

PREPARACION DE SUERO ANTIFIBRINA: MODIFICACION Y COMPENDIO DE VARIAS TECNICAS EXISTENTES

Fernando Atmetlla*

Resumen

El suero antifibrina es el componente principal de la mayoría de los métodos que detectan productos de degradación de fibrinógeno-fibrina (PDF) en suero, se consideró de gran interés describir el procedimiento que desde hace varios años se realiza en nuestro laboratorio con resultados prácticos muy satisfactorios. Esta técnica es muy sencilla y no precisa de equipo de laboratorio complicado, siendo posible su preparación en cualquier laboratorio hospitalario del país. Es un compendio de otras técnicas existentes, y tiene la ventaja adicional de ser muy económica.

Introducción

Se ha descrito una variedad de procedimientos para detectar la presencia de productos de degradación de fibrinógeno-fibrina(PDF) en suero (5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 20, 21).

Todas estas técnicas presentan un común denominador que es el requerir de suero antifibrina, el cual puede ser directamente utilizado, como en las pruebas de floculación, inmunoelectroforesis e inhibición de la hemaglutinación, o bien ser adsorbido a partículas de látex (5, 15). Es por consiguiente el componente principal de la mayoría de los métodos descritos para detectar PDF en suero, por lo que se considera de gran interés práctico describir el procedimiento que desde hace tres años se realiza en nuestro laboratorio, con resultados muy satisfactorios. Esta técnica es un compendio de otras existentes (4, 6, 8, 10, 11, 18, 19), habiéndose modificado de tal forma que se convierta en una técnica sencilla, económica y con un alto poder sensibilizante al utilizar fibrina en vez de fibrinógeno y coadyuvante de Freund.

Material y Métodos

Preparación del suero antifibrina:

1. Emplear como antígeno fibrina humana, obtenida de 500 ml de plasma con ACD.
2. Agregar 100 ml de CaCl_2 0,1 M a 500 ml de plasma previamente calentado a 37°C. Mezclar.
3. Eliminar el suero del coágulo formado, utilizando un agitador de vidrio o baja lenguas. Alternativamente se puede esperar unas horas y eliminar el suero a presión.
4. Picar el coágulo y lavarlo con solución salina varias veces al día por un período de 4 a 5 días, hasta que el sobrenadante sea transparente, con el fin de eliminar proteínas contaminantes.

* Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica y Cátedra de Medicina, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense de Seguro Social.

Este paso es crítico para poder obtener sueros que presenten bandas únicas de precipitación frente a un plasma normal.

5. Deshidratar la fibrina con una solución alcohol etílico 95° — éter (calidad reactivo) a partes iguales tal y como lo propuso Lewis (8). Luego continuar agregando más éter que alcohol en proporción 3:1 respectivamente, hasta que la fibrina adquiera una consistencia que permita pulverizarla en un mortero. Este proceso consume abundante tiempo (3 a 4 semanas), ya que es necesario transformarla de su estado original huloso a otro capaz de ser pulverizado en el mortero. En lugar de este proceso de deshidratación, otros autores homogenizan la fibrina a través de procesos más tediosos (6).
6. Pesarse 100 mg de fibrina pulverizada (polvo fino de color blanco), disolverla en 4 ml de adyuvante completo de Freund (10, 19); e inyectarla intramuscularmente en dos conejos machos. Algunos autores prefieren utilizar fibrina pulverizada en hidróxido de aluminio (8, 11), y otros en simple solución salina (6).
7. Inocular el conejo cada 7 días por un lapso de 6 semanas, al cabo de las cuales generalmente ha desarrollado anticuerpos antifibrina. Para comprobar lo anterior, extraer 1 ml de sangre de la vena marginal de la oreja y obtener el suero.
8. Demostrar en el suero la presencia de anticuerpos antifibrina mediante la prueba de Ferreira (6), utilizando plasma diluido 1/50 en solución salina fisiológica y suero normal (controles positivo y negativo respectivamente).
9. Obtener mediante punción cardíaca, 20-25 ml de sangre del animal inmunizado, coagular a 37°C y separar el suero por centrifugación. Sin necesidad de sacrificar el conejo, esta operación puede repetirse a intervalos mensuales, previa inoculación de dosis de refuerzo, una semana antes de cada extracción.

Adsorción y Especificidad (16, 18)

1. Mezclar 1 ml de antisuero con 0,2 ml del suero normal (diluido 1/5) y mantener por un mínimo de 72 horas a 4°C para adsorber los anticuerpos inespecíficos (anti gammaglobulinas) desarrollados por los conejos inmunizados, debido a que algunas de estas proteínas están firmemente unidas a los filamentos de fibrina (6). Centrifugar y eliminar el precipitado.
2. Practicar inmunolectroforesis o contraímmunolectroforesis al suero adsorbido, empleando suero y plasma normal. El suero normal se debe obtener coagulando 2,5 ml de sangre con 0,05 ml de trombina de 1000 U.I./ml, 0,05 ml de tromboplastina y 0,05 ml de ácido epsilon amino caproico al 25 por ciento. Si la reacción es tipo anticuerpo específico, se presentará una banda de precipitación con el plasma normal. En la posición del suero no debe haber reacción antígeno-anticuerpo.
3. Al suero antifibrina preparado agregarle 1 mg/ml de azida de sodio, separarlo en alícuotas de 2,5 ml y congelarlo entre -4° C y 0°C, exceptuando la alícuota para el uso diario, la cual se mantiene a 4°C.

Estandarización

1. Determinar por duplicado a una mezcla 10 ó más plasmas citratados la concentración de fibrinógeno. Puede utilizarse el método del fibrinocrito (17), y/o el de trombina de Data.Fi *

* Dade Division American Hospital Supply Corporation Miami Florida 33152

2. Una vez conocida la concentración de fibrinógeno, hacer diluciones seriadas a la mezcla de plasma en solución salina para determinar, por la prueba de Ferreira (6), cuál es la dilución mínima capaz de ser detectada por el suero antifibrina. De esta manera obtenemos los microgramos/ml de fibrinógeno o de PDF que es capaz de detectar el suero.

Discusión

Todos los antisueros se han conservado entre -4°C y 0°C desde el momento de su preparación, sin realizar previamente el proceso de adsorción, lo que se efectúa únicamente a las alícuotas que se van utilizando para el trabajo diario y control de sensibilidad del suero durante el transcurso de su almacenamiento. En uno de los preparados se determinó el título luego de 28 meses de almacenamiento por este procedimiento, encontrándose que la potencia del mismo se había mantenido a través de ese lapso de tiempo, lo cual demuestra la prolongada estabilidad del antisuero preparado.

El suero antifibrina reacciona de igual forma con el fibrinógeno, fibrina o sus productos de degradación, lo cual fue demostrado por Ferreira y Murat utilizando tres determinaciones (6). Lo anterior fue respaldado posteriormente por numerosas investigaciones mediante técnicas inmunoeléctricas, realizando degradaciones parciales de la molécula de fibrinógeno con plasmina y luego haciéndolas reaccionar con sueros antifibrina (2, 4, 7, 9). Por este procedimiento se observó que los fragmentos X, Y, D y E, reaccionan con el suero antifibrina y cada uno presenta una movilidad característica en inmunoeléctroforesis. Estas reacciones se explican al demostrarse posteriormente que el fibrinógeno posee dos grupos antigénicos fundamentales los cuales se encuentran aún en los productos terminales de degradación (D y E) (3).

Esta técnica para preparación de suero antifibrina es muy sencilla y no precisa de equipo de laboratorio costoso para su realización, siendo posible su obtención en cualquier laboratorio hospitalario del país. Una ventaja adicional es la de ser muy económico ya que en cada proceso de inmunización se obtiene, de 10-15 ml de antisuero para realizar un gran número de pruebas para detectar PDF, prescindiéndose de la necesidad de comprar juegos comerciales de alto costo, por lo cual su preparación es de gran interés práctico. Además con este antisuero se ha realizado y comparado la prueba de Ferreira (6), con una comercial (5), habiéndose obtenido resultados muy satisfactorios (1).

Agradecimiento

Al Dr. Eduardo Brilla S., por contribuir en la revisión del presente trabajo. El apoyo económico fue obtenido de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, Proyecto No. 02-07-05-82.

BIBLIOGRAFIA

1. Atmetlla, F.; Alvarado, M.; Guerrero, C.L. y Artavia, A. Estudio comparativo de 2 métodos para la determinación de productos de degradación de Fibrinógeno/Fibrina "PDF" en suero. *Acta Med. Cost.* 1979; 22(1):97—103.

2. Altman, R. y Rouvier, J. Hemostasis y trombosis. Fisiolog. Tomo I, 1ª. Edic. 107. pp. Alkadia Editorial, Buenos Aires 1975.
3. Altman, R.; Braude, R. and Rouvier, J. Fibrinolisis: Detección inmunológica de los productos líticos y su cinética. In Resúmenes Segundo Seminario de Hematología en el IMSS y Primera Reunión del grupo cooperativo latinoamericano de hemostasis, México, D.F. 1975.
4. Caspary, E.A. The immunological properties of a purified human fibrinogen. *Biochem. J.* 1956; 62: 13—18.
5. Ellman, L. Carvalho, A., Colman, R.W. The Thrombo-wellcotest as a screening test for disseminated intravascular coagulation. *New England J. of Med.* 1973; 288(12) :633—634.
6. Ferreira, H.C. and Murat, L.G. An Immunological method for demostrating fibrin degradation products in serum and its use in the diagnosis of fibrinolytic states. *Brit. J. Haemat.* 1963; 9: 299 —310.
7. Furlan, M. and Beck, E.A. Plasmic degradation of human fibrinogen. I-Structural characterization of Degradation Products. *Bioch et Biophy. Acta.* 1972; 263:631 —644.
8. Lewis, J.H., Wilson, J.H. and Brandon, J.M. Counterelectrophoresis test for molecules immunologically similar to fibrinogen. *Am. J. Clin. Pathol.* 1972; 58:400—404.
9. Marder, V.J. and Shulman, N.R. High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin, I Physicochemical and Immunological characterization *J. of Biological Chemistry.* 1969; 244(8); 2111—2119. 75
10. Matsushima, S. and Tezuka, T.A simplified method for detecting fibrinogen and its derivatives by tanned red cell hemagglutination inhibition immune assay. *Tohoku J. Exp. Med.* 1969; 99:327—330.
11. Merskey, C., Kleiner, G. J. and Johnson, A.J. Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum, relation to diagnosis and treatment. *Blood.* 1966; 28(1)1—18.
12. Merskey, C., Lalezari, P. and Johnson, A.J. A rapid, simple, sensitive method for measuring fibrinolytic split products in human serum. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1969; 131:871—875.
13. Merskey, C., Lalezari, P. and Johnson, A.J. Tanned red cell hemagglutination inhibition immunoassay for fibrinogen-fibrin related antigen (fibrinolytic degradation products) in human serum. *Scand. J. Haematol.* 1970; 13:83—87.
14. Mertens, B.F. McDuffie, F.C., Bowie, E.J.W. and Owen, Ch.A. Rapid sensitive method for measuring fibrinogen split-products in human serum. *Mayo Clinic Proceedings.* 1969; 44(2):114— 120.
15. Molinas, F.C. y Sánchez Avalos, J.C. Activación del sistema fibrinolítico por el nicotinato de sodio. *Medicina.* 1967; XXVII (4):219—226.
16. Ruiz-Reyes, G. Comunicación personal (1976).
17. Ruiz-Reyes, G., Jiménez, T. Técnica rápida de microprecipitación en tubo capilar para determinación de fibrinógeno. *Revista Mex. de Lab. Clin.* 1965; XVII (6):3—7.
18. Ruiz-Reyes G., Tabe-Tabe, D. and Exaire-Murad, E. Quantitative counterimmunoelectrophoresis for urinary fibrinogen-related antigens. *Am. J. Clin. Path.* 1977; 67(2):174—176.
19. Salah Rabaa, M.; Bernier, G.M. and Ratnoff, O.F. Rapid detection of fibrinogen-related antigen in serum. *J. Lab. Clin. Med.* 1973; 81(3):476—483.
20. Singh, G. Assessment of immuno-gel diffusion technique and fibrin degradation flocculation test in fibrinolysis investigations. *Ind. Jour. Med. Res.* 1969; 57(7):1261—1267.
21. Thomas, D.P., Niwiarowski, S., Myres, A.R., Bloch, K.J. and Colman, R.W. A comparative study of four methods for detecting fibrinogen degradation products in patients with various diseases. *New Eng. J. of Med.* 1970; 283(13):663—668.