UNIVERSIDAD DE MURCIA

Área de Inmunología. Prácticas de Inmunología Clínica
Autor: Gonzalo Rubio Pedraza grubio@um.es

DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y TITULACIÓN DE ISOHEMAGLUTININAS

Al finalizar la práctica, el alumno debe ser capaz de:

- Manejar con seguridad muestras de sangre potencialmente infecciosas.
- Interpretar reacciones de aglutinación de Ag particulados.
- Preparar suspensiones de hematíes fenotipados A, B, AB y O.
- Llevar a cabo pruebas cruzadas y caracterizar isohemaglutininas.
- Preparar y titular antisueros para determinar el grupo hemático.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS:

La determinación del grupo sanguíneo es una técnica habitual en la transfusión de hemoderivados. Es necesaria porque sistema inmunitario de algunos individuos rechaza los hematíes de otros. Esta reacción inmunológica está mediada por las **isohemaglutininas**, que son anticuerpos (Ac) fácilmente detectables y cuantificables ya que forman aglutinados visibles cuando se enfrentan a hematíes específicos. La detección de isohemaglutininas en el suero o plasma de un individuo tiene un interés triple. Por una parte, se requiere para determinar correctamente el grupo sanguíneo y evitar **reacciones transfusionales** graves. Por otra, sirve para evaluar la capacidad de producir Ac de una persona, algo muy útil para el **diagnóstico de inmunodeficiencias**. Finalmente, sirve para obtener **reactivos** para tipaje de grupos sanguíneos. Se pueden determinar al menos 27 sistemas antigénicos hemáticos con sus correspondientes variantes alélicas. Los más importantes en transfusión sanguínea, por su alta inmunogenicidad, son los sistemas H - ABO y Rhesus (Rh).

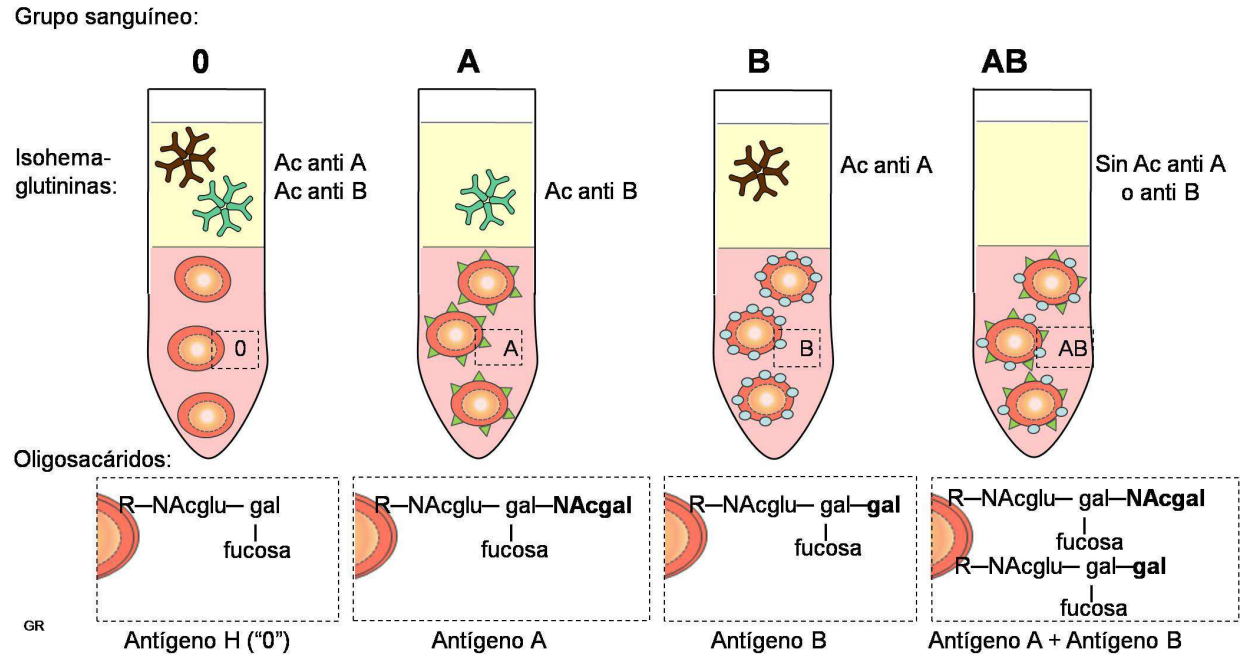

Figura 1. Sistema H-ABO. Se indican los grupos sanguíneos mayoritarios, los oligosacáridos responsables y las isohemaglutininas presentes.

Sistema H – ABO:

Los epítopos responsables son **carbohidratos** presentes en glicoesfingolípidos y glicoproteínas de membrana (Figura 1), que están codificados por dos loci génicos. El locus H, en el cromosoma 19, codifica una enzima fucosil transferasa que adiciona fucosa a un oligosacárido precursor, formando el denominado **"antígeno" H**. Sobre éste actúa el producto del locus ABO, en el cromosoma 9, que tiene tres alelos: los **alelos A y B** son codominantes y codifican dos glicosil transferasas que unen, respectivamente, N-Acetil galactosamina y galactosa. El **alelo 0** es un gen delecionado sin actividad enzimática, de modo que en homocigosis deja la secuencia H intacta. Los genotipos responsables de los cuatro grupos mayoritarios son: 00, *grupo 0*; AA y A0, *grupo A*; BB y B0, *grupo B* y el AB, *grupo AB*. En este último, los hematíes tendrán oligosacáridos con una y otra modificación.

La importancia inmunológica de los antígenos H-AB0 está en el hecho de que las personas toleran sus propios oligosacáridos pero **sintetizan en gran cantidad Ac frente a los otros grupos**. Como se producen espontáneamente, es decir sin contacto previo con hematíes de dichos grupos, se consideran "Ac naturales". En el recién nacido alcanzan un nivel detectable en plasma a las pocas semanas de edad. Hay evidencias que indican que en realidad se sintetizan en respuesta a bacterias de la flora intestinal, pólenes y/o a sustancias presentes en alimentos de origen animal, que contendrían oligosacáridos con reactividad cruzada.

Sistema Rhesus:

Los epítopos responsables están en dos proteínas integrales de membrana, codificadas en tándem el cromosoma 1, denominadas **RhCE (gen RHCE)** y **RhD (gen RHD)**, y que resultan de la duplicación de un gen ancestral. La proteína RhD es la más importante a efectos transfusionales. Las personas que expresan RhD se caracterizan como "Rh positivas", mientras que si carecen de RhD por deleción parcial o completa del gen RHD, serán "Rh negativas". Se utiliza también la letra "d" para indicar la carencia de D o fenotipo D-negativo. Como RhD se diferencia de RhCE en 30-35 aminoácidos, la proteína RhD resulta muy inmunogénica para las personas Rh negativas. La carencia de RhCE, por su parte, es muy infrecuente.

Los anticuerpos anti RhD, que son IgM e IgG, no aparecen espontáneamente en las personas Rh negativas, sino que son consecuencia de la exposición a hematíes D, por ejemplo tras una transfusión incorrecta o en el embarazo si la madre gesta un feto que expresa RhD.

Determinación de antígenos eritrocitarios e isohemaglutininas:

La determinación correcta del grupo sanguíneo requiere el análisis de los eritrocitos para ABO y D mediante Ac específicos anti-A, anti-B y anti-D. Esto se denomina **grupo hemático** y suele llevarse a cabo en sangre completa, sin que interfiera la presencia de plasma, leucocitos o plaquetas. Después se analiza el suero o el plasma para detectar la presencia de isohemaglutininas, lo que se denomina **grupo sérico** o plasmático, utilizando para ello hematíes fenotipados A, B y O lavados y un paso de centrifugación y resuspensión. En ambas pruebas, el resultado positivo será la aglutinación clara de los hematíes. La asignación del grupo sanguíneo definitivo se hace con ambos resultados, que deben ser **coherentes**. Los resultados discrepantes deben analizarse con extremo cuidado por su importancia sanitaria y

porque pueden dar información nueva sobre el polimorfismo de los grupos sanguíneos.

Para titular las isohemaglutininas, se diluye seriadamente la muestra de suero o plasma y se añade una cantidad fija de los hematíes fenotipados adecuados. Tras procesar adecuadamente, se determina si hay aglutinación de manera visual (Figura 2). El **título** será la **dilución máxima aglutinante**. Las personas con deficiencias en la producción de Ac mostrarán títulos más bajos de lo normal o incluso carecerán de isohemaglutininas.

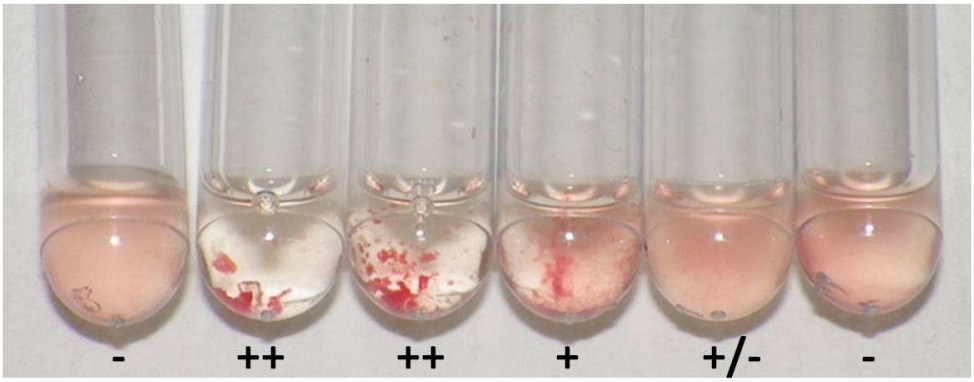

Figura 2. Determinación visual de la aglutinación de hematíes fenotipados.

Otra de las pruebas de laboratorio que se suele llevar a cabo antes de una transfusión, dependiendo de la urgencia del caso, es la **prueba cruzada**, que examina la compatibilidad entre suero del receptor con las células, hematíes en este caso, del/los donantes que va a recibir. Se realiza mezclando una muestra de suero del receptor con hematíes lavados de la/s bolsa/s de donación. Tras incubar y centrifugar se examinan para hemólisis y aglutinación. Cuando estas últimas no se presentan se dice que la prueba cruzada es compatible y la transfusión es posible.

EQUIPAMIENTO, REACTIVOS Y MUESTRAS:

- Centrífuga para tubos Eppendorf (tipo Minifuge).
- Centrífuga para tubos de 12x75mm.
- Microscopio.
- Portaobjetos.
- Tubos Eppendorf.
- Tubos de poliestireno de 6.5x38mm o, en su lugar, tubos de 12x75 o similares.
- Pipetas de 5-40, 40-200 y 200-1000µl y puntas.
- Lancetas de un solo uso.
- Algodón y alcohol etílico de 70°.
- Anticuerpos monoclonales anti-A, anti-B y anti-D.
- Suero salino fisiológico (NaCl 0.85%).
- Muestras de sangre anticoagulada con heparina o EDTA (un tubo por pareja).
- Muestras de plasma para titulación de isohemaglutininas (una por pareja).

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (por parejas):

Determinación del grupo hemático:

1) Cada pareja recibe un tubo de sangre anticoagulada con heparina o EDTA *[si algún alumno desconoce su grupo sanguíneo puede utilizar su propia sangre siguiendo las anotaciones de*

cada paso].

2) Centrifugar 5 minutos a 400xg.

3) Tomar 1 ml de plasma y depositarlo en un tubo Eppendorf rotulado con el número de la muestra o iniciales del alumno.

4) Tapar el tubo con su tapón o con un trozo de parafilm y resuspender por agitación suave.

5) Preparar un portaobjetos y otro tubo Eppendorf rotulados con el número de la muestra o las iniciales del alumno. En este último se pipetea 1 ml de suero salino fisiológico.

6) Sobre el porta se pipetean tres gotas de 20 µl de sangre bien separadas. *[Masajear enérgicamente la yema de un dedo y limpiar con algodón humedecido en alcohol. Dejar unos segundos que evapore y pinchar con la lanceta estéril. Sobre el portaobjetos, depositar tres gotas de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, bien separadas]*.

7) Antes de continuar con el portaobjetos, tomar 30 µl de sangre del tubo, o de las gotas del dedo puestas sobre el porta, y pipetearlos en el segundo tubo Eppendorf (el del suero fisiológico). Guardar a temperatura ambiente, se procesará más adelante.

8) Sobre cada gota de sangre del porta se pipetean 10 µl de los Ac correspondiente. El orden recomendable es (de izquierda a derecha): anti-A, anti-B, anti-D.

9) Mezclar bien la sangre y el Ac con una punta de pipeta limpia para cada gota.

10) Casi instantáneamente podrá ver los resultados de A y B. Para D, espere al menos tres minutos moviendo el porta ligeramente. En caso de duda, visualice con transiluminador o microscopio.

11) Anote el número de su muestra de sangre.....y el resultado AB0.....RhD.....

Represente 8 portas con los resultados posibles e indique el AB0 y RhD correspondiente:

Lavado y preparación de hematíes al 2%:

12) Anotar en el tubo Eppendorf de los 30 µl de sangre el grupo hemático obtenido (A; B; AB y O (indicar el RhD en el caso del O) y el nº de la muestra.

13) Centrifugar 1 minuto en la Minifuge.

14) Aspirar y descartar el sobrenadante (preferentemente con bomba de vacío).

15) Resuspender enérgicamente el pellet y añadir 1 ml de suero fisiológico.

16) Repetir los pasos 13 y 14.

17) Resuspender en 1485 µl de suero fisiológico. A esto se denomina *hematíes fenotipados y lavados al 2% (v/v)*, y serán compartidos por el grupo.

Detección y caracterización de isohemaglutininas en suero o plasma:

18) Tomar tres tubos de poliestireno de 6.5x38 y rotular A, B y O respectivamente. Colocarlos sobre una placa microtiter de 96 pocillos, que hará de gradilla.

19) Pipetear 50 µl del plasma de nuestra sangre, el que tomamos en el paso 3, en cada uno de los tubos.

20) Pipetear 25 µl de hematíes al 2% A en un tubo, hematíes B en otro y hematíes 0 en el último.

21) Mezclar y centrifugar 15 segundos en la Minifuge.

22) Dispersar el pellet, si es necesario con el vortex lento, y determinar aglutinación (ver Figura 2).

Resultados de la muestra número: ..... de grupo hemático AB0: ..... y RhD:.....

Represente los resultados obtenidos en los tres tubos:

Isohemaglutininas (indique + o -): anti-A:..... anti-B:..... anti-0:.....

Razone si hay coherencia entre el grupo hemático y el grupo plasmático:

Titulación de isohemaglutininas:

23) Tomar 8 tubos de 6.5x38 y rotularlos: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 y 1/256. Colocar en una placa-gradilla.

24) Pipetear 50 µl de suero fisiológico en todos los tubos excepto en el rotulado 1/2.

25) Pipetear 50 µl de plasma problema en el primer y segundo tubo y mezclar. NOTA: si su tubo de sangre ha resultado ser AB, pida plasma de otro grupo al profesor.

26) Del segundo tubo tomar 50 µl y pasarlos al siguiente. Mezclar y tomar 50 µl y pasarlos al siguiente y así hasta el último tubo. Esto se denomina dilución seriada. Tomar 50 µl del último tubo y descartar.

27) Pipetear 50 µl de los hematíes al 2% que correspondan: A o B (elija uno de ellos si titula un plasma de individuo O).

28) Mezclar por agitación suave e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

29) Centrifugar 15 segundos en la Minifuge.

30) Dispersar el pellet, con vortex lento si es necesario, y determinar aglutinación tal y como se indica en la Figura 2. Anote sus resultados en la tabla siguiente:

Titulación del plasma nº.....con hematíes lavados de fenotipo..... y nº……..								
Dilución final:	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Aglutinación (marcar ++, +, +/- ,-)	…….	…….	…….	…….	…….	…….	…….	…….
Este plasma podríamos utilizarlo como reactivo de laboratorio para determinar:								

Tabule los resultados medios de los plasmas analizados en el grupo de prácticas:

Resultados del grupo de prácticas: titulación de isohemaglutininas en plasma			
Plasmas de individuos	Hematíes al 2% usados	Rango	Título medio
A (n=.....)			
B (n=.....)			
0 (n=.....)			
0 (n=.....)			

Recoja el lugar de trabajo, desechando el material de un solo uso al contenedor de material infeccioso y complete el cuestionario de actividades grupales que le ha facilitado el profesor.