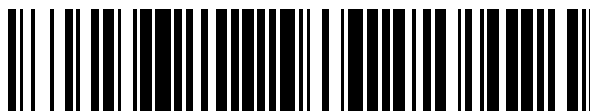


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 335**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10004427 .0**
96 Fecha de presentación: **27.04.2010**
97 Número de publicación de la solicitud: **2246699**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.2010**

54 Título: **Procedimiento para la selección, cribado, de sangre y/o suero con respecto a anticuerpos antigranulocitarios en una extensa población de donantes**

30 Prioridad:
27.04.2009 DE 102009019013

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2012

73 Titular/es:
**DRK BLUTSPENDEDIENST BADEN-
WÜRTEMBERG-HESSEN GMBH (100.0%)
Gunzenbachstraße 35
76530 Baden-Baden, DE**

72 Inventor/es:
NGUYEN, XUAN DUC

74 Agente/Representante:
ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 389 335 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la selección, cribado, de sangre y/o suero con respecto a anticuerpos antigranulocitarios en una extensa población de donantes

5 Campo técnico

La invención se refiere a un procedimiento para la selección, cribado, de sangre y/o suero con respecto a anticuerpos antigranulocitarios en una extensa población de donantes.

10 Estado de la técnica

Es sabido que los anticuerpos asociados a leucocitos pueden producir graves reacciones transfusionales en receptores de donaciones de sangre o plasma, en particular en el pulmón (TRALI; véanse: 1. Popovsky MA, Chaplin HC Jr, Moore, SB. Transfusion-related acute lung injury: a neglected, serious complication of hemotherapy. Transfusion 1992, 32: 589-592; 2. Silliman CC. Transfusion-related acute lung injury. Transfus Med Rev 1999, 13: 177-186) o a reacciones transfusionales febriles durante la administración de donaciones de sangre o plasma, en particular cuando dichas donaciones contienen anticuerpos HNA-3a específicos contra granulocitos. Algunos estudios analíticos realizados a gran escala han demostrado la importancia de los anticuerpos antigranulocitarios, de modo que debe conocerse su presencia o ausencia en la sangre de los donantes así como en los productos plasmáticos de donantes para excluir en lo posible la administración de donaciones de sangre y/o plasma con anticuerpos antigranulocitarios. Los granulocitos o micrófagos son leucocitos polimorfonucleares que, sin embargo, una vez completamente diferenciados, ya no son capaces de dividirse y que contienen un citoplasma granular.

25 La patogénesis de la lesión TRALI incluye la infusión de anticuerpos específicos del donante dirigidos contra antígenos, a saber, HLA de clase I o de clase II, o específicos de granulocitos, que pueden estar presentes en los leucocitos del receptor como resultado de activaciones del complemento, de secuestros y de activaciones de neutrófilos (PMN) en el pulmón, lo que puede conducir a una destrucción endotelial y a falta de perfusión capilar, así como a lesiones pulmonares agudas (ALI). En la mayoría de los casos clínicos de TRALI se encuentran afectados los anticuerpos HLA de clase II y HNA, en particular HNA-3a.

Como procedimientos de diagnóstico de granulocitos para el cribado de sangre y/o plasma para la detección de anticuerpos antigranulocitarios, se conocen el ensayo de aglutinación de granulocitos al microscopio, abreviado GAT, así como el ensayo de inmunofluorescencia de granulocitos al microscopio, abreviado GIFT (véanse: 1. Lalezari P, Jiang A, Lee S: A microagglutination technique for the detection of leucocyte agglutinins; en Ray JG (ed.): NIAID Manual of Tissue Typing Techniques, NIH Publication, Rockville. National Institutes of Health, 1979, 20-2; 2. Verheugt FW, von dem Borne AE, Décaray F, Engelfriet CP. The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. Br J Haematol 1977, 36: 533-44). Si el ensayo de aglutinación de granulocitos (GAT) o el ensayo de inmunofluorescencia de granulocitos (GIFT) dan resultado positivo, se emplea la técnica MAIGA para la especificación de los anticuerpos detectados.

En los procedimientos conocidos se procede de la manera siguiente: en principio se analiza la sangre con EDTA de al menos tres donantes tipificados con respecto a HNA, llevando a cabo un aislamiento de células mediante un gradiente de densidad. A continuación las muestras se lavan y se realiza una lisis de los eritrocitos residuales y después se repite el lavado. Los procedimientos GIFT y GAT divergen después de estas etapas de lavado.

Con respecto al ensayo de inmunofluorescencia de granulocitos al microscopio, se lleva a cabo una fijación con PFA, así como una etapa de lavado. A continuación tiene lugar una incubación con suero, así como una incubación con anticuerpos marcados por fluorescencia. El resultado se somete a un análisis microscópico. Con respecto al ensayo de aglutinación de granulocitos al microscopio, tiene lugar una incubación con suero y después el resultado se somete a un análisis microscópico. La desventaja de los procedimientos anteriores consiste en que requieren mucho tiempo, necesitándose de cinco a seis horas para la conclusión del análisis microscópico. Además, solo es posible un bajo rendimiento, que va acompañado de un gran consumo de células de prueba debido a grandes pérdidas durante el aislamiento de las mismas. Con los procedimientos conocidos GIFT y GAT no es posible un cribado de sangre o suero en una extensa población de donantes.

Además, se ha dado a conocer una citometría de flujo como procedimiento sensible para la detección de inmunoglobulinas unidas a granulocitos (Veys PA, Gutteridge CN, Macey M, Ord J y col. Detection of granulocyte antibodies using flow cytometric analysis of leucocyte immunofluorescence. Vox Sang 1989, 56: 42-7). Sin embargo,

este procedimiento requiere el aislamiento de los granulocitos, en lo que debe tenerse en cuenta que habrá grandes pérdidas de células.

5 Por lo tanto, en el estado de la técnica es necesario emplear los procedimientos estándar GIFT y GAT para detectar todos los anticuerpos HNA relevantes, en particular los anticuerpos dirigidos contra HNA-3a, en que la mejor manera de poder detectarlos es mediante el procedimiento GAT (véanse: 1. Bux J, Chapman J: Results of the Second International Granulocyte Serology Workshop. Transfusion, 1997, 37: 977-83; 2. Lucas G, Rogers S, de Haas M y col. Report on the Fourth International Immunology Workshop: progress toward quality assessment. Transfusion, abril de 2002, 42: 462-8).

10

Objetivo técnico

15 La invención se basa en el objetivo de conseguir un procedimiento para la selección, cribado, de sangre y/o plasma con respecto a anticuerpos antigranulocitarios, con el fin de poder analizar rápidamente numerosas muestras de sangre en una extensa población de donantes, en particular en un procedimiento automatizado; asimismo, el procedimiento solamente deberá requerir un consumo reducido de células de prueba. En particular, el procedimiento deberá permitir la detección de aquellos anticuerpos antigranulocitarios que hasta ahora solo podían detectarse mediante la combinación de los procedimientos GIFT y GAT.

20 Según la invención, la consecución del objetivo consiste en que para la selección, cribado, de sangre y/o suero con respecto a anticuerpos antigranulocitarios en una extensa población de donantes se emplea una citometría de flujo con inmunofluorescencia de granulocitos, en la que se usa sangre con EDTA de dos donantes tipificados con respecto a HNA y se lleva a cabo un aislamiento de células mediante un gradiente de densidad y una lisis de sangre completa, sin centrifugación, seguido una etapa de lavado, después de la cual, para la realización del ensayo de
25 inmunofluorescencia de granulocitos, tiene lugar una incubación del material celular aislado con suero, así como una incubación con anticuerpos marcados por fluorescencia y el material celular incubado se somete a un análisis por citometría de flujo.

30 En otra configuración de la invención, este análisis por citometría de flujo se realiza en un procedimiento automatizado.

35 La ventaja del procedimiento según la invención para selección, cribado, de sangre y/o plasma con respecto a anticuerpos antigranulocitarios consiste especialmente en que se pone a disposición un análisis por citometría de flujo mediante el cual pueden analizarse numerosas muestras de sangre de extensas poblaciones de donantes, en particular en un procedimiento automatizado. Al evitar la etapa de centrifugación, el consumo de células de prueba es bajo, ya que especialmente la centrifugación conduce a la destrucción e inutilidad de las células de prueba. Otra ventaja del procedimiento según la invención consiste en que ahora se detectan también aquellos anticuerpos antigranulocitarios que hasta el momento según el estado de la técnica solo podían detectarse con la combinación de los procedimientos GIFT y GAT. Otra ventaja consiste en que el procedimiento según la invención permite
40 realizar rápidamente numerosos análisis sucesivos. Por ejemplo, para 50 análisis se necesitan solamente de tres a un máximo de cuatro horas, mientras que en el estado de la técnica se necesitan de cinco a seis horas para unos pocos análisis.

45 En otra configuración de la invención, cada población de células se separa por sedimentación al llevar a cabo el gradiente de densidad de Ficoll para el aislamiento de las células, con lo que se obtienen granulocitos, monocitos y linfocitos en cantidad suficiente para analizar un gran número de muestras de sangre.

Otras configuraciones ventajosas del procedimiento se describen en las reivindicaciones subordinadas.

50 Breve descripción de los dibujos, en los que muestran:

la figura 1: el protocolo para el análisis de la fluorescencia unida a células para granulocitos (GRC), monocitos (MO) y linfocitos (LY);

55 la figura 2: un ejemplo de un análisis por citometría de flujo de un suero con una IgG específica para granulocitos dirigida contra HNA-3a; y

la figura 3: un ejemplo de un análisis por citometría de flujo de un suero con anticuerpos citotóxicos y no citotóxicos dirigidos contra HLA de clase I, que muestran un alto nivel de unión a granulocitos, monocitos y linfocitos;

la figura 4: la determinación del número de células de leucocitos, granulocitos, monocitos y linfocitos antes (columna izquierda) y después del aislamiento por medio de un gradiente de densidad de Ficoll, inclusive centrifugación (columna media) y un gradiente de densidad de Ficoll sin centrifugación (columna derecha);

5 la figura 5: el análisis de 140 sueros;

la figura 6: una serie de diluciones de los sueros que presentan IgG humanas específicas dirigidas contra HNA-1a, -1b, -2a y -3a;

10 la figura 7: determinaciones de variaciones intraensayo e interensayo para analizar la estabilidad del ensayo FLOW GIFT; y

la figura 8: el principio según la invención del ensayo de inmunofluorescencia de granulocitos por citometría de flujo (FLOW GIFT).

15

Según la figura 1, los granulocitos GRC, monocitos MO y linfocitos LY se diferenciaron en el histograma 1, en el que se muestran por la dispersión de luz lateral y frontal. Todas las células detectadas en el histograma 1 aparecen en el histograma 2, formado a partir del cuarto canal de fluorescencia, así como de la dispersión lateral. En este histograma, las células muertas se examinaron mediante 7-AAD (espectro de emisión de 650 nm), para analizar los anticuerpos citotóxicos. Los granulocitos, monocitos y linfocitos se examinaron individualmente en cada histograma con respecto a la fluorescencia unida a las células, la cual se compone del primer canal de fluorescencia (FITC), así como del número de células. En este ejemplo se analizó un suero con anticuerpos dirigidos contra HNA-2a (anti-HNA-2a). Los anticuerpos específicos se encuentran únicamente unidos a los granulocitos. El histograma muestra una imagen típica de los anticuerpos anti-HNA-2a, con un histograma bifásico.

20

La figura 2 muestra un ejemplo de un análisis por citometría de flujo de un suero con IgG específicas para granulocitos dirigidas contra HNA-3a (anti-HNA-3a). Este anticuerpo se une tanto a los granulocitos como también a monocitos y linfocitos, ya que todas estas poblaciones de células presentan HNA-3a. El anticuerpo anti-HNA-3a muestra un efecto citotóxico débil (7,2% de células positivas para 7-AAD). Los anticuerpos dirigidos contra HLA se excluyeron por medio de ELISA.

25

La figura 3 muestra un ejemplo de un análisis por citometría de flujo de un suero con anticuerpos citotóxicos y no citotóxicos dirigidos contra HLA de clase I, que muestran un alto nivel de unión a granulocitos, monocitos y linfocitos. La citotoxicidad de estos anticuerpos es la causa de la muerte celular. Las células muertas son positivas para 7-AAD (31% de células positivas para 7-AAD).

30

La figura 4 muestra una determinación del número de células de leucocitos o WBC, granulocitos, monocitos y linfocitos antes (columna izquierda) y después del aislamiento por medio de un gradiente de densidad de Ficoll, inclusive centrifugación (columna media) y un gradiente de densidad de Ficoll sin centrifugación (columna derecha). Para los procedimientos estándar GIFT y GAT es necesario aislar los granulocitos eliminando los monocitos y los linfocitos. En este caso pudo observarse una clara pérdida de todas las células remanentes después del aislamiento con el gradiente de densidad de Ficoll, inclusive centrifugación (* $p < 0,002$, 0,02, 0,0002 y 0,003 en igual medida para leucocitos (WBC), granulocitos, monocitos o linfocitos).

40

La figura 5 muestra en un análisis de 140 sueros, la cantidad de los sueros de resultado positivo o negativo con respecto a la unión de una IgG específica contra granulocitos en el procedimiento FLOW-GIFT en comparación con los procedimientos GIFT estándar, GAT y GIFT estándar en combinación con GAT.

45

La figura 6 muestra una serie de diluciones de los sueros que presentan IgG humanas específicas dirigidas contra HNA-1a, -1b, -2a y -3a. Se representan los títulos correspondientes en los procedimientos FLOW GIFT, GIFT estándar y GAT. A este respecto, FLOW GIFT se mostró más sensible en comparación con GIFT estándar y GAT.

50

En la figura 7 se determinaron las variaciones intraensayo e interensayo para analizar la estabilidad del ensayo FLOW GIFT. Un suero AB, tres sueros con anti-HNA-1a, -1b, -3a y dos sueros con un anticuerpo fuerte y un anticuerpo débil dirigidos contra HLA de clase I se examinaron por duplicado y en distintos tiempos para determinar en cada caso las variaciones intraensayo e interensayo. Para cada uno de los sueros se calculó el coeficiente de variación (CV).

55

En la figura 8 se representa el principio según la invención del ensayo de fluorescencia de granulocitos por

citometría de flujo (FLOW GIFT). Las células de prueba junto con el suero, por ejemplo Grz-GP + hαGP, se marcan por medio de anticuerpos secundarios marcados por fluorescencia, por ejemplo dhAK-FITC y, a continuación, la luz fluorescente producida por el anticuerpo secundario marcado por fluorescencia se detecta con un detector tras su excitación por un detector láser.

5

Según la invención, a partir de 10 ml de sangre completa de un donante sano con un hemograma normal es posible aislar un número suficiente de células de prueba para la preparación de aproximadamente 150 sueros.

10 En comparación, al usar el procedimiento conocido según los procedimientos GIFT estándar y GAT de la práctica normal de los laboratorios, las células aisladas solo fueron suficientes para el análisis de cinco sueros. Este procedimiento según la invención permite también una realización rápida del análisis, ya que se ha reducido el número de etapas de lavado y, en particular, también puede prescindirse de la fijación de las células. De este modo pudo conseguirse una realización completa del análisis en dos horas.

15 Como se demostró en la serie de diluciones de los sueros con distintos anticuerpos específicos contra granulocitos, el procedimiento FLOW GIFT, según la invención, pudo detectar anti-HNA-1a, -1b, -2a y -3a en mayores niveles de dilución que los procedimientos GIFT estándar y GAT. En particular, llama la atención que mediante FLOW GIFT se detectaran tres sueros con IgG dirigidas contra CD16 (anti-CD16) y anticuerpos dirigidos contra HLA de clase I. Los datos según la invención demuestran que el procedimiento FLOW GIFT es capaz de detectar anticuerpos
20 específicos con mayor sensibilidad en comparación con el procedimiento GIFT estándar en combinación con GAT. Esta observación puede explicarse porque en el procedimiento GIFT estándar se emplea PFA para la fijación de las células, con el fin de conseguir una mejor diferenciación entre los resultados positivos y negativos en la evaluación microscópica. De hecho, como ya es sabido, la fijación de células y tejidos con PFA ha de considerarse como crítica con respecto a la antigenicidad de las moléculas que se unen a la membrana. Con el procedimiento FLOW GIFT no
25 es necesaria una fijación de las células con PFA para una mejor diferenciación de los tipos de células mediante un análisis por citometría de flujo. Además, el uso de 7-AAD para la identificación de anticuerpos citotóxicos a través del examen de las células muertas, así como la evaluación simultánea de la fluorescencia unida a las células en monocitos y linfocitos resultó ser útil en algunos casos, Fig. 3. HNA-1 y -2 solamente se encuentran en granulocitos, de modo que los anticuerpos individuales específicos contra estos antígenos solo pueden detectarse por medio de
30 un análisis por citometría de flujo en neutrófilos, Fig. 1. En cuanto a HNA-3a, este antígeno se encuentra tanto en neutrófilos como en linfocitos. En el estudio según la invención, también pudo detectarse anti-HNA-3a en monocitos, Fig. 2. Con frecuencia este anticuerpo está relacionado con los anticuerpos antigranulocitarios en TRALI. Tres sueros con este anticuerpo resultaron negativos con el procedimiento GIFT estándar. Mediante la evaluación por medio de FLOW GIFT se observó una mayor correlación, tanto entre la MFI de las muestras sin diluir y los
35 correspondientes títulos, como entre las series de diluciones y la concentración utilizada de las muestras individuales. Estos resultados demuestran que el procedimiento FLOW GIFT es capaz de proporcionar una información más precisa sobre la intensidad del anticuerpo en relación con la gran escala de MFI de cada población de células, en particular en el caso de anticuerpos con títulos altos. Una comparación directa entre las muestras (ensayos) ofrece resultados comparables. Para ello se examinaron 140 sueros. Un resultado discrepante entre los
40 procedimientos FLOW GIFT y GIFT estándar en combinación con GAT pudo observarse solamente en tres sueros. Este resultado demuestra que el procedimiento FLOW GIFT, sin el uso del ensayo de aglutinación, es capaz de identificar anticuerpos específicos contra granulocitos con una especificidad prácticamente idéntica a la del procedimiento GIFT estándar en combinación con GAT. Por lo tanto, el procedimiento FLOW GIFT es perfectamente adecuado para una automatización del análisis de anticuerpos antigranulocitarios en un gran número de muestras.
45 Para demostrar la estabilidad del procedimiento FLOW GIFT se determinaron las variaciones intraensayo e interensayo. El bajo CV subraya la estabilidad y la precisión del procedimiento FLOW GIFT.

En resumen, el procedimiento FLOW GIFT ofrece un procedimiento sencillo y rápido para la determinación de anticuerpos asociados a granulocitos, en que dicho procedimiento presenta todas las ventajas del procedimiento
50 GIFT estándar en combinación con el procedimiento GAT. Para realizar este ensayo se necesita una menor cantidad de células. Este nuevo sistema permite la detección de anticuerpos antigranulocitarios en una mayor población de donantes.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS: en total se examinaron 140 sueros en cuanto a la presencia de anticuerpos
55 antigranulocitarios: 29 sueros, en los que previamente se habían detectado los antígenos HNA-1a, -1b, -1c, -2a, -3a, -4a y -5a por medio de los procedimientos GAT y/o GIFT y 111 sueros asociados con sospecha de TRALI. Las células de prueba se aislaron a partir de muestras de sangre completa de donantes tipificados con respecto a HNA mediante sedimentación celular en un gradiente de densidad de Ficoll. Los leucocitos se incubaron con el suero correspondiente; la unión de los anticuerpos a las células de prueba se determinó por medio de anticuerpos contra

IgG humana conjugados con FITC. Como procedimientos de referencia se usaron GIFT estándar y GAT. RESULTADOS: veintisiete de los sueros dieron resultado positivo en el procedimiento FLOW GIFT, mientras que seis sueros, que contenían anti-HNA-3a (3x), anti-CD16 (1x) y anti-HLA de clase I (2x) resultaron negativos mediante GIFT estándar. El nuevo procedimiento FLOW GIFT fue capaz de identificar todos los anticuerpos antigranulocitarios, que de otro modo solamente habrían podido determinarse mediante una combinación de GIFT estándar y GAT. Mediante GAT no fue posible determinar ocho sueros con anti-HNA-2a (2x), anti-CD16 (2x) y anti-HLA de clase I (4x). En una serie de diluciones sucesivas, el procedimiento FLOW GIFT pudo detectar los anticuerpos en diluciones más altas que los procedimientos de referencia GIFT y GAT. CONCLUSIÓN: el procedimiento FLOW GIFT permite una rápida identificación de anticuerpos antigranulocitarios, en lo que se requiere una menor cantidad de células de prueba de los donantes. Probablemente, este procedimiento abrirá el camino para un análisis (cribado) de anticuerpos antigranulocitarios en grandes poblaciones de donantes.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS:

15 Muestras de sangre:

Ciento cuarenta sueros de donantes congelados, que estaban relacionados con reacciones transfusionales anteriores se examinaron en cuanto a la presencia de anticuerpos reactivos con granulocitos. Los granulocitos de prueba se obtuvieron a partir de sangre completa en Na₂EDTA extraída recientemente de donantes sanos, en los que previamente se habían tipificado los antígenos neutrofílicos HNA-1a, -1b, -1c, -2a, -3a, -4a y -5a. Como controles normales se usaron sueros del grupo sanguíneo AB de donantes sanos sin anticuerpos específicos contra leucocitos. Todos los sueros de prueba examinados se analizaron mediante los procedimientos convencionales GAT y GIFT en comparación con FLOW GIFT.

25 Ensayos de inmunofluorescencia (GIFT) y de aglutinación (GAT) de granulocitos:

Los ensayos estándar GIFT y GAT se realizaron como se describe. Brevemente, se analizaron granulocitos de sangre anticoagulada en EDTA de tres donantes sanos. Los granulocitos se aislaron del sobrenadante de plasma rico en leucocitos mediante centrifugación de un gradiente de densidad de Ficoll (Polymorphprep, Axis-Shield, Oslo, Noruega). Después de efectuarse la lisis de los eritrocitos por medio del tampón PeliLyse A1 (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos), la suspensión de células se lavó dos veces en PBS, compuesto de BSA al 0,2% y Na₂-etilendiaminotetraacetato (EDTA) al 0,5%. Para el procedimiento GIFT, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% en placas de microtitulación y de nuevo se lavaron dos veces. Después de 30 minutos de incubación a 37°C se añadieron los sueros correspondientes y se volvió a lavar (cuatro veces); las células se incubaron después con anticuerpos F(ab')₂ de conejo dirigidos contra IgG humana y marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako, Hamburgo, Alemania), se lavaron de nuevo tres veces y se examinaron mediante un microscopio de fluorescencia.

El ensayo GAT se realizó en placas Terasaki (Greiner, Frickenhausen, Alemania). Se incubaron 2 µl de granulocitos, obtenidos como se describe anteriormente, con 2 µl de suero durante 120 minutos a 37°C y después se evaluaron con el microscopio. Los resultados se calcularon con los valores siguientes: una escala de 0 a 4 puntos para el procedimiento GIFT y porcentajes (0-100%) para el procedimiento GAT.

Diferenciación de los anticuerpos específicos contra granulocitos y detección de anticuerpos dirigidos contra HLA:

La diferenciación de los anticuerpos específicos contra granulocitos en los procedimientos GIFT y GAT se llevó a cabo por medio del ensayo de inmovilización específica de antígenos de granulocitos por anticuerpos monoclonales (MAIGA) con los AcMo dirigidos contra: CD16, clon 3G8; CD18, clon 7E4; CD11a, clon 25,3; CD11b, clon Bear1, todos ellos de Immunotech, Marsella, Francia; y CD177, clon MEM 166 (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Para la determinación de los anticuerpos dirigidos contra HLA se empleó el ensayo de inmunoenzimología de adsorción (ELISA; Biotest, Dreieich, Alemania) o un ensayo Flow PRA de One Lambda (Canoga Park, EE. UU.).

Inmunofluorescencia de granulocitos por citometría de flujo (FLOW GIFT):

Para aislar leucocitos para el procedimiento según la invención FLOW GIFT, se añadieron 9 ml de sangre anticoagulada en EDTA de dos donantes sanos a un gradiente de densidad de Ficoll de 15 ml, sin una etapa de centrifugación (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Después de un tiempo de espera de 20 minutos a temperatura ambiente, los leucocitos se separaron automáticamente por sedimentación del sobrenadante de plasma rico en leucocitos. Los eritrocitos (RBC) remanentes en el sobrenadante se lisaron por la adición de cloruro

- de amonio al 10%. A continuación, las células se lavaron en PBS, compuesto de BSA al 0,2% y Na₂-EDTA al 0,5%, y se resuspendieron en 7 ml de PBS. Una cantidad de 50 µl de las células resuspendidas se incubó con 50 µl del suero correspondiente durante 30 minutos a 37°C; después siguieron dos etapas de lavado, así como una incubación con anticuerpos F(ab')₂ de conejo dirigidos contra IgG humana y marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako, Hamburgo, Alemania). Para excluir las células muertas se añadió 7-AAD (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania). Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente siguió una etapa de lavado, así como una resuspensión en 300 µl de PBS que contenía paraformaldehído (PFA) al 0,1%; la fluorescencia unida a las células se determinó mediante un análisis por citometría de flujo.
- 10 Todos los análisis por citometría de flujo se llevaron a cabo por medio de un aparato FC500 (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania). La regulación del citómetro de flujo se ajustó para la amplificación lineal de la dispersión de la luz y la amplificación logarítmica de cinco canales de fluorescencia. Los valores límite se definieron en una dispersión frontal para excluir residuos celulares.
- 15 Los granulocitos, monocitos y linfocitos se mostraron como dispersión lateral y frontal. Después de la retroselección ("backgating") en el cuarto canal de fluorescencia frente a la dispersión lateral, se analizaron las células muertas (células positivas para 7-AAD). La fluorescencia unida a las células se analizó por separado para los granulocitos, monocitos y linfocitos (Figs. 1 y 2). Se midieron al menos 5.000 sucesos por cada población de células. Como valor se tomó la intensidad de fluorescencia media (MFI). El valor de corte se definió como la razón entre el MFI del suero de prueba y del suero AB. El suero se consideró positivo cuando esta razón fue >2.

Análisis de las células restantes después del aislamiento a partir de sangre completa:

- Para analizar las células remanentes después del aislamiento con el gradiente de densidad de Ficoll, con o sin etapa de centrifugación, se prepararon 10 ml de muestras de sangre completa en EDTA de diez donantes sanos como corresponde según los dos procedimientos de aislamiento. El hemograma diferencial antes y después del aislamiento se determinó por medio del analizador hematológico automático Cell Dyn 3700 (Abbott, Wiesbaden-Delkenheim, Alemania). Se analizó el número total de leucocitos (WBC), granulocitos, monocitos y linfocitos.
- 30 Titulación de sueros con anticuerpos de unión específica a granulocitos y comprobación de la estabilidad del procedimiento FLOW GIFT:
- Se prepararon diluciones seriadas de sueros con anticuerpos dirigidos contra HNA-1a, -1b, -2a y -3a con suero AB. Para investigar la estabilidad del procedimiento FLOW GIFT se analizó la variación intraensayo e interensayo. El suero AB y cinco sueros más con anticuerpos anti-HNA-1a, -1b, -3a y anti-HLA de clase I (dos sueros, uno con un anticuerpo fuerte y el otro con un anticuerpo débil) se analizaron por duplicado para determinar la variación intraensayo. Para la variación interensayo se analizaron los mismos sueros en distintos tiempos.

Análisis estadístico y cálculos:

- 40 Los valores medios, desviaciones estándar y coeficientes de variación se calcularon como corresponde. Las diferencias entre los datos se consideran estadísticamente significativas para un valor de $p < 0,05$. Todas las pruebas se llevaron a cabo mediante software comercial para ordenadores personales (SPSS para Windows NT, SPSS Software GmbH, Múnich, Alemania).

45 RESULTADOS:

Obtención de granulocitos, monocitos y linfocitos después del aislamiento mediante gradiente de densidad de Ficoll, con o sin centrifugación:

- 50 Se analizó el número total de células remanentes después del aislamiento mediante el gradiente de densidad de Ficoll, con o sin etapa de centrifugación. Antes del aislamiento, el número total de leucocitos fue de $73 \pm 16,9$ ($55-100$) $\times 10^6$, con 43 ± 17 ($25-72$) $\times 10^8$ granulocitos, 5 ± 2 ($2,6-8,5$) $\times 10^6$ monocitos y $27,7 \pm 16,6$ ($16,2-72,8$) $\times 10^8$ linfocitos. Después del aislamiento de células mediante un gradiente de densidad de Ficoll, con o sin etapa de centrifugación, el número de leucocitos fue de 18 ± 11 ($1,33-42,1$) $\times 10^6$ frente a 45 ± 13 ($30-63$) $\times 10^8$, con $11,5 \pm 10$ ($1,1-36,3$) $\times 10^8$ frente a $27,5 \pm 9$ ($16-43$) $\times 10^6$ granulocitos, $0,22 \pm 0,1$ ($0,1-0,45$) $\times 10^6$ frente a $4,4 \pm 1,7$ ($2,1-7,74$) $\times 10^6$ monocitos y $2,22 \pm 1,56$ ($0,14-5,81$) $\times 10^8$ frente a $10,3 \pm 6,1$ ($2,1-19,6$) $\times 10^8$ linfocitos. Por consiguiente, después del aislamiento con un gradiente de densidad de Ficoll y una etapa de centrifugación pudo observarse una considerable pérdida de células de cada una de las poblaciones celulares remanentes ($p < 0,02$) (Fig. 4).

Especificidad

Para determinar la especificidad del procedimiento FLOW GIFT en comparación con los procedimientos GIFT estándar y GAT, se investigaron 140 sueros de donantes que habían sido asociados con reacciones transfusionales o de pacientes con distintas enfermedades primarias. De los 140 sueros, 29 sueros, que contenían anticuerpos específicos para granulocitos dirigidos contra HNA-1a (4x), -1b (4x), -1c (1x), -2a (3x), -3a (11x), CD16 (2x) y HLA de clase I (4x), se analizaron en un ensayo interlaboratorios y se confirmaron por medio de FLOW GIFT. La especificidad de los anticuerpos se confirmó en el marco de un análisis detallado de granulocitos tipificados mediante las técnicas MAIGA y HLA-ELISA. De los 29 sueros con resultado positivo en el procedimiento FLOW GIFT, 23 sueros se identificaron mediante el procedimiento GIFT estándar. Ciento once sueros dieron resultado negativo en los dos ensayos (Fig. 5). Seis sueros que contenían anti-HNA-3a (n = 4), anti-CD16 (n = 1) y anti-HLA de clase I (n = 2) solamente resultaron positivos en el procedimiento FLOW GIFT, pero dieron resultado negativo en el procedimiento GIFT estándar. Con respecto a los resultados del procedimiento GAT, 21 sueros resultaron positivos y 119 sueros, negativos. Ocho sueros que contenían anti-HNA-2a (n = 2), anti-CD16 (n = 2) y anti-HLA de clase I (n = 4), no se identificaron mediante GAT. De los 29 sueros con resultado positivo en FLOW GIFT, tres dieron resultado negativo en el procedimiento GIFT estándar y también en el procedimiento GAT (1x anti-CD16 y 2x anti-HLA de clase I). Cuatro sueros contenían anti-HNA-3a y solamente se identificaron en el procedimiento GAT. En el análisis por citometría de flujo, los anticuerpos dirigidos contra HLA de clase I y cuatro muestras con anti-HNA-3a dieron resultado positivo en las poblaciones de linfocitos y monocitos.

20 Sensibilidad y estabilidad del procedimiento FLOW GIFT:

Para determinar la sensibilidad del procedimiento FLOW GIFT, cuatro sueros, en cada caso con anticuerpos conocidos de unión específica a granulocitos (anti-HNA-1a, -1b, -2a, -3a), se diluyeron con suero AB y se analizaron en el procedimiento FLOW GIFT, así como en los procedimientos GIFT estándar y GAT. La figura 6 muestra la serie de diluciones de los sueros. Todos los valores medidos de la serie de diluciones disminuyen proporcionalmente en relación con la concentración empleada. En todos los sueros, el procedimiento FLOW GIFT pudo detectar los anticuerpos específicos contra granulocitos en una dilución más alta que los procedimientos GIFT estándar y/o GAT. Pudo observarse una alta correlación entre la MFI de las muestras sin diluir y los correspondientes títulos, así como entre la serie de diluciones y la concentración correspondiente empleada de cada uno de los sueros ($p < 0,01$).

Para confirmar la estabilidad del procedimiento FLOW GIFT se determinaron las variaciones intraensayo e interensayo. El suero AB, así como cinco sueros más con anti-HNA-1a, -1b, -3a y anti-HLA de clase I (dos sueros, uno de los cuales con un anticuerpo fuerte y el otro con un anticuerpo débil) se analizaron por duplicado para determinar la variación intraensayo. Se calculó el promedio de la desviación estándar (coeficiente de variación) de cada suero. El coeficiente de variación intraensayo fue de $4,5 \pm 3,43\%$ (2,04-10,98). Para la variación interensayo se analizaron los mismos sueros, pero en distintos tiempos. Para cada suero se calculó el coeficiente de variación, que fue de $5,5 \pm 5,2$ (0,6-14,46)% (Fig. 7).

40 La citometría de flujo según la invención demostró ser un procedimiento sensible para la detección de inmunoglobulinas que se unen a leucocitos. La citometría de flujo permite la diferenciación de distintos analitos en una muestra individual con respecto a su tamaño y color. Los procedimientos empleados hasta ahora para el aislamiento de células conducían en cada caso a grandes pérdidas de células. Por lo tanto, para analizar un gran número de muestras de sangre se necesitaba una gran cantidad de sangre completa de donantes sanos para el aislamiento de las células de prueba. En este aspecto, se ha conseguido establecer un procedimiento mediante el que puede realizarse una rápida detección de anticuerpos antigranulocitarios y en el que el número de células necesarias para ello se mantiene lo menor posible. Además, se ha conseguido obtener más información sobre la unión de anticuerpos a otros tipos de células, como los monocitos y linfocitos, así como sobre la muerte celular a causa de posibles anticuerpos activadores del complemento.

50 Para evitar grandes pérdidas de células, el procedimiento de aislamiento actual según el estado de la técnica se ha modificado según la invención de modo que se usa el procedimiento del gradiente de densidad de Ficoll sin centrifugación. Las poblaciones de células se separan por sedimentación. Con este procedimiento pueden obtenerse granulocitos, monocitos y linfocitos en una cantidad suficiente para poder analizar una gran cantidad de muestras de sangre. De esta manera, es posible obtener una cantidad suficiente de células de prueba para el análisis de un mínimo de 150 sueros a partir de 10 ml de sangre completa de un donante sano con un hemograma normal. En comparación, al usar el procedimiento conocido según los procedimientos GIFT estándar y GAT de la práctica normal de los laboratorios, las células aisladas solo son suficientes para el análisis de cinco sueros. Este procedimiento permite también una realización rápida del análisis, ya que se ha reducido el número de etapas de

lavado y, en particular, se prescinde también de la fijación de las células. De este modo puede conseguirse una realización completa del análisis en dos horas.

Como se ha demostrado en la serie de diluciones de los sueros con distintos anticuerpos específicos contra granulocitos, el procedimiento FLOW GIFT puede detectar anti-HNA-1a, -1b, -2a y -3a en mayores niveles de dilución que los procedimientos GIFT estándar y GAT. Llama especialmente la atención que mediante FLOW GIFT se detecten tres sueros con IgG anti-CD16 y anticuerpos dirigidos contra HLA de clase I. Los datos presentados demuestran que el procedimiento FLOW GIFT es capaz de detectar anticuerpos específicos con mayor sensibilidad en comparación con el procedimiento GIFT estándar en combinación con GAT. Esta observación puede explicarse porque en el procedimiento GIFT estándar se emplea PFA para la fijación de las células, con el fin de conseguir una mejor diferenciación entre los resultados positivos y negativos en la evaluación microscópica. De hecho, la fijación de células y tejidos con PFA ha de considerarse como crítica con respecto a la antigenicidad de las moléculas que se unen a la membrana. Con el procedimiento FLOW GIFT no es necesaria una fijación de las células con PFA para una mejor diferenciación de los tipos de células mediante un análisis por citometría de flujo. Además, el uso de 7-AAD para la identificación de anticuerpos citotóxicos a través del examen de las células muertas, así como la evaluación simultánea de la fluorescencia unida a las células en monocitos y linfocitos resultó ser útil en algunos casos (Fig. 3). HNA-1 y -2 solamente se encuentran en granulocitos, de modo que los anticuerpos individuales específicos contra estos antígenos solo pueden detectarse por medio de un análisis por citometría de flujo en neutrófilos (Fig. 1). En cuanto a HNA-3a, este antígeno se encuentra tanto en neutrófilos como en linfocitos. En el estudio presentado, también pudieron detectarse anti-HNA-3a en monocitos (Fig. 2). Este anticuerpo está relacionado frecuentemente con anticuerpos antigranulocitarios en TRALI. Tres sueros con este anticuerpo dieron resultado negativo con el procedimiento GIFT estándar. Mediante la evaluación por medio de FLOW GIFT se observó una mayor correlación, tanto entre la MFI de las muestras sin diluir y los correspondientes títulos, como entre las series de diluciones y la concentración utilizada de las muestras individuales. Estos resultados demuestran que el procedimiento FLOW GIFT es capaz de proporcionar una información más precisa sobre la intensidad del anticuerpo en relación con la gran escala de MFI de las poblaciones de células, en particular en el caso de anticuerpos con títulos altos. Estos resultados demuestran que el procedimiento FLOW GIFT es capaz de proporcionar una información más precisa sobre la intensidad del anticuerpo en relación con la gran escala de MFI de las poblaciones de células, en particular en el caso de anticuerpos con títulos altos.

Una comparación directa entre las muestras (ensayos) ofrece resultados comparables. Para ello se examinaron 140 sueros. Un resultado discrepante entre los procedimientos FLOW GIFT y GIFT estándar en combinación con GAT pudo observarse solamente en tres sueros. Este resultado demuestra que el procedimiento según la invención FLOW GIFT, sin el uso del ensayo de aglutinación, es capaz de identificar anticuerpos específicos contra granulocitos con una especificidad prácticamente idéntica a la del procedimiento GIFT estándar en combinación con GAT. Por lo tanto, el procedimiento FLOW GIFT es perfectamente adecuado para una automatización del análisis de anticuerpos antigranulocitarios en un gran número de muestras. Para demostrar la estabilidad del procedimiento FLOW GIFT se realizaron variaciones intraensayo e interensayo. El bajo CV subraya la estabilidad y la precisión del procedimiento FLOW GIFT.

En resumen, el procedimiento FLOW GIFT ofrece un procedimiento sencillo y rápido para la determinación de anticuerpos asociados a granulocitos, en que dicho procedimiento presenta todas las ventajas del procedimiento GIFT estándar en combinación con el procedimiento GAT. Para realizar este ensayo se necesita una menor cantidad de células. Este nuevo sistema permite la detección de anticuerpos antigranulocitarios en una mayor población de donantes.

La invención puede usarse comercialmente para la selección, cribado, de sangre y/o suero con respecto a anticuerpos antigranulocitarios en una extensa población de donantes. La ventaja especial consiste en que mediante la invención se pone a disposición un procedimiento sencillo, rápido y sensible con bajo consumo de células de prueba. Mientras que con los procedimientos anteriores del estado de la técnica podían realizarse de seis a ocho análisis con 10 ml de sangre con EDTA, la invención permite realizar aproximadamente 150 análisis con 10 ml de sangre con EDTA.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la selección, cribado, de sangre y/o suero con respecto a anticuerpos antigranulocitarios en una extensa población de donantes, **caracterizado porque** se emplea una citometría de flujo con inmunofluorescencia de granulocitos, en la que en la que se usa sangre con EDTA de dos donantes tipificados con respecto a HNA y se lleva a cabo un aislamiento de células mediante un gradiente de densidad y una lisis de sangre completa, sin centrifugación, seguido de una etapa de lavado, después de la cual, para la realización del ensayo de inmunofluorescencia de granulocitos, tiene lugar una incubación del material celular aislado con suero, así como una incubación con anticuerpos marcados por fluorescencia y el material celular incubado se somete a un análisis por citometría de flujo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** cada población de células se separa por sedimentación mediante un gradiente de densidad de Ficoll para el aislamiento de las células.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** la sedimentación se facilita mediante sacudidas.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, 2 o 3, **caracterizado porque** se prescinde de una fijación de las células.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, **caracterizado porque** se usa 7-AAD para la identificación de anticuerpos citotóxicos mediante el examen de las células muertas, así como la evaluación simultánea de la fluorescencia unida a las células en monocitos y linfocitos.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el ensayo de inmunofluorescencia de granulocitos por citometría de flujo (FLOW GIFT) tiene lugar en un procedimiento automatizado por medio de un robot.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** las células de prueba se marcan junto con el suero por medio de anticuerpos secundarios marcados por fluorescencia y, a continuación, la luz fluorescente producida por el anticuerpo secundario marcado por fluorescencia se detecta con un detector tras su excitación por un detector láser.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque**, para el aislamiento de leucocitos, se añade sangre anticoagulada a un gradiente de densidad de Ficoll, sin una etapa de centrifugación, a continuación, después de un tiempo de espera de 10 a 30 minutos, preferentemente de aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente, tiene lugar una separación automática mediante sedimentación de los leucocitos del sobrenadante de plasma rico en leucocitos, a continuación, los eritrocitos (RBC) remanentes en el sobrenadante se lisan, preferentemente por la adición de cloruro de amonio al 10%, después, las células se lavan, preferentemente en PBS, compuesto de BSA al 0,2% y Na₂-EDTA al 0,6%, y se resuspenden, preferentemente en PBS, luego tiene lugar una incubación de las células resuspendidas con el suero correspondiente, preferentemente durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 37°C; después sigue, dado el caso, una etapa de lavado, en particular dos etapas de lavado y una incubación, preferentemente con anticuerpos F(ab')₂ de conejo dirigidos contra IgG humana y marcados con FITC, en lo que, para excluir las células muertas se añade 7-AAD y se espera un tiempo de incubación, preferentemente de aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente, al que sigue, dado el caso, otra etapa de lavado, así como, dado el caso, una resuspensión, preferentemente en PBS con paraformaldehído (PFA) preferentemente a aproximadamente el 0,1%; finalmente se determina la fluorescencia unida a las células mediante un análisis por citometría de flujo.

Figura 1

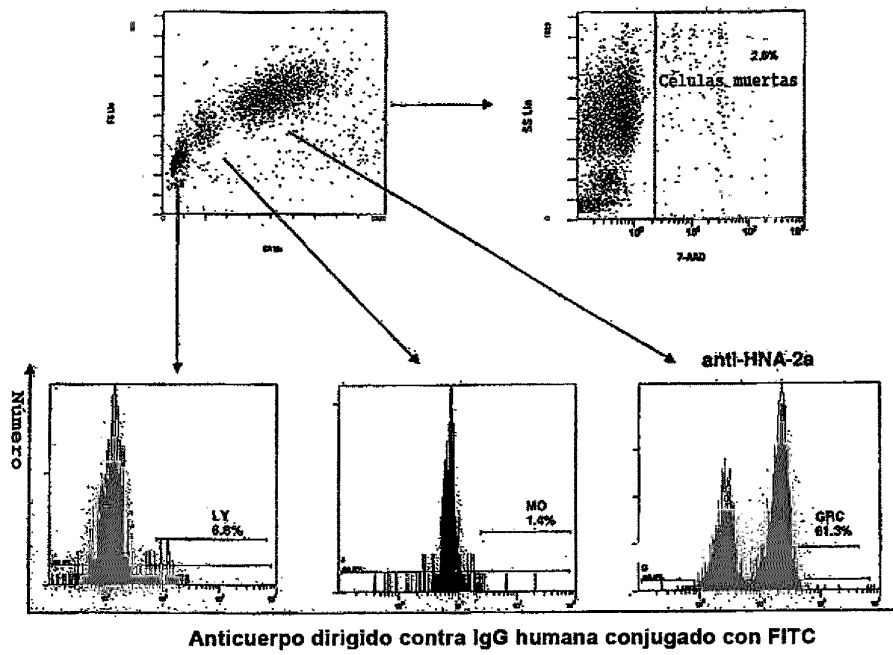


Figura 2

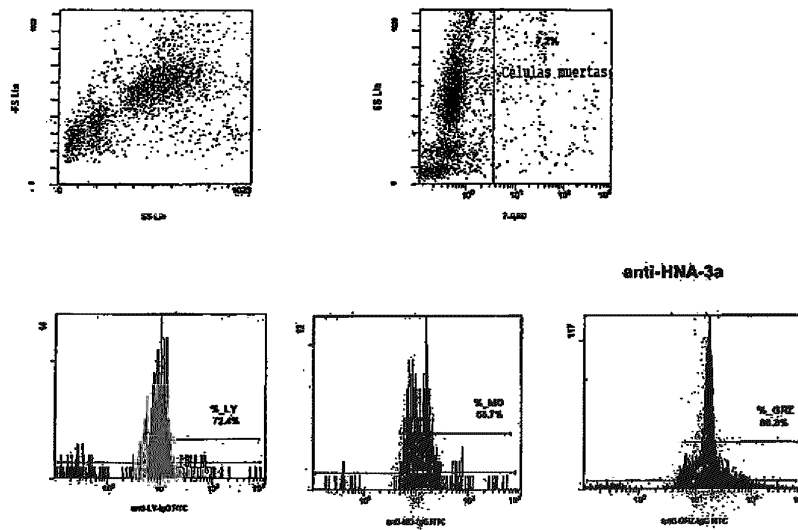


Figura 3

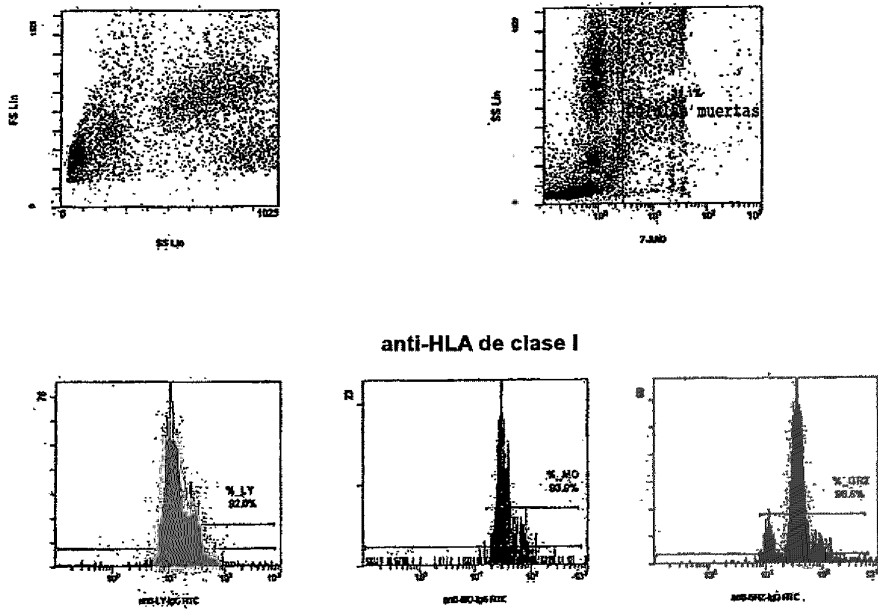


Figura 4

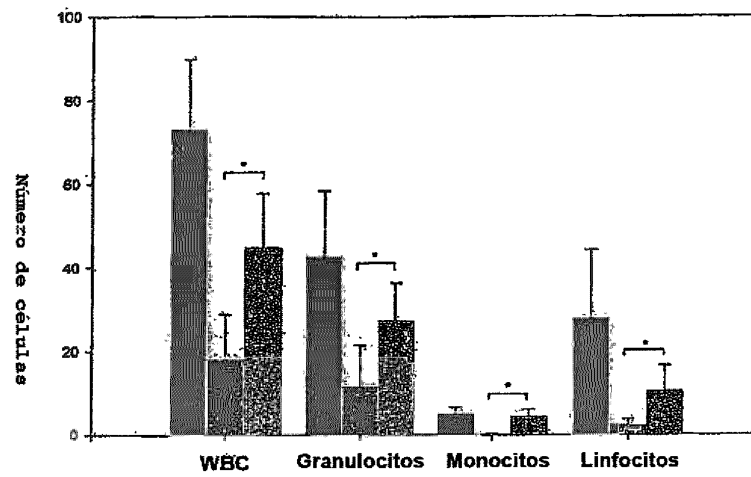


Figura 5

Flow GIFT		GIFT estándar		GAT		GIFT estándar y GAT	
+	-	+	-	+	-	+	-
29	111	23	117	21	119	26	114

Figura 6

Sueros	Titulo		
	Flow GIFT	GIFT estándar	GAT
anti-HNA-1a	8	4	4
anti-HNA-1b	64	8	4
Anti-HNA-2a	4	1	negativo
anti-HNA-3a	64	1	16

Variaciones intraensayo			
Sueros	Análisis 1	Análisis 2	CV
	MFI		
Suero AB	5,63	5,92	3,55
anti-HNA-1a	34	29,1	10,98
anti-HNA-1b	61,2	58	3,80
anti-HNA-3a	20,3	19,6	2,48
anti-HLA de clase I (fuerte)	21,1	20,5	2,04
anti-HLA de clase I (débil)	10,1	10,4	2,07

Variaciones interensayo			
Sueros	Análisis 1	Análisis 2	GV
	MFI		
Suero AB	4,04	4,22	3,08
anti-HNA-1a	67,2	76,2	8,88
anti-HNA-1b	86,4	89,8	2,73
anti-HNA-3a	23,5	23,7	0,60
anti-HLA de clase I (fuerte)	39,5	48,5	14,46
anti-HLA de clase I (débil)	8,6	8,2	3,37

Figura 7

GIFT por citometría de flujo (FLOW GIFT)

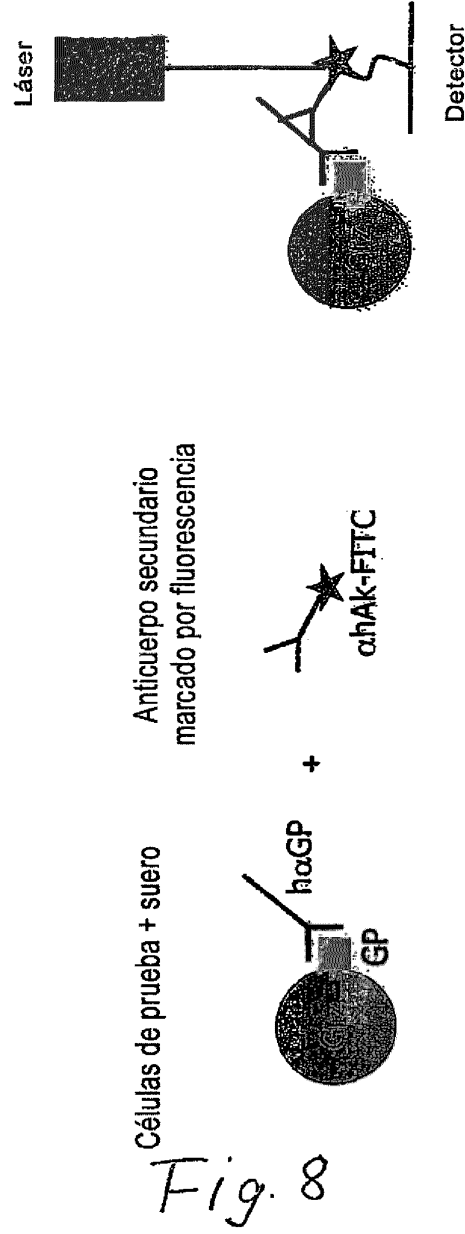


Fig. 8

- Material necesario para el análisis:
10 ml de sangre completa