



MICROPLACAS:
SU APLICACIÓN EN
INMUNOHEMATOLOGÍA
BÁSICA DE BANCO
DE SANGRE

Dra. Elena Franco
Directora Banc de Sang de Balears

**MICROPLACAS:
SU APLICACIÓN EN
INMUNOHEMATOLOGÍA
BÁSICA
DE BANCO DE SANGRE**

Dra. Elena Franco
Directora Banc de Sang de Balears
Palma de Mallorca

Editado por cortesía de:



Ortho-Clinical Diagnostics

a *Johnson & Johnson* company

© Elena Franco

Reservados todos los derechos

El contenido de esta obra no puede ser reproducido ni transmitido total o parcialmente de forma alguna, por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo la fotocopia y la grabación, ni mediante cualquier sistema para conservar o recuperar información, sin la autorización escrita del titular del copyright

2ª Edición 1998

Depósito legal: M-45017-1998

Editado por ENE EDICIONES - Pº de la Habana, 204 - 28036 Madrid

Dirigido por:

Dra. ELENA FRANCO

Directora del Banc de Sang de Balears
Palma de Mallorca.

Coordinación:

Dra. MATILDE SEDEÑO

Jefe de Sección
Banc de Sang de Balears. Palma de Mallorca.

Autores:

ELENA FRANCO

Directora del Banc de Sang de Balears
Palma de Mallorca.

EDUARDO MUÑIZ

Médico Adjunto. Servicio de Hemoterapia
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

JULIA MAS

Doctora en Biología
Ex Adjunto.
Banc de Sang de Creu Roja. Barcelona.

NEUS BOTO y SERGI ESCRICH

Diplomados en Enfermería. Laboratorio de Inmunoematología
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

MATILDE SEDEÑO

Jefe de Sección
Banc de Sang de Balears. Palma de Mallorca.

ÍNDICE

PRÓLOGO	7
INTRODUCCIÓN	9
1. USO DE LAS MICROPLACAS	11
1.1. Equipamiento necesario	12
1.2. Consideraciones técnicas	19
1.3. Cuidados especiales para su uso	20
1.4. Preparación de las microplacas de forma previa a su utilización	20
1.5. Reutilización de las microplacas: Lavado	21
1.6. Microplacas con antígeno o anticuerpo prefijado.....	21
2. REACTIVOS: CONDICIONES QUE DEBEN CUMPLIR.....	23
2.1. Preparación de los reactivos y diluyentes	24
2.2. Suspensiones celulares	24
2.3. Enzimas	24
2.4. Hematíes.....	24
3. CENTRIFUGACIÓN DE MICROPLACAS.....	25
4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	27
4.1. Microplacas en U	27
4.2. Microplacas en V	27
4.3. Lectura de las microplacas en U por métodos automáticos	28
5. SOLUCIONES Y REACTIVOS MÁS UTILIZADOS EN INMUNOHEMATOLOGÍA.	29
5.1. Solución salina fisiológica	29
5.2. Soluciones de albúmina bovina	29
5.3. Soluciones de enzimas proteolíticas	30
5.4. Soluciones de baja fuerza iónica (LISS).....	31
5.5. Antisueros específicos.....	33
5.6. Reactivo antiglobulina humana.....	34

5.7. Hematíes reactivo.....	38
5.8. Polybrene.....	38
5.9. Polietilenglicol (PEG).....	38
5.10. Conservación de los reactivos usados para pruebas en microplacas.	39
6. DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DE LOS ANTISUEROS.	41
7. REACCIÓN SEROLÓGICA DE AGLUTINACIÓN.....	43
7.1. Factores que influyen sobre sus dos fases	47

2ª parte
DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS:
Procedimientos Manual y Automatizado

8. LA AUTOMATIZACIÓN DEL PROCESO EN MICROPLACA.	51
9. DETERMINACIÓN DEL GRUPO ABO Y Rh EN MICROPLACA	53
10. PRUEBA D ^u EN MICROPLACA	57
11. FENOTIPO Rh EN MICROPLACA	61
11.1. Microplacas en U	62
11.2. Microplacas en V	64
12. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES EN MICROPLACA.....	67
13. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTILUÉTICOS (RPR y TPHA) EN MICROPLACA	73
14. TIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS ERITROCITARIOS CON POLYBRENE. TÉCNICA EN MICROPLACA.	77
15. INVESTIGACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTIPLAQUETARIOS EN MICROPLACA POR TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA	81
15.1. Investigación de anticuerpos antiplaquetarios en fase sólida	89
16. BIBLIOGRAFÍA.....	93
17. TABLA DE CONVERSIÓN DE “r.p.m.” EN “g” Y VICEVERSA ..	95

PRÓLOGO

*L*as técnicas en microplacas aplicadas al campo de la transfusión han supuesto mejoras cruciales en el campo del laboratorio de inmunohematología que, en su mayoría, permanecen actuales. Las microplacas han aportado sencillez, posibilidad de automatización y un enorme ahorro de costes. Sin embargo, si en serología viral las microplacas se hicieron de inmediato insustituibles, en inmunohematología debieron ser resueltos diversos problemas antes de que se generalizasen. Estos problemas estaban relacionados, sobre todo, con la calidad de los lectores, con la disponibilidad de herramientas informáticas para interpretar las aglutinaciones y con la posibilidad de transferir los resultados a una unidad central.

Todos estos problemas están hoy satisfactoriamente resueltos y ello, unido al avance conseguido en la versatilidad de los dispensadores, hace que la totalidad de las técnicas básicas de inmunohematología sean realizables en microplacas con muchas ventajas sobre otras técnicas, sobre todo por su bajo coste en reactivos y en consumibles.

Por eso, este manual dirigido por la Dra. Franco ha tenido una justificada aceptación y seguirá teniéndola en el futuro. Esta 2ª edición hace más énfasis que la previa en la automatización de los procedimientos, aunque conserva las técnicas manuales e incluye los avances habidos en los temas tratados.

Con toda seguridad, serán muchos los profesionales de habla española que seguirán encontrando muy útil un texto tan claro y práctico, y la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea agradece su escritura a todos sus autores, porque contribuirá a que realicemos mejor nuestro trabajo.

*Dr. Antonio Fernández Montoya
Presidente de la Sociedad Española
de Transfusión Sanguínea*

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN A LA PRIMERA EDICIÓN

Las técnicas en microplaca representan un eslabón intermedio entre las técnicas automatizadas y las técnicas manuales convencionales.

Teniendo en cuenta las características de la reacción, las microplacas aportan un considerable ahorro en tiempo de técnico, de reactivo, de material fungible, etc., y al mismo tiempo proporcionan una sensibilidad igual o mayor a las técnicas en tubo.

El esfuerzo que para nuestro Banco de Sangre supuso la estandarización y puesta en funcionamiento de estas técnicas en la rutina diaria y los buenos resultados obtenidos nos hizo pensar en la utilidad de ofrecer, bajo el patrocinio de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea, un curso sobre el uso de las mismas.

El presente manual, basado en nuestra experiencia personal, nace como recopilación del contenido del curso, con la participación de los mismos técnicos que como profesores participamos en él y se ha puesto especial cuidado en recoger todas las cuestiones que consultaron los asistentes al mismo. Tómesele el lector como una orientación que le sirva para encontrar su propia experiencia óptima.

Estaremos satisfechos si resulta útil para aquellos técnicos que se sientan interesados por este tipo de técnicas.

Dra. Elena Franco Cama
1993

INTRODUCCIÓN A LA SEGUNDA EDICIÓN

Ante la 2ª edición de este Manual debo hacer referencia especial a la generalización que de esta metodología ha tenido lugar en estos últimos años.

La facilidad de automatización que presentan que va desde el montaje de las técnicas hasta la interpretación de resultados ha sido fundamental en su difusión. Hoy en día, cuando la gestión informática de los bancos de sangre es casi una necesidad, tiene especial consideración el modo de asegurar tanto la realización correcta de las técnicas como la transmisión de datos directamente a la unidad central evitando posibles errores humanos.

Me siento satisfecha de que esta nueva edición haya sido solicitada por los destinatarios de la misma.

Dra. Elena Franco Cama
Julio de 1998

Nuestro agradecimiento a Ortho-Clinical Diagnostics que ha hecho posible esta 2ª edición.

1. USO DE LAS MICROPLACAS

*Elena Franco
Matilde Sedeño*

La introducción de las microplacas en Banco de Sangre tuvo lugar en la década de los 60, siguiendo las técnicas desarrolladas por Crawford, Gottman y Gottman. Han ido con posterioridad experimentando una gran aceptación debido a las ventajas que presentan sobre los métodos convencionales, siendo una muy buena alternativa para procesar gran número de muestras sin el costo que supone la automatización. Además, permiten ir adoptando una automatización progresiva a elección del usuario.

Una microplaca puede considerarse como una gradilla de 96 tubos de pequeño tamaño, con un volumen que oscila entre 200 y 300 microlitros, dispuestos a lo largo de 8 filas horizontales y 12 verticales. Son 96 pocillos cuyo fondo puede ser en U, V o plano.

Las microplacas pueden ser rígidas o flexibles. La elección del tipo depende de la preferencia y experiencia personal del técnico. No obstante, las más utilizadas son las rígidas y con pocillo en U, debido a que éstas permiten tanto la lectura macroscópica como por medio de lectores automáticos.

Entre las ventajas del uso de las microplacas respecto a las técnicas en tubo podemos subrayar las siguientes:

- Igual o superior sensibilidad.
- Ahorro de reactivo debido a las pequeñas cantidades que se precisan y a que se utilizan generalmente diluidos.
- Necesidad escasa de equipamiento especial.
- Rapidez en la ejecución con ahorro de tiempo del técnico.
- Reducción considerable de material de laboratorio.

- El trabajo en micrométodo exige un especial cuidado de los detalles técnicos, (volumen de muestra, reactivos) lo que facilita la estandarización.
- Posibilidad de semiautomatización o automatización.

Las técnicas en microplacas pueden usarse tanto para la detección de antígenos en los hematíes como de anticuerpos en el suero.

Además de su uso en las técnicas virológicas que no son motivo de éste texto, en la actualidad, en Banco de Sangre, podemos utilizar las microplacas en:

- Determinación del sistema ABO
 - hemático
 - sérico
- Determinación del sistema Rh:
 - fenotipo Rh
 - prueba D^u
- Determinación de otros antígenos eritrocitarios.
- Escrutinio e identificación de anticuerpos irregulares.
- Titulación de anticuerpos, reactivos etc.
- Anticuerpos antiplaquetares y HLA.
- Serología luética (RPR, TPHA).

1.1. EQUIPAMIENTO NECESARIO

Las técnicas en microplacas pueden realizarse de forma manual, automatizada o parcialmente automatizada.

Dependiendo del procedimiento de trabajo el equipamiento va a variar.

A) Procedimiento manual:

Además de las microplacas más idóneas para la técnica a desarrollar, es necesario contar con una centrífuga (Figs. 1 y 2) en cuyo rotor se puedan adaptar soportes para microplacas. Es imprescindible que permita realizar centrifugados suaves sin excesivas vibraciones.

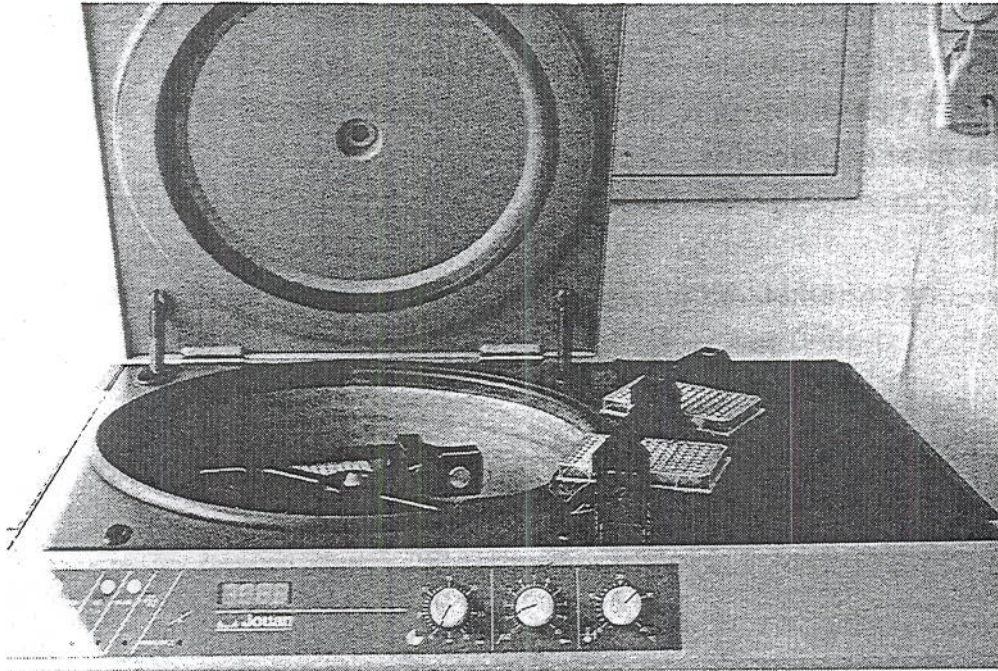


Figura 1.

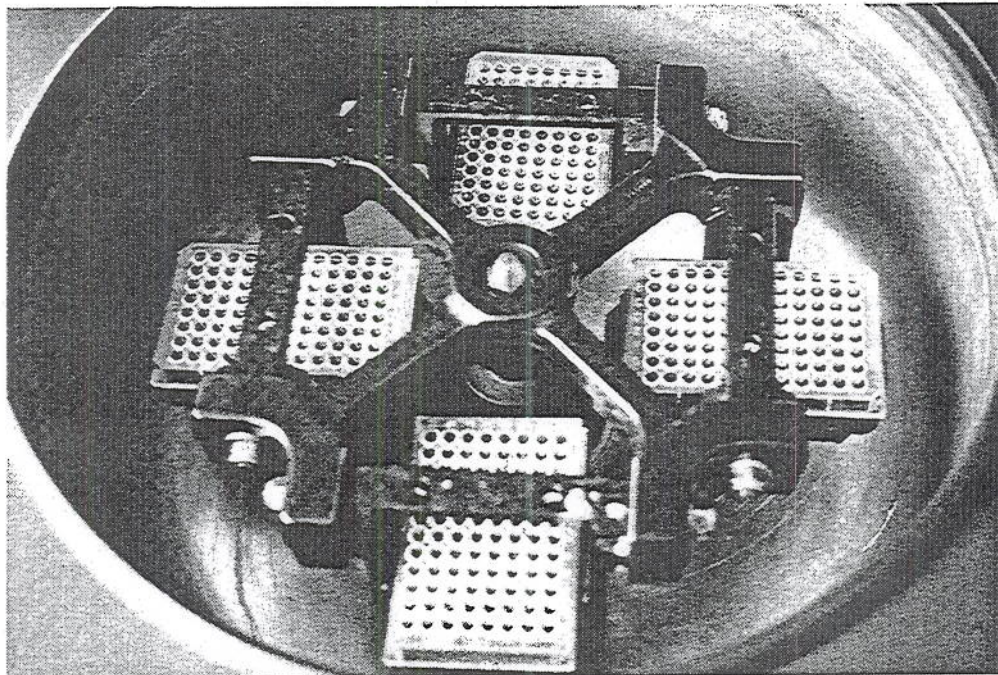


Figura 2.

Pipetas semiautomáticas (Fig. 3) para dispensar volúmenes iguales en pocillos o filas (monocanales, multicanales o repetidoras).

Agitador para microplacas (Fig. 4), que permite regular las revoluciones y el tiempo de agitación.

Visor con espejo de aumento y dispositivo de iluminación posterior.

Para determinadas técnicas será necesario un incubador para 37°C, tipo calor seco o baño maría.

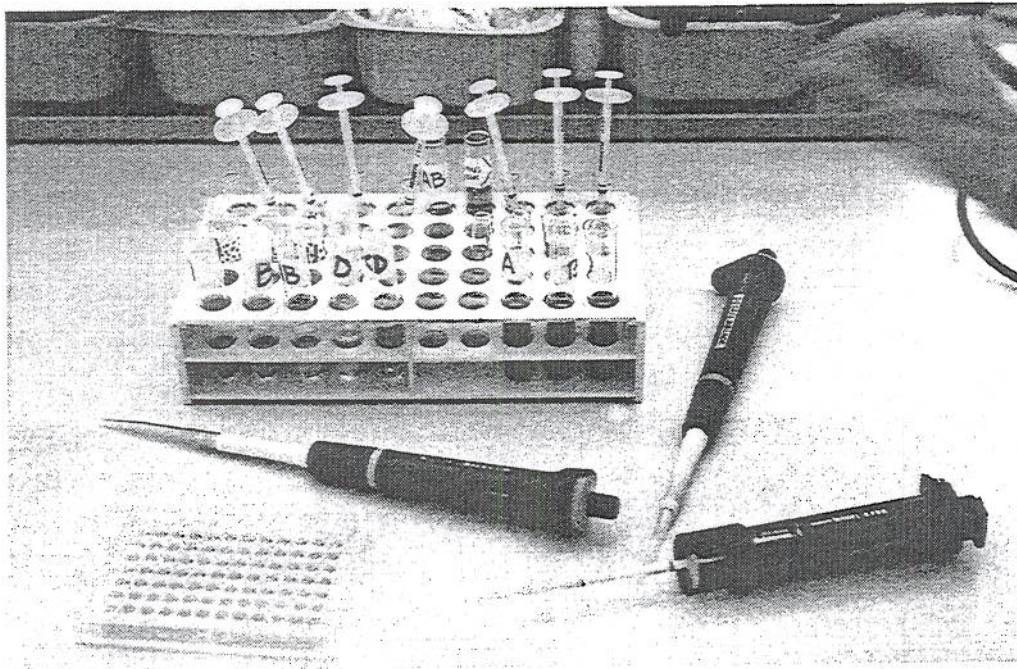


Figura 3.

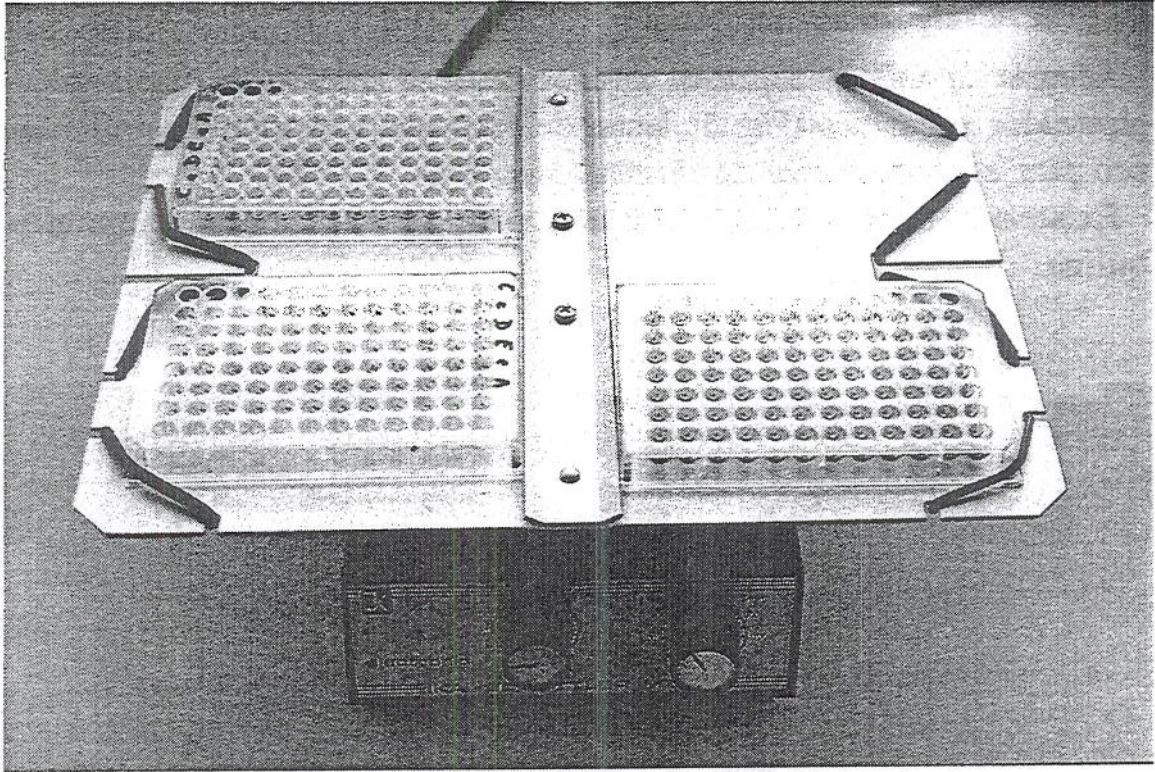


Figura 4.

B) Procedimiento automatizado:

Además de todo lo expuesto anteriormente se necesita un dispensador-pipeteador automático (Fig. 5), lector de microplacas y programa informático para la interpretación de los resultados (Figs. 6a y 6b).

Existen lavadores que pueden utilizarse para la técnica de antiglobulina.

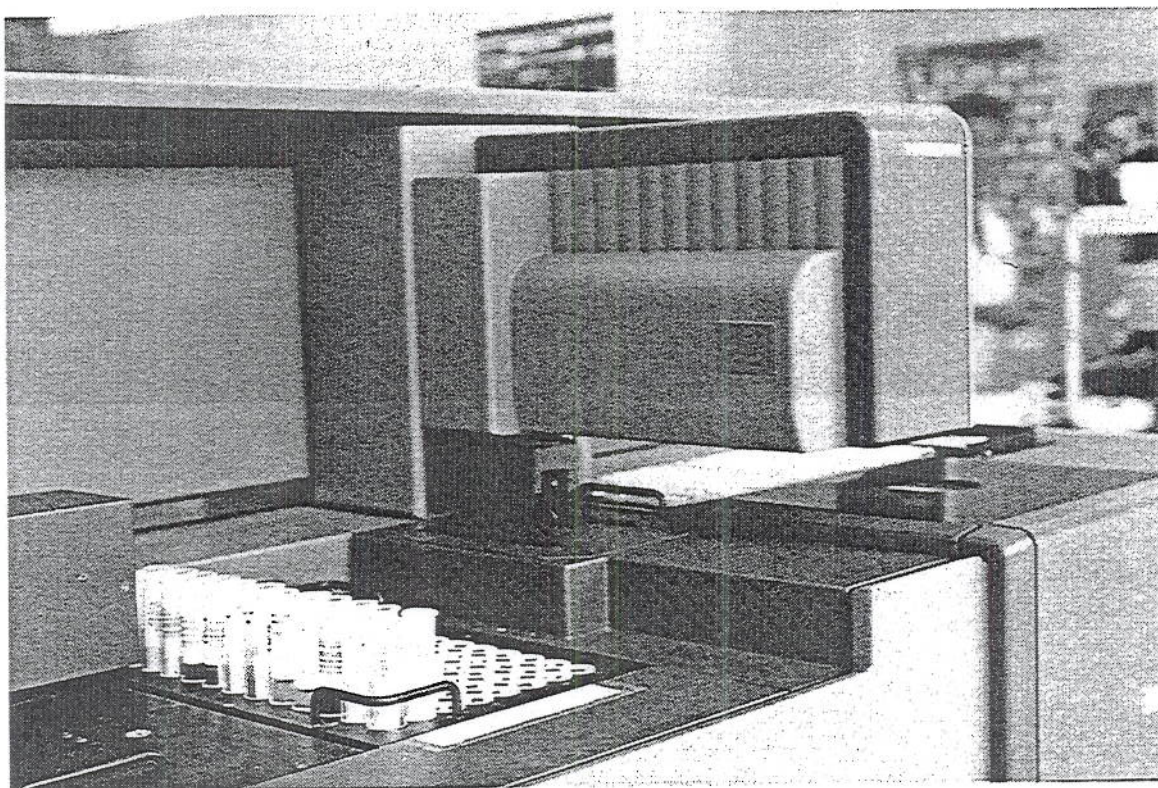


Figura 5.

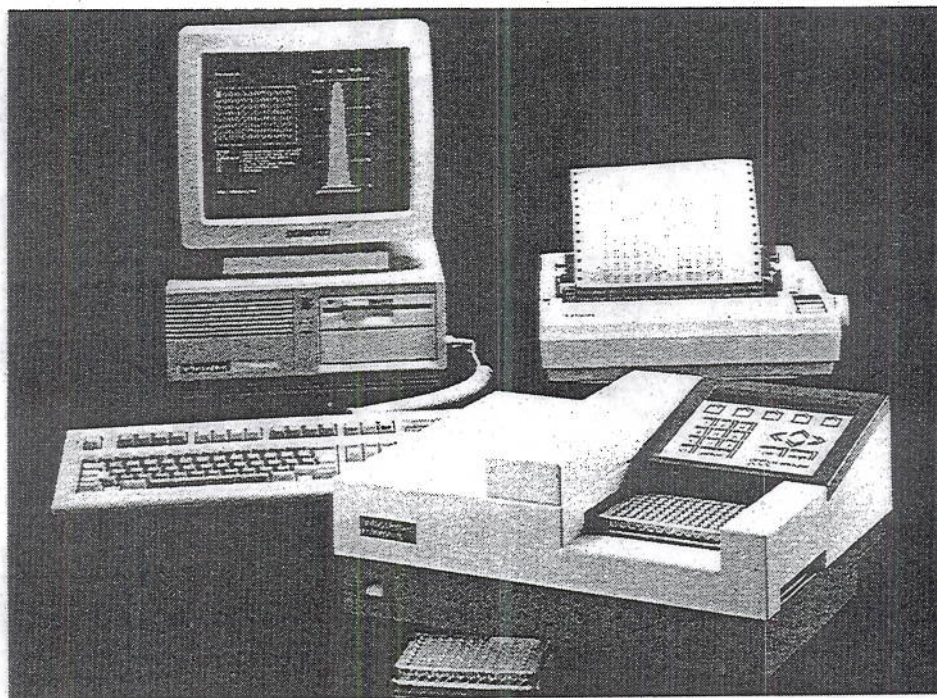


Figura 6a.

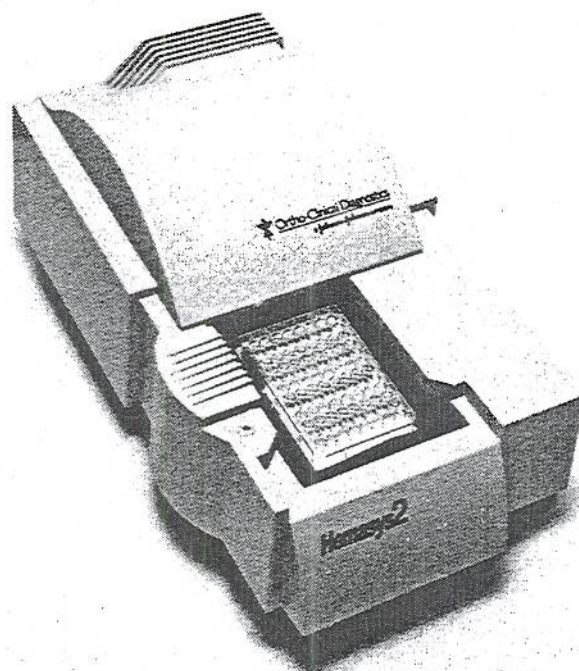
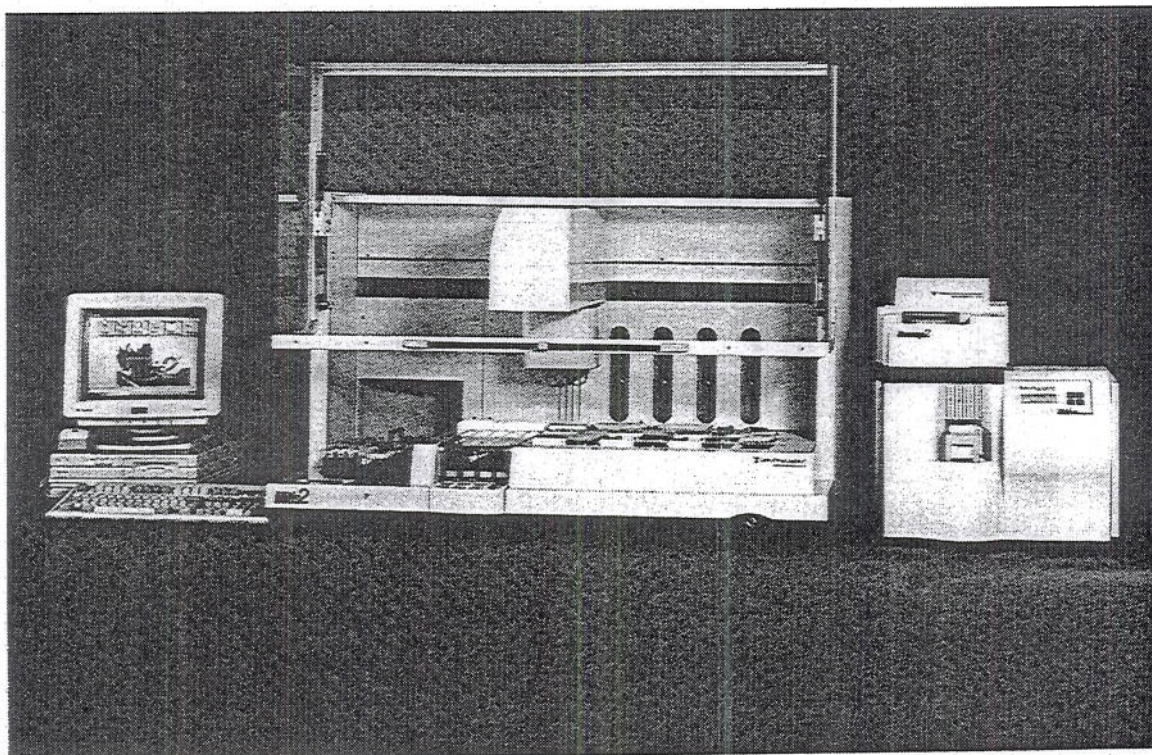


Figura 6b.



Sistemas Mitis-2 compuesto por:

- Dispensador mixto para técnicas en microplacas y CAT (Técnicas de aglutinación en columna)*
- Lector digital para microplacas*
- Lector digital para técnicas CAT*
- Sistema informático*

1.2. CONSIDERACIONES TÉCNICAS

1. Hay que tener en cuenta que al trabajar en microplaca se están utilizando micrométodos, por lo que es muy importante saber que la alta concentración de proteínas, la viscosidad y el exceso de concentración de anticuerpos pueden alterar los resultados.

Por este motivo los reactivos (antisueros) que contienen alta concentración de albúmina, tienen que diluirse con albúmina al 3% para facilitar la posterior interpretación; los actuales antisueros en general tienen baja concentración de albúmina.

Otros reactivos necesitan ser diluidos con otros diluyentes y algunos, como los químicamente modificados, no necesitan ser diluidos.

2. Es muy importante estandarizar los volúmenes y concentraciones de hematíes que se van a utilizar.
3. Las condiciones y técnica de resuspensión de los hematíes mediante agitadores, así como las características de la centrifugación, como tiempo y revoluciones, también deben ser estandarizados.
4. Cuando la técnica requiera la utilización de enzimas, como por ejemplo la bromelina, es muy importante poner siempre controles, debido a que los enzimas pueden incrementar la sensibilidad y las reacciones inespecíficas.
5. La presencia de fibrina en el plasma puede interferir en la interpretación. Para la detección de anticuerpos es preferible la utilización de suero por este motivo.
6. Las microplacas nuevas, deben tratarse con albúmina al 0,1% en salina o con suero humano para prevenir la adherencia de las células por las fuerzas electrostáticas del plástico.
7. Cuando la técnica requiera incubación a 37°C, las microplacas deben taparse para evitar la evaporación.
8. Las microplacas, una vez usadas, pueden volver a ser reutilizadas durante bastante tiempo. Deben dejar de usarse cuando el fondo del pocillo pierda su transparencia; ésto es especialmente crítico cuando se usan lectores automáticos.

1.3. CUIDADOS ESPECIALES PARA SU USO

- Cada día, antes de reutilizar una placa, hay que poner especial cuidado en comprobar que todos los pocillos estén limpios.
- Asegurarse bien de la localización que corresponde a cada muestra, ya que tiene cierta dificultad el acostumbrarse a trabajar con pocillos tan pequeños. Se debe tener protocolizada la localización dentro de la microplaca de las muestras y reactivos, que deben situarse siempre en la misma posición para una misma técnica. En el procedimiento automatizado utilizando dispensadores éste punto está garantizado.
- Los reactivos deben dispensarse con cuidado y procurando introducirlos en el centro del pocillo, evitando salpicaduras que provoquen una contaminación entre los mismos. Con los dispensadores automáticos éste problema no existe.
- Los sueros diluidos en el Banco de Sangre para usar en microplaca, pueden perder estabilidad en las soluciones bajas en proteínas, por lo que deben guardarse entre 1 y 6 grados en nevera no más de 7 días. No así cuando están diluidos por el fabricante. Diariamente debe comprobarse su reactividad y especificidad.

1.4. PREPARACIÓN DE LAS MICROPLACAS DE FORMA PREVIA A SU UTILIZACIÓN

En las placas nuevas la electricidad estática representa un problema, porque adhiere las células y el suero a los lados del pocillo. Disponemos de varios métodos para eliminarla.

1. Poner las placas en remojo en agua destilada o desionizada durante toda la noche.
2. Hacer una dilución de albúmina al 1% en solución salina. Llenar los pocillos. Esperar varios minutos y aspirar el contenido de los pocillos antes de poner los reactivos.
3. Llenar cada pocillo de la microplaca con plasma humano. Dejarla así durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se procede al lavado de la placa con agua escasamente jabonosa. Aclarar con

agua abundante, siendo muy importante efectuar el último aclarado con agua destilada. Dejar la placa sobre un papel de filtro invertida, durante unas horas en una estufa a 37°C.

Cualquiera de estos procedimientos sólo es necesario realizarlos la primera vez que se va a utilizar la microplaca.

Si a pesar del tratamiento previo se sigue observando electricidad estática, se puede eliminar frotando el fondo de la placa con una toallita húmeda o pasando la placa por la llama de un mechero.

1.5. REUTILIZACIÓN DE LAS MICROPLACAS: LAVADO

Las placas pueden ser reutilizadas, durante un determinado tiempo.

Una vez utilizadas proceder a lavarlas de la siguiente forma:

1. Invertir la placa y vaciar su contenido en la pila o un recipiente, dando un golpe seco con la muñeca.
2. Lavar con abundante agua del grifo para eliminar cualquier resto.
3. Colocar las placas durante 30 minutos en un recipiente que contenga hipoclorito sódico al 2,5% aproximadamente.
4. Aclarar con agua, y hacer un último aclarado con abundante agua destilada.
5. Secar las placas en estufa a 37°C, colocándolas invertidas sobre un papel de filtro.

1.6. MICROPLACAS CON ANTÍGENO O ANTICUERPO PREFIJADO

Existen en el mercado microplacas que llevan prefijado en las paredes del pocillo anticuerpos (antisueros) o antígenos. Actualmente se dispone de ellas para la determinación del grupo ABO, anticuerpos irregulares y anticuerpos antiplaquetas. Estas microplacas no son reutilizables. La metodología a seguir depende de cada tipo y siempre según las instrucciones del fabricante.

2. REACTIVOS. CONDICIONES QUE DEBEN CUMPLIR

*Elena Franco
Matilde Sedeño*

Muy pocas casas comerciales especifican que sus antisueros pueden utilizarse en microplaca, por lo tanto su utilización es en la mayoría de los casos responsabilidad del usuario, aunque ya existen algunas que disponen de antisueros diluidos para este uso. Cada lote debe evaluarse en el laboratorio y establecer la dilución óptima.

Los hematíes reactivos utilizados para la determinación del grupo sérico, pueden usarse, o bien comerciales, o bien preparados en el banco de sangre, procedentes de donantes. Las células de casas comerciales pueden usarse durante el tiempo que indiquen los fabricantes, mientras que las células preparadas en el banco deben renovarse diariamente.

Los hematíes para escrutinio de anticuerpos, pueden usarse o bien de casas comerciales, o también de donantes de sangre. No deben usarse de pacientes.

El diluyente para los antisueros, como la albúmina al 3%, puede prepararse en el banco, a partir de albúmina bovina a cualquier otra concentración.

La adición de azida sódica al 0,1% permite la conservación de los reactivos durante un periodo más largo.

Las sustancias que se utilizan para lavados en la realización de la prueba de antiglobulina indirecta, pueden ser: suero fisiológico, albúmina al 0,1% o Tween 20 al 0,02% en solución salina. Los resultados obtenidos son los mismos. Se preparan diariamente.

Si se utilizan enzimas, deben prepararse diariamente.

Debe estudiarse cada nuevo lote de antiglobulina humana.

2.1. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS Y DILUYENTES

La sensibilidad de los reactivos que se utilizan para la determinación de grupo ABO y Rh puede verse favorecida al trabajar en microplaca. Además como el patrón de reactividad puede ser igual o mejor a baja dilución, suelen diluirse antes de su uso.

En cada nuevo lote de reactivo se debe hacer una titulación para así poder establecer la dilución óptima de trabajo, estudiándose la especificidad y sensibilidad del antisuero frente a antígenos débiles.

Los reactivos se diluyen con albúmina al 3% u otro diluyente, (ver página 27) pudiendo así conservarse durante 5-7 días en nevera.

Debe registrarse el estudio realizado a los reactivos, se anota el número de lote, la especificidad, el diluyente empleado, la dilución de trabajo, la fecha de caducidad y las iniciales del técnico que realizó el estudio.

Cada día debe efectuarse un control positivo y otro negativo con hematíes conocidos.

2.2. SUSPENSIONES CELULARES

Las suspensiones celulares deben prepararse con mucho cuidado. Para las microplacas con el pocillo de fondo en V, la suspensión no debe ser superior al 1%; para las microplacas con el pocillo de fondo en U pueden utilizarse suspensiones entre el 2 y el 4%.

Las diluciones demasiado bajas pueden dar falsos negativos y las altas falsos positivos.

2.3. ENZIMAS

Si se usan enzimas en las pruebas de rutina, el estudio de los reactivos debe realizarse con los hematíes tratados previamente con los mismos enzimas que serán utilizados en la práctica diaria.

2.4. HEMATÍES

Es importante que los hematíes que se utilizan permanezcan el menor tiempo posible fuera de la nevera. Antes de su uso deben haber estado a temperatura ambiente unos diez minutos.

3. CENTRIFUGACIÓN DE MICROPLACAS

*Elena Franco
Matilde Sedeño*

Las condiciones adecuadas de centrifugación deben establecerse para cada centrífuga. A continuación señalamos unos valores orientativos de fuerza de centrifugación “g” y tiempo. Su conversión en r.p.m. dependerá del radio de giro de la centrífuga. (Ver tabla de conversión página 87). No obstante cada laboratorio debe estandarizar cuidadosamente las condiciones de centrifugación para obtener los mejores resultados.

MICROPLACAS EN U RÍGIDAS

- a) 400 g durante 30 segundos, para grupo hemático y sérico y la primera centrifugación de la prueba de antiglobulina.
- b) 400 g durante 40 segundos para el lavado de la prueba de antiglobulina.
- c) 400 g durante 30 segundos después de añadir la antiglobulina.

MICROPLACAS EN U FLEXIBLES

- a) 700 g durante 5 segundos para determinación de grupo hemático y sérico, para la primera centrifugación de la prueba de antiglobulina y escrutinio de los anticuerpos.
- b) 700 g durante 20 segundos, para la fase de lavado.
- c) 700 g durante 5 segundos después de añadir la antiglobulina.

MICROPLACAS EN V RÍGIDAS

- a) 900 g durante 40 segundos, para grupo sérico y hemático y primera centrifugación de la prueba de antiglobulina.

- b) 900 g durante 40 segundos, para el lavado de la prueba de antiglobulina.
- c) 900 g durante 10 segundos, después de añadir la antiglobulina.

MICROPLACAS EN V FLEXIBLES

- a) 700 g durante 10 segundos, para grupo sérico y hemático, primera centrifugación de la prueba de antiglobulina.
- b) 700 g durante 20 segundos para el lavado de la prueba de antiglobulina.
- c) 700 g durante 10 segundos después de añadir la antiglobulina.

4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Elena Franco

4.1. MÉTODO MANUAL. MICROPLACAS EN U

Para el grupo hemático y sérico y la primera fase de centrifugación de la prueba de antiglobulina, se procede del siguiente modo:

Agitar la placa con un agitador, hasta la resuspensión completa de los hematíes del control negativo. Usar para la lectura visores con luz o visores con espejo de aumento.

Una reacción positiva es igual a la aglutinación que aparece en tubo.

En la reacción negativa, las células están suspendidas en el pocillo de forma homogénea.

Raras veces una reacción débil presenta problemas de interpretación, no obstante si es preciso se procede del siguiente modo:

Agitar la microplaca para resuspender las células completamente, poner la microplaca sobre un visor con espejo de aumento, esperar unos 20 minutos, hasta que las células se asienten completamente en el fondo. Las reacciones débiles positivas aparecen como un botón celular rodeado de un halo.

4.2. MÉTODO MANUAL. MICROPLACAS EN V

La lectura se realiza con la microplaca apoyada en posición tal que forme un ángulo sobre la horizontal de 60-70°.

1. Reacciones negativas; no hay un botón visible. Se produce una caída de los hematíes en forma de lágrima al resbalar por el pocillo.
2. Reacciones positivas; aparece un firme botón en el centro del pocillo. Algunas veces este botón puede caer entero por la pared del pocillo dando un patrón ligeramente distinto.

4.3. MÉTODO AUTOMÁTICO. MICROPLACAS EN U

Hay distintos lectores automáticos en el mercado. Poseen un fotómetro que realiza unas lecturas en base a un patrón, en el que se distingue la aglutinación de la suspensión de hematíes.

El fundamento de la lectura se basa en el grado de transmisión de luz a través de cada pocillo, que será distinta si la luz atraviesa una suspensión homogénea o si existen aglutinados. Para ello se efectúan múltiples lecturas en cada pocillo. La interpretación del resultado depende de la gráfica del conjunto de lecturas efectuadas.

En cada tipo de lector es muy importante seguir los consejos establecidos por el fabricante. En algún caso se recomienda realizar la lectura de forma inmediata a la agitación de la microplaca, en otros se recomienda esperar unos minutos.

En el empleo de lectores automáticos es de suma importancia la estandarización del tiempo y velocidad de agitación de la microplaca mediante los agitadores mecánicos.

El programa informático interpreta el grupo sanguíneo de cada muestra comparando el patrón de reacciones de aglutinación positiva y negativa con los patrones de reacción previamente programados.

Los resultados pueden visualizarse por pantalla, imprimirse y transmitirse al ordenador central, con lo cual se agiliza notablemente la transcripción de datos evitando errores.

Ante una posible no interpretación automática del grupo de una muestra problema, se tiene la opción de introducir manualmente el resultado previa observación visual de la microplaca. Esta situación se debe a que los lectores automáticos suelen requerir una mayor intensidad de aglutinación que la lectura visual.

Otro motivo de no interpretación automática es la presencia de hemólisis (reacción antígeno-anticuerpo de tipo hemolítico) o lipemias de alto grado.

5. SOLUCIONES Y REACTIVOS MÁS UTILIZADOS EN INMUNOHEMATOLOGÍA

Julia Mas

No se pretende hacer aquí una descripción exhaustiva de los reactivos empleados en inmunohematología, únicamente se indica el mecanismo de acción de algunos de ellos y las pequeñas modificaciones que es preciso efectuar para adecuarlos a las técnicas de microplaca.

5.1. SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA

Se prepara por disolución de 8,5 g de ClNa en 1 litro de agua destilada. Debe utilizarse, a ser posible, recién preparada aunque no es rigurosamente necesario que sea estéril.

Se utiliza en general como medio de suspensión de hematíes. Es de fácil preparación en el laboratorio.

5.2. SOLUCIONES DE ALBÚMINA BOVINA

Se emplean como medio proteico destinado a potenciar determinados anticuerpos de grupo sanguíneo.

La materia prima es la albúmina obtenida por fraccionamiento del plasma bovino, según métodos industriales bien estandarizados (fraccionamiento salino, fraccionamiento alcohólico, métodos cromatográficos, filtración a través de gel, etc.).

Parámetros muy importantes en la preparación de soluciones de albúmina bovina son el pH, la conductividad específica, la pureza de la fracción albúmina, la concentración y el grado de polimerización.

Las soluciones de albúmina bovina ejercen un efecto potenciador gracias a que aumentan la constante dieléctrica del medio en el que se hallan los hematíes y los anticuerpos; ésto tiene como resultado la disminución del potencial Z y, en consecuencia, la repulsión electrostática existente entre los hematíes cuando se hallan en suspensión en un medio salino.

Concentraciones más empleadas: 30%, 22%, 6%, 3%.

En microplaca la concentración más utilizada suele ser la del 3%.

La temperatura más adecuada para la conservación de las soluciones de albúmina es de 4°C. Además, para evitar la contaminación bacteriana se utiliza la azida sódica (N₃Na) al 1:1.000.

El uso de soluciones de albúmina a concentraciones elevadas (más del 30%) puede favorecer la formación de «rouleaux» o pilas de monedas. Este inconveniente queda obviado en las técnicas en microplaca por la dilución que se aplica para su uso. Si la concentración de proteínas es elevada la viscosidad puede ser causa de resultados erróneos. Por ello, es indispensable efectuar diluciones. Además de la solución de albúmina al 3% ya mencionada pueden emplearse otros diluyentes como el citrato trisódico al 3,8% o el Tween 20 al 0,02% en solución salina.

5.3. SOLUCIONES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Los anticuerpos de grupo sanguíneo de tipo IgG pueden aglutinar los hematíes si éstos se tratan con soluciones tamponadas de algunas enzimas proteolíticas. El mecanismo de acción puede interpretarse como una disminución de la repulsión electrostática entre los hematíes. La digestión superficial de la membrana de los hematíes con separación de ácido siálico o NANA disminuye el número de cargas electrostáticas negativas, representado por σ en la fórmula del potencial Zeta:

$$Z = f\left(\frac{\sigma}{D\sqrt{\mu}}\right)$$

La disminución del potencial Zeta determinada por la disminución de σ permitirá un mayor acercamiento de los hematíes facilitando su aglutinación por los anticuerpos de tipo IgG.

Los enzimas que se usan corrientemente en inmunohematología son: tripsina, papaína y bromelina. La ficina tiene su aplicación limitada por ser tóxica, aunque es la que produce mayor disminución del potencial Zeta.

Las pruebas para la investigación de anticuerpos mediante enzimas proteolíticas son muy sensibles para determinados anticuerpos pero tienden a dar resultados falsos positivos.

En las determinaciones de grupo ABO y Rh en microplaca suelen utilizarse suspensiones de hematíes ligeramente bromelinizados aunque no es imprescindible.

5.4. SOLUCIONES DE BAJA FUERZA IÓNICA (LISS)

La carga de iones positivos y negativos que poseen es inferior a la que contiene la solución salina fisiológica normal, por ello, la interacción de los iones del medio dificulta menos las uniones antígeno/anticuerpo (sensibilización de los hematíes) permitiendo tiempos de incubación más cortos (Fig. 7).

En 1974, Löw y Maseter describieron una solución para ser utilizada en lugar del suero salino fisiológico en las suspensiones de hematíes destinadas a la investigación de anticuerpos. En 1976 Moore y Mollison describieron otra solución de baja fuerza iónica en cuya composición entra un tampón de fosfatos, un aminoácido (glicina o glicocola), una pequeña cantidad de ClNa y azida sódica (N_3Na) como conservante. Las soluciones descritas por los mencionados autores, se mostraron particularmente útiles en las pruebas indirectas de la antiglobulina humana sin aumento significativo de falsos positivos. Si se añaden medios macromoleculares o policones al medio de fuerza iónica baja, además de un tiempo de incubación considerablemente más corto, se puede lograr la aglutinación de los hematíes antes de la fase de la antiglobulina (Rosenfield, 1978).

ACCIÓN DE LOS MEDIOS DE BAJA FUERZA IÓNICA

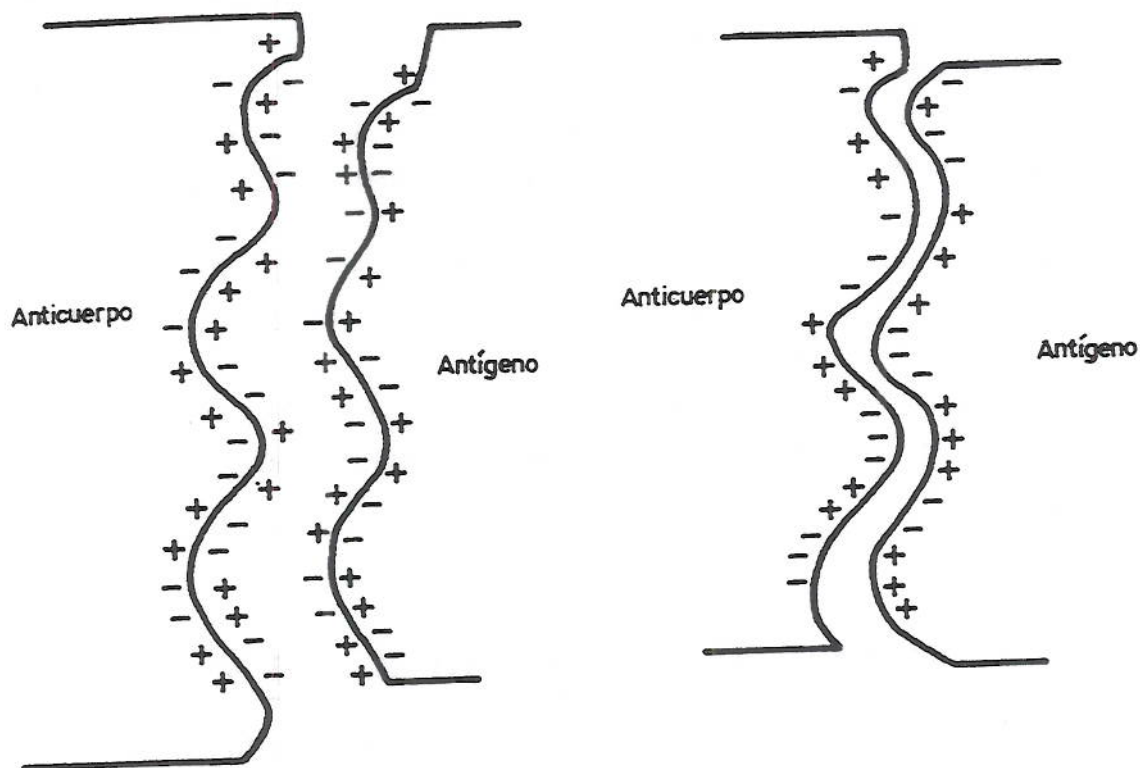


Figura 7. Estructuras reaccionantes del antígeno y del anticuerpo en medio salino normal. La interacción de los iones del medio exige un tiempo de incubación largo (izda.). Estructuras reaccionantes del antígeno y del anticuerpo en un medio de baja fuerza iónica. La unión de ambas estructuras se logra con un tiempo de incubación más corto (dcha.).

En la actualidad es posible disponer de diversos preparados comerciales, que reúnen las propiedades de acortamiento del tiempo de incubación y potenciación de la aglutinación de los hematíes, que se añaden como un reactivo más a la mezcla de suero y hematíes (LISS aditivo). Esto ofrece la comodidad de no tener que lavar aquellos hematíes con la solución LISS (además del lavado que se hace normalmente con el suero salino fisiológico normal).

Para evitar el posible deterioro de algunos antígenos hemáticos debido al medio de baja fuerza iónica, es preciso seguir muy estrictamente las instrucciones que proporciona el fabricante de cada LISS aditivo.

5.5. ANTISUEROS ESPECÍFICOS

Los antisueros específicos a que nos vamos a referir son los más utilizados en las técnicas de rutina del Banco de Sangre como por ejemplo anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, etc. Pueden ser de origen humano, de origen animal o monoclonales producidos por hibridomas. También pueden ser extractos de tejidos vegetales e incluso animales, que reaccionan con determinados componentes de la membrana del hematíe y pueden, por ello, ser utilizados como reactivos, por ejemplo las lectinas anti-A1 y anti-H.

Los anticuerpos monoclonales proceden de una sóla clona o grupo de células derivadas de una célula original única.

Los hibridomas se obtienen al fusionar, con células de mieloma, linfocitos procedentes de bazo de ratón inmunizado. Para la fusión suele emplearse polietilenglicol (PEG).

Las células fusionadas se cultivan en medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Las células de mieloma mueren en dicho medio pues no pueden subsanar el bloqueo metabólico causado por la presencia de aminopterina. Las células procedentes del bazo mueren en cultivo al cabo de 1-2 semanas, quedando solamente los hibridomas, que conservan la propiedad de producir anticuerpos y la propiedad de reproducirse en medio de cultivo.

Se determina la especificidad de los anticuerpos producidos por los hibridomas y se clonan los que producen el anticuerpo deseado.

La clonación suele efectuarse diluyendo sucesivamente una población celular de modo que, en algunos pocillos quede una sóla célula, cuyas descendientes constituirán una clona.

En los antisueros, además de su especificidad, debemos considerar su potencia, es decir, el título o grado de dilución que todavía dará resultado positivo frente a los hematíes adecuados, la intensidad de aglutinación indicada por el tamaño de los grupos que forman con los hematíes y la rapidez de la aglutinación o avidéz.

Cuando los antisueros llevan adicionada una cantidad importante de albúmina bovina, como por ejemplo algunos antisueros comer-

ciales de origen humano, la lectura de la aglutinación en microplaca puede verse alterada, por lo que es necesario diluirlos convenientemente.

5.6. REACTIVO ANTIGLOBULINA HUMANA

El suero antiglobulina humana se obtiene inyectando animales mamíferos, generalmente conejos, con globulinas humanas purificadas siguiendo un protocolo estándar de inmunización. De acuerdo con este protocolo se prueba el suero de los conejos y se escogen los que han respondido mejor a la inmunización. Se obtiene sangre total de los mismos (no es imprescindible sacrificarlos) y se hace una mezcla de plasmas que se procesa para obtener un reactivo específico que será capaz de detectar globulinas humanas, especialmente gamma globulinas y componentes del complemento. La mezcla indicada se diluye con una solución tampón (pH aprox. de 7) que contiene una pequeña cantidad de albúmina bovina; se le añade un 0,1% de azida sódica (N_3Na) como conservante. Para evitar errores en la utilización del reactivo obtenido, que es incoloro, puede adicionarse un colorante verde.

La prueba de la antiglobulina humana permite detectar e identificar inmunoglobulinas y/o componentes del complemento unidos a hematíes, ya que, añadido a hematíes sensibilizados producirá su aglutinación a condición de que dichos hematíes hayan sido lavados a fondo con suero salino fisiológico para eliminar las proteínas plasmáticas que no estén unidas específicamente a los mismos (Fig. 8).

Prueba de antiglobulina directa

Detecta los anticuerpos o componentes del complemento fijados in vivo en los hematíes de un paciente. Por ello, podemos aplicar dicha prueba al estudio de la enfermedad hemolítica del recién nacido y de las anemias hemolíticas, ya sean autoinmunes o inducidas por fármacos y de las reacciones transfusionales (Tabla I).

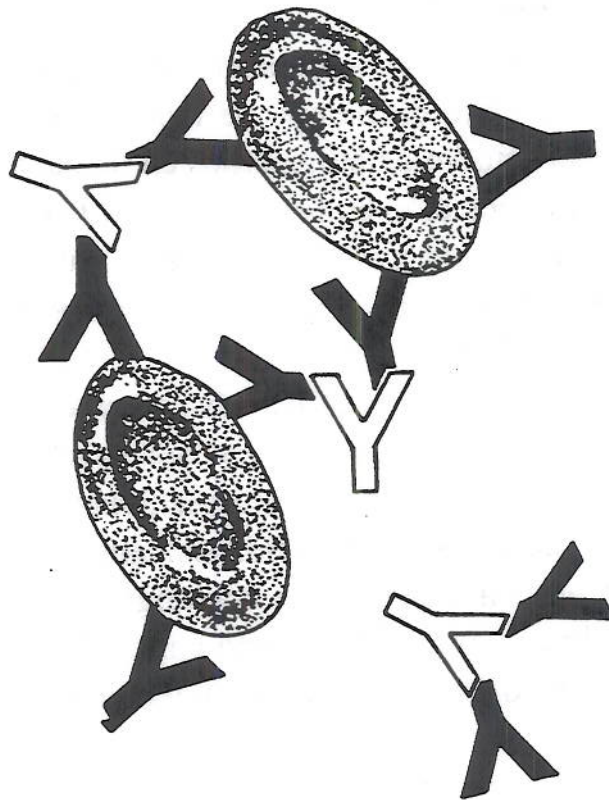


Figura 8. Mecanismo de acción del reactivo antiglobulina humana

PRUEBA DIRECTA

- Enfermedad hemolítica del recién nacido
- Anemia hemolítica por autoanticuerpos
- Anemia hemolítica debido a fármacos
- Investigación de reacciones transfusionales

PRUEBA INDIRECTA

- Investigación de anticuerpos
- Pruebas cruzadas
- Fenotipos eritrocitarios

Tabla I. Aplicaciones de la técnica antiglobulina.

Prueba de antiglobulina indirecta

Detecta los anticuerpos o los componentes del complemento fijados *in vitro* a los hematíes durante un tiempo de incubación en el laboratorio. Tiene aplicación en el estudio de anticuerpos en un suero problema a través de hematíes de composición antigénica conocida (hematíes de escrutinio, paneles de hematíes, etc.), determinación de antígenos eritrocitarios a través de antisueros específicos y, por último, en las pruebas de compatibilidad pretransfusional (Tabla I).

El reactivo antiglobulina que se utiliza básicamente en todas las aplicaciones indicadas es un suero poliespecífico que contiene principalmente anti-IgG y anti-componente C3d del complemento, pudiendo contener además anticuerpos de otras especificidades: anti-IgM, anti-IgA, anti-C3b, etc., pero no es conveniente que contenga anti-C4, ya que dicha especificidad no sólo carece de significado para el diagnóstico, sino que los resultados positivos debidos a la misma pueden confundir por tratarse de positivos falsos.

En una prueba de antiglobulina directa positiva con el suero poliespecífico, puede tener interés investigar, mediante los sueros antiglobulina mono-específicos, el tipo de anticuerpo unido a los hematíes. Siempre que en los hematíes se detecte algún anticuerpo fijado, se puede separar mediante un proceso de elución y proceder a su estudio. Si únicamente están fijados componentes del complemento, no se puede efectuar ninguna elución pero ello constituye un dato útil para el diagnóstico (Tabla II).

<ul style="list-style-type: none">• POLIESPECÍFICO Anti-IgG + Anti-componentes del complemento
<ul style="list-style-type: none">• MONOESPECÍFICO Anti-IgG Anti-componentes del complemento

Tabla II. Reactivo antiglobulina.

Los diversos sueros antiglobulina monoespecíficos se obtienen de modo análogo a los poliespecíficos, pero se utilizan las distintas fracciones separadas y purificadas para inyectar a los animales destinados a producir el reactivo, aunque en la actualidad se obtienen reactivos de calidad excelente gracias a los métodos de obtención de anticuerpos monoclonales.

Para los estudios de anticuerpos irregulares en sueros problema y las pruebas cruzadas, se ha cuestionado la utilidad de la presencia de anti-complemento en los reactivos antiglobulina humana, pero lo cierto es que favorecen la detección de algunos anti-Jk^a, anti-Jk^b, anti-Fy^a y anti-K.

Anticuerpos monoclonales

La aplicación y perfeccionamiento de la técnica de los hibridomas (Kohler, 1975) ha permitido el uso de los sueros reactivo con anticuerpos monoclonales, es decir, derivados de una clona única de células y poseen por tanto, una sola especificidad.

Los anticuerpos monoclonales han sido útiles en el estudio de antígenos de los hematíes así como de otras células tisulares.

En el campo de los grupos sanguíneos han permitido la detección de subgrupos débiles de algunos antígenos.

También son valiosos los reactivos antiglobulina humana obtenidos por este procedimiento.

Para obtener los mejores resultados con los mencionados reactivos es preciso seguir las instrucciones de uso de cada preparador o fabricante.

5.7. HEMATÍES REACTIVO

Son suspensiones de hematíes conocidos, destinados al estudio de anticuerpos en suero o plasma.

1. Suspensiones de hematíes de los grupos A1 y B para la determinación del grupo sérico. Ocasionalmente se emplean hematíes A2 y hematíes 0 como control.
2. Suspensiones de hematíes 0, extensamente fenotipados, destinados a la detección de anticuerpos irregulares.
3. Paneles de hematíes del grupo 0 extensamente fenotipados, que se conservan en soluciones isotónicas tamponadas especiales y se utilizan para la identificación de anticuerpos irregulares.

La concentración de las suspensiones de hematíes utilizadas en las técnicas de microplaca no suele ser superior al 1% en las placas con los pocillos en V y entre un 2 y un 4% para los pocillos de fondo en U.

5.8. POLYBRENE

Es un polication de amonio cuaternario (bromuro de exadimetrina) que agrega reversiblemente los hematíes normales, mediante la adición de citrato. Si los hematíes están sensibilizados esta aglutinación persiste.

5.9. POLIETILENGLICOL (PEG)

La solución de Polietilenglicol (PEG), especialmente en un medio de baja fuerza iónica, agrega los hematíes y aumenta la sensibilidad de las técnicas de detección de anticuerpos, consiguiendo la disminución del tiempo de incubación. Suele utilizarse como complemento de otras técnicas convencionales para la detección de reacciones antígeno-anticuerpo débiles.

5.10. CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS USADOS PARA PRUEBAS EN MICROPLACA

	Temperatura	Tiempo
Suspensiones de hematíes para grupo sérico y estudio de anticuerpos irregulares comerciales	2-8°C	El indicado por el fabricante
Preparadas en laboratorio	2-8°C	12 horas
Anticuerpos comerciales no diluidos	2-8°C	El indicado por el fabricante
Antisueros comerciales diluidos	2-8°C	Una semana
Suero antiglobulina humana comercial no diluida	2-8°C	El indicado por el fabricante
Suero antiglobulina humana diluida	2-8°C	Una semana
Solución stock de bromelina 1%	-18°C	Un año
Solución de trabajo de bromelina	2-8°C	12 horas
Tween 20	Temp. Amb.	Indefinidamente
Solución albúmina bovina 0,1%	2-8°C	12 horas
Solución salina fisiológica con Tween 20	2-8°C	12 horas
Solución albúmina bovina 3%	2-8°C	7 días
Solución de azida sódica 2%	2-8°C	Indefinidamente
Solución salina normal	Temp. Amb.	El indicado por el fabricante
Polybrene	Temp. Amb.	El indicado por el fabricante

Tabla III.

6. DETERMINACIÓN DE LA DILUCION ÓPTIMA DE LOS ANTISUEROS

*Julia Mas
Elena Franco*

Las técnicas en microplaca ofrecen mayor sensibilidad que las pruebas en tubos estándar, por ello es posible diluir los sueros reactivo. El diluyente empleado es una solución de albúmina bovina 3% y el grado de dilución se escoge después de efectuar extensas titulaciones frente a hematíes portadores de antígenos de baja reactividad. La mencionada solución de albúmina bovina 3% puede utilizarse para diluir todos los antisueros incluidos los anti-Rh y los controles.

La adición de azida sódica (N_3Na) 0,1% al diluyente permite conservarlo durante una semana. En caso de no añadir azida sódica la solución debe prepararse diariamente.

La dilución de trabajo óptima para los antisueros se establece como sigue:

Por ejemplo para un anti-A seleccionaremos 4 muestras de hematíes de reactividad baja (A_2B) con las que prepararemos suspensiones del orden del 2-4% en albúmina bovina 3% para microplacas de pocillos en U.

Efectuaremos una serie de diluciones del antisuero que estamos probando, con la solución de albúmina bovina 3% antes mencionada, desde 1/1 hasta 1/128 empleando pipetas automáticas de puntas desechables (Fig. 9).

Enfrentaremos las diluciones del antisuero con cada una de las suspensiones de hematíes preparadas al efecto mediante la técnica en placa de microtitulación. Como dilución óptima de trabajo se elige la que propor-

ciona una aglutinación clara, tanto para la lectura visual como para el lector automático. Las lecturas automáticas suelen requerir mayor intensidad de aglutinación que las lecturas efectuadas a simple vista.

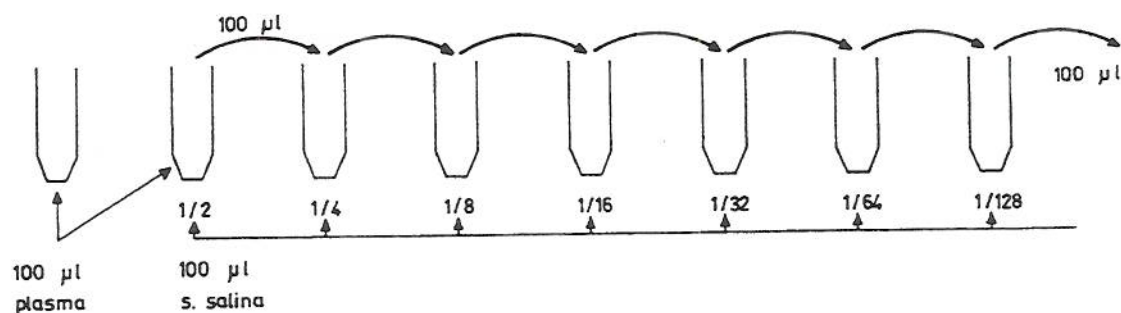


Figura 9.

De igual forma se procede con los restantes antisueros, escogiendo siempre para el estudio a hematíes de reactividad baja.

7. REACCIÓN SEROLÓGICA DE AGLUTINACIÓN

Julia Mas

En las técnicas de grupos sanguíneos eritrocitarios las reacciones más importantes son las de aglutinación. Los antígenos situados en la membrana de los hematíes reaccionan con los anticuerpos y el resultado de la reacción es la formación de grumos de hematíes o aglutinados. Las determinaciones de antígenos hemáticos y el estudio de anticuerpos en sueros se basan principalmente en la aglutinación de los hematíes, aunque en ocasiones la unión antígeno/anticuerpo que activa la vía clásica del sistema del complemento puede ser detectada por una hemólisis «in vitro». Los anticuerpos de grupo sanguíneo esencialmente hemolíticos son: anti-A, anti-B, anti-Le^a, anti-Vel y anti-PP1p^k.

La reacción hemolítica «in vitro» debida a los anticuerpos de grupo sanguíneo se produce con poca frecuencia ya que la secuencia de la activación del complemento se interrumpe a partir del componente C3.

Un factor muy importante es el tipo de inmunoglobulina a que pertenecen los anticuerpos reaccionantes. Si los anticuerpos son del tipo IgM la aglutinación se produce directamente. Por su tamaño molecular y la distribución de los lugares de reacción con los antígenos, pueden unirse fácilmente con varios hematíes y producir su aglutinación (Figs. 10 y 11).

La sensibilización de hematíes por anticuerpos de tipo IgG no puede producir aglutinación. La molécula de IgG es demasiado pequeña para unirse a más de un hematíe a no ser que se introduzca algún artificio que ya indicaremos (Figs. 12 y 13).

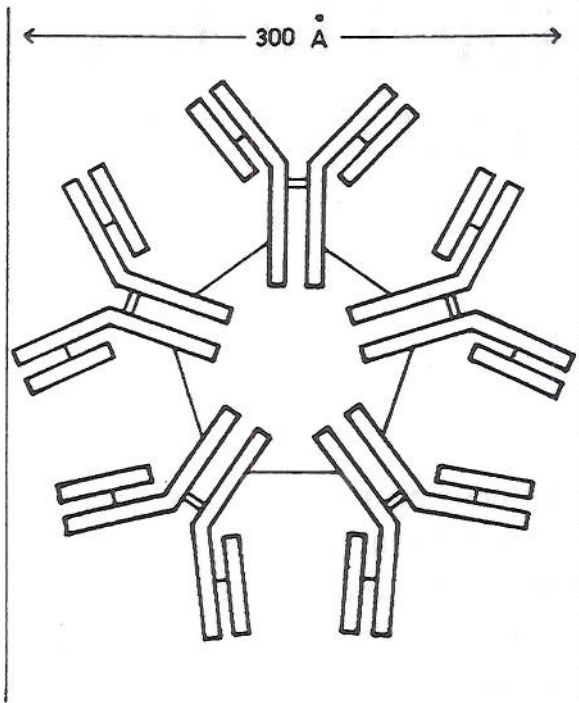


Figura 10. Esquema de la molécula IgM

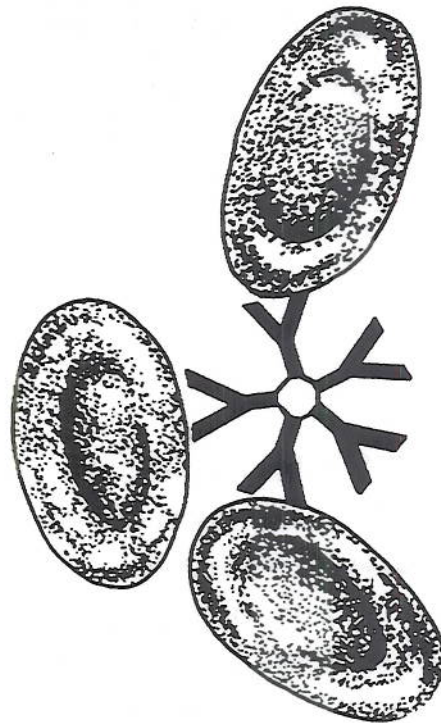


Figura 11. Hematíes aglutinados por una molécula de anticuerpo de tipo IgM

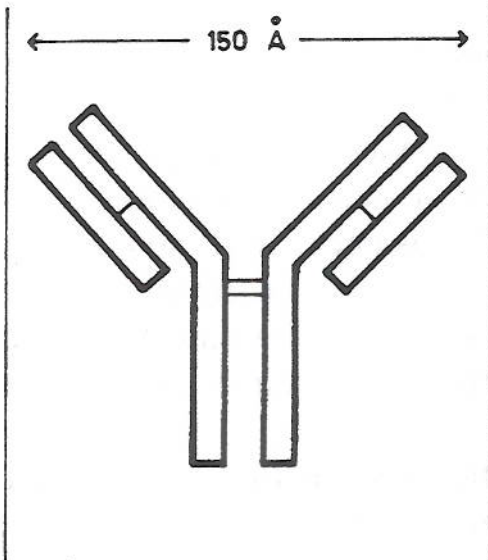


Figura 12. Esquema de la molécula IgG

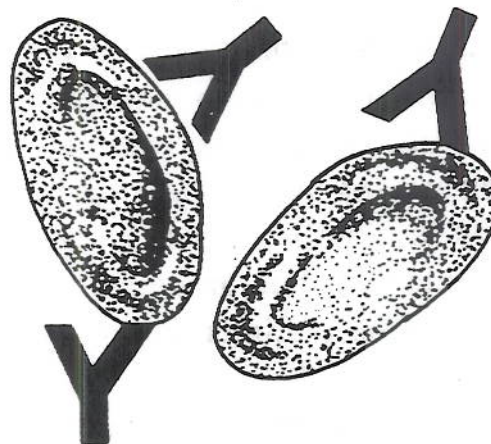


Figura 13. Hematíes sensibilizados por moléculas de IgG

La distancia que han de salvar los anticuerpos para producir aglutinación es la que guardan entre sí los hematíes en suspensión en su propio suero o plasma o en un medio salino isotónico, distancia que viene impuesta por las fuerzas de repulsión existentes entre los hematíes. La teoría más ampliamente aceptada para explicar este hecho es la del potencial Zeta.

La superficie de los hematíes tiene cargas eléctricas negativas debidas a los carboxilos del ácido siálico (NANA) de la membrana. Si los hematíes están en suspensión en un medio que contiene iones libres, los cationes forman una envoltura de cargas positivas alrededor de aquéllos convirtiéndolos en partículas cargadas de electricidad del mismo signo que experimentan una fuerza de repulsión entre ellas. Esta fuerza de repulsión se denomina potencial Zeta y puede expresarse mediante la fórmula siguiente (Fig. 14):

$$Z = f\left(\frac{\sigma}{D \sqrt{\mu}}\right)$$

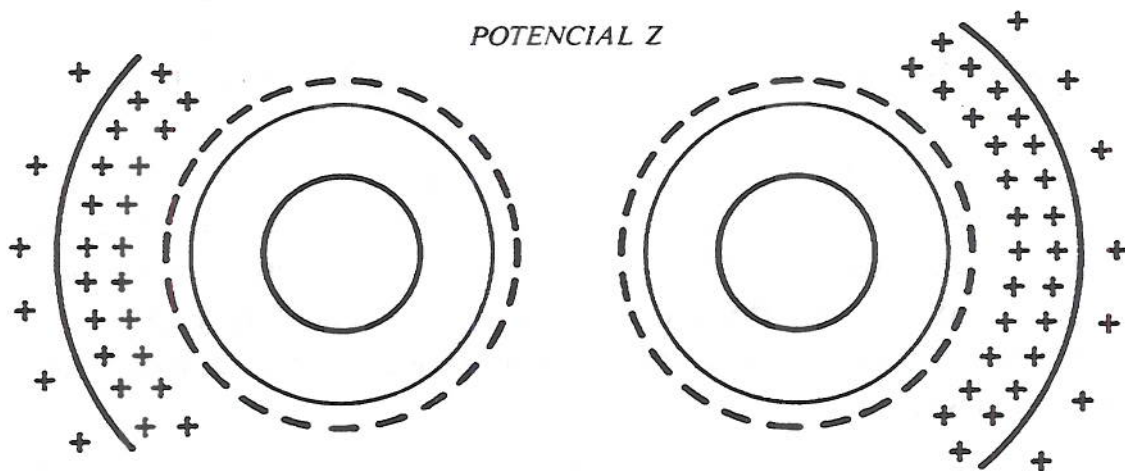


Figura 14. Cálculo del Potencial Zeta

σ = carga eléctrica de los hematíes

D = constante dieléctrica del medio

μ = fuerza iónica del medio

El potencial Zeta puede ser disminuido por el aumento de la constante dieléctrica (D) mediante la adición de sustancias macromoleculares (albúmina bovina, etc.); por la disminución de las cargas negativas de los hematíes (σ) mediante la acción de enzimas proteolíticas. Es decir, podremos lograr la disminución de la distancia entre los hematíes favoreciendo la sensibilización y aglutinación de los mismos. En la Tabla IV se dan como ejemplo diversos valores del potencial Zeta y su influencia sobre la aglutinabilidad de los hematíes.

- 23 mV	No hay aglutinación
- 18 mV	Crítico para IgM
- 16 mV	Solución NaCl 0,15 M
- 10 mV	Crítico para IgG
- 7 mV	Aglutinación no específica

Tabla IV. Aglutinabilidad de los hematíes en función del potencial Z

La base molecular de la unión de los antígenos con los anticuerpos la constituyen múltiples atracciones intermoleculares no covalentes, reversibles:

Uniones hidrófobas con exclusión de moléculas de agua en las zonas de interacción.

Puentes de hidrógeno (O-H-O, N-H-N, O-H-N).

Fuerzas de Van der Waals, resultantes de la interacción entre nubes electrónicas y uniones hidrófobas. Son fuerzas débiles pero la suma de las mismas puede ser importante en las uniones antígeno/anticuerpo.

Fuerzas electrostáticas procedentes de la atracción entre aminoácidos de cargas opuestas.

La reacción serológica de aglutinación de los hematíes que constituye el punto final de técnicas en las que intervienen antígenos hemáticos y anticuerpos de grupo sanguíneo, está influenciada por diversos factores que deben tenerse en cuenta para obtener los mejores resultados en el laboratorio y que a continuación se exponen.

7.1 REACCIÓN SEROLÓGICA DE AGLUTINACIÓN. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE SUS DOS FASES

Fase de sensibilización

Unión de los anticuerpos con los antígenos de la membrana del hematie.

Temperatura óptima para cada sistema antígeno/anticuerpo.

pH entre 6,5 y 7,6.

Concentración relativa del antígeno y del anticuerpo (Fig. 15).

Fuerza iónica del medio.

Tiempo de incubación (Fig. 16).

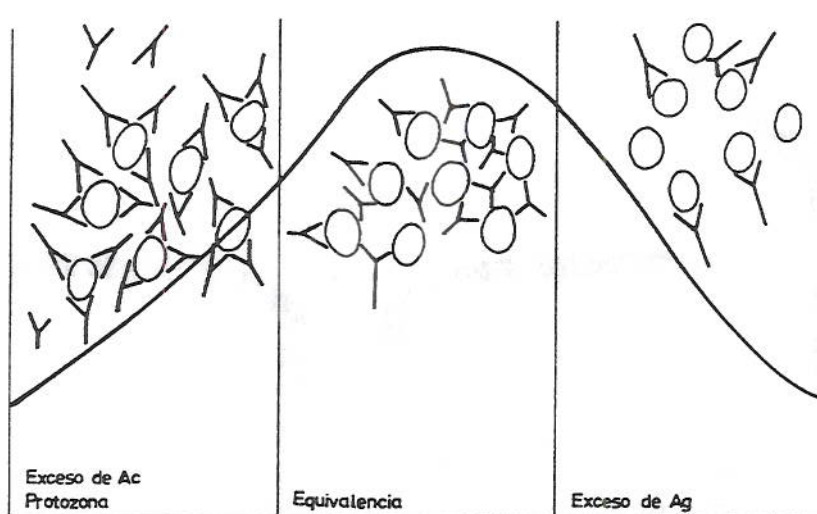


Figura 15.
Reacción de aglutinación según la concentración de antígeno y anticuerpo

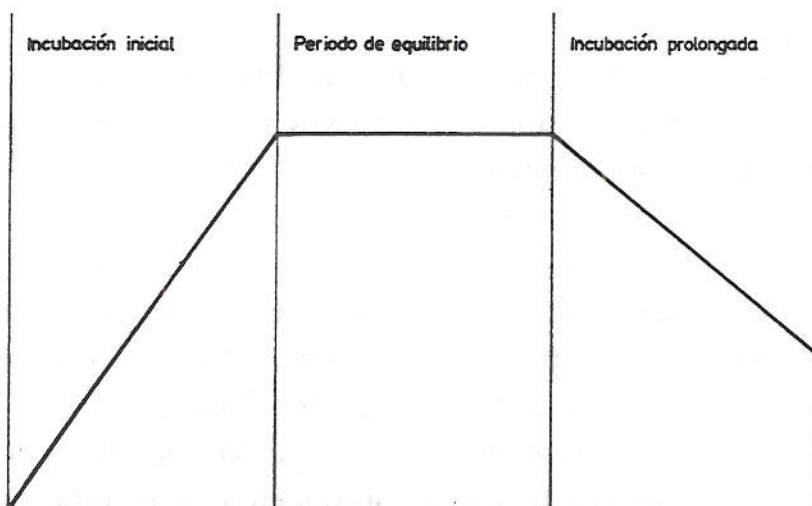


Figura 16.
Formación del complejo antígeno-anticuerpo en función del tiempo

Fase de aglutinación

Se produce cuando los hematíes están lo bastante próximos para que una molécula de anticuerpo pueda hacer de puente entre células adyacentes.

Potencial iónico del medio. Potencial Zeta.

Temperatura.

Densidad del antígeno.

Agrupación y movilidad de los antígenos.

Características del anticuerpo (clase de inmunoglobulina y su modificación química) (Fig. 17).

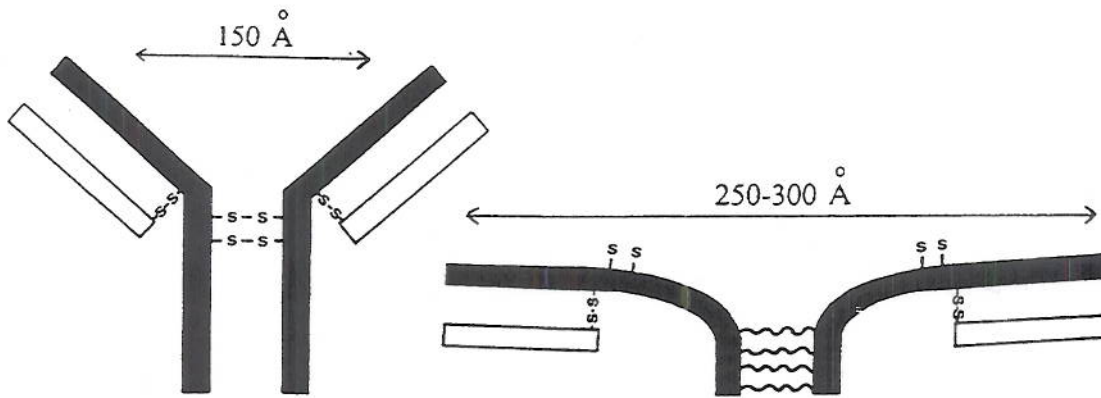


Figura 17. Tratamiento químico de una molécula de IgG.

Mediante reducción de los puentes disulfuro que unen las dos cadenas L se consigue que la molécula de IgG tenga mayor envergadura y pueda cubrir más fácilmente la distancia que existe entre hematíes adyacentes

Para potenciar las reacciones de aglutinación y facilitar así la lectura e interpretación de los resultados, se emplean diversos métodos, que pueden consistir simplemente en una centrifugación, controlada en cuanto a tiempo y velocidad, y/o en la adición de soluciones de enzimas proteolíticas, soluciones coloidales de compuestos macromoleculares, etc., y en la aplicación de la técnica de antiglobulina. La centrifugación logra la formación de grumos visibles en el momento de efectuar las lecturas y la adición de medios macromoleculares, de enzimas proteolíticas, y el uso de antiglobulina permiten detectar la sensibilización de los hematíes por anticuerpos de tipo IgG, que generalmente no producen aglutinación.

2ª Parte

DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS

PROCEDIMIENTOS MANUAL Y AUTOMATIZADO

8. LA AUTOMATIZACIÓN DEL PROCESO EN MICROPLACA

Elena Franco

Las técnicas en microplaca empezaron a realizarse de forma exclusivamente manual, por las ventajas que ya se han detallado anteriormente (ahorro de tiempo de técnico, rapidez, ahorro de reactivo y poco utillaje preciso). Dependiendo del volumen de trabajo y de las posibilidades de los laboratorios, los procesos pueden ir automatizándose de forma progresiva.

Desde hace ya unos años la automatización en el laboratorio es una realidad.

El Banco de Sangre, aunque algo más tardíamente también se ha ido automatizando, iniciándose este proceso por las técnicas consideradas más engorrosas; que duda cabe que una de ellas es la determinación del grupo ABO.

Para todas las técnicas las muestras problema y reactivos pueden ser dispensados por medio de pipeteadores-muestreadores automáticos, programando mediante ordenador la localización que queramos dar a cada muestra y reactivo en la microplaca. De forma igualmente automática se preparan las suspensiones de hematíes. Los pipeteadores automáticos son versátiles y programables para realizar distintas funciones tales como diluir, distribuir, dispensar reactivos, etc.

La lectura también puede ser automatizada. Para las reacciones de hemaglutinación se utiliza una técnica fotométrica. Disponemos de distintos tipos de lectores en el mercado. Unos efectúan una lectura del pocillo y varias periféricas; otros, realizan una lectura en forma de barrido de todo el pocillo. La interpretación del resultado depende de la gráfica del conjunto de lecturas efectuadas

Para la correcta interpretación de resultados de forma automática, es más crítico que nunca conseguir un buen patrón de aglutinación. Una aglutinación débil, pero perceptible a simple vista, puede no ser interpretada por el lector. Por esta razón el conseguir los mejores aglutinados mediante el uso de antiseros adecuados, de las suspensiones de hemáties correctas y de una adecuada agitación final de la microplaca, es fundamental.

Gracias al uso de etiquetas con código de barras podemos conseguir una correcta identificación de muestra y resultado. Estos resultados pueden transferirse directamente al ordenador central; de esta forma, se archivan grandes volúmenes de información sin posible error al transcribir los datos, hecho éste de gran importancia en transfusión.

El usuario tiene gran flexibilidad a la hora de diseñar el procedimiento de ensayo a seguir y es libre para elegir los reactivos a emplear.

La automatización de todo el proceso descrito puede ser modular, adaptándose así a las disponibilidades de Banco de Sangre con distintos volúmenes de procesamiento. Es evidente que la relación coste-beneficio, con aplicación de tecnología de alto costo, se justifica para el procesamiento de grandes volúmenes. Sin embargo, la adopción de un sistema modular puede ser rentabilizado para diferentes situaciones intermedias.

A la hora de realizar un estudio de costo de la automatización del proceso es importante destacar el ahorro de tiempo de técnico y la seguridad que proporciona al minimizar errores técnicos y de transcripción de datos.

A continuación se detalla la realización de las técnicas, tanto de forma manual como automatizada.

9. DETERMINACIÓN DEL GRUPO ABO Y Rh EN MICROPLACA

*Elena Franco
Matilde Sedeño*

MATERIAL

Técnica manual

- Muestra problema extraída en tubo con anticoagulante (EDTA-K).
- Antisueros: anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D. Control anti-D, en dilución óptima de trabajo.
- Albúmina al 3%, para la dilución de los antisueros.
- Solución salina para la dilución de los hematíes problema. También puede utilizarse bromelina al 0,1% en salina. Los resultados son los mismos.
- Hematíes A, B y O, suspendidos al 2-4%, para la determinación del grupo sérico.
- Microplacas con fondo en U de 96 pocillos.
- Pipetas de 0 a 10 lambdas.
- Pipetas de 10 a 100 lambdas.
- Pipetas repetidoras de 10 a 50 lambdas.

Técnica automática

Además de las muestras y reactivos anteriormente descritos:

- Pipeteador-muestreador automático.
- Lector de microplacas y programa que interprete los resultados.
- Etiquetas con código de barras en las muestras problema.

TÉCNICA MANUAL

Una vez centrifugados los tubos de muestra, proceder como sigue:

Grupo hemático

Dispensar 30 lambdas de solución salina ayudados de una repetidora, en los pocillos destinados a la determinación del grupo hemático; pocillos A, B, C, D, E (Fig. 18).

Añadir 1 lambda de concentrado de hematíes problema en cada uno de estos pocillos, de forma que en cada columna se estudie una muestra.

Con una pipeta repetidora añadir 30 lambdas del antisuero correspondiente (anti-A en la fila A, anti-B en la fila B, anti-AB en la fila C, anti-D en la fila D y control anti-D en la fila E).

Grupo sérico

Dispensar 50 lambdas de plasma o suero de la muestra, en los pocillos destinados a la determinación del grupo sérico, pocillos F, G, H (Fig.18).

Con una pipeta repetidora añadir 30 lambdas de suspensión de hematíes A en la fila F, 30 lambdas de suspensión de hematíes B en la fila G y 30 lambdas de suspensión de hematíes O en la fila H.

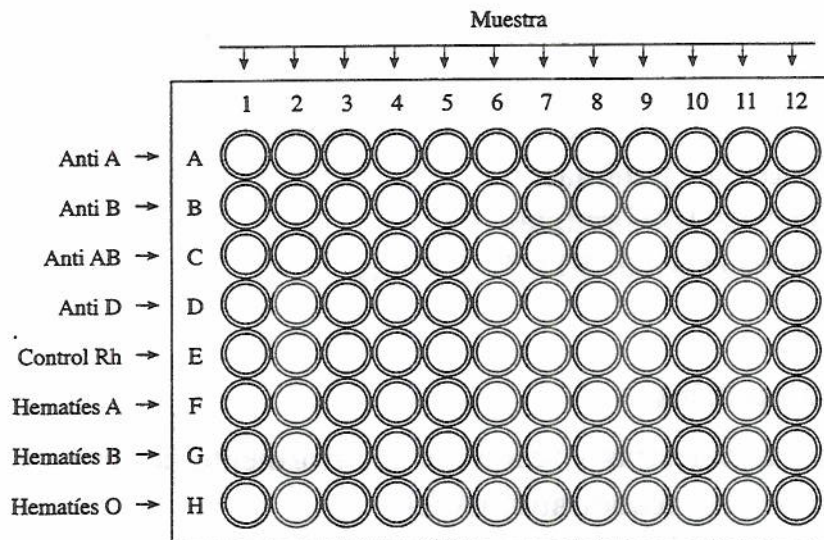


Figura 18. Columnas 1 a 12: muestras. Filas A, B, C, D, E: suspensiones de hematíes. Filas F, G, H: suero o plasma.

TÉCNICA AUTOMÁTICA

Colocar el rack de muestras, la solución salina, los antisueños y las microplacas en el pipeteador automático.

Proceder a la dispensación de las placas con el programa adecuado (ABO, Rh).

Una vez dispensadas las muestras de hematíes para grupo hemático y suero para grupo sérico, seguir los pasos de centrifugado, etc. como en la forma manual.

Centrifugar a 400 g durante 30 segundos.

Agitar hasta conseguir la resuspensión del botón de hematíes de los controles (control anti-D y hematíes O).

Proceder a la lectura de las placas, con lectores automáticos que puedan pasar la información al ordenador central.

En el caso de que la lectura se haga visual, el procedimiento sería semiautomático (Fig. 19).

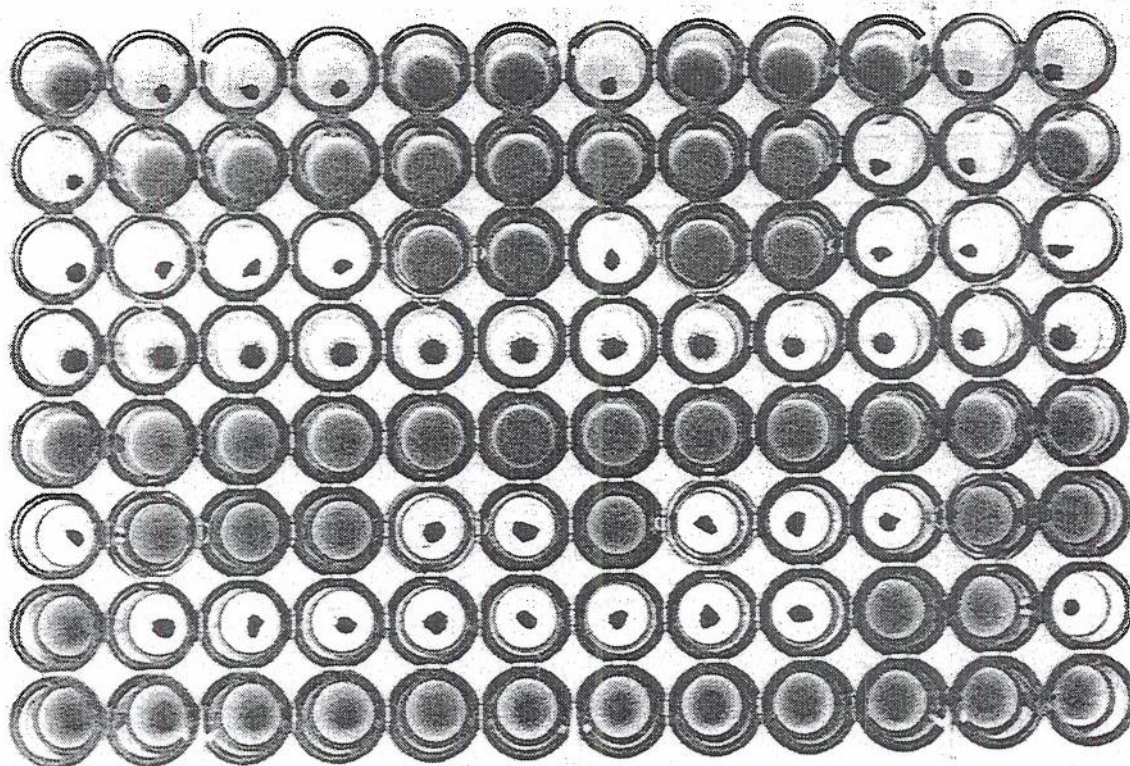


Figura 19. Ejemplo de resultados de la determinación ABO (prueba hemática y sérica) y Rh en microplaca.

EJEMPLO DE RESULTADOS AUTOMATIZADOS

BANC DE SANG DE BALEARS									
	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D	Control D	Hemat.A	Hemat.B	Hemat.O	Grupo
12336(1)	+	-	+	+	-	-	+	-	A+
12337(2)	-	-	-	-	-	+	+	-	O-
12338(3)	+	+	+	-	-	-	-	-	AB-
12339(4)	-	-	-	+	-	+	+	-	O+
12340(5)	+	-	+	+	-	-	+	-	A+
12341(6)	+	-	+	-	-	-	+	-	A-
12342(7)	+	+	+	-	-	-	-	-	AB-
12343(8)	+	-	+	+	-	-	+	-	A+
12344(9)	-	-	-	+	-	+	+	-	O+
12345(10)	+	-	+	+	-	-	+	-	A+
12346(11)	-	-	-	+	-	+	+	-	O+
12347(12)	-	+	+	-	-	+	-	-	B-

10. PRUEBA D^U EN MICROPLACA

*Matilde Sedeño
Elena Franco*

MATERIAL

Técnica Manual

- Muestras problemas extraídas en tubo con anticoagulante.
- Suero anti-D en dilución óptima de trabajo.
- Control de Rh a la misma dilución.
- Suero antiglobulina diluido a $\frac{1}{2}$.
- Solución de lavado: solución salina fisiológica.
- Hematíes sensibilizados con IgG como control antiglobulina.
- Incubador a 37°C.
- Hematíes D^u positivo como control.
- Placa de microtitulación con pocillos en U.
- Pipetas para 20 lambdas y repetidores de 25 a 200 lambdas.

Técnica Automática:

Además de las muestras y reactivos anteriormente descritos:

- Pipeteador-muestreador automático.
- Lector de microplacas y programa que interprete los resultados.
- Etiquetas con código de barras en las muestras problema.

TÉCNICA MANUAL

Se necesita una microplaca para preparar la dilución y otra para la realización de la técnica.

1. Dispensar 100 lambdas de suero fisiológico en el pocillo 1; y 100 lambdas en el 2, en la microplaca de dilución.

2. Añadir 20 lambdas de hematíes problema en el pocillo 1. De esta dilución, coger 20 lambdas y trapasarlal al pocillo 2.
 3. De la dilución obtenida en el pocillo 2 (2,7%), transferir 20 lambdas al pocillo A y 20 lambdas al pocillo B, de la placa de trabajo.
 4. Añadir 20 lambdas de anti-D en el pocillo A.
 5. Añadir 20 lambdas de control Rh en el pocillo B (Fig. 20).
 6. Incubar de 30 a 45 minutos a 37°C, tapando la microplaca.
 7. Centrifugar 20 segundos a 800 g.
 8. Decantar el sobrenadante.
 9. Agitar el botón de hematíes.
 10. Dispensar 200 lambdas de solución salina en cada pocillo.
 11. Centrifugar 40 segundos a 400 g y decantar. Repetir este proceso dos veces más.
 12. Añadir 25 lambdas de antiglobulina.
 13. Centrifugar 30 segundos a 400 g.
 14. Agitar suavemente hasta la resuspensión de los hematíes y observar la presencia de aglutinación.
- Un resultado positivo en los pocillos de control Rh invalida la prueba.

Prueba control antiglobulina

Añadir 25 lambdas de hematíes control antiglobulina, a los negativos y comprobar el viraje hacia la positividad, después de centrifugar 10 segundos a 400 g y agitar suavemente y leer.

TÉCNICA AUTOMÁTICA

La puesta en marcha de esta técnica aconseja trabajar en paralelo con el método convencional hasta que el personal técnico esté convenientemente entrenado y los resultados sean los esperados.

Dado el escaso volumen de D^u que habitualmente se realiza, esta técnica se hace de forma semiautomática .

Los pasos 1 y 2 de la técnica manual pueden automatizarse utilizando la placa de dilución de los grupos sanguíneos ABO y Rh, que ha sido dispensada por el pipeteador automático, y cuya dilución es la óptima para

la realización de esta técnica, ahorrándonos así tiempo en su preparación.

La interpretación se realiza de forma visual o automática.

Para proceder a la lectura automática se precisa de un programa que interprete los resultados de las muestras problema y de los controles (Fig. 21).

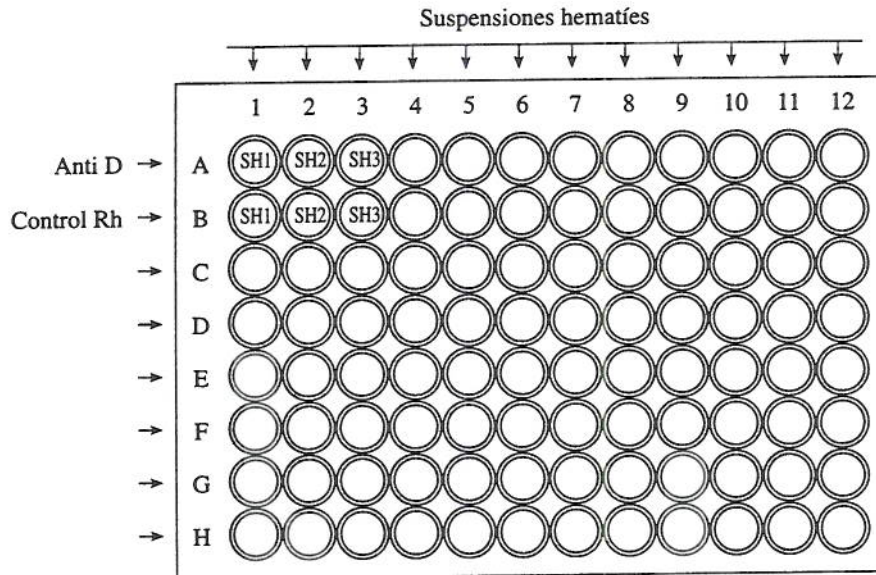


Figura 20.

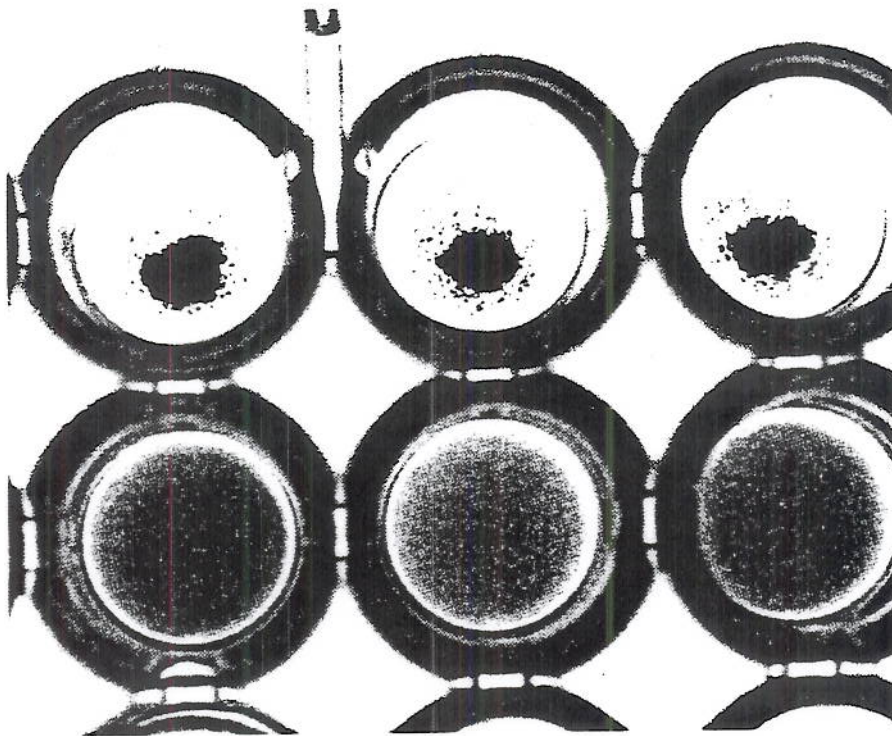


Figura 21.
Resultado de la prueba D^u en microplaca

11. FENOTIPO Rh EN MICROPLACA

*Elena Franco
Matilde Sedeño*

Para el fenotipado Rh en microplaca, además de todas las consideraciones técnicas generales necesarias, hay que tener en cuenta lo siguiente:

- Tipo de antisuero empleado (viscosidad, si precisa o no incubación, según las instrucciones del fabricante).
- Debe adoptarse un adecuado procedimiento de control. Ya que trabajaremos con antisueros de bajo nivel de proteínas, el control debe tener similares características. Habitualmente se usa albúmina al 3%.

Es muy conveniente procesar una muestra conocida; por ejemplo, de panel (habitualmente R1 R2) como control.

Siguiendo lo que ya se ha explicado en las generalidades, la concentración de las suspensiones de hematíes y las revoluciones de centrifugación variarán según el tipo de microplacas utilizadas.

Cada laboratorio debe estandarizar la técnica que emplee, tras realizar las pruebas necesarias hasta conseguir los mejores resultados.

MATERIAL

- Muestra problema extraída en tubo con anticoagulante (EDTA-K).
- Antisueros (salinos, químicamente modificados o monoclonales. En el caso de utilizar albuminosos, deben ser siempre diluidos). La dilución de los antisueros se hace con albúmina al 3% hasta la dilución de trabajo escogida para cada uno de ellos.
- Solución salina.
- Microplacas en U o en V igual a las empleadas para determinar el grupo ABO.

- Pipetas de 25 y 10 lambdas.
- Centrífuga para microplacas.
- Agitador de microplacas.
- Visor.

TÉCNICA

Distribuir los antiseros y las muestras problema, siguiendo el siguiente esquema: (Fig. 22).

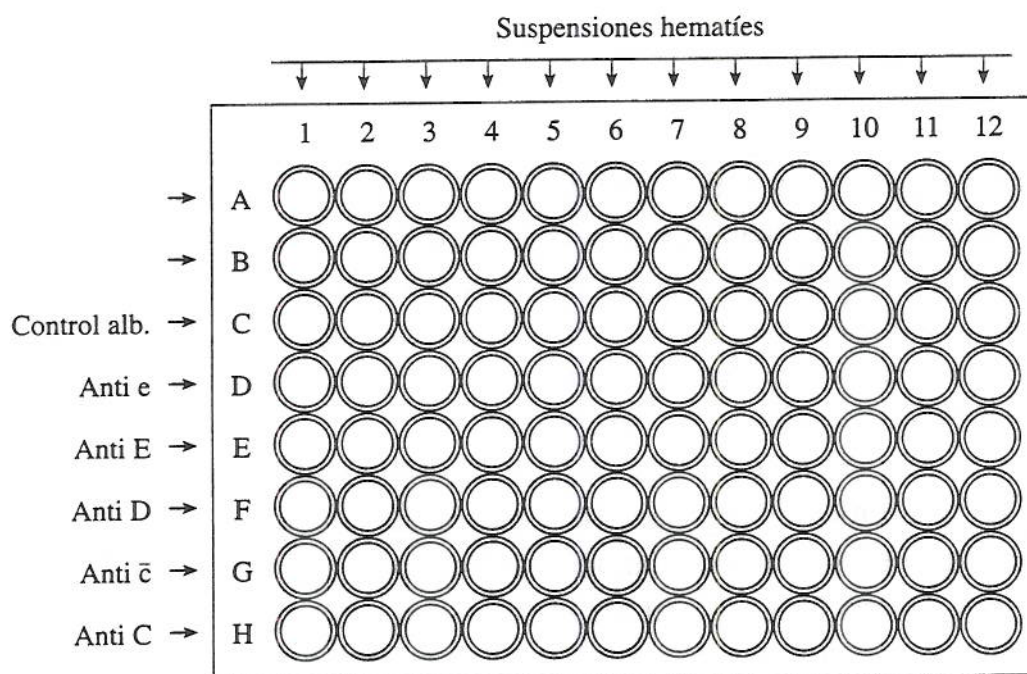


Figura 22.

De esta forma podremos hacer 12 determinaciones por cada microplaca.

11.1. MICROPLACAS EN U

1. Dispensar 10 lambdas de reactivo diluido en los pocillos de las filas correspondientes, así como la misma cantidad de albúmina al 3% como control.

2. Dispensar 500 lambdas de solución salina en una serie de tubos.

Añadir a cada uno de ellos, 25 lambdas de los hematíes de las muestras a estudiar y de una muestra conocida, generalmente R1R2 como control (Fig. 23).

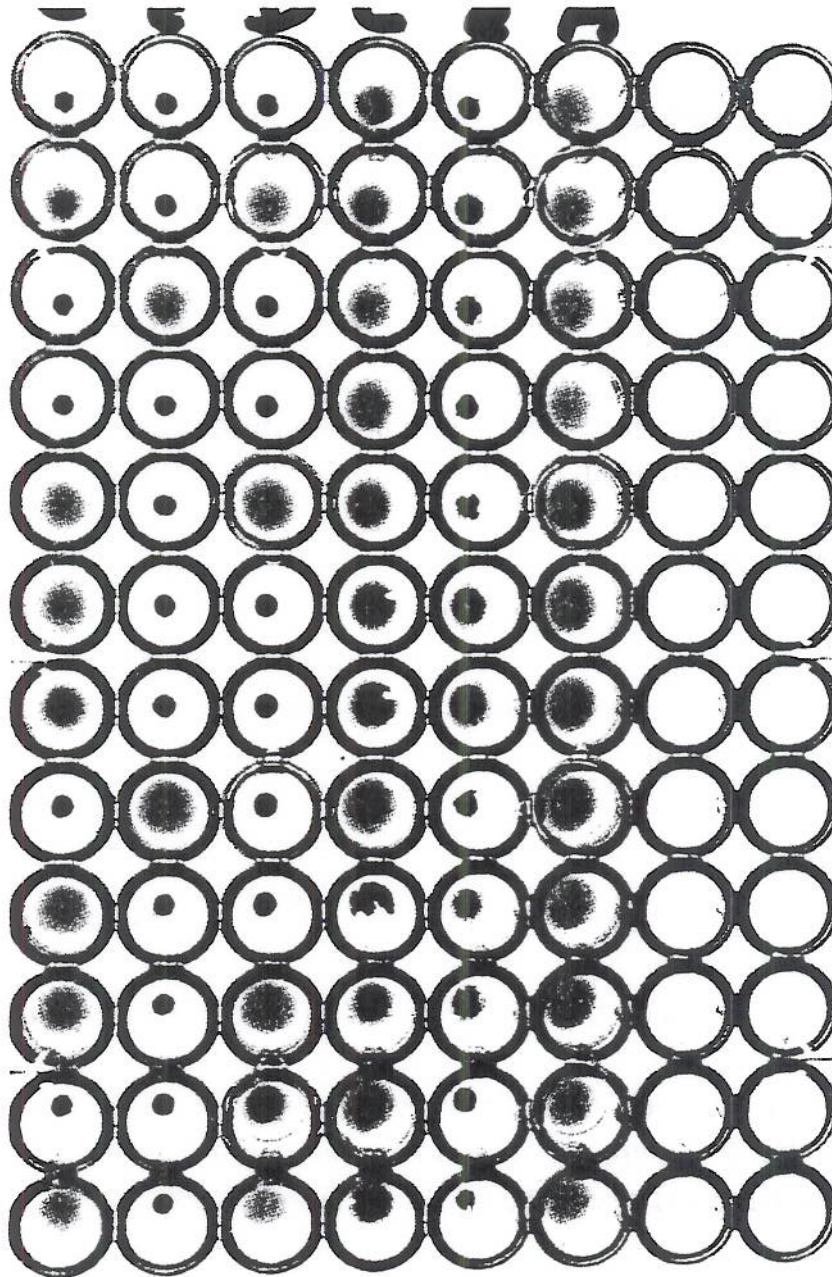


Figura 23. Resultados del fenotipo Rh en microplaca con fondo en U.

De esta mezcla, transferiremos 10 lambdas en los 6 pocillos de la fila correspondiente.

Tapar la microplaca. Mezclar e incubar 30 minutos a 37°C.

Centrifugar aproximadamente a 400 g durante 40 segundos.

Agitar y leer.

Interpretación

Aglutinación: resultado positivo.

11.2. MICROPLACAS EN V

Dispensar 10 lambdas de reactivos en los pocillos correspondientes.

En una serie de tubos dispensar 500 lambdas de Tween 20 al 2,2% y añadir 7 lambdas de concentrado de hematíes problema.

De esta mezcla, transferir 10 lambdas en los 6 pocillos de la fila correspondiente.

Tapar la microplaca, mezclar e incubar 30 minutos a 37°C.

Centrifugar a 900 g durante 10 segundos.

Colocar la microplaca de modo que forme una angulación con la horizontal de 60-70° sobre un visor con luz posterior, durante unos 5 minutos.

Leer en esta posición.

Interpretación

La reacción negativa provoca un descenso de los hematíes en forma de lágrima al resbalar por el pocillo.

La reacción positiva da imagen de un aglutinado puntiforme en el fondo del pocillo.

Este aglutinado puede también caer, dando un patrón de positividad ligeramente distinto, pero en cualquier caso totalmente diferenciado a la imagen de lágrima del resultado negativo (Fig. 24).

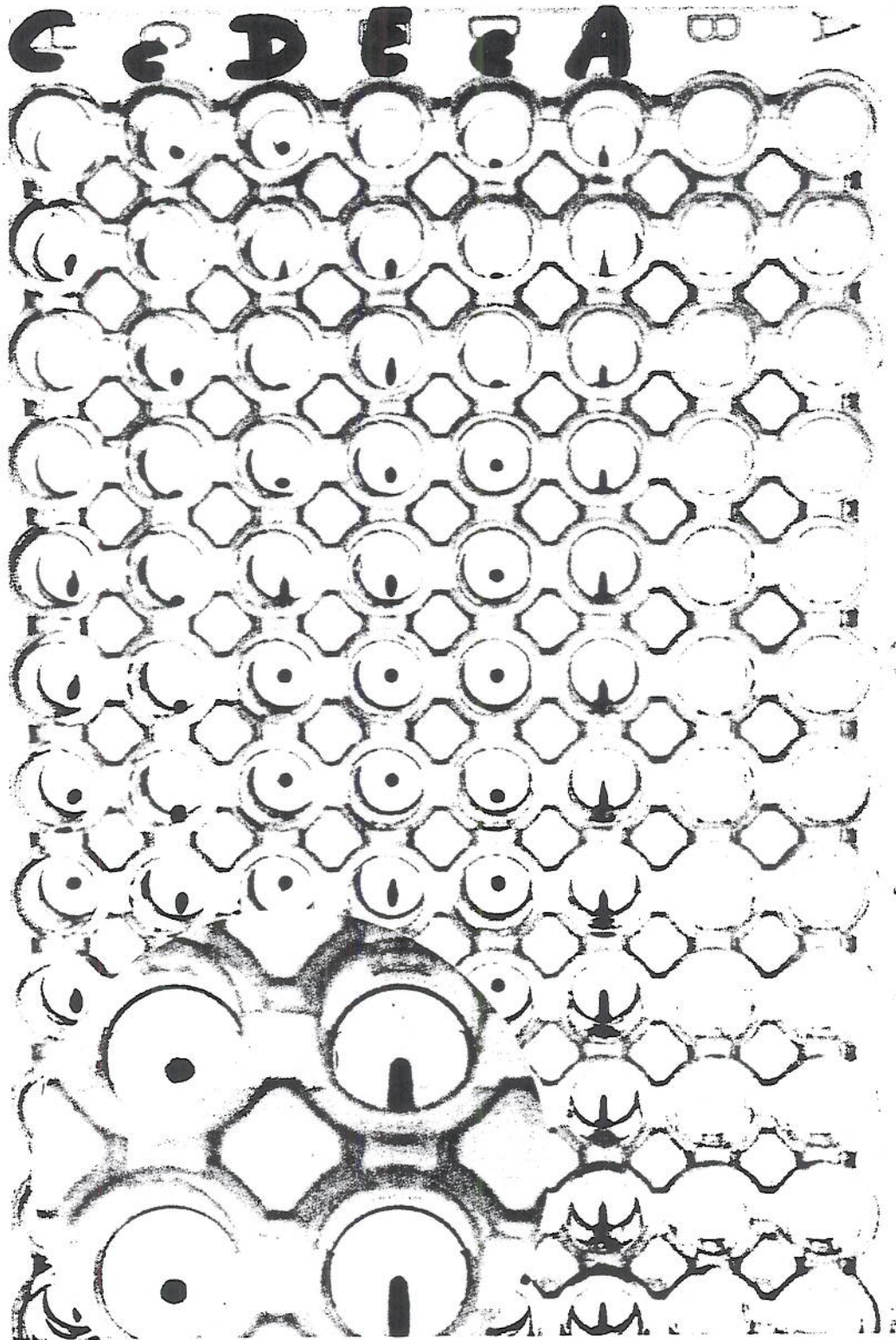


Figura 24. Resultado del fenotipo Rh en microplaca con fondo en V.

12. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IRREGULARES EN MICROPLACA

*Elena Franco
Matilde Sedeño*

Esta técnica suele realizarse con microplacas con pocillos en U porque la apreciación del grado de aglutinación es más fácil, tanto para la lectura manual como automática. Al ser algo mayor la capacidad de los pocillos en U, reduce el peligro de contaminación pocillo a pocillo durante los lavados.

Cada laboratorio estandarizará convenientemente la técnica (volúmenes, suspensiones de hematíes, velocidad de centrifugación, dilución de antiglobulina). Especial importancia adquiere la agitación final para conseguir una resuspensión del botón celular.

Una agitación excesiva o escasa puede desvirtuar la lectura de una aglutinación débil.

La puesta en marcha de esta técnica aconseja trabajar en paralelo con un método convencional, hasta que el personal técnico esté convenientemente entrenado y los resultados sean los esperados. Muestras positivas y sus respectivas diluciones deben ser estudiadas por micrométodo para asegurar la sensibilidad de la técnica.

En la rutina diaria siempre es conveniente trabajar con un control positivo débil junto a las muestras problema.

Después de la interpretación de los resultados, el control con hematíes sensibilizados IgG puede hacerse a todos los negativos, o a unas determinadas muestras por serie, y observar el viraje a la positividad.

MATERIAL

Técnica manual

- Suero problema.
- Suspensión de hematíes reactivos al 3%.
- Solución salina.
- LISS.
- Antiglobulina poliespecífica.
- Control antiglobulina (hematíes sensibilizados IgG).
- Suero control positivo débil.
- Microplacas en U.
- Pipeta de 50 lambdas.
- Pipeta repetidora de 25 a 200 lambdas.
- Opcional, pipeta multicanal de 200 lambdas.
- Centrífuga para microplacas.
- Agitador de microplacas.
- Visor con espejo de aumento.

Técnica automática

Además de todo el material arriba descrito para la técnica manual es necesario:

- Pipeteador automático.
- Lector de microplacas, programa que interprete los resultados.
- Etiquetas con código de barras en las muestras problema.

TÉCNICA MANUAL

Emplear tantos doubles pocillos como muestras debemos procesar, más un control positivo en cada microplaca.

- Dispensar:
 - 50 lambdas de suero en dos pocillos.
 - 25 lambdas de hematíes reactivos I y II.
 - 50 lambdas de LISS en cada pocillo.
- Agitar.
- Incubar 10 minutos a 37°C con la microplaca tapada.

- Centrifugar a 400 g durante 40 segundos.
- Decantar el sobrenadante con un movimiento rápido de muñeca.
- Secar los bordes de la microplaca.
- Agitar el botón de hematíes.
- Dispensar con una pipeta, repetidora o multicanal, 200 lambdas de solución salina.
- Volver a centrifugar a 400 g durante 40 segundos y repetir el proceso.
- En total deben hacerse 3 lavados.
- Después de decantar el último sobrenadante (tras el tercer lavado), agitar el botón.

Prueba control antiglobulina

- Añadir 50 lambdas de antiglobulina diluida a 1/2.
- Centrifugar a 400 g durante 10 segundos.
- Agitar y leer.
- Una vez leído el resultado añadir, a los negativos, 50 lambdas de hematíes sensibilizados IgG (control antiglobulina), y observar la positividad de la prueba, tras haber centrifugado 10 segundos a 400 g (Fig. 25).

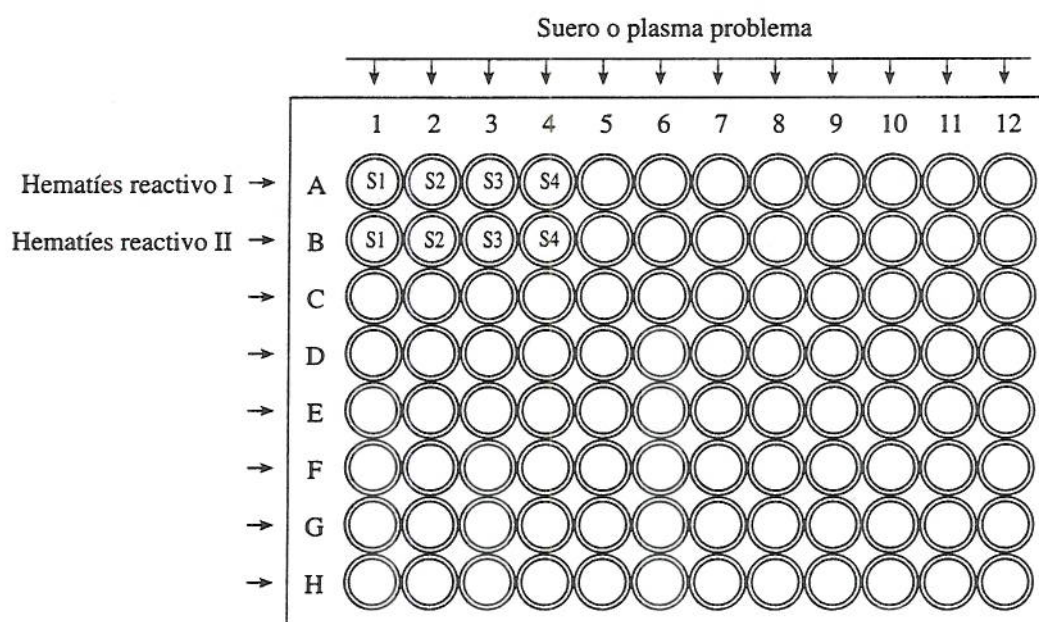


Figura 25.

TÉCNICA AUTOMÁTICA

Colocar el rack de muestras, microplacas, hematíes reactivos y LISS en el pipeteador automático.

Los hematíes reactivos, el LISS y la antiglobulina pueden dispensarse con el pipeteador automático; no obstante el laboratorio puede optar por hacer estos pasos tal como se describe en la técnica manual

Hay dificultad para que un lavador de microplacas no pierda hematíes durante el proceso. Por esta razón, se opta por realizar los lavados con la ayuda de pipetas multicanales, tal y como describimos en el procedimiento manual.

La lectura se realiza mediante un lector de microplacas y se interpreta con el programa correspondiente.

La detección de anticuerpos irregulares clínicamente significativos, utilizando polietilenglicol en solución de baja fuerza iónica como potenciador de la interacción eritrocitaria antígeno-anticuerpo, se realiza siguiendo la misma técnica anteriormente descrita, sustituyendo la adición de LISS por polietilenglicol (PEG).

La agregación inespecífica que provoca el polietilenglicol hace que la lectura se base exclusivamente en la fase antiglobulina, no detectándose en general anticuerpos de tipo IgM.

Se recomienda en este caso el empleo de antiglobulina IgG (monoespecífica), para evitar reacciones inespecíficas debidas a autoanticuerpos que fijan la fracción 3 del complemento (C3).

Existen en el mercado unas microplacas que llevan fijada la antiglobulina en las paredes del pocillo (antiglobulina en fase sólida) y otras, que llevan fijados los antígenos hemáticos. Las reacciones positivas por la unión del antígeno con el anticuerpo específico se muestran por la adherencia de los hematíes sensibilizados sobre las paredes del pocillo formando un tapiz homogéneo y las reacciones negativas producen botones en el fondo del pocillo (Figs. 26a y 26b).

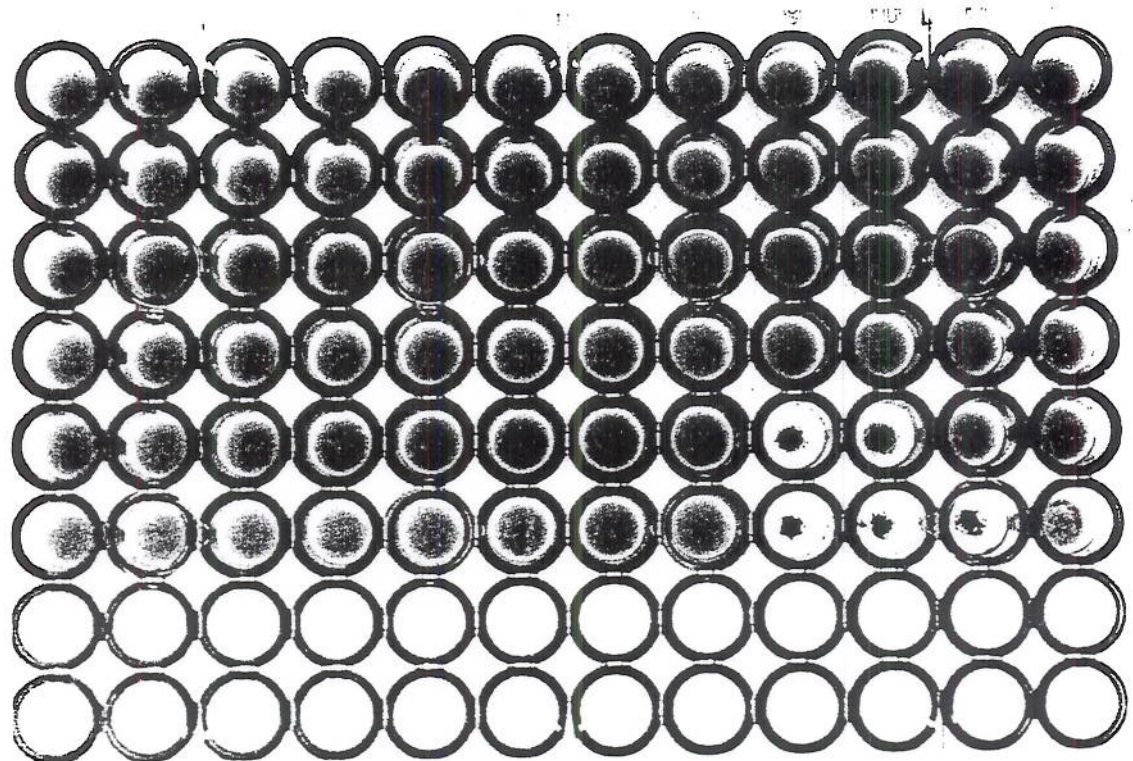
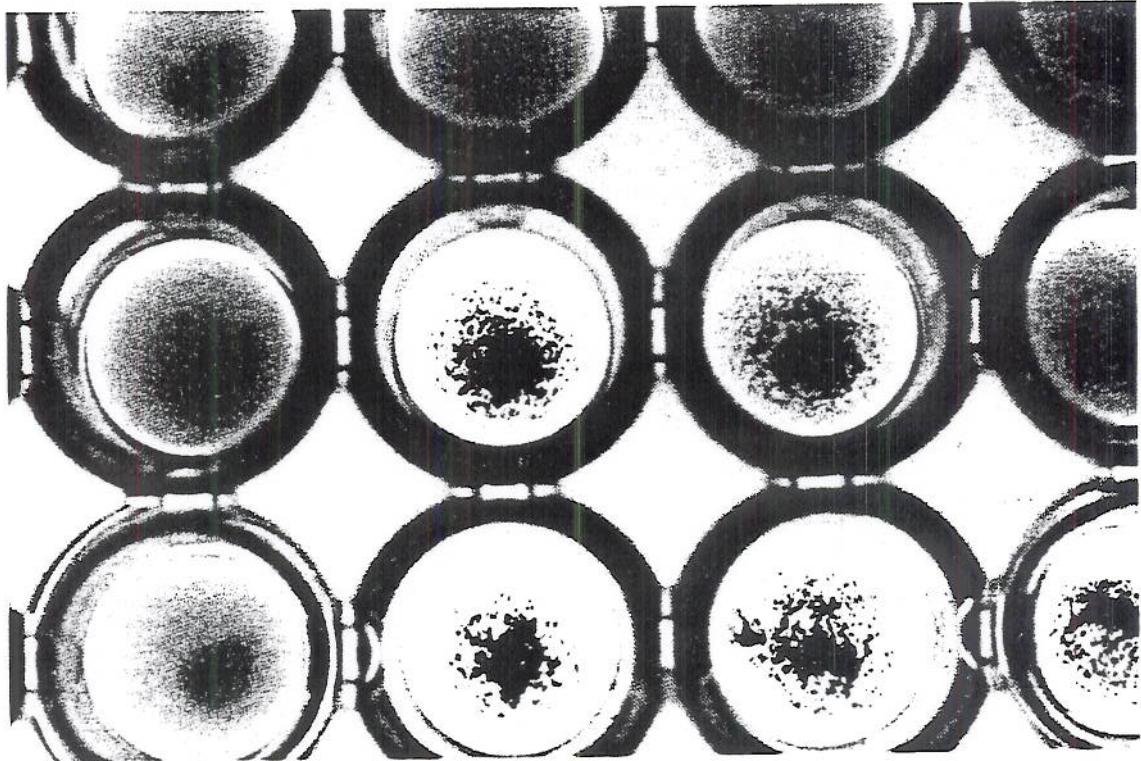


Figura 26a y b. Resultado de la detección de anticuerpos irregulares en microplaca.

13. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTILUÉTICOS (R.P.R. Y TPHA) EN MICROPLACA

*Matilde Sedeño
Elena Franco*

Aunque el objetivo de este Manual es la descripción, para su realización, de las técnicas de inmunohematología de banco de sangre en microplaca, hemos decidido incluir este capítulo por la agilidad y fiabilidad que proporciona al laboratorio que ya trabaja con microplacas, la detección de los anticuerpos antiluéticos también con esta metodología

R.P.R.

Material

- Microplaca rígida con pocillos de fondo plano.
- Reactivo: suspensión coloidal cardiolípidica en frasco dispensador.
- Control positivo.
- Agitador de microplacas.
- Pipetas para 5-50 lambdas.

Técnica

- Dispensar 25 lambdas de suero o plasma problema en cada pocillo más un control positivo
- La dispensación de muestras y reactivos puede realizarse mediante cualquier dispensador automático.
- Añadir con el dispensador 1 gota (12 lambdas) de reactivo.
- Mezclar.

- Agitar durante 10 minutos.
- Leer visualmente.

Interpretación del resultado

Según el reactivo utilizado, en general la positividad muestra una imagen más o menos importante de punteado por aglutinados (Fig. 27).

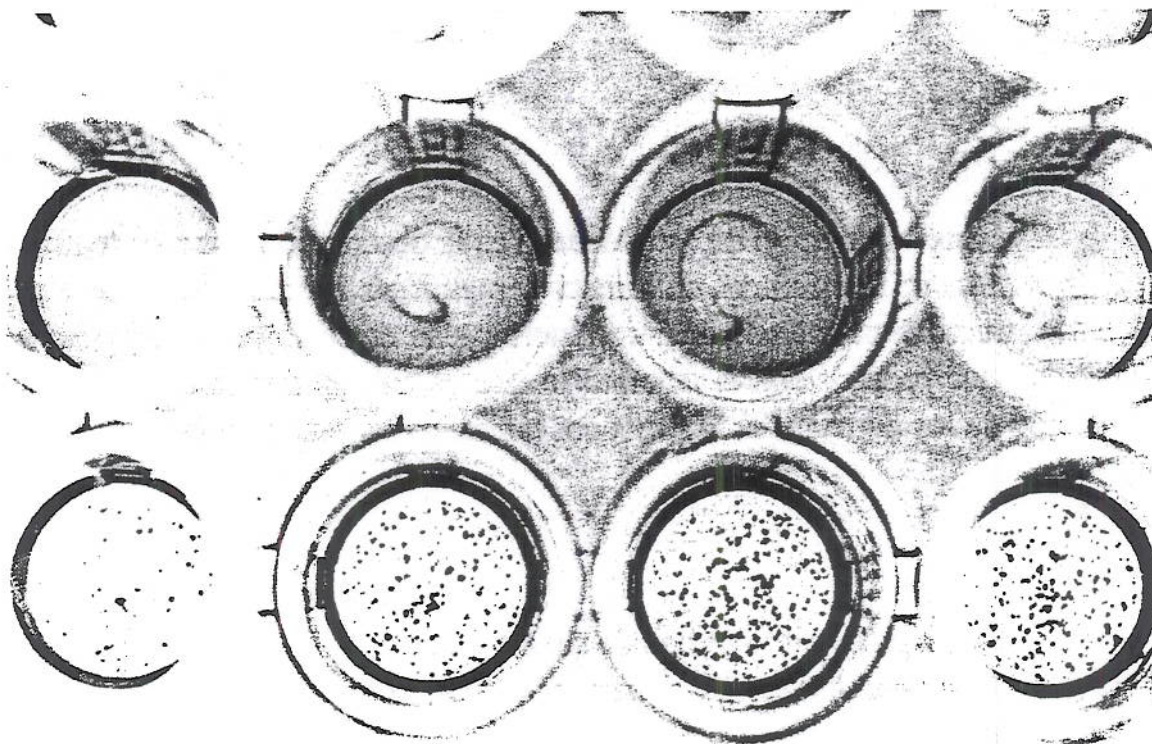


Figura 27. Resultado de la detección de anticuerpos antilúeticos (R.P.R.) en microplaca.

TPHA

Material

- Microplacas con fondo en U.
- Antígeno Reactivo: hematíes sensibilizados.
- Reactivo Control: hematíes no sensibilizados.
- Diluyente de las muestras (tampón fosfato).
- Control Positivo.

- Control Negativo.
- Pipeteador automático.
- Agitador de microplacas.
- Programa para interpretar la lectura de las microplacas.

Técnica

- Mediante el programa adecuado del pipeteador se procede a la dispensación de muestras, diluciones y reactivos.
- Agitar.
- Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- Leer con lector de microplacas y programa que interprete las lecturas.

Interpretación del resultado

Un resultado positivo da una imagen de células indicadoras (hematíes sensibilizados) sobre toda la superficie del pocillo, formando una capa homogénea.

Un resultado negativo da una imagen de un botón de células indicadoras (hematíes sensibilizados) en el centro del pocillo. No se aprecian células rodeando al botón central.

La lectura también puede ser automatizada, se requiere un lector capaz de llevar a cabo lecturas en puntos múltiples del mismo pocillo y un programa informático que interprete los resultados (Fig. 28).

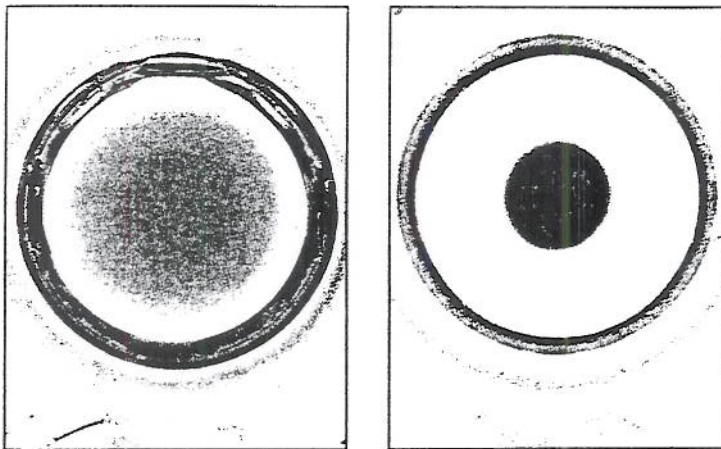


Figura 28. Esquema de los resultados negativo y positivo de la técnica TPHA.

14. TIPIFICACIÓN DE ANTÍGENOS ERITROCITARIOS CON POLYBRENE. TÉCNICA EN MICROPLACA

*Neus Boto
Sergi Esrich*

El Polybrene (hexadimethrine bromide) es un polímero de amonio cuaternario que aglutina los hematíes, de forma no específica, al neutralizar la carga negativa de éstos.

La sensibilización de los hematíes es realizada en un medio de baja fuerza iónica (LIM).

El Polybrene produce aglutinación no específica de los hematíes, lo que causa estrecha aproximación de éstos y, consecuentemente, permite la formación de puentes de moléculas de anticuerpo.

Para garantizar la aglutinación inespecífica del Polybrene es fundamental la adición de los reactivos como se describe en la técnica. No debe añadirse nunca el Polybrene antes del LIM.

La aglutinación no específica de los hematíes causada por el Polybrene es dispersada por la adición del citrato sódico. Se reconoce la presencia de antígenos eritrocitarios por la persistencia de aglutinación una vez neutralizado el efecto del Polybrene.

Los distintos lotes de Polybrene presentan diferencias que pueden causar variaciones en la prueba. Para evitar tales problemas es necesario estandarizar cada lote de Polybrene. Además debe existir un balance entre la concentración de Polybrene y su antagonista, el citrato sódico.

Una vez preparada la solución de trabajo de Polybrene debe conservarse a temperatura ambiente en un envase de plástico, ya que el vidrio lo inactiva. En estas condiciones mantiene su actividad durante, aproximadamente, un mes. El resto de los reactivos a utilizar pueden conservarse hasta un mes a 4°C. Debe dejarse que alcancen la temperatura ambiente antes de usarlos.

REACTIVOS

1. Antisueros

Cualquier antisuero, sea comercial o no, debe ser probado y estandarizado antes de su utilización en Polybrene, pues no todos los antisueros son aptos, ya sea porque:

- Produzcan poliaglutinabilidad.
- Detecten algún otro anticuerpo asociado que en tubo, o en la técnica aconsejada por el fabricante, no se detecte.
- No sean reactivos.

Selección de antisueros

El antisuero a estudiar debe enfrentarse, en esta técnica, a un panel eritrocitario para comprobar que las reacciones de aglutinación observadas corresponden al anticuerpo presente en el reactivo que está en estudio.

Una vez comprobada la especificidad, se debe establecer la dilución más elevada (1/2, 1/4, 1/8, etc., en suero AB al 5%.) en la que todavía muestra aglutinaciones claras con hematíes portadores de la expresión más débil del correspondiente antígeno (heterocigotos). Esta será la dilución que se utilizará posteriormente en la tipificación (dilución de trabajo). Este punto es muy importante, ya que la sensibilidad del Polybrene permite obtener unos resultados fiables con reactivos diluidos, lo que supone un notable ahorro de unos reactivos muchas veces escasos y unos costes inferiores con respecto a las técnicas habituales en tubo.

2. Hematíes

Lo más frescos posible o, como mínimo, de una antigüedad no superior a 15 días, los extraídos sobre CPD y a 3 días, los recogidos sobre EDTA.

En suspensión salina (ClNa 0,9%) al 2%, tanto los hematíes a fenotipar, como los hematíes control positivo y negativo.

3. Solución de Polybrene (Hexadimethrine Bromide- Sigma (H9268)

- Solución stock: Polybrene al 10% en ClNa 0,9%.
- Solución de trabajo: Polybrene al 0,025-0,050% en ClNa 0,9%.

4. LIM

- Glucosa al 5%: 5 g de dextrosa en 100 ml de agua destilada.
- EDTA-Na₂ · 2H₂O (TITRIPLEX®).
 - Diluir 0,22 g de EDTA Na₂ · 2H₂O en 100 ml de glucosa al 5%.

5. Solución de resuspensión

- Disolver 3,53 g de citrato trisódico (Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O) y 2 g de dextrosa en 100 ml de agua destilada.

6. Suero AB

Carente de anticuerpos eritrocitarios, para control negativo de las reacciones positivas que se produzcan.

MATERIAL

- Microtubos (1 ml)
- Gradillas microtubo
- Cubetas de reactivos
- Microplacas en U
- 2 pipetas multicanal (12 puntas) graduables: de 0 a 50 µl y de 50 a 250 µl.
- Cronómetro
- Centrífuga con cabezal para microplacas (Fig. 29).

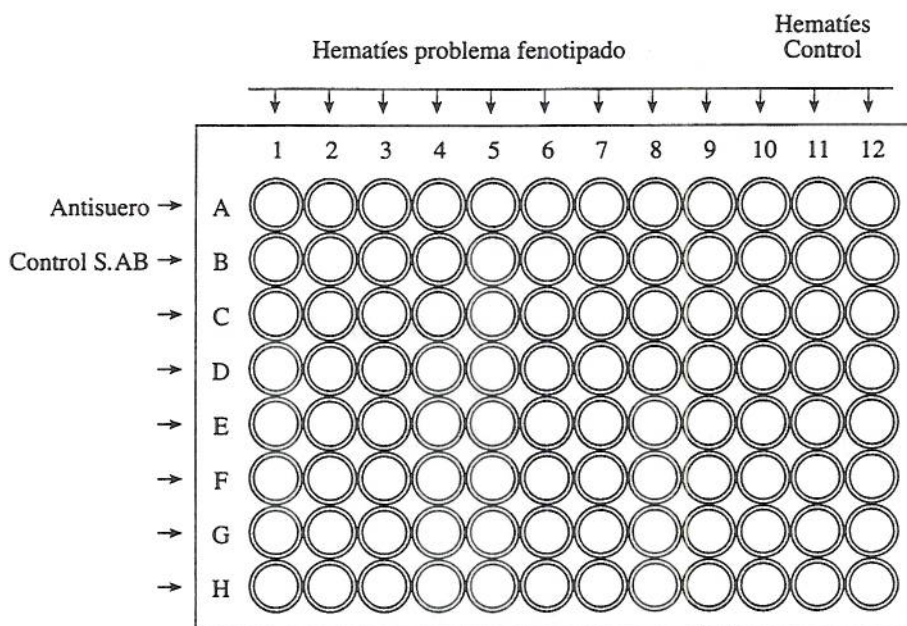


Figura 29.
Pocillos de las columnas n° 1 al n° 10: muestras problema.
Pocillos de las columnas n° 11 y n° 12: hematíes control, positivo y negativo respectivamente.
Fila (B): Suero AB. Fila (A): Antisero

TÉCNICA

- Dispensar 20 µl de suero AB en fila B.
- Dispensar 20 µl de antisero en fila A.
- Dispensar 20 µl de LIM en filas A y B (empezando por B para evitar una posible contaminación).
- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- Añadir 20 µl de Polybrene (0,025-0,050%) en filas A y B.
- Incubar 15-30 segundos.
- Centrifugar 1 minuto a 200-260 g.
- Decantar sobrenadante (dando un golpe seco con la muñeca).
- Añadir 20 µl de solución de resuspensión en filas A y B.
- Proceder de modo similar en las demás filas de la placa.

LECTURA E INTERPRETACIÓN

Se hace inmediatamente después de la adición de la solución de resuspensión, agitando hasta que los hematíes con suero AB estén bien resuspendidos.

La completa resuspensión de los hematíes al cabo de unos segundos se interpreta como resultado negativo.

La persistencia de aglutinados se interpreta como resultado positivo.

15. INVESTIGACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTIPLAQUETARIOS EN MICROPLACA POR TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Eduardo Muñiz

La técnica de inmunofluorescencia para plaquetas tratadas con paraformaldehído (PFA), descrita por Von dem Borne en 1980, está basada en el principio de la «antiglobulina» que permite demostrar la presencia de anticuerpos antiplaquetarios con la ayuda de un segundo anticuerpo (inmunoglobulina antihumana) marcado, en este caso, con fluoresceína. El tratamiento de las plaquetas con PFA actúa bloqueando el receptor plaquetar para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas IgG impidiendo, por tanto, la fijación inespecífica de inmunoglobulinas IgG, de agregados, o de complejos inmunes. Además, tiene la propiedad de inhibir la agregación plaquetar favoreciendo la manipulación de las plaquetas, de expulsar la IgG intraplaquetar que podría interferir en la evaluación de los resultados, y de producir un aumento del tamaño de la plaqueta que la hace más visible en el microscopio.

La técnica consta de las siguientes etapas:

- *Prueba directa.* Con ella se valora la presencia de inmunoglobulinas fijadas a las plaquetas del paciente con la ayuda de la antiglobulina, polivalente o monoespecífica, marcada con fluoresceína.

– *Elución.* Permite confirmar que las inmunoglobulinas detectadas en la prueba directa son verdaderos autoanticuerpos. En este caso el eluido debe de ser reactivo con unas plaquetas control a las que es enfrentado. La elución se efectúa por diferentes procedimientos, si bien, los más frecuentemente utilizados son el método de éter y el del cloroformotri-cloroetileno.

– *Prueba indirecta.* Se emplea para el estudio del eluido y para valorar si existe, además, anticuerpo libre en el suero del paciente.

A diferencia de otros ensayos, con la técnica de inmunofluorescencia es posible precisar si otras inmunoglobulinas distintas de la IgG están implicadas en la citopenia (IgM y/o IgA), así como las subclases de IgG, y la posible participación del complemento. Además, se trata de la única técnica de las basadas en el principio de la antiglobulina que consta de un control verdaderamente negativo, un suero AB procedente de un varón no transfundido. Las plaquetas empleadas como control normal deben ser ABO compatibles con el paciente. Como control positivo, que marca el correcto desarrollo de la técnica, suele emplearse un anticuerpo HLA pluri-específico, es decir con la capacidad potencial de reaccionar con cualquier plaqueta utilizada como control.

La sencillez y fácil reproducibilidad de esta técnica motivaron que el Comité de Expertos en Estandarización de la Sociedad Internacional de Transfusión la considerara en Munich, en 1984, la técnica de elección para la investigación rutinaria de los anticuerpos antiplaquetarios.

Los resultados pueden valorarse de forma semicuantitativa por microscopía de fluorescencia o bien, de forma totalmente cuantificable, mediante un citofluorómetro. En el primer caso, se utiliza una escala en la que los resultados positivos pueden oscilar entre el positivo débil (+), y +, ++, +++, +++++. Se acepta el estudio como positivo cuando la prueba directa y el eluido son positivos. La presencia de autoanticuerpos libres en el suero es un dato complementario, pero que no tiene valor diagnóstico si no se cumple el requisito anterior.

Cuando la prueba directa es positiva y el eluido es negativo, puede deberse a una fijación inespecífica de inmunoglobulinas o de complejos inmunes, pero también deben de excluirse otras posibilidades: anticuer-

pos de baja afinidad que se pierden durante el proceso de elución, insuficiente número de plaquetas en el paciente para conseguir una concentración de eluido suficiente, etc. En algunos casos, el empleo de una técnica de elución distinta a la inicialmente empleada (elución en ácida o en éter-ácida), la concentración del eluido obtenido o, simplemente, esperar a que el paciente presente un nivel de plaquetas más aceptable, son medidas que permiten clarificar el diagnóstico. En los pacientes con menos de $20 \times 10^9/l$ plaquetas no es factible realizar el estudio, por lo que se recomienda esperar hasta que se rebase esta cifra. La instauración de tratamiento con esteroides no enmascara, en general, el resultado, cuando no se han sobrepasado los 15 días desde su inicio.

La cantidad de sangre del paciente necesaria para efectuar esta técnica depende de la cifra de plaquetas que éste presente. Los criterios utilizados para determinar esta cantidad se sumarizan en la Tabla V.

Contaje de plaquetas	N.º de tubos con EDTA-Na ₂	
NIÑOS > 4 AÑOS:		
25.000-45.000/mm ³	5 ó más	(45 ml)
50.000-65.000/mm ³	4	(36 ml)
70.000-90.000/mm ³	3	(36 ml)
Más de 90.000/mm ³	2	(18 ml)
NIÑOS < 4 AÑOS	2 tubos (18 ml)	
ADULTOS:		
30.000-40.000/mm ³	10	(90 ml)
50.000-60.000/mm ³	8	(72 ml)
60.000-80.000/mm ³	6	(54 ml)
80.000-95.000/mm ³	4	(36 ml)
Más de 95.000/mm ³	2	(18 ml)
Además se extraerán 2 tubos (18 ml) de un testigo sano (ABO compatible con el paciente).		

Tabla V. Protocolo de extracciones para la realización del estudio de las trombocitopenias autoinmunes

En 1986 se describió una modificación de esta técnica para su utilización en placa de microtitulación que ha supuesto un acortamiento notable del tiempo requerido para la realización de la misma, un ahorro de la cantidad de reactivos necesarios y la posibilidad de efectuar un mayor número de estudios por la facilidad de manejo de las muestras. Estas ventajas la convierten en el método de elección para la investigación rutinaria de anticuerpos antiplaquetarios.

El proceso de aislamiento de las plaquetas a partir de sangre total anticoagulada en EDTA-Na₂ es el mismo que se sigue con la técnica original para la obtención de la suspensión de trabajo, tal como se describe a continuación.

En la Figura 30 se muestra el esquema a seguir, en el caso del estudio de una trombocitopenia de supuesto mecanismo autoinmune, para la dispensación de las muestras en los pocillos de la placa de microtitulación.

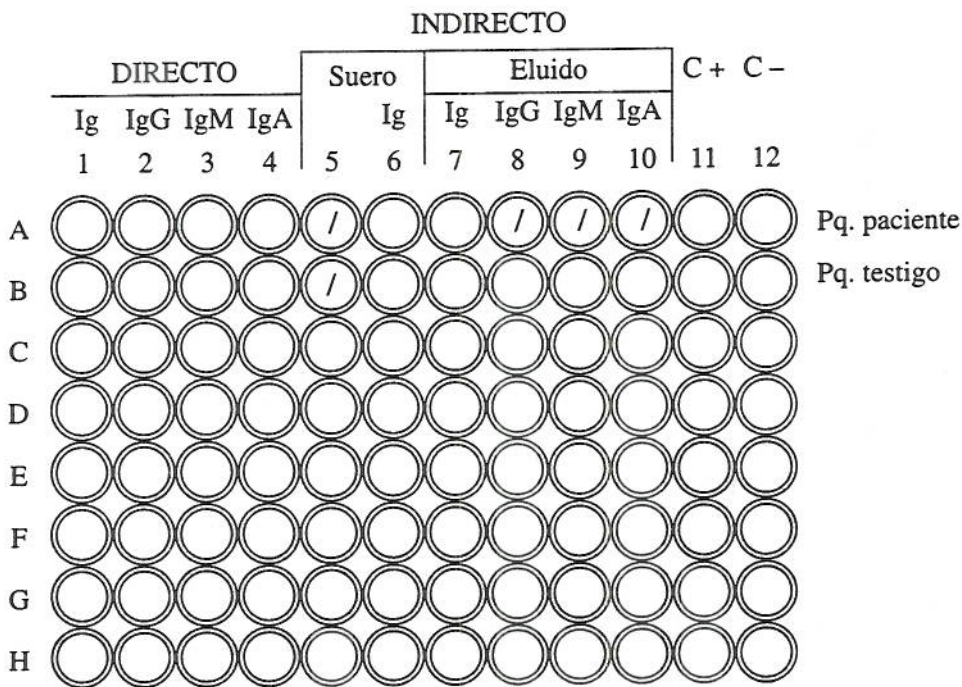


Figura 30. Esquema de trabajo en el estudio de trombocitopenias autoinmunes con la técnica de microplaca

REACTIVOS

1. PBS (liofilizado comercial) o:

- 8,2 g ClNa.
- 1,6 g $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- 0,2 g $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Hasta 1.000 ml de agua destilada.

2. EDTA- Na_2 al 5%

5 g de EDTA- Na_2 hasta 100 ml de PBS.

3. PARAFORMALDEHÍDO (PFA)

- Solución madre al 4%:
 - 4 g de PFA hasta 100 ml de PBS.
 - Calentar a 75°C durante 5-10 minutos.
 - Añadir NaOH 1M hasta que la solución sea transparente.
 - Dejar una hora a 4°C.
 - Filtrar con filtro Millipore.
 - Guardar en una botella estéril y cubierta con aluminio.
 - Ajustar el pH a 7,3 con ClH 1N.
 - Guardar a 4°C.
- Solución de trabajo al 1%:
 - 1 volumen de PFA al 4% + 3 volúmenes de PBS.
 - Comprobar el pH.

4. PBS-EDTA

- 8,186 g ClNa.
 - 3,35016 g EDTA- Na_2 .
 - 4,6968 g $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Añadir agua destilada hasta 1.000 ml.

5. PBS-EDTA BSA

- Añadir 5 ml de albúmina bovina al 20% a 1.000 ml de PBS-EDTA.

6. GLICEROL-PBS

- 3 volúmenes de glicerol y
- 1 volumen de PBS.

7. PBS-BSA al 0,2%

5 ml de albúmina bovina al 20% más 495 ml de PBS.

8. ANTIGLOBULINA LIOFILIZADA

- Seguir las indicaciones del fabricante.
- Habitualmente un vial se reconstituye con 1 ml de agua destilada.
- Una vez reconstituido el vial, centrifugar 10 minutos a 1.900 g.
- Separar el sobrenadante y guardarlo en alícuotas a -20°C.

TÉCNICA

I. Preparación de la suspensión de plaquetas y del eluido

- Centrifugar los tubos de sangre total 7 minutos a 300 g con el freno no conectado y el termostato a 22°C para la obtención de un plasma rico en plaquetas (PRP).
- Traspasar el PRP a otro tubo de cristal y centrifugar, nuevamente, 7 minutos a 2.000 g, con el freno conectado y a 22°C.
- Aspirar el plasma pobre en plaquetas (PPP) sobrenadante.
- Lavar 3 veces el botón de plaquetas en solución PBS-EDTA-BSA y centrifugar tras cada lavado, 7 minutos a 2.000 g, freno conectado y a 22°C. Para los lavados es recomendable añadir al botón plaquetar 1 ml de solución de lavado, resuspender las plaquetas con una pipeta Pasteur hasta la total disolución de los agregados y completar el llenado del tubo con la misma solución.
- Después del último lavado, separar los tubos con las plaquetas del paciente en dos mitades: una para la obtención del eluido y la otra para el tratamiento con PFA y la posterior preparación de la suspensión de trabajo.
- Añadir 2 ml de solución de PFA al 1%, resuspender las plaquetas en esta solución y dejar reposar durante unos cinco minutos.

- Lavar 2 veces en solución PBS-EDTA-BSA y centrifugar 7 minutos a 2.000 g con el freno conectado y a 22°C.
- Aspirar el sobrenadante del último lavado y preparar la suspensión de trabajo añadiendo PBS-EDTA-BSA hasta que empiece a visualizarse la pipeta Pasteur a través de la suspensión. La concentración de plaquetas final que se pretende es de 3×10^8 /ml.

II. Elución

a) Elución por éter

- Resuspender el botón de plaquetas destinado a elución en una solución de PBS-BSA 0,2%, hasta que comience a visualizarse la punta de la pipeta Pasteur.
- Añadir 2 volúmenes de éter y tapar el tubo.
- Agitar vigorosamente durante 2 minutos.
- Incubar la mezcla durante 30 minutos a 37°C, manteniendo el tapón y agitando regularmente.
- Centrifugar el eluido 10 minutos a 2.000 g. Se formarán tres capas, que corresponden de arriba a abajo al éter, los estromas y el eluido.
- Recoger el eluido con una pipeta Pasteur atravesando, cuidadosamente, las capas de éter y de estromas.
- Centrifugar el eluido, nuevamente, 10 minutos a 2.000 g y traspasarlo a continuación a un tubo limpio.
- Si el eluido no se emplea en el mismo día, es posible conservarlo a 20°C hasta su utilización.

b) Elución por el método de cloroformo-tricloroetileno

- Resuspender el botón de plaquetas en solución PBS-BSA al 0,2% hasta que comience a visualizarse la punta de la pipeta Pasteur.
- Añadir un volumen igual de una mezcla de cloroformo-tricloroetileno, que debe de prepararse al día.
- Agitar vigorosamente durante 2 minutos.
- Incubar durante 10 minutos a 37°C, agitando regularmente.
- Centrifugar 10 minutos a 3.400 g. La capa superior corresponde al eluido, que deberemos de recoger y traspasar a un tubo limpio.

III. Prueba indirecta

- Dispensar 20 μ l de suero y eluido del paciente, y de los sueros control positivo y negativo en los pocillos correspondientes, tal como se indica en la Figura 30.
- Dispensar 20 μ l de la suspensión de plaquetas del paciente y del testigo sano, y mezclar.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces en la solución de lavado PBS-EDTA-BSA y centrifugar la microplaca en su adaptador durante 3 minutos a razón de 300 g, con el freno conectado. Tras cada lavado, eliminar el sobrenadante por decantación y secar la superficie de la microplaca en celulosa. Resuspender el botón de plaquetas en el ciclomixer.
- Tras el último lavado desechar el sobrenadante y añadir 20 μ l de anti-globulina humana marcada con fluoresceína. Mezclar.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y a oscuras.
- Lavar 2 veces más, tal como se ha explicado anteriormente.
- Desechar el sobrenadante del último lavado y añadir 20 μ l de la solución glicerol-PBS (3:1). Mezclar.
- Traspasar el contenido de cada pocillo a un porta y cubrirlo con un cubre de 24 x 24. Mantener a 4°C todos los portas, protegidos de la luz hasta el momento de la lectura (mínimo 30 minutos).

IV. Prueba directa

- Dispensar en los pocillos correspondientes 20 μ l de la suspensión de plaquetas del paciente y del testigo.
- Centrifugar la microplaca 3 minutos a 300 g. Decantar para eliminar el sobrenadante y secar la superficie con celulosa. Resuspender con cuidado el botón de plaquetas en el ciclomixer.
- Añadir 20 μ l de la antiglobulina marcada con fluoresceína (polivalente y monoespecíficas) al pocillo correspondiente.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y a oscuras.
- Lavar 3 veces con 150 μ l de la solución de lavado PBS-EDTA-BSA y centrifugar 3 minutos a 300 g. Eliminar el sobrenadante por decantación y resuspender los botones de plaquetas.

- Tras el último lavado, resuspender el botón y añadir 20 µl de glicerol-PBS.
- Traspasar el contenido de cada pocillo a un porta y cubrir (cubre 24 x 24). Mantener los portas a 4°C, protegidos de la luz, hasta el momento de la lectura (mínimo 30 minutos).
- La lectura en microscopio de fluorescencia es recomendable efectuarla utilizando un objetivo de inmersión en agua (x 50).

NOTA: La dispensación de las muestras para la prueba directa se efectúa intercalando las mismas tras la primera incubación de la prueba indirecta, antes de la centrifugación que sigue al tercer lavado.

V. Control de las antiglobulinas

Realizar un test de inmunofluorescencia indirecto con un suero AB de varón no transfundido y un suero testigo positivo (anti-HLA o específico de plaquetas), con varias diluciones de la antiglobulina en PBS.

Escoger aquella dilución en la que los resultados con el suero AB sean negativos y el máximo positivos con el suero testigo positivo.

15.1. INVESTIGACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PLAQUETARIOS EN FASE SÓLIDA

En los últimos años han sido comercializadas una serie de técnicas para la investigación de anticuerpos antiplaquetarios que utilizan como soporte microplacas. Entre estas técnicas se pueden citar las siguientes:

CAPTURE-P (Immucor). Se trata de un sistema en fase sólida basado en los métodos originalmente descritos por Rachel et al (Med Lab Sci 1985; 42:194) y Shibata et al (Vox Sang 1981; 41:25). Las plaquetas del paciente o del donante son dispensadas y fijadas en el fondo de los pocillos correspondientes y, posteriormente, se incuban con el suero en estudio. Para valorar la presencia de los anticuerpos antiplaquetarios se emplean en la fase final unos hematíes indicadores recubiertos de IgG que reaccionan de manera distinta según estén o no presentes estos anticuerpos determinando, en cada caso, un patrón de lectura característico.

PAKPLUS™ (GTI-Reactiva). Se trata de otro método en fase sólida basado en los principios del enzoinmunoensayo (ELISA). En este caso, las microplacas ya llevan prefijado el antígeno (moléculas HLA de clase I, glicoproteínas de membrana IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa y IV). Tras la incubación antígeno-anticuerpo se utiliza una antiglobulina humana marcada con fosfatasa y finalmente un substrato que producirá la reacción de color. La densidad óptica del color producido se valora con un espectrofotómetro.

MASPAT (CLB-Menarini). Se trata también de una técnica en fase sólida. La microplaca lleva prefijado un anticuerpo antiplaquetario monoclonal de ratón que inmoviliza a las plaquetas dispensadas posteriormente. Tras la dispensación del suero en estudio, se añade una antiglobulina de ratón anti-IgG humana y hematíes sensibilizados. En el caso de que el suero contenga anticuerpos antiplaquetarios (IgG), la antiglobulina de ratón y los hematíes sensibilizados se unirán a éstos. En caso contrario, los hematíes sensibilizados formarán un botón en el centro del pocillo.

En conjunto, las tres técnicas resultan muy eficaces para la detección de aloanticuerpos antiplaquetarios (HLA de clase I y específicos de plaquetas), y una de sus indicaciones principales es la búsqueda de donantes de plaquetas compatibles (prueba cruzada plaquetaria) en los pacientes que desarrollan refractariedad inmune a las transfusiones de plaquetas. Sin embargo, no resultan suficientes para la investigación de autoanticuerpos plaquetarios en los pacientes con sospecha de Púrpura trombocitopénica autoinmune (PTAI), como sucede con todas las técnicas que basan esta investigación en el estudio del suero del paciente (Fig. 31).

AGRADECIMIENTOS. A Montse Ibáñez, Merche Gracia y Marina Arilla por su excelente asistencia técnica en la investigación de anticuerpos antiplaquetarios y en la evaluación de las nuevas técnicas diseñadas para este fin.

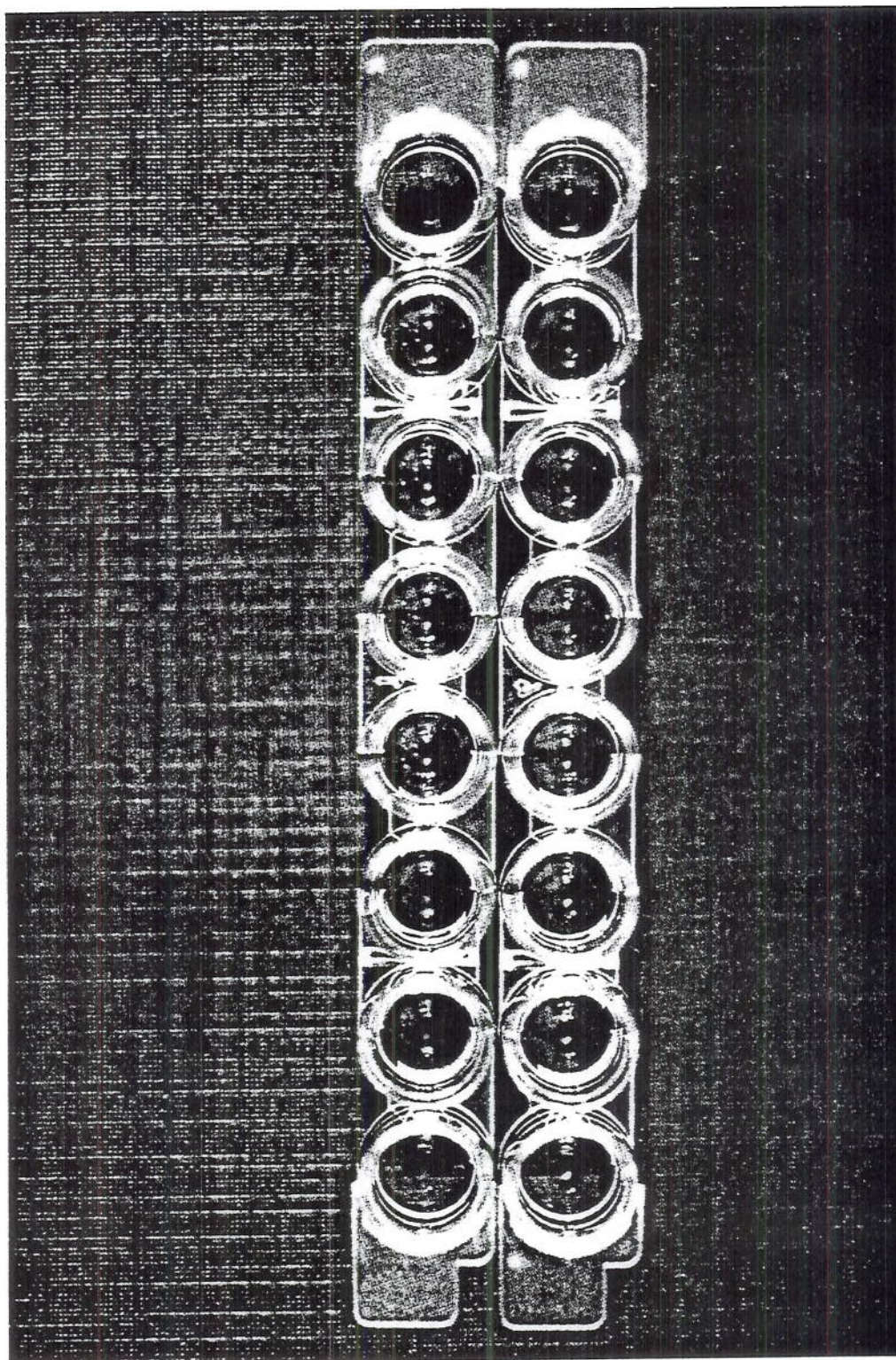


Figura 31.