

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

EVALUACION DE UN METODO DE ENSAYO  
INMUNOENZIMATICO "ELISA" COMO PRUEBA DE  
COMPATIBILIDAD PLAQUETARIA EN PACIENTES  
POLITRANSFUNDIDOS Y PACIENTES CON  
PURPURA TROMBOCITOPENICA AUTOINMUNE  
(PTA).

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
JOSE ANTONIO RAZO NERI

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HEMOS HECHO  
EN NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E.

I. INTRODUCCION.	1
II. FUNDAMENTACION.	4
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	16
IV. OBJETIVOS.	17
V. HIPOTESIS.	18
VI. METODOLOGIA.	19
VII. MATERIAL Y METODOS.	20
VIII. RESULTADOS.	25
IX. ANALISIS DE RESULTADOS.	36
X. CONCLUSIONES.	39
XI. BIBLIOGRAFIA.	40

## 1. INTRODUCCION.

La sangre ha sido utilizada de múltiples maneras y desde épocas remotas, pero es a partir de la mitad del siglo XVII que existen referencias indudables de transfusiones de sangre y es hasta el año 1900, cuando se revela la presencia de sustancias isoaglutinantes e isoaglutinables en la sangre humana, que se establecen las bases teóricas y prácticas de la terapia transfusional. (8)

El objetivo inicial de la terapéutica transfusional fue la reposición de la sangre total, pero el conocimiento de que la sangre es un tejido complejo con numerosos constituyentes, la comprensión básica de la fisiopatología de los trastornos sometidos a tratamiento para así determinar la deficiencia y al ser posible la separación práctica de los elementos sanguíneos; conllevan a establecer la terapia de componentes, que es uno de los adelantos más importantes de la transfusión sanguínea.

Actualmente, las transfusiones tienen un uso continuo así como creciente, debido a que la disponibilidad y seguridad de la sangre completa o de sus componentes permiten efectuar muchas operaciones, además de realizar otros tratamientos, que habrían resultado imposibles de otra manera.

Dentro de la terapia de componentes se encuentra la transfusión plaquetaria, la cual ha sido usada en medicina clínica durante más de 60 años; la terapéutica plaquetaria se emplea, generalmente, para controlar o mejorar problemas de la hemostasia en los pacientes. (5, 8, 21)

Junto con la terapéutica transfusional, se inicia la serología y con ella la práctica de las pruebas para determinar la compatibilidad de la sangre a ser transfundida; hoy, por ejemplo, se conocen 13 sistemas de grupos sanguíneos, independientes y bien definidos, que caracterizan a las hemáticas. La caracterización de los grupos sanguíneos esta fundamentada en la interacción antígeno-anticuerpo y es el desarrollo de nuevas técnicas para evidenciar esta reacción, lo que ha llevado a progresar con rapidez a la definición inmunológica sanguínea, hasta llegar a conocer en la actualidad la existencia concluyente de sistemas complejos de aloantígenos que diferencian a leucocitos y plaquetas. (4,5,11)

De los nuevos métodos, sensibles y específicos, para detectar las reacciones antígeno-anticuerpo, tenemos el Enzimoanálisis, en el que se emplean antígenos y anticuerpos marcados con enzimas; una de las técnicas que se basa en estos conceptos es la del Ensayo Enzimático Inmunoespecífico ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), en la cual los anticuerpos o los antígenos se pueden ligar a una enzima e interactuar, reteniendo el complejo tanto la actividad inmunológica como la enzimática. En la actualidad, ELISA es una técnica confiable de diagnóstico y ha demostrado su utilidad en la investigación clínica. (11,16)

En conjunto, el creciente uso de la hemoterapia de componentes, incluida la terapia plaquetaria y el desarrollo de nuevas técnicas, como la de ELISA, son factores que tienden a mejorar la efectividad y seguridad en la aplicación de la terapia transfusional.

En el presente trabajo se evalúa la posibilidad de establecer una técnica de ELISA, como prueba de compatibilidad transfusional a las células plaquetarias en especial, con la cual se espera detectar

donadores adecuados para pacientes que requieran como hemoterapia estas células sanguíneas.

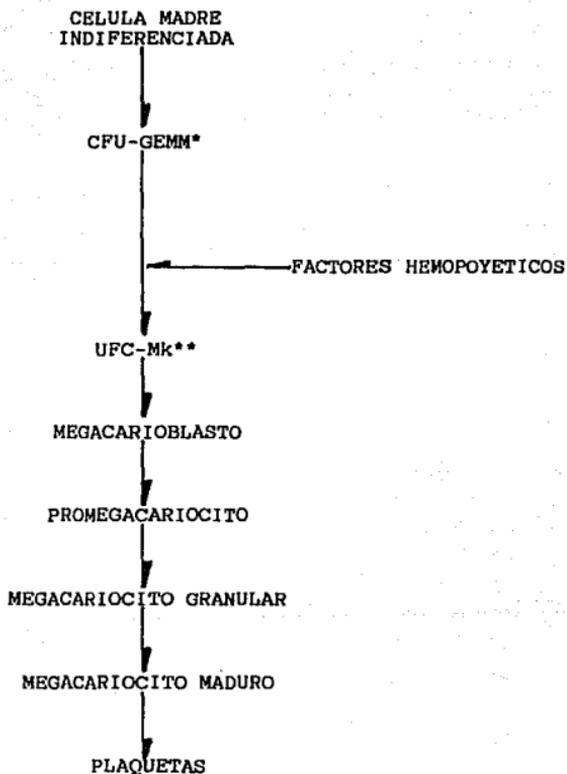
## II. FUNDAMENTACION.

La sangre es un tejido en circulación dentro de los vasos sanguíneos, constituido por una suspensión de elementos celulares y sustancias orgánicas e inorgánicas en un medio líquido. Los elementos celulares son de tres tipos: los eritrocitos, los leucocitos y las plaquetas o trombocitos. (15)

Las plaquetas se originan en la médula ósea por gemación y disolución del citoplasma de megacariocitos maduros; los megacariocitos se forman por multiplicación y maduración de megacarioblastos, las primeras células identificables de la serie, que proceden de la célula madre hematopoyética pluripotencial, probablemente de forma directa a partir de una célula progenitora diferenciada. (Diagrama "A")

No se conocen bien los factores que controlan la maduración de los megacariocitos y la producción de plaquetas pero es muy probable que estén reguladas por factores humorales, un factor estimulante de las colonias megacariocíticas (Mk-FEC) que tiende a inducir la proliferación de las células progenitoras diferenciadas y la trombopoyetina o factor estimulante de la trombopoyesis (TSF) que promueve la diferenciación de éstas hacia los megacariocitos; también se piensa que intervienen en el proceso el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrofagos (GM-CSF) y la interleucina-3 (IL-3). (5, 24)

Aproximadamente, la vida media de las plaquetas está entre nueve a doce días y si bien no hay reservas de plaquetas, se ha observado que una tercera parte de éstas es captada por el bazo y después

DIAGRAMA "A".

\* Unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos. Célula madre hematopoyética pluripotente.

\*\* Unidad formadora de colonias megacariocíticas o células progenitoras diferenciadas.

vuelven a la circulación. Los sitios en que más son destruidas o utilizadas aparentemente, son el hígado y el bazo. (15)

Las plaquetas son pequeños cuerpos no nucleados, granulares, en forma de disco que miden de 0.5 a 3  $\mu\text{m}$  y que circulan en número de 200,000 a 400,000 por  $\text{mm}^3$ . Su morfología depende de varios factores: método por medio del cual son examinadas, método de obtención de la muestra y el tipo de material donde es contenida, por el anticoagulante utilizado, el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y su procesamiento, la temperatura y por algunos trastornos plaquetarios o mieloproliferativos entre otros. En preparaciones húmedas, la plaqueta es incolora, moderadamente retráctil y de forma elíptica o helicoidal; en frotis panóptico, son redondas, ovales, alargadas, con gránulos en su citoplasma hialino azul claro. (5, 15, 22)

Cuando en diversas situaciones un vaso sanguíneo pierde su integridad por alguna lesión se provoca una hemorragia, la cual podría suscitar un grave problema según sus características. Para evitar esto, existen mecanismos defensivos que tienden a detener la hemorragia; estos mecanismos se denominan hemostasia y coagulación.

#### HEMOSTASIA.

Es la serie de fenómenos fisiológicos y bioquímicos que se suceden desde el momento de la lesión vascular, hasta la formación del coágulo o trombo. La hemostasia se ha dividido en tres fases, que se dan en forma secuencial y algunas ocasiones simultáneamente:

1) fase vascular, 2) fase plaquetaria y 3) fase plasmática; en esta última se lleva a cabo la coagulación.

#### COAGULACION.

Es el mecanismo mediante el cual la sangre pasa del estado de "sol" al estado de "gel", esto ocurre mediante la interacción de los facto-

res de la coagulación y termina en la transformación de fibrinógeno en fibrina la cual al polimerizarse produce el cambio mencionado.(15)

Las plaquetas son esenciales para el mantenimiento de una hemostasia normal, éstas desempeñan dos papeles diferentes en el mecanismo de la detención de hemorragias, la función hemostática que se realiza mediante el taponamiento de los vasos sangrantes por una masa de plaquetas y la función tromboplástica que es inducida mediante la participación de constituyentes químicos propios de las plaquetas en el mecanismo de la coagulación.(21)

Una hemoterapia segura y efectiva requiere la comprensión básica de la fisiopatología del trastorno sometido a tratamiento para identificar la deficiencia. La terapéutica por transfusión plaquetaria se emplea para controlar o mejorar la hemostasia afectada por causa de la trombocitopenia que, independientemente del número y diversidad de desordenes a los que puede ser asociada, se produce de tres maneras: producción deficiente de plaquetas, destrucción acelerada y distribución o secuestro anormal de las plaquetas en el organismo.(21,22)

Es así, que encontramos pacientes con trombocitopenia asociada a: leucemia, aplasia medular ósea, cirugía vascular, púrpuras, quimioterapia, radioterapia, esplenomegalia, etc. (Tabla "B") (5,9,21,24)

El criterio, generalmente establecido, para la aplicación de una transfusión de plaquetas es cuando el conteo plaquetario en los pacientes sea menor de 30,000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. (5,9,21)

La selección de las plaquetas a ser transfundidas, debe tomar en cuenta a los sistemas de determinantes antigénicos plaquetarios, los cuales son de tres tipos: Antígenos ABO, Antígenos HLA y Antígenos específicamente plaquetarios.(22)

APLICACION DE LA TRANSFUSION DE PLAQUETAS.

I. Trombocitopenia con producción plaquetaria disminuida.

A. Leucemia.

B. Anemia aplásica.

II. Trombocitopenia debida a pérdida, destrucción o secuestro de plaquetas.

A. Pérdida de plaquetas.

1. Transfusiones múltiples.
2. Uso de sangre almacenada.
3. Bombas extracorpóreas.

B. Secuestro de plaquetas.

1. Esplenomegalia.

C. Destrucción.

1. PTA (aguda y crónica).
2. Púrpura postransfusional.
3. Trombocitopenia isoimmune neonatal.
4. Púrpura farmacológica.
5. Defectos hereditarios.
6. Infección.

III. Transtornos plaquetarios cualitativos.

A. Congénitos.

B. Adquiridos.

Los antígenos ABO se han detectado sobre la superficie plaquetaria, aunque se desconoce si son parte intrínseca de la membrana o solo son simplemente adsorbidos; se hace prudente el seleccionar las plaquetas según el tipo ABO-compatibles pero no estrictamente necesario, debido a que la disminución de la supervivencia de las plaquetas transfundidas ABO-incompatibles no es significativa y es de sobremanera aceptable.

Respecto a la compatibilidad "Rh", ésta no se hace necesaria en la terapéutica plaquetaria, debido a que la contaminación eritrocitaria de los concentrados plaquetarios es mínima y sólo en caso de mujeres Rh(-), se recomienda usar plaquetas compatibles o en su caso administrar la inmunoglobulina Rh. (9, 21, 22)

El sistema HLA es el más importante de los antígenos plaquetarios por ser compartido con leucocitos y con tejidos. De los antígenos específicamente plaquetarios, podemos mencionar al Antígeno DU20, el sistema  $Pl^A$  (Zw), el  $Ko$  y el  $Pl^E$ . (Tabla "C") (20, 22)

El éxito o fracaso de la terapia plaquetaria depende de la integridad funcional de las plaquetas transfundidas, la causa del defecto plaquetario en el receptor y la presencia o ausencia de anticuerpos antiplaquetarios. (22)

La naturaleza de los anticuerpos antiplaqueta es del tipo IgG (1, 7, 10, 13, 14, 18, 19, 22), por lo tanto, la importancia clínica de los sistemas antigénicos plaquetarios estriba en su capacidad de inducir la producción de anticuerpos.

El sistema de antígenos HLA es el más importante inductor de anticuerpos antiplaqueta, tanto que, en los centros hospitalarios en donde es posible, la selección de plaquetas a transfundir se hace por tipificación HLA; si bien, las transfusiones así tipificadas son exi-

TABLA "C".SISTEMAS DE ANTIGENOS PLAQUETARIOS.

SISTEMAS	ANTIGENOS
HLA	HLA-A1
	HLA-A2
	HLA-B7
	HLA-B8
DUZO	DUZO <sup>a</sup>
P1 <sup>A</sup> (Zw)	P1 <sup>A1</sup> (Zw <sup>a</sup> )
	P1 <sup>A2</sup> (Zw <sup>b</sup> )
Ko	Ko <sup>a</sup>
	Ko <sup>b</sup>
P1 <sup>E</sup>	P1 <sup>E1</sup>
	P1 <sup>E2</sup>

tosas, en aproximadamente del 30 al 50% de los receptores dejan de producir incrementos satisfactorios, debido a que se desarrollan anticuerpos contra los sistemas plaqueta-específicos, donde los sistemas  $PI^A(PI^{A1})$  y el  $Ko(Ko^a)$  son capaces de inducir aloanticuerpos con una relevante frecuencia clínica. (17,18,19,20,22)

Cuando los pacientes quedan inmunizados deben afrontar la consiguiente disminución en el rendimiento y vida media de las plaquetas en posteriores transfusiones, aunque entre los pacientes existe una gran variabilidad en cuanto al número de transfusiones requeridas para la inmunización, la transfusión previa de sangre total o de concentrado de hematíes puede producir que las plaquetas no viables provoquen la inmunización y si además añadimos que muchas transfusiones consisten en mezclas (preparados de sangre de múltiples donadores) de concentrados plaquetarios, entonces la inmunización es más rápida; debido a esto es que entre el 40 y el 70% de aquellos pacientes que requieren múltiples transfusiones de plaquetas, se tornen refractarios o sea que son pacientes en los que se fracasa en obtener un incremento de plaquetas, después de repetidas transfusiones, a causa de la producción de anticuerpos antiplaqueta. (13,17,19,21)

Las trombocitopenias en donde el aumento de la destrucción plaquetaria es provocada por la sensibilización de éstas a anticuerpos se denominan trombocitopenias inmunitarias, en ellas, además de englobar a padecimientos en donde los aloanticuerpos contra las plaquetas son generados, como en el caso de las transfusiones múltiples, se suscriben los padecimientos autoinmunitarios capaces de generar autoanticuerpos antiplaqueta. (Tabla "D") (2). Uno de estos padecimientos es la Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI), el término idiopático significa "de causa desconocida", actualmente se sabe que es un

TABLA "D".

## TROMBOCITOPENIAS INMUNITARIAS.

- 
1. PURPURA TROMBOCITOPENICA IDIOPATICA O AUTOINMUNE.
  2. TROMBOCITOPENIA AUTOINMUNE SECUNDARIA.  
Lupus eritomatoso generalizado(LES).  
Leucemia linfocítica crónica.  
Linfomas.  
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida(SIDA).  
Mononucleosis infecciosa.
  3. TROMBOCITOPENIA INMUNITARIA INDUCIDA POR FARMACOS.
  4. PURPURA POSTRANSFUSIONAL.
  5. PURPURA TROMBOCITOPENICA TROMBOTICA.
  6. TROMBOCITOPENIAS NEONATALES INMUNITARIAS.
  7. DESTRUCCION DE PLAQUETAS TRANSFUNDIDAS.
-

desorden que se desarrolla en ciertos individuos con predisposición genética así como de sexo(femenino),seguido probablemente,de un evento ambiental;el resultado es la producción de autoanticuerpos IgG antiplaqueta,con la consiguiente disminución y destrucción de éstas células,por tal motivo se ha propuesto el término de Púrpura Trombocitopénica Autoinmune (PTA).

En estos pacientes las transfusiones de plaquetas son de vida corta y no son recomendadas de manera profiláctica,a no ser que se presente una hemorragia grave o se requiera una intervención quirúrgica.(2,7,14,15,22)

De esta manera,se puede afirmar que gran parte de la problemática transfusional plaquetaria esta ligada a los anticuerpos antiplaqueta lo cual nos lleva a la necesidad de buscar formas de poder detectarlos en los pacientes.

Dada la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo,ésta ha sido utilizada con magníficos resultados en la investigación de anticuerpos séricos,sobre todo con fines de diagnóstico.Es así,que sobre la detección de anticuerpos antiplaqueta se han desarrollado técnicas de:Inmunofluorescencia,Inhibición del Complemento,Prueba de Coombs Radiomarcada,Microtoxicidad,Radioinmunoanálisis y Análisis Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).(2,10,13,18,19)

La técnica de Análisis Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas(ELISA), forma parte de la metodología del Enzimoimmunoanálisis(EIA),en el que se emplean anticuerpos o antígenos marcados con enzimas.El EIA se divide en dos tipos:homogéneo y heterogéneo,en el primero,la enzima se conjuga con un hapteno y cuando este conjugado reacciona con el anticuerpo se altera la actividad enzimática y no se requiere separación del combinado libre;en el EIA heterogéneo,los anticuerpos o

el antígeno se pueden ligar a una enzima, reteniendo el complejo tanto la actividad inmunológica como la enzimática, estos ensayos son conocidos generalmente como ELISA.

Es posible desarrollar los ELISA en varias configuraciones, los tipos más frecuentes son: ELISA competitivo para el antígeno, Inmunoenzimométrico, Inmunoenzimométrico de dos lugares, Análisis en "sandwich" para anticuerpos y Enzimométrico doble de anticuerpos para antígenos. (Tabla "E")

De estas técnicas, una de las más utilizadas en el análisis en "sandwich" para la detección de anticuerpos, el esquema que se sigue en general es el de incubar el antígeno fijado en la fase sólida con una muestra que contiene el anticuerpo que hay que detectar, cuando ha tenido lugar la reacción y después de un lavado, se añade un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente y que sea reactivo frente al primer anticuerpo, así, la cantidad de actividad enzimática que sea registrada es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo antígenoespecífico existente. (5, 11, 16) De los métodos de ELISA propuestos para la determinación de anticuerpos antiplaqueta, la técnica del "sandwich" ha sido una de las más utilizadas. (2, 10, 13, 18, 19)

Dadas las características de ELISA, su aplicación en la determinación de anticuerpos antiplaqueta ha sido de gran utilidad, pero es importante señalar que aún con el acúmulo de conocimientos adquiridos en el campo de las transfusiones, éstas continúan presentando riesgos potenciales de diversos tipos.

TABLA "E".

## ENZIMOINMUNOANALISIS (EIA).

## I. EIA HETEROGENEO O ELISA.

- a) Competitivo para el antígeno.
- b) Análisis inmunoenzimométrico.
- c) Análisis inmunoenzimométrico de dos lugares.
- d) Análisis en "sandwich" para la detección de anticuerpos.
- e) Análisis inmunoenzimométrico de doble anticuerpo para antígenos.

## II. EIA HOMOGENEO.

- a) Marcador enzimático.
- b) Sustrato marcado.
- c) Cofactor.
- d) Grupo prostético marcado.
- e) Modulador enzimático.
- f) Anticuerpo marcado.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La terapéutica por transfusión de plaquetas se emplea para controlar o mejorar la hemostasia en los pacientes con trombocitopenia asociada a leucemia y otros tipos de cáncer, aplasia de médula ósea, quimioterapia, radioterapia, esplenomegalia, púrpuras y cirugías.

Actualmente esta terapia se ha incrementado y la selección de donadores para pacientes que requieren múltiples transfusiones o aquellos que, por ser politransfundidos, se han tornado refractarios, representan un difícil problema clínico; el cual se ve acrecentado por la búsqueda de un método adecuado y confiable para realizar dicha selección de donadores.

#### IV. OBJETIVOS.

1. Evaluar la utilidad del método de ELISA propuesto, para la realización de pruebas de compatibilidad plaquetaria.
2. Con base en las características de la prueba de ELISA, proporcionar un método viable y adecuado para pruebas de compatibilidad plaquetaria.
3. Establecer la utilidad del método propuesto, como prueba de compatibilidad para pacientes politransfundidos y pacientes con PTA.
4. Proporcionar un método adecuado que, en consecuencia, puede lograr una buena respuesta transfusional en los pacientes.
5. En general, proporcionar un método para pruebas de compatibilidad en pacientes que requieran terapia transfusional plaquetaria.

#### V. HIPOTESIS.

Puesto que la técnica de ELISA es capaz de detectar los anticuerpos IgG antiplaqueta séricos, que provocan la destrucción de las plaquetas; al poner el suero del paciente en contacto con plaquetas de posibles donadores y detectar o no la presencia de tales anticuerpos, se podría establecer un criterio de aceptación, o de rechazo, a las plaquetas donadas; en sí, puede ser, un criterio de compatibilidad.

## VI. METODOLOGIA.

1. Estandarizar el método en una población de personas sanas.
2. Seleccionar pacientes politransfundidos, sin tomar en cuenta el tipo de productos sanguíneos que se les ha proporcionado, y proceder a la detección de aloanticuerpos IgG plaquetarios, aplicando el método como prueba de compatibilidad.
3. Seleccionar pacientes que padezcan PTA y realizar la detección de anticuerpos IgG plaquetarios, estableciendo el método como prueba de compatibilidad.
4. Establecer la relación entre los resultados obtenidos y la utilidad del método como prueba de compatibilidad.

## VII. MATERIAL Y METODOS.

## 1. MATERIAL.

Tubos de ensayo de plástico(12 X 75).20 tubos.Sorin Biomédica.

Pipetas graduadas de 0.1,1,2,5 y 10 ml.

Pipetas Pasteur.

Pipetas de Thoma para glóbulos rojos.10 pipetas.Propper Trophy.

Cámaras de Neubauer.2 cámaras.Bright-Line Americal Optical Co.

Cajas de Petri.

Papel filtro.

Microplacas ELISA.Dynatech Immulon.

## 2. REACTIVOS.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ .500 g.J.T.Baker S.A.

$\text{NaCl}$ .500 g.J.T.Baker S.A.

EDTA disódico.500 ml.Solución al 10% preparada por el IMSS.

Oxalato de amonio.500 g.Técnica Química S.A.

Dietanolamina.1 Kg.Sigma Chemical Co.

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ .500 g.Merk Co.

$\text{NaOH}$ .1 Kg.J.T.Baker S.A.

Anti-IgG humana conjugada con FA.Behring. (Frasco con 1 ml.)

p-nitrofenilfosfato.Sigma Chemical Co.(200 tabletas)

Albúmina bovina al 22%.Ortho.(Frasco con 10 ml.)

## 3. APARATOS.

Centrífuga. Clay Adams Inc.

Agitador mecánico para pipetas de Thomas. Clay Adams Inc.

Incubador(baño maría). Blue "M" Magni Whirl.Mod:MW-110A-1.

Microscopio. Carl Zeiss.

Lector ELISA.Reader Micro ELISA System.Organon Teknika.Veedijk 58.

Modelo: 310 C.

#### 4. SOLUCIONES.

Solución amortiguadora de fosfatos salina con EDTA y 1% de albúmina sérica bovina (PBS-EDTA-1% BSA). pH=7.3.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	-----	9.44 g.
NaCl	-----	8.18 g.
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	-----	3.35 g.
Albúmina	-----	10 g.
Agua destilada c.b.p.	-----	1000 ml.

Solución amortiguadora de dietanolamina. pH=9.8.

Dietanolamina	-----	100 ml.
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	-----	102 mg.
Agua destilada c.b.p.	-----	1000 ml.

Solución de Hidróxido de sodio. 1N.

NaOH	-----	40 g.
Agua destilada c.b.p.	-----	1000 ml.

Solución de Oxalato de amonio al 1%.

Oxalato de amonio	-----	1 g.
Agua destilada c.b.p.	-----	100 ml.

Filtrar la solución antes de usar.

Solución de p-nitrofenilfosfato.

p-nitrofenilfosfato ----- 1 tableta.

Amortiguador de

dietanolamina ----- 5 ml.

Preparar al momento de usar y proteger de la luz.

## 5. MATERIAL BIOLÓGICO.

Sueros sanguíneos.

Concentrados plaquetarios frescos.

## 6. METODOS.

### A). Preparación de plaquetas.

- Tomar de 8 a 10 ml. de concentrado plaquetario en tubos de plástico.
- Centrifugar a 3000 rpm/1 min. y lavar 2 veces con PBS-EDTA-1% BSA.
- Resuspender en 2 ml. de PBS-EDTA-1% BSA.
- Contar y ajustar las plaquetas a 20,000/mm<sup>3</sup>, diluyendo con el mismo amortiguador.

### B). Cuenta de plaquetas. (Técnica de Brecher). (3,6)

- Con una pipeta de Thoma para eritrocitos, se toma una muestra de plaquetas lavadas, llevando hasta la marca 1.
- Con Oxalato de amonio al 1% se completa hasta la marca 101.
- Agitar la pipeta durante 3 min. en agitador mecánico.
- Desechar las primeras 7 gotas y llenar la cámara de Neubauer. Dejarla reposar durante 10 min. dentro de una caja de Petri con papel filtro humedecido en agua, para evitar la evaporación. El conteo debe hacerse con el objetivo seco fuerte (40 X).

- Cálculos:

$$\text{Plaquetas/mm}^3 = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de células contadas})(\text{Dilución})}{(0.004)(\text{cuadros contados})}$$

C). Preparación del suero.

Inactivar a 56°C. por 30 minutos.

D). Preparación de la microplaca ELISA.

Poner 200 µl. de PBS-EDTA-1% BSA en cada pozo e incubar por 60 minutos a 37°C. y lavar cinco veces con el mismo amortiguador.

## 7. METODO DE ELISA.

Fundamento:

El método de ELISA propuesto, se basa en el principio denominado del "sandwich" para los ensayos inmunoenzimáticos.

Plaqueta---IgG antiplaqueta---Anti-IgG/FA + p-nitrofenilfosfato.

Al poner en contacto a la fosfatasa alcalina, conjugada a la Anti-IgG humana, con el p-nitrofenilfosfato, la acción de la enzima da como resultado un fosfato y p-nitrofenol, que en medio alcalino se convierte en ión p-nitrofenilato, el cual asume una estructura quinoide de color amarillo que se puede leer a 405 nm. (23)



## VIII. RESULTADOS.

La técnica de ELISA fue aplicada a los sueros de 100 donadores normales, 50 pacientes con PTA y 45 pacientes politransfundidos, obteniéndose los siguientes resultados.

TABLA 1

GRUPOS	SUEROS	A	B	Ab.	RANGO
DONADORES NORMALES	100	5	476	0.212	0.103-0.311
P T A	50	7	365	0.217	0.105-0.432
POLITRANSFUNDIDOS	45	5	243	0.207	0.104-0.368

A: Promedio de concentrados plaquetarios por suero.

B: Número de lecturas de absorbancia.

Ab.: Absorbancia media.

I. DISTRIBUCION DE LAS LECTURAS DE ABSORBANCIA DE DONADORES NORMALES

$$\bar{X} = 0.212$$

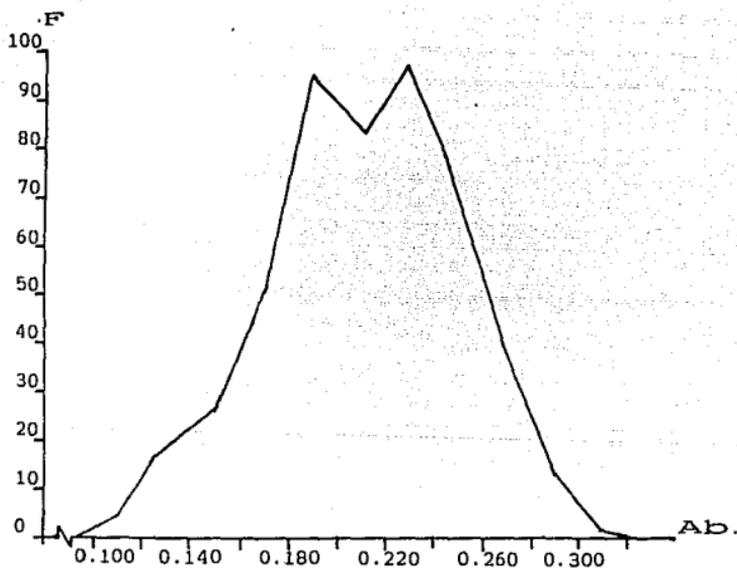
$$S^2 = 1.47 \times 10^{-3}$$

$$S = 0.038$$

$$I.C. \mu = 0.208 < X < 0.215 = 0.95$$

FIGURA. 1

## DONADORES NORMALES.



F = Frecuencia en número de lecturas de absorbancia.

Ab = Absorbancia.

A). Bondad de Ajuste.

Hipótesis:

H<sub>0</sub>: Distribución Normal.

H<sub>a</sub>: Distribución No Normal.

Nivel de Significancia:  $\alpha = 0.05$

Estadígrafo:  $\chi^2$  cuadrada.

$$\chi^2 = (\sum O_i^2 / E_i) - n$$

Datos:  $n = 476$      $\sum O_i^2 / E_i = 490.7389$     Grados de libertad = 8

$$\chi^2 \text{ cal.} = 14.7389$$

$$\chi^2 \text{ tab.} = 15.507$$

Regla de Decisión:

$\chi^2 \text{ tab.} > \chi^2 \text{ cal.}$ , Se acepta H<sub>0</sub>. La distribución es normal.

B). Determinación de Límites de Tolerancia.

Nivel de Significancia:  $\alpha = 0.05$

Proporción de la población:  $\eta = 0.95$

Límites de tolerancia:  $\bar{X} \pm K S$

Datos:  $\bar{X} = 0.212$      $S = 0.038$      $K(500, 0.95) = 2.070$

$$L.T.I. = 0.1333$$

$$L.T.S. = 0.2906$$

B). Determinación de criterios.

Cálculo de probabilidad. Curva Normal (Z):

$$P ( Ab < 0.290 ) = 0.9798 (97.98\%)$$

$$P ( 0.291 < Ab < 0.300 ) = 0.0088 (0.88\%)$$

$$P ( Ab > 0.300 ) = 0.0104 (1.04\%)$$

Criterios:

$Ab < 0.290$  Se consideran como Compatibles.

$0.291 < Ab < 0.300$  Se consideran como Dudosos.

$Ab > 0.300$  Se consideran como Incompatibles.

## II. DISTRIBUCION DE LAS LECTURAS DE ABSORBANCIA DE LOS PACIENTES.

PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS.

$$\bar{X} = 0.207$$

$$S^2 = 1.639 \times 10^{-3}$$

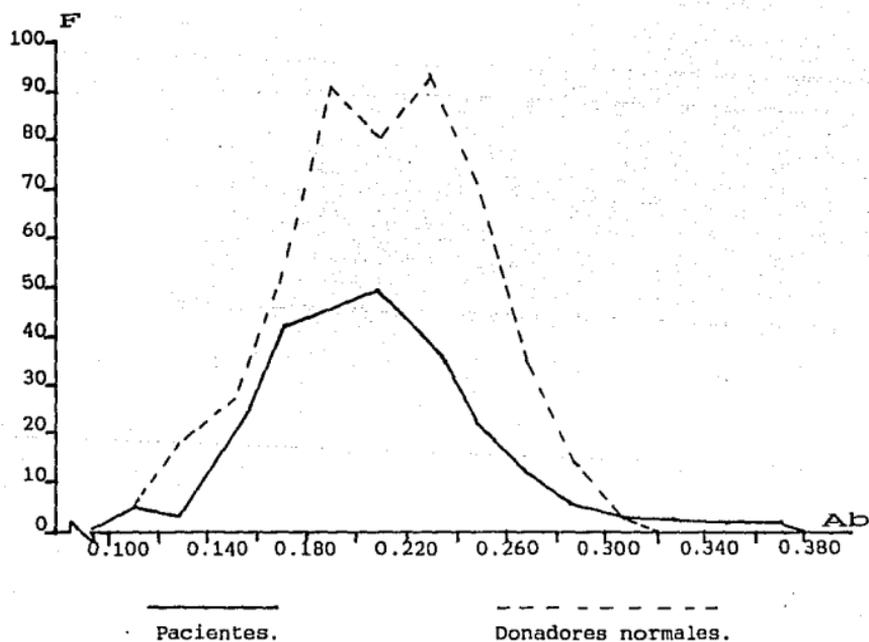
$$S = 0.040$$

PACIENTES CON PTA.

$$\bar{X} = 217$$

$$S^2 = 1.55 \times 10^{-3}$$

$$S = 0.039$$

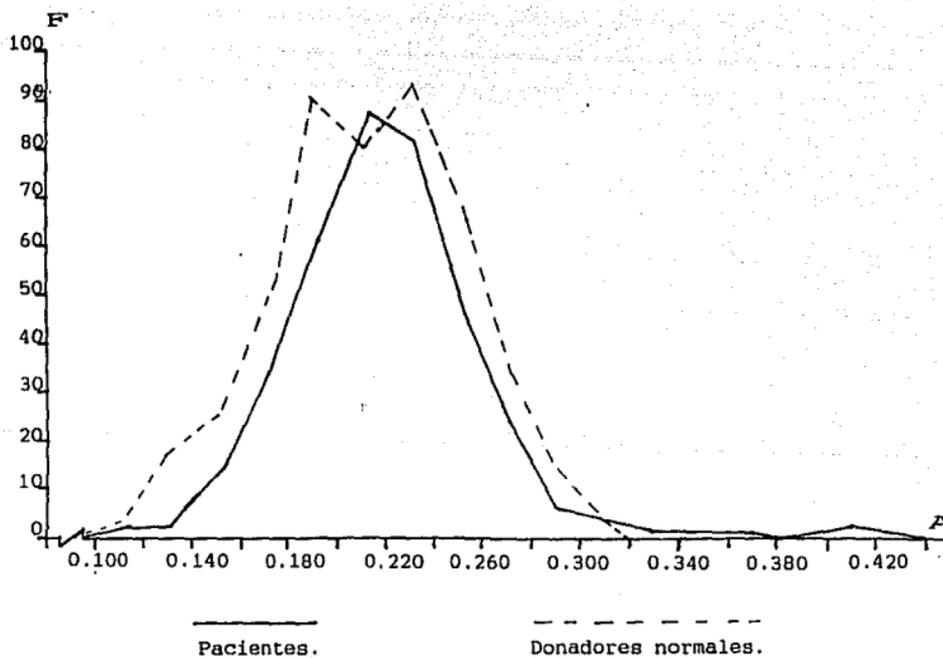
FIGURA. 2**POLITRANSFUNDIDOS .**

F = Frecuencia en número de lecturas de absorbancia.

Ab = Absorbancia

FIGURA. 3

P T A .



F = Frecuencia en número de lecturas de absorbancia.

Ab = Absorbancia

## III. APLICACION DE LOS CRITERIOS A LOS GRUPOS ESTUDIADOS.

TABLA 2

	LECTURAS $\geq 0.300$ DE Ab*	PACIENTES	%
donadores normales	1	1	1
PTA	7	6	12
politransfundidos	5	4	8.88

Ab\*.:Absorbancia.

TABLA 3

## PACIENTES POR CRITERIO

	DONADORES NORMALES.	P T A.	POLITRANSFUNDIDOS
COMPATIBLES	96	44	41
DUDOSOS	3	0	0
INCOMPATIBLES	1	6	4

#### IV. DETERMINACION DE LA DIFERENCIA DE LAS PROPORCIONES DE INCOMPATIBILIDAD.

##### Donadores Normales y Pacientes con PTA.

Hipótesis:

$$H_0: \pi_{PTA} \leq \pi_{DN} ; \pi_{PTA} - \pi_{DN} \leq 0$$

$$H_a: \pi_{PTA} > \pi_{DN} ; \pi_{PTA} - \pi_{DN} > 0$$

Nivel de Significancia:  $\alpha = 0.05$

Estadígrafo:

$$Z = \frac{P_{PTA} - P_{DN}}{\sqrt{\bar{p} \bar{q} (1/n_{PTA} + 1/n_{DN})}}$$

$$\text{Datos: } P_{PTA} = 0.12 \quad P_{DN} = 0.01 \quad \bar{p} = 50(0.12) + 100(0.01) / 150 = 0.0466$$

$$\bar{q} = 0.9534$$

$$Z \text{ cal.} = 3.0130$$

$$Z \text{ tab.} = 1.6450$$

Regla de Decisión:

$Z \text{ tab.} < Z \text{ cal.}$  Se rechaza  $H_0$ . La proporción porcentual de pacientes con PTA es mayor que la de los donadores normales.

Donadores normales y Pacientes Politransfundidos.

Hipótesis:

$$H_0: \pi_{PT} \leq \pi_{DN} : \pi_{PT} - \pi_{DN} \leq 0$$

$$H_a: \pi_{PT} > \pi_{DN} : \pi_{PT} - \pi_{DN} > 0$$

Nivel de Significancia:  $\alpha = 0.05$ 

Estadígrafo:

$$Z = \frac{P_{PT} - P_{DN}}{\sqrt{\bar{p} \bar{q} \left( \frac{1}{n_{PT}} + \frac{1}{n_{DN}} \right)}}$$

Datos:  $P_{PT} = 0.0888$   $P_{DN} = 0.01$   $\bar{p} = 45(0.0888) + 100(0.01) / 145 = 0.0344$

$$\bar{q} = 0.9656$$

$$Z \text{ cal.} = 2.4086$$

$$Z \text{ tab.} = 1.6450$$

Regla de Decisión:

$Z \text{ tab.} < Z \text{ cal.}$  Se rechaza  $H_0$ . La porción porcentual de pacientes politransfundidos es mayor que la de los donadores normales.

## V. DETERMINACION DE LA RELACION ENTRE GRUPOS Y CRITERIOS.

TABLA 4

	DONADORES NORMALES.	P T A.	POLITRANSFUNDIDOS.	TOTAL.
compatibles	96	44	41	181
incompatibles	4	6	4	14
TOTAL	100	50	45	195

Hipótesis:

Ho: Independientes.

Ha: No Independientes.

Nivel de Significancia:  $\alpha = 0.05$

Estadígrafo: ji cuadrada.

$$\chi^2 = \sum \sum O^2_{ij} / E_{ij} - n$$

Datos: n = 195       $\sum \sum O^2_{ij} / E_{ij} = 198.4581$       Grados de Libertad = 2

$$\chi^2_{cal.} = 3.4581$$

$$\chi^2_{tab.} = 5.991$$

Regla de Decisión:

$X^{\text{tab.}} > X^{\text{cal.}}$  Se acepta  $H_0$ . El Criterio y los grupos son independientes.

## IX. ANALISIS DE RESULTADOS.

Fueron seleccionados al azar, los sueros de 100 donadores normales, 50 de pacientes con PTA y 45 de pacientes politransfundidos, cada suero fue probado contra plaquetas obtenidas de mezclas de concentrados plaquetarios frescos, conforme a la técnica de ELISA propuesta; la tabla 1 muestra los resultados obtenidos de manera general.

La aplicación de la técnica sobre un grupo de donadores normales establece el control del ensayo, aportando datos que, dentro de un nivel de confiabilidad, nos servirán de referencia. La distribución que siguen las lecturas de absorbancia (Fig. 1) muestran ser, estadísticamente, del tipo normal, con un amplio rango de lecturas que va de: 0.103 a 0.311; para establecer valores de estimación se determinaron los límites de tolerancia, cubriendo el 95% de la distribución, de donde el límite superior es 0.290, con base en esto fue considerado como un valor más práctico el de 0.300 de absorbancia para después formular los criterios de aceptación y de rechazo, que posteriormente se aplicarían a los grupos de pacientes.

Si la característica principal de nuestro grupo control es la ausencia del factor antiplaquetario, es significativo que valores mayores a 0.300 de absorbancia sean considerados poco probables ( $P: Ab > 0.300 = 0.0104$ ), por lo cual se propone que la ausencia de anticuerpos este aunada a lecturas de absorbancia menores o iguales a 0.290 y que a la vez se introduzca el criterio de compatibilidad.

La técnica de ELISA nos muestra que la actividad enzimática aumenta conforme crece la presencia del anticuerpo sobre el que actúa el conjugado y si hemos establecido un límite superior de

0.300, debemos esperar que en los casos donde se rebase dicho límite, la presencia de anticuerpos antiplaqueta es muy factible y con ellos la incompatibilidad de transfusión.

Respecto al intervalo delimitado por nuestros valores de compatibilidad e incompatibilidad y al que denominamos de criterio dudoso, cabe decir que es resultado de las fronteras establecidas, pero que dado el carácter del estudio, debemos tomar en cuenta que en la práctica transfusional no se dan los términos intermedios y aunque teóricamente son probables ( $P: 0.291 < Ab < 0.299 = 0.0088$ ) en la aplicación deberían tratarse con reserva y no ser considerados a transfusión habiendo la manera de optar por otros concentrados que aporten datos más confiables.

Al ser determinados nuestros criterios de transfusión, estos fueron estimados a los grupos de pacientes politransfundidos y con PTA; la distribución de las lecturas de absorbancia de estos grupos fue comparada con la del grupo control (Fig. 2 y 3), los promedios de absorbancia de los grupos de pacientes no difieren prácticamente con el del grupo normal, pero es de señalarse que registran un aumento en el rango de lecturas (Tabla. 1), así tenemos que mientras el grupo control muestra solo una lectura de absorbancia mayor de 0.300, en pacientes con PTA hay 7 lecturas (que corresponden a 6 pacientes) y en politransfundidos hay 5 lecturas (de 4 pacientes). (Tabla. 2)

La mayoría de los pacientes politransfundidos (91.12%) y con PTA (88%) están dentro de nuestro criterio de compatibilidad, lo cual hace suponer que carecen de anticuerpos antiplaqueta o que, por sus características clínicas, aun no los desarrollan y por lo tanto éstos pacientes pueden cubrir ampliamente sus requerimientos transfusionales plaquetarios, aunque no se descartan problemas posteriores.

Al criterio de incompatibilidad responden el 12% de los pacientes con PTA y el 8.88% de los politransfundidos, fueron clasificados de tal manera si mostraban una lectura de absorbancia mayor, o igual, a 0.300 a cuando menos uno de los concentrados plaquetarios. Ninguno de los pacientes fue situado dentro del criterio de dudosos. (Tabla.3)

Al conocer las proporciones implicadas de cada grupo estudiado con los criterios determinados, se buscó contrastar estos resultados con el grupo control y puesto que las fracciones de pacientes incompatibles son la diferencia teórica y práctica, se estimó la diferencia estadística de dichas proporciones, encontrando que en ambos grupos de pacientes la porción porcentual de incompatibles es mayor que la del grupo control, lo cual demuestra que la aplicación de los criterios afecta particularmente al grupo de pacientes y que la diferencia no es sólo aparente.

También se buscó establecer la asociación existente entre los tres grupos y los criterios de compatibilidad e incompatibilidad (Tabla. 4), se debe mencionar que se contaron como incompatibles los tres donadores normales que se clasificaron como dudosos dada la conveniencia práctica de no ser considerados totalmente viables, resultando que los criterios y los grupos muestran ser independientes, por lo tanto podemos decir que la prueba y los criterios son válidos independientemente del grupo a que se apliquen.

## X. CONCLUSIONES.

Dadas las características de sensibilidad y especificidad del ensayo inmunoenzimático, el método de ELISA descrito fue desarrollado para facilitar la selección de adecuados donadores de plaquetas, por medio de la detección de anticuerpos IgG antiplaqueta y al ser evaluado se califica como aceptable para la aplicación de pruebas de compatibilidad plaquetaria.

De la técnica en sí, podemos mencionar que es de fácil realización, relativamente práctica, tomando en cuenta que consume varias horas, pero es factible de ser optimizada, es reproducible y adaptable al uso del laboratorio clínico.

De la aplicación del método se establecieron, con amplia confiabilidad, los parámetros de selección, mostrando su utilidad al poder determinar la porción de los grupos clínicos que son ampliamente receptores de una terapia transfusional plaquetaria viable y de aquellos que inician una problemática que puede verse acentuada; y también muestra su consistencia al hacerse extensivo el método a diversos grupos clínicos.

Cabe mencionar la importancia de considerar la realización de una valoración clínica que se conjunte para lograr un método integral.

## XI. BIBLIOGRAFIA.

1. COURT, W.S., BOZEMAN, J.M., SOONG, S., et al. "Platelet surface-bound IgG in patients with immune and nonimmune thrombocytopenia". Blood 56 : 278-283, 1987.
2. FEUDENBERG, H.H., STITES, D.P., et al. Inmunología básica y clínica. 5ª edición. Ed. El manual moderno S.A. México D.F. Año: 1985. pp: 489-493.
3. GERZSO, F., PALOMARES, R. Enfermedades hemorrágicas. Diagnóstico y tratamiento. Ed. Editor Francisco Méndez C. México D.F. Año: 1976 pp: 213-214.
4. HARRIS, J.B. Grupos sanguíneos y técnicas para su identificación. Ed. El manual moderno S.A. México D.F. Año: 1976. pp: 9, 71.
5. HENRY, J. BERNARD. Todd-Sanford-Davidsohn. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Tomo I y II. 8ª edición. Ed. Salvat Editores S.A. México D.F. Año: 1991. pp: 795-796, 1122-1127, 1266.
6. HILLMANN, R.S., HARKER, L.A. Manual de hematología. Ed. El manual moderno S.A. México D.F. Año: 1977. pp: 270.
7. KARPATKIN, SIMON. "Autoimmune thrombocytopenic purpura". Blood 56: 329-343, 1980.
8. LEAVELL, B.S., THORUP, O.A. Hematología clínica. 4ª edición. Ed. Interamericana. S.A. México D.F. Año: 1978. pp: 656-657, 663-664.
9. LINARES G, JESUS. Inmunohematología y transfusión. Ed. Cromotip C.A. Caracas, Venezuela. Año: 1986. pp: 340-342.
10. LYNCH, D.M., LYNCH, J.M., HOWE, S.E. "A quantitative ELISA procedure for the measurement of membrane-bound platelet-associated IgG (PAIgG)" Am. J. Clin. Pathol. 1985; 83: 331-336.

11. MARGNI, R.A. Inmunología e inmunquímica. 3ª edición. Ed. Panamericana S.A. Buenos Aires; Argentina. Año: 1982. pp: 237-263.
12. MARQUEZ DE CANTU, M.J. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. Ed. UNAM. México D.F. Año: 1988. pp: 141-145, 271-275, 297-298, 326, 337-340 y 344-348.
13. Mc. GRATH, P., TREMEL, N., EASTLUND, D.T. "Use of two crossmatch techniques to select compatible platelet donors for patients refractory to HLA matched donors". American Association of Blood Banks. The 39th. Annual Meeting. San Francisco. USA. 1986.
14. Mc. MILLAN, R., TANI, P., MASON, D. "The demonstration of antibody binding to platelet-associated antigens in patients with immune thrombocytopenic purpura". Blood. 56:993-995, 1980.
15. NOVALES CASTRO, X de J. y AMATO, J.D. Sistema linfohemático. Ed. UNAM. Edo. de Mex., México. Año: 1989. pp: 12, 15-17, 258-259 y 274-276.
16. ROSE, N.R. y FRIEDMAN, H. El laboratorio en inmunología clínica. 2ª edición. Ed. Panamericana S.A. Buenos Aires; Argentina. Año: 1984. pp: 414-426.
17. SCHIFFER, C.A. y SLICHTER, S.J. "Platelet transfusions from single donors". N. Engl. J. Med. 1982; 307:245-247.
18. SCHIFFER, C.A. y YOUNG, V. "Detection of platelet antibodies using a Micro-Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)". Blood. 61:311-317, 1983.
19. TAMERIUS, J.D., CURD, J.G., et al. "An Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for platelet compatibility testing". Blood. 62:744-749, 1983.
20. VORLAENDER, K.O. Diagnóstico por métodos inmunológicos. Ed. Salvat Editores S.A. Barcelona, España. Año: 1983. pp: 200-201.

21. WILLIAMS, W.J. et al. Hematología. Tomo II. 2ª edición. Ed. Salvat S.A. España. Año: 1982. pp: 1624-1625, 1650-1656.
22. WINTROBE, M.M., LEE, G.R., BOGGS, D.R., et al. Clinical Hematology 8ª edición. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia, Pa; USA. Año: 1981. pp: 355, 481-483, 514.
23. WOLF, P.L. y WILLIAMS, D. Practical clinical enzymology. Techniques and interpretations Ed. John Wiley and Sons Inc. USA. Año: 1973. pp: 20-22.
24. WOODLIFF, H.J. y HERRMANN, R.P. Hematología clínica. Ed. El manual moderno S.A. México D.F. Año: 1981. pp: 185-204.