asegurar que un porcentaje importante, por ejemplo el 90% de los CS, cumplen las recomendaciones con un 95% de confianza. Esto nos permitiría detectar desviaciones de la media y procesos fallidos, y en consecuencia adoptar medidas de corrección o asumir trabajar con un nivel de exigencia más bajo. En cuanto a las PQ, algunos países recogen en su normativa los parámetros que se deben chequear cuando se introduce un nuevo producto o se hacen cambios significativos en el proceso. En nuestro centro se realizan estudios de activación (CD62, Annexina V), de parámetros de metabolismo (glucosa, lactato, pH), de agregación plaquetaria y en la actualidad se está implementando la determinación de algunos mediadores bioactivos, todo ello con el fin de conocer el comportamiento de los CP producidos y chequear nuevos productos como CP tratados con técnicas de reducción de patógenos.

Probablemente la producción de CS con la dinámica actual, en lo referente a recuperación celular y proteínas se sitúa, si no en la cima, muy cerca de ella. El nivel conseguido va a permitir pocos cambios en términos de ganancia neta (cuantitativa), pero sí que serán posibles mejoras cualitativas en los CS. Esto podría lograrse a través de optimizar algunas condiciones de su preparación y almacenamiento, con el fin de disminuir la lesión de almacenamiento en GR y PQ y conseguir que la recuperación de proteínas sea buena y estable. En el caso de la producción de derivados del plasma, será la industria la que deberá aportar su cuota de mejora.

En la exposición se hará un breve comentario de cada uno de los componentes que se distribuyen en la actualidad y de otros que potencialmente se puedan incorporar en un futuro.

En resumen

✓ Se han alcanzado altos porcentajes de recuperación celular y de proteínas en los CS obtenidos a par-

tir de la ST usando la tecnología actual.

✓ Para mejorar la calidad y seguridad de los CS se han implementado en los últimos años varias estrategias que siguen vigentes, como la utilización de nuevos plásticos, SA o tecnologías de filtración y de reducción de patógenos.

✓ Se van conociendo algunos resultados adversos en relación con la transfusión de CS, lo que hace necesario el análisis e investigación de estos hechos, sin perder la perspectiva del beneficio incuestionable que ha supuesto en las últimas décadas la transfusión de componentes. Para acometer tales estudios es imprescindible la aportación de la investigación básica y el diseño de ensayos clínicos controlados y aleatorizados.

✓ Nuevas estrategias u otros cambios adicionales serán de fácil implantación si el grado de evidencia en que se apoya la tecnología utilizada es alto, si los costes de tal intervención son razonables, si el impacto sobre el número total de donantes es pequeño y si la organización logística se afecta mínimamente. La aceptación final tendrá más valor si las premisas anteriores están avaladas por propuestas internacionales de consenso.

Referencias

1. Högman CF, Erikson L, Gong J, et al. Half-strength citrate CPD combined with a new additive solution for improved storage of red cells suitable for clinical use. *Vox Sang* 1993; 65: 271-8.
2. Högman CF, Knutson F, Löf H, et al. Improved maintenance of 2,3 DPG and ATP in RBCs stored in a modified additive solution. *Transfusion* 2002; 32: 824-9.
3. Hess JR, Greenwalt TG. Storage of red blood cells: new approaches. *Transfus Med Rev* 2002; 16: 283-95.
4. Reesink HW, Hanfland P, Herfelder HJ, et al. International forum. What is the optimal storage temperature for whole blood prior to preparation of blood components. *Vox Sang* 1993; 65: 320-7.
5. Wilsher C, Garwood M, Sutherland J, et al. The effect of storing whole blood at 22°C for up to 24 hours with and without rapid cooling on the quality of red cell concentrates and fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2008; 48: 2338-47.
6. Yoshida T, AuBuchon JP, Tryzelaar L, et al. Extended storage of red blood cells under anaerobic conditions. *Vox Sang* 2007; 92: 22-31.
7. Koch CG, Li I, Sessler DI. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med* 2008; 358: 1229-39.
8. Bosman GJCGM, Werre JM, Willekens FL, et al. Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfus Med* 2008; 18: 335-47.
9. Dzik W. Fresh blood for everyone? Balancing availability and quality of stored RBCs. *Transfus Med* 2008; 18: 260-5.
10. Gulliksson H. Additive solutions for the storage of platelets for transfusion. *Transfus Med* 2000; 10: 257-64.
11. Gulliksson H, AuBuchon JP, Vesterinen M, et al. Storage of platelets in additive solutions. A pilot study of the effects of potassium and magnesium. *Vox Sang* 2002; 82: 131-6.
12. Hirayama J, Azuma H, Fijihara M, et al. Storage of platelets in a novel additive solution (M-sol), which is prepared by mixing solutions approved for clinical use that not especially for platelet storage. *Transfusion* 2007; 47: 960-5.
13. Sweeney J. Additive solutions for platelets: is it time for North America to go with the flow? *Transfusion* 2009; 49: 199-201.

14. Wandall HH, Hoffmeister KM, Sorensen AL, et al. Galactosylation does not prevent the rapid clearance of long-term, 4°C stored platelets. *Blood* 2008; 111: 3249-56.
15. Blumberg N, Gettings KF, Turner C, et al. An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse reactions to platelet transfusions. *Transfusion* 2006; 46: 1813-21.
16. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007; 21: 157-71.
17. Högman CF, Knutson F. Standardized units of RBCs: Is it time for implementation? *Transfusion* 2000; 40: 330-4.
18. Sher GD, Devine DV. The consensus development process in transfusion medicine: does it add value? *Transfusion* 2007; 47: 2176-9.
19. Zimrin AB, Hess JR. Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells. *Vox Sang* 2009; 96: 93-103.
20. Shubert P, Devine DV. The application of proteomics to blood banking. *Vox Sang* 2008; 3: 30-6.

