

Normalización de un inmunoensayo para la detección de anticuerpos antiplaquetarios por citometría de flujo



Adams-Villalón Y¹, Jerez-Barceló Y², Chang-Monteagudo A¹, Bencomo-Hernández A¹

¹Instituto de Hematología e Inmunología; ² ICBP “Victoria de Giron”; La Habana, Cuba.

Email: yanetjerez@infomed.sld.cu

RESUMEN

Los métodos para la detección de anticuerpos antiplaquetarios (AAP) se han ido perfeccionando a la par de los avances científico-técnicos. La introducción por primera vez en Cuba de un citómetro de flujo ApogeeFlow®, desarrollado para la detección de micropartículas con alta resolución, permitió la aplicación de la citometría de flujo (CF) a los estudios de detección de AAP. Se realizó un estudio experimental entre enero-diciembre del 2015 en el laboratorio nacional de referencia de Inmunohematología del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI) de La Habana, con el objetivo de normalizar un inmunoensayo para la detección de AAP por CF. Para la clasificación de las muestras que formaron parte de los controles y paneles de muestras se utilizó como prueba de la verdad el diagnóstico clínico de trombocitopenia inmune primaria. Se obtuvieron controles positivos y negativos con la actividad biológica requerida y se determinó una dilución óptima para los controles positivos de 1/5. La mejor dilución para el conjugado fue de 1/20 y su tiempo de incubación de 30 min. Se prepararon y caracterizaron los reactivos biológicos y se determinaron las condiciones óptimas de trabajo de un inmunoensayo basado en CF para la detección de AAP, el cual presentó indicadores de normalización acordes con los criterios internacionales para este tipo de método.

Palabras clave: anticuerpos antiplaquetarios, citometría de flujo, trombocitopenia inmune primaria

INTRODUCCIÓN

En nuestro país la identificación de los AAP se realiza mediante la técnica de IF que permite evaluar la morfología de las plaquetas con bajos niveles de sensibilidad.

La introducción por primera vez en Cuba de la tecnología de CF ApogeeFlow ®, desarrollada para la detección de micropartículas con alta resolución, permitió aplicar la CF a los estudios de detección de AAP en el laboratorio nacional de referencia de Inmunoematología del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI) de La Habana. Se desconocen las condiciones óptimas para el ensayo con este nuevo tipo de lectura y el grado de correlación con el diagnóstico clínico de los pacientes. Por lo cual se hizo necesario realizar la normalización del inmunoensayo por CF, para la detección de AAP, que contribuiría a mayores facilidades para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con PTI.

OBJETIVO

Normalizar un inmunoensayo para la detección de anticuerpos antiplaquetarios por citometría de flujo con tecnología ApogeeFlow ®.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio de tipo experimental en el laboratorio de Inmunoematología del IHI en el período comprendido entre enero-diciembre del 2015.

La recolección de la muestra se realizó en el centro de extracciones y en salas de hematología del IHI. Se obtuvo 10 mL de sangre periférica dividida en dos tubos con 1mL de EDTA al 5 %.

Toda la información recogida se incluyó en una base de datos de Microsoft Access 2016.

Preparación de controles y paneles de muestras.

Control negativo: Plasma de donantes voluntarios de sangre, masculinos, no transfundidos, de grupo AB, negativos a la pesquisa de anticuerpos anti HLA por el método de ELISA, negativos a la detección de AAP por Inmunofluorescencia directa e indirecta y por MAIPA.

Control positivo

Suero control positivo producido en el laboratorio de referencia en Inmunoematología de Cataluña (Banc de Sang i Teixits, Barcelona, España).

Mezcla de plasma de 30 pacientes con AAP positivos por microscopia de Inmunofluorescencia directa e indirecta y por el método MAIPA.

Panel de muestras negativas:

- Muestras de plasma de 20 donantes de sangre masculinos no transfundidos.
- Muestras de plasma de 15 pacientes con trombocitopenia no inmunes.

Panel de muestras positivas:

- Plasma y plaquetas procedentes de 30 pacientes con criterios de diagnóstico clínico de PTI primaria.

Dilución de los controles.

Se realizaron diluciones en el plasma control negativo de los controles positivos (1/2,1/5,1/10,1/20,1/40,1/80), y se seleccionó la que permitiera la mayor discriminación de las IMF con respecto a los controles negativos.

Dilución del conjugado y selección del nivel de corte

Se determinó la IMF de los controles positivos utilizando varias diluciones del conjugado (1/2,1/5,1/10,1/20,1/40,1/80) AcMo poliespecífico antinmunoglobulinas humana marcado con FITC (DAKO), en PBS (*“phosphate buffered saline solution”*), más albúmina bovina al 1%. Se seleccionó como mejor dilución del conjugado la que mostró mayor diferencia entre las medianas de IMF entre control positivo y negativo.

Para la selección del nivel de corte se consideró como resultado positivo una IMF superior a la media más dos desviaciones estándar de la IMF los controles negativos.

Procesamiento Técnico

Se centrifugaron las muestras a 150 g durante 15 min y se separó el plasma rico en plaquetas, el cual se centrifugó a 1100 g durante 5 min. El plasma pobre en plaquetas resultante se almacenó

en alícuotas a -20°C para su posterior utilización en la prueba; y el botón plaquetario se sometió a *shock* osmótico con cloruro de amonio al 0.4 % para eliminar los hematíes. Las plaquetas se sometieron a cuatro lavados a 1 300 g, 5 min con PBS-azida sódica al 0,1 % y se fijaron con PFA0.75 % por 5 min. Finalmente se realizaron 3 lavados y se ajustó la concentración celular a 2×10^8 cel /L.

Prueba directa

Se utilizó una muestra de 20 μL de plaquetas del paciente y 10 μL del AcMo poliespecífico anti-Igs humana marcado con FITC (DAKO) según la dilución que se determinó en la normalización. Se incubó 30 minutos en microplacas de PVC de 96 pocillos fondo en U recubiertas con PBS-BSA al 1 % a $20-25^{\circ}\text{C}$. Se realizó un lavado a 1 100 g durante 5 min para retirar el exceso de conjugado. Para la lectura por microscopia, la muestra se resuspendió en glicerol PBS-azida sódica 0,1 %, y dispensaron 20 μL en lámina; y para la lectura por CF se añadieron 500 μL de PBS-PFA al 1 % a 20 μL de la muestra.

Prueba indirecta

Se utilizó una mezcla de plaquetas de 5 donantes del grupo sanguíneo O sin tratar y tratadas con cloroquina al 20 % para eliminar los antígenos HLA clase I de las 4. plaquetas y diferenciar la presencia de los anticuerpos anti-HLA. Las plaquetas se incubaron con 20 μL del plasma del paciente a $20-25^{\circ}\text{C}$ por 30 min; y los anticuerpos no unidos se retiraron mediante cuatro lavados a 1 100 g durante 5 min con PBS-azida sódica 0,1 %. Se aplicaron 10 μL del AcMo poliespecífico anti-Igs humana marcado con FITC (DAKO), durante una segunda incubación en ausencia de luz en iguales condiciones de temperatura y tiempo. Los elementos no fijados fueron eliminados por un lavado con PBS-azida sódica 0,1 %, a 1 100 g durante 5 min. Para la lectura por microscopia, la muestra se resuspendió en glicerol PBS-azida sódica 0,1 %, y dispensaron 20 μL en lámina; y para la lectura por CF se añadieron 500 μL de PBS-PFA al 1 % a 20 μL de la muestra.

Interpretación de la lectura por microscopia

Para la lectura se utilizó un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Los resultados se expresaron como positivos ante la fluorescencia de color verde manzana, de clara a brillante intensa. Se consideró un marcador de positividad adicional la formación de *clusters* de fluorescencia sobre la superficie de las plaquetas. Como resultados negativos se evaluaron todas aquellas lecturas donde no se observó fluorescencia visible o en las que esta fue escasamente opaca a la tinción verde manzana comparable con su control negativo correspondiente.

Interpretación de la lectura en el citómetro de flujo

En un citómetro de flujo ApogeeFlow A40-Universal (Apogee Flow Systems Ltd, Hemel Hempstead, UK) se estableció una región de interés (*ROI*, del inglés “*region of interest*”) que incluyera 4000 eventos de la zona de mayor densidad de plaquetas en un gráfico de FSC vs SSC. A partir de la ROI seleccionada se construyó un histograma que representara la cantidad de eventos *versus* el logaritmo de la intensidad de fluorescencia verde. La prueba se consideró positiva cuando la IMF fue superior a la media más dos desviaciones estándar de la IMF los controles negativos.

RESULTADOS

El control positivo obtenido en la presente investigación presentó una IMF detectable desde las diluciones 1/2 hasta 1/20 lo que demostró su adecuada actividad biológica. Estos controles presentaron menor IMF con respecto a los de referencia, pero suficiente para una buena diferenciación con respecto al control negativo (Gráfico 1).

La dilución que se seleccionó para los controles fue de 1/5, por ser aquella en la que se observó la mejor discriminación de las IMF con respecto a los controles negativos y porque en dicha dilución no existieron diferencias estadísticamente significativas de las IMF del control positivo con respecto al comportamiento del control positivo de referencia ($p > 0,14$).

Esta dilución de los controles fue similar a las seleccionadas por investigadores quienes en sus estudios de especificidad de AAP diluyeron sus controles en el rango 1/2 hasta 1/8.

La actividad biológica del control positivo fue disminuyendo a medida que se les aplicaron ciclos de congelación y descongelación lo cual está relacionado con la desnaturalización de los APP (Gráfico 2).

Existieron diferencias estadísticamente significativas de las IMF entre ciclos ($p < 0,015$) por lo cual se determinó que la forma óptima de almacenamiento sería preparando alícuotas en viales de 1,5 mL que se guardarían en congelación a -20°C y durante su utilización se pasarían a 4°C hasta su agotamiento o desecho.

La mayor dilución del conjugado que permitió una mejor discriminación entre el control negativo y los controles positivos fue 1/20. Esta dilución mostró la mayor diferencia entre las medianas de IMF entre el control negativo y el control positivo (Gráfico 3).

Con el aumento de la concentración del conjugado no se observó un incremento de la señal del control negativo lo que evidenció que fueron mínimas las interacciones inespecíficas de la molécula señal en el inmunoensayo (Gráfico 3).

Los resultados en la selección de la dilución del conjugado coincidieron con otros autores que normalizaron ensayos para la inmunología plaquetaria basados en CF como He y colaboradores, quienes en el 2013 desarrollaron un método para la detección de autoanticuerpos contra las plaquetas utilizando perlas recubiertas de antígenos.

Con la incubación del conjugado de $20-25^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, se logró la mayor discriminación entre los controles positivos y negativos (Gráfico 4). Este tiempo coincidió con el utilizado por algunos autores.

A pesar de que a los 45 min de incubación del conjugado aún se logró una buena discriminación entre los controles, aumentó la IMF de las muestras negativas, probablemente como expresión del incremento de las uniones inespecíficas.

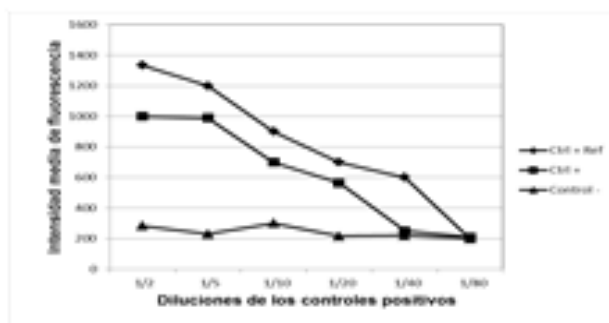


Gráfico 1: Evaluación de la dilución de los controles positivos

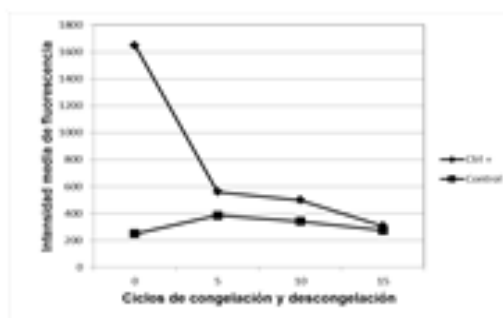


Gráfico 2: Evaluación del efecto de los ciclos de congelación-descongelación sobre el control positivo.

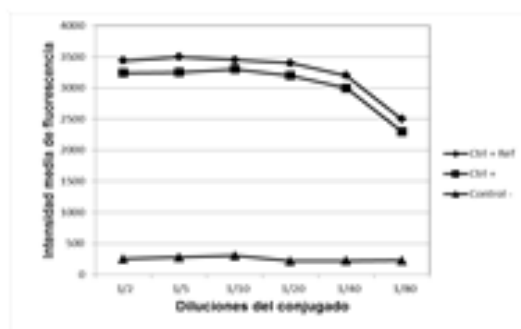


Gráfico 3: Evaluación de la dilución del conjugado.

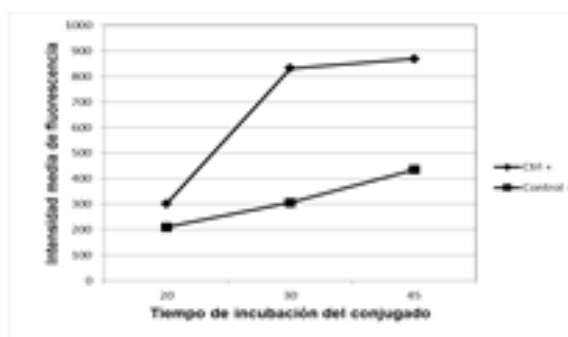


Gráfico 4: Evaluación del tiempo de incubación con el conjugado.

CONCLUSIONES

Se determinaron las condiciones óptimas trabajo de un inmunoensayo basado en citometría de flujo para la detección de AAP.

RECOMENDACIONES

Caracterizar el método de determinación de AAP según los indicadores de validación de los ensayos cualitativos por citometria de flujo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bene MC, Zini G. Innovation in hematology: morphology and flow cytometry at the crossroads. *Haematologica*. 2016;101(4):394-5.
2. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*. 2016:1-14.
3. Barnett D, Louzao R, Gambell P, De J, Oldaker T, Hanson CA. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part IV - postanalytic considerations. *Cytometry Part B, Clinical Cytometry*. 2013; 84(5):309-14.
4. Saboor M, Moinuddin M, Ilyas S. New horizons in platelets flow cytometry. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*. 2013;20(2):62-6.
5. Davis BH, Wood B, Oldaker T, Barnett D. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part I - rationale and aims. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2013;84(5):282-5.