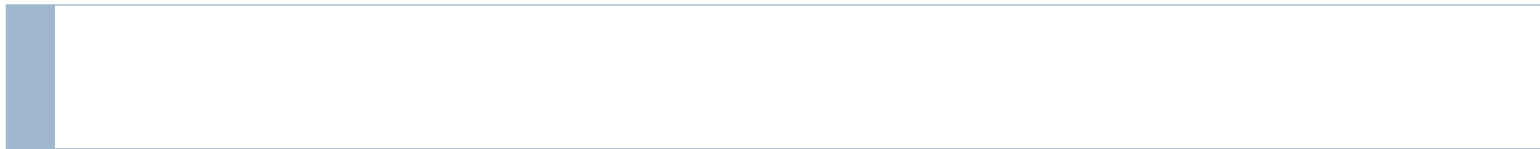


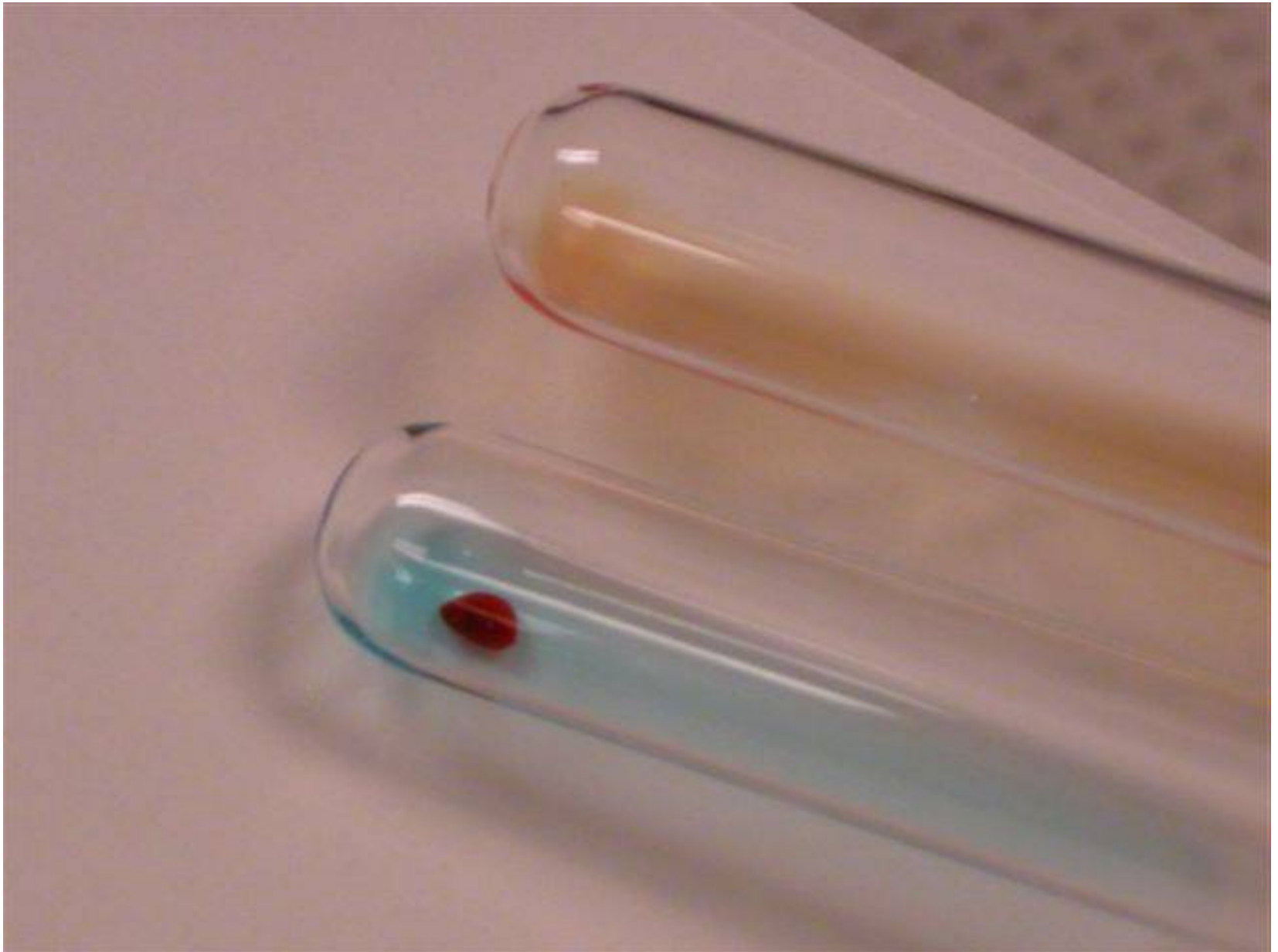
José Antonio Paredes Arrascue

Dr. (c), Mg., Lic. en Tecnología Médica
Profesor Asociado de la Facultad de Medicina
U.N.M.S.M.

Tecnólogo Médico del Servicio de Medicina Transfusional
H.N.E.R.M. - EsSalud

Reacción de Aglutinación y sensibilización.
Uso de potenciadores.
Efecto de las enzimas sobre la membrana
de los hematíes.





-
- ▶ Se trabajaron pruebas inmunológicas antes que se estableciese la inmunología
 - ▶ Aglutinógeno
 - ▶ Aglutininas



-
- ▶ El protocolo completo de la prueba de compatibilidad es una revisión de la evolución de la prueba en sí.
 - ▶ CI
 - ▶ TA
 - ▶ ALB
 - ▶ 37 °C
 - ▶ Coombs

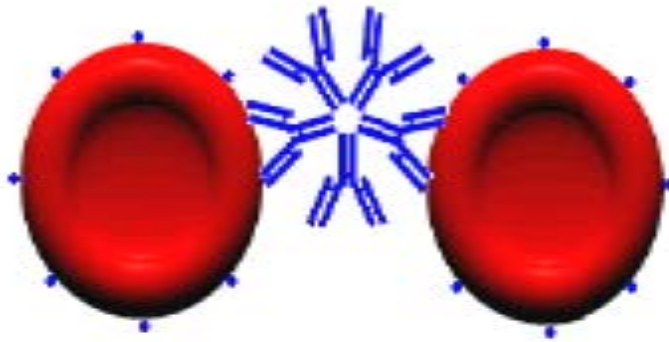


Fases de la Aglutinación

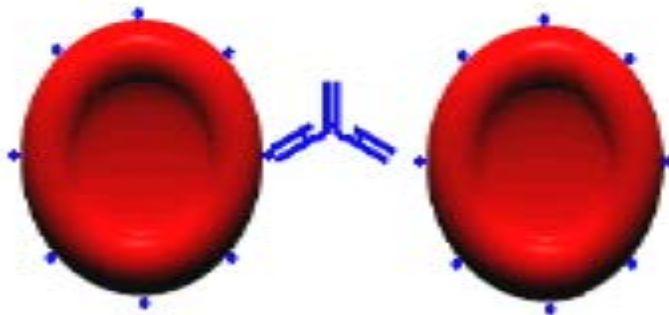
- ▶ **1ra fase: Sensibilización**
 - ▶ Temperatura
 - ▶ Tiempo
- ▶ **2da fase: Acercamiento entre células (Aglutinación propiamente dicha)**



Teoría de los puentes



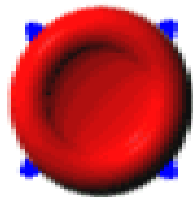
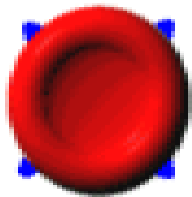
Complete Antibody (IgM)



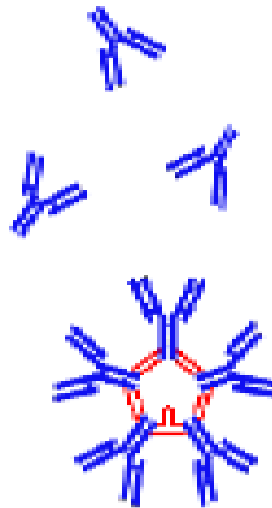
Incomplete Antibody (IgG)



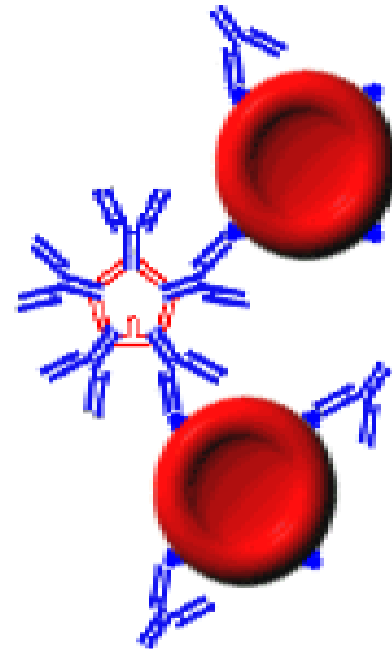
Antigen - Antibody Reaction



+



=

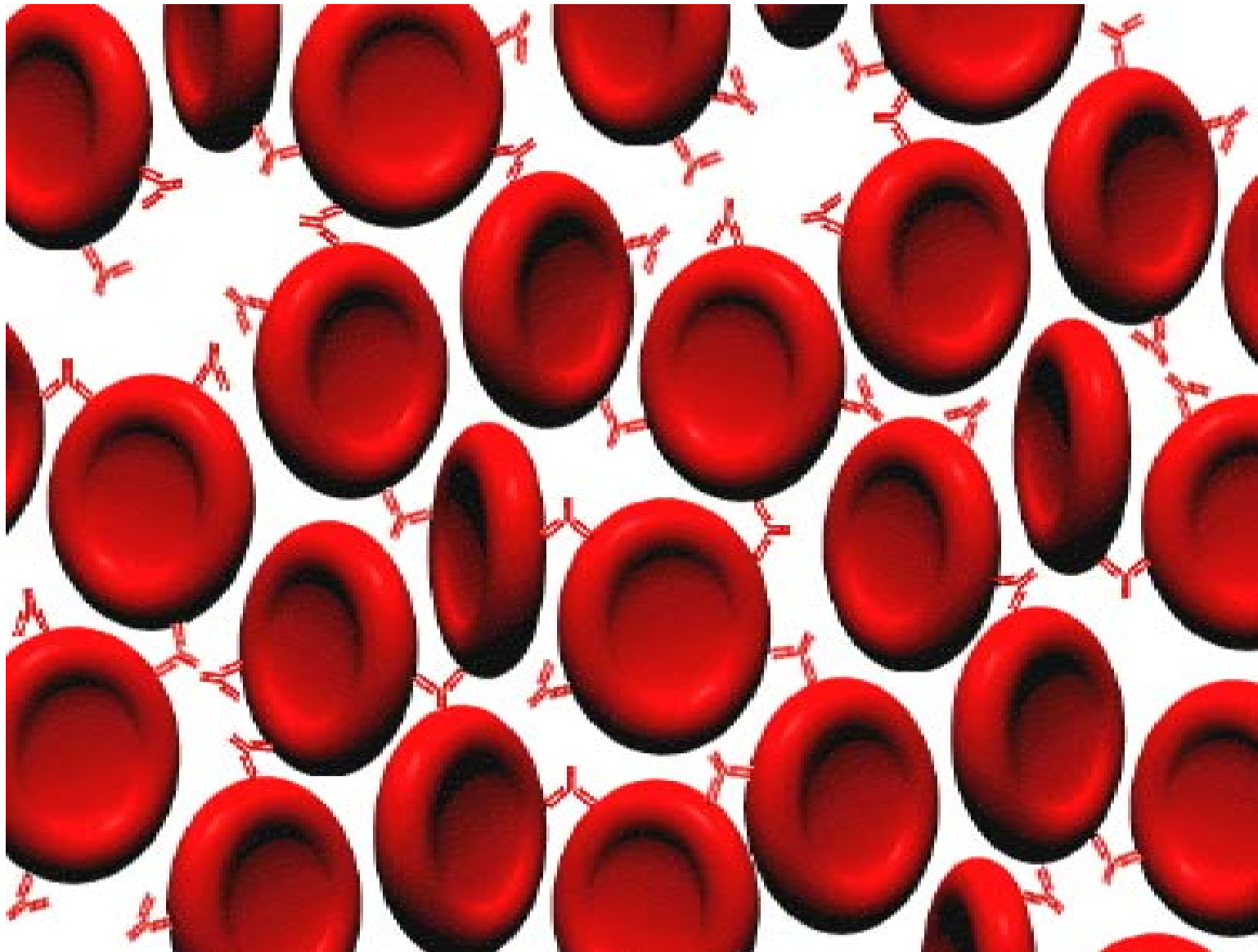


Erythrocytes with antigen "blue"

Antibody against antigen "blue"

- Binding to erythrocytes
- Agglutination of erythrocytes
- Eventually complement activation





ausencia de
aglutinación

nube de
iones

Ig G
anticuerpo
incompleto

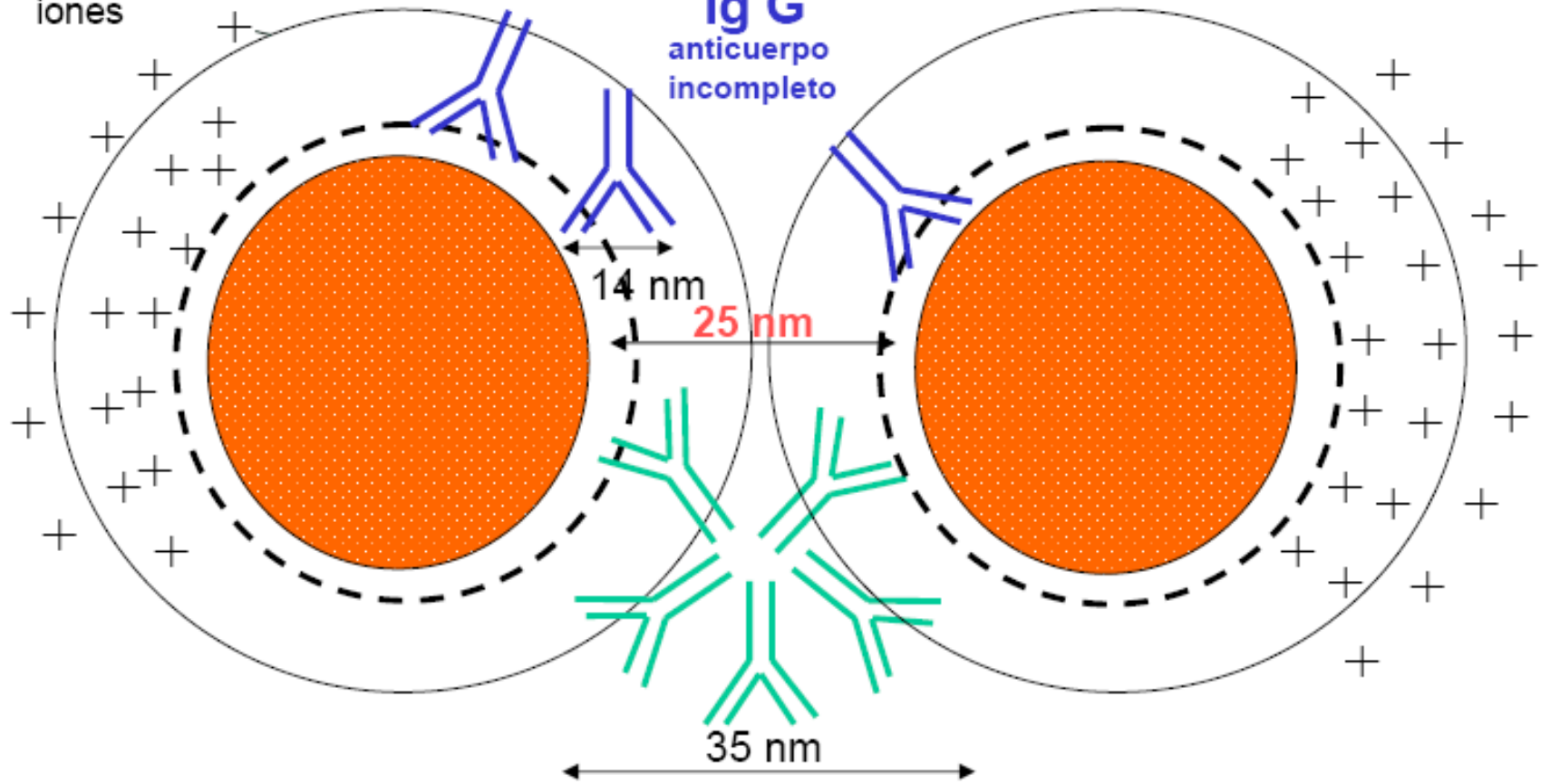
14 nm

25 nm

35 nm

Ig M
anticuerpo
completo

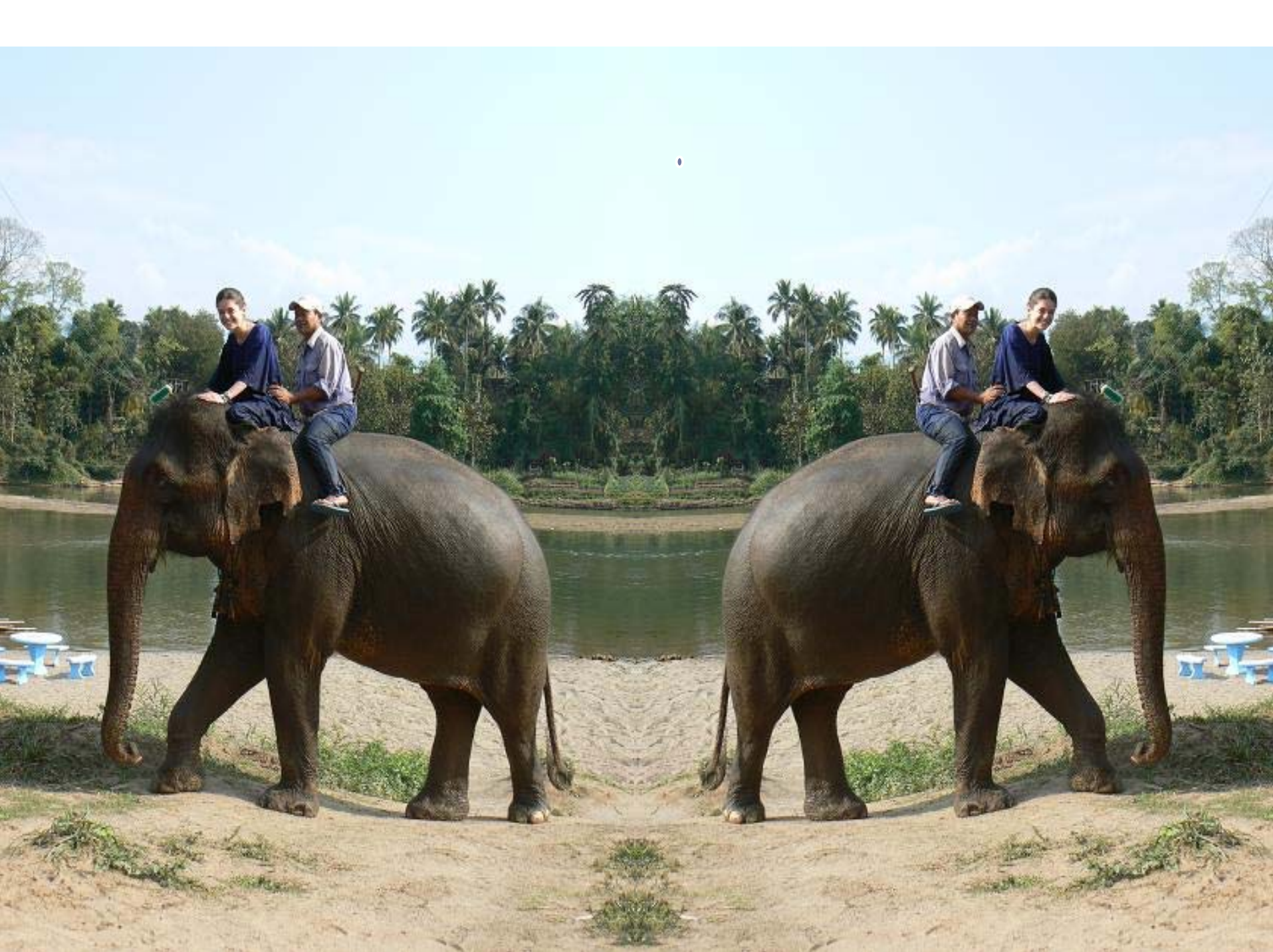
aglutinación



Tamaño comparativo

IgG	14 nm	
Potencial Z	25 nm	
IgM	35 nm	
Glóbulo Rojo	7,2 um	7 200 nm





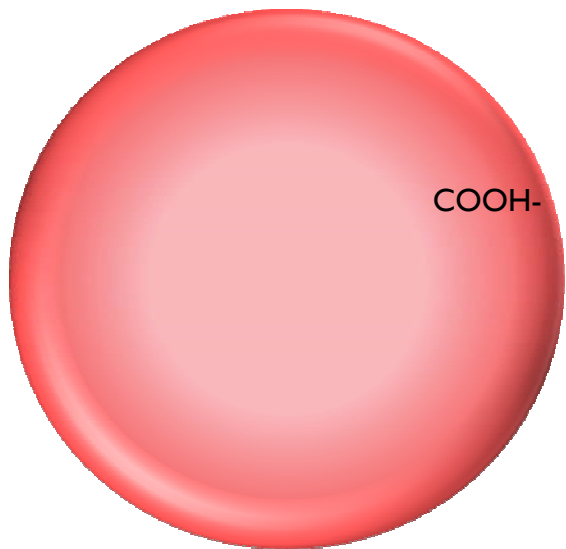
Potencial Zeta

-
- ▶ Considerando la carga eléctrica del glóbulo rojo , la fuerza iónica del medio de la suspensión (μ) y la constante dieléctrica del medio (D), Pollack desarrolló la siguiente expresión del potencial zeta (Z):

$$“Z = f[\gamma, 1/D, 1/\sqrt{\mu}]”$$

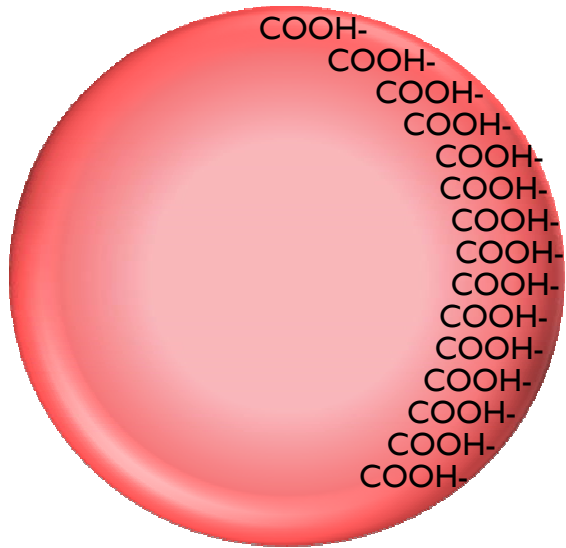
o sea, la diferencia del potencial zeta es una función que varia directamente con la electronegatividad de la membrana eritrocitaria (γ) e inversamente con la constante dieléctrica del medio de suspensión (D) y con la raíz cuadrada de su fuerza iónica (μ).





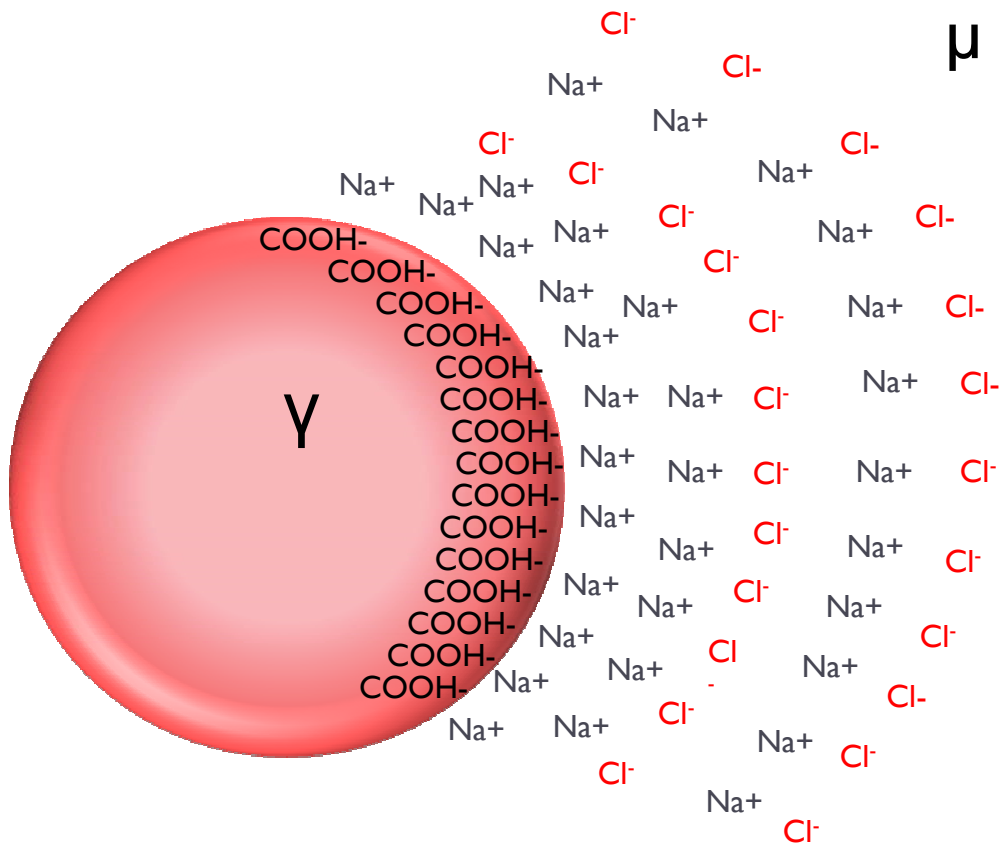
COOH-





Cl⁻ Na⁺

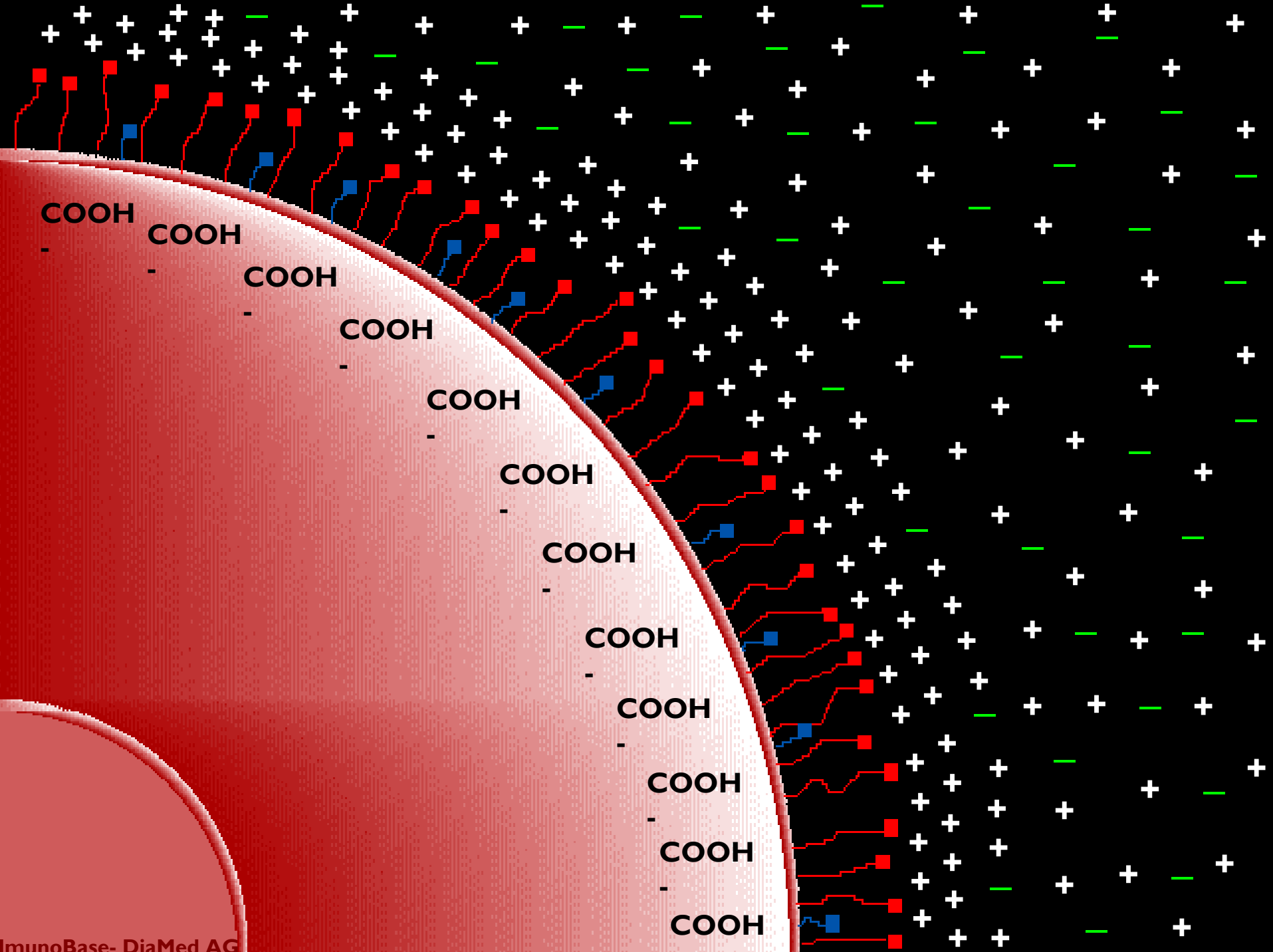


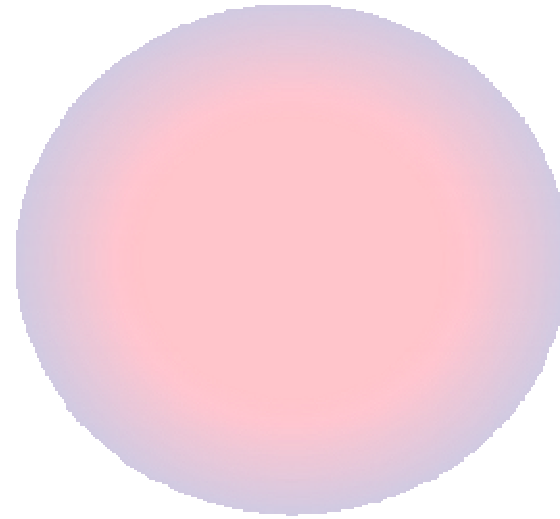
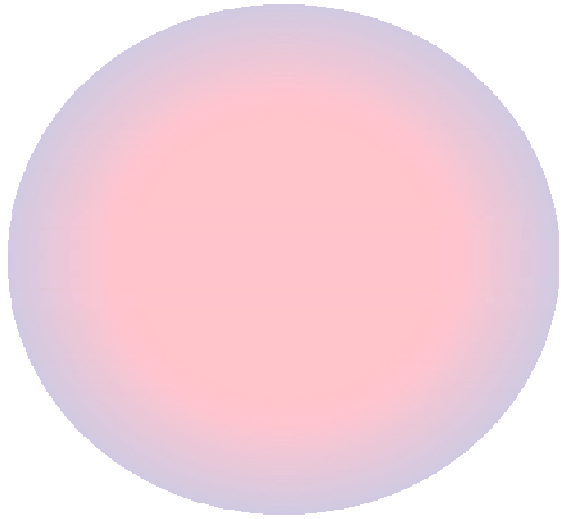



D

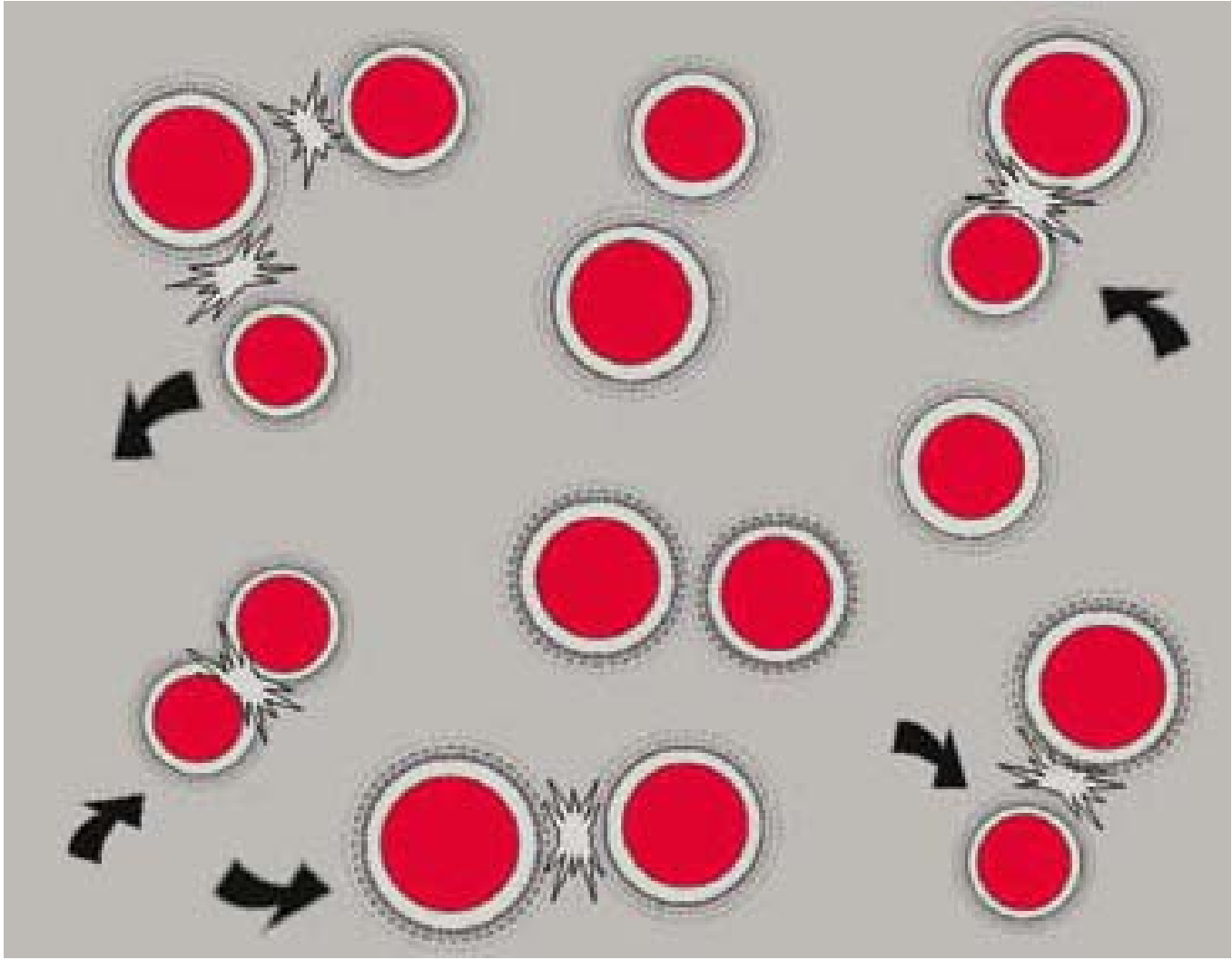
$$\frac{\gamma}{D \sqrt{\mu}}$$

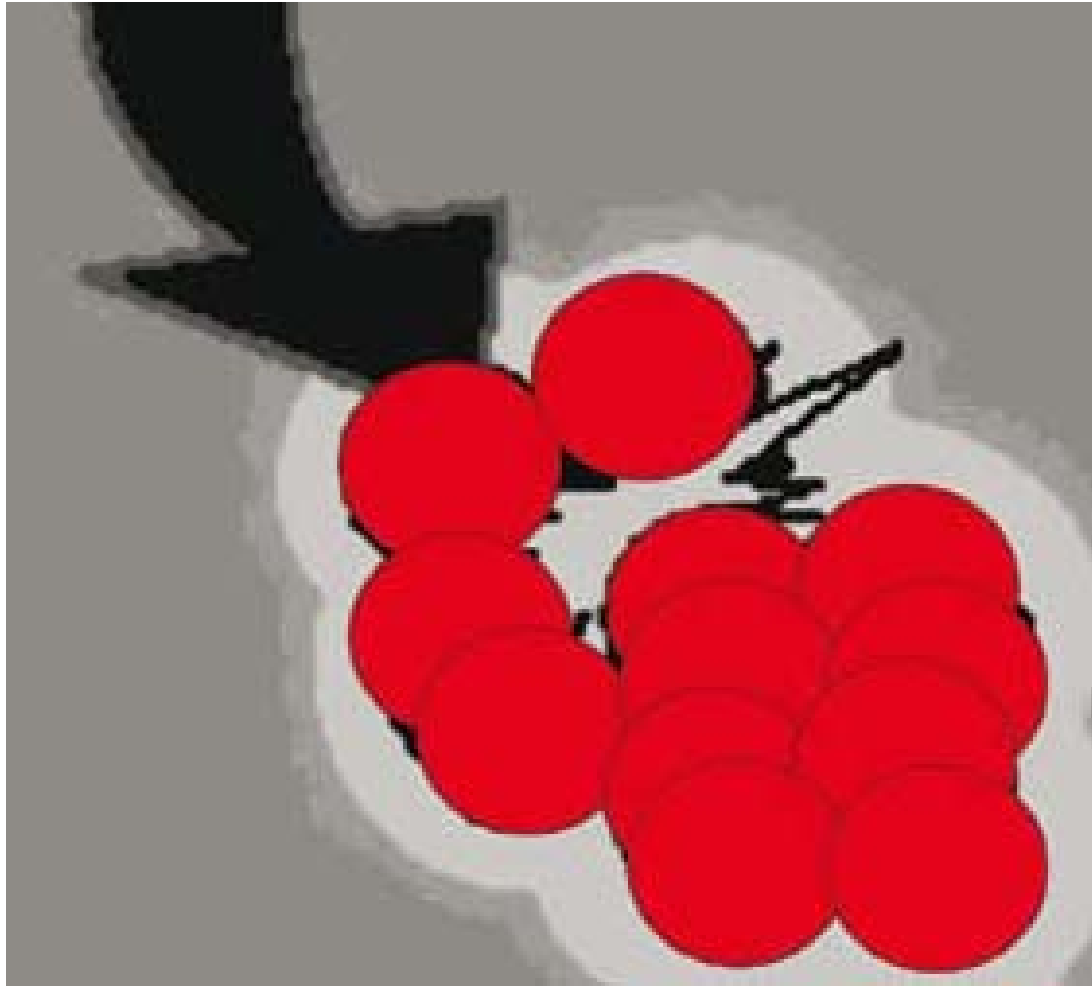






-
- ▶ La nube de iones positivos que involucra cada glóbulo, se vuelve menos densa mientras se aleja del glóbulo. La diferencia de potencial eléctrico creada entre la doble capa de iones positivos (Na^+) cerca del glóbulo y el medio con iones de sodio y cloruro en equilibrio (neutro), se llama “Potencial Zeta”.
-
- 





Potencial Zeta crítico y clases de Anticuerpos

POTENCIAL Z (mV)	
-23	Aglutinación imposible a partir de este punto
- 18 a - 23	Potencial Z crítico para IgM
-15	Potencial Z de una suspensión de GR en (SSF)
-8 a -10	Potencial Z crítico para IgG
-7	Aglutinación inespecífica por debajo de este punto

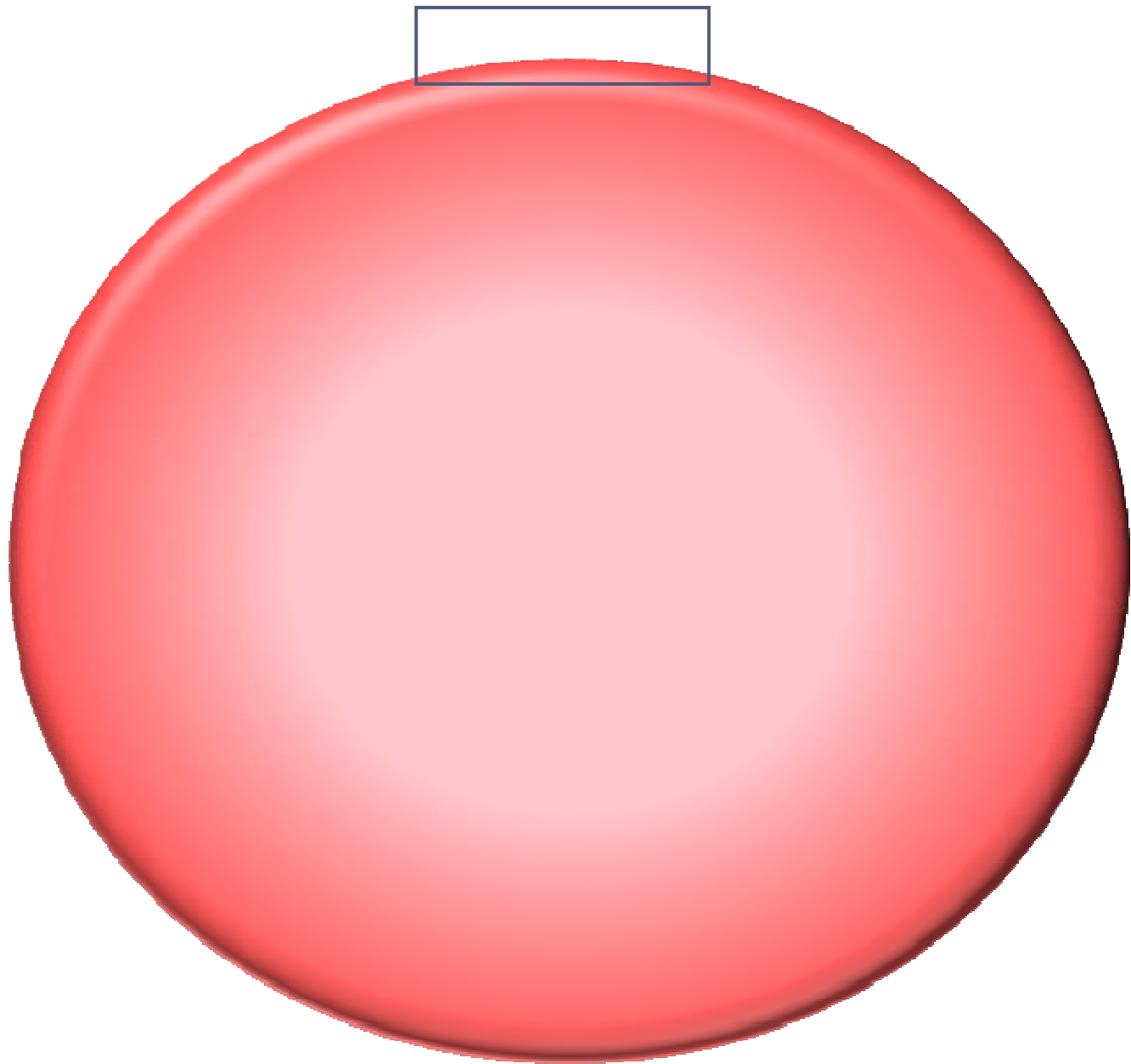
Fuente: Rouger P., Salmon C.; La pratique de l'agglutination des Erythrocytes et du test de Coombs

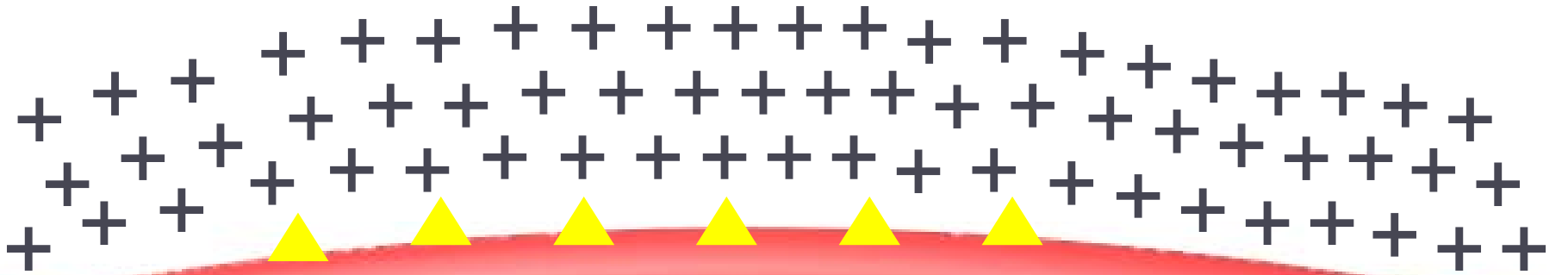
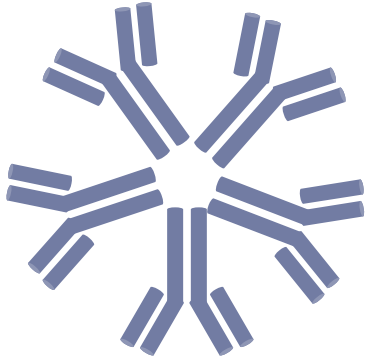


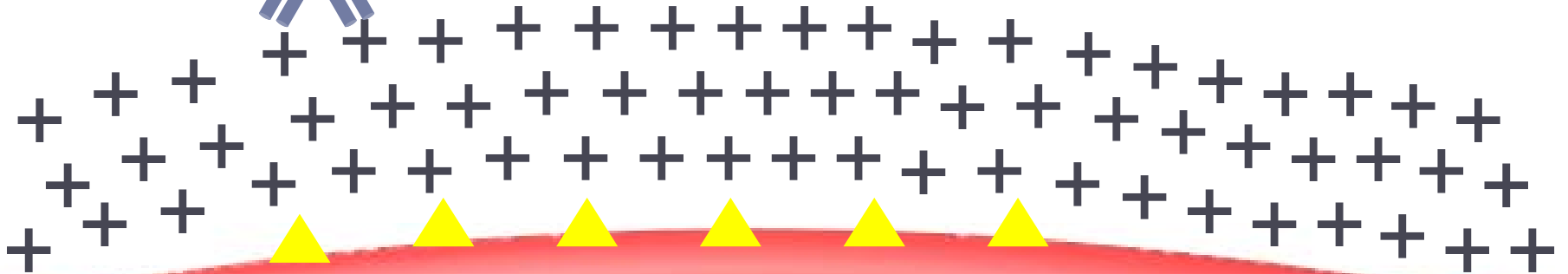
Procedimientos más importantes bajo la ecuación de Pollack para reducir el potencial zeta:

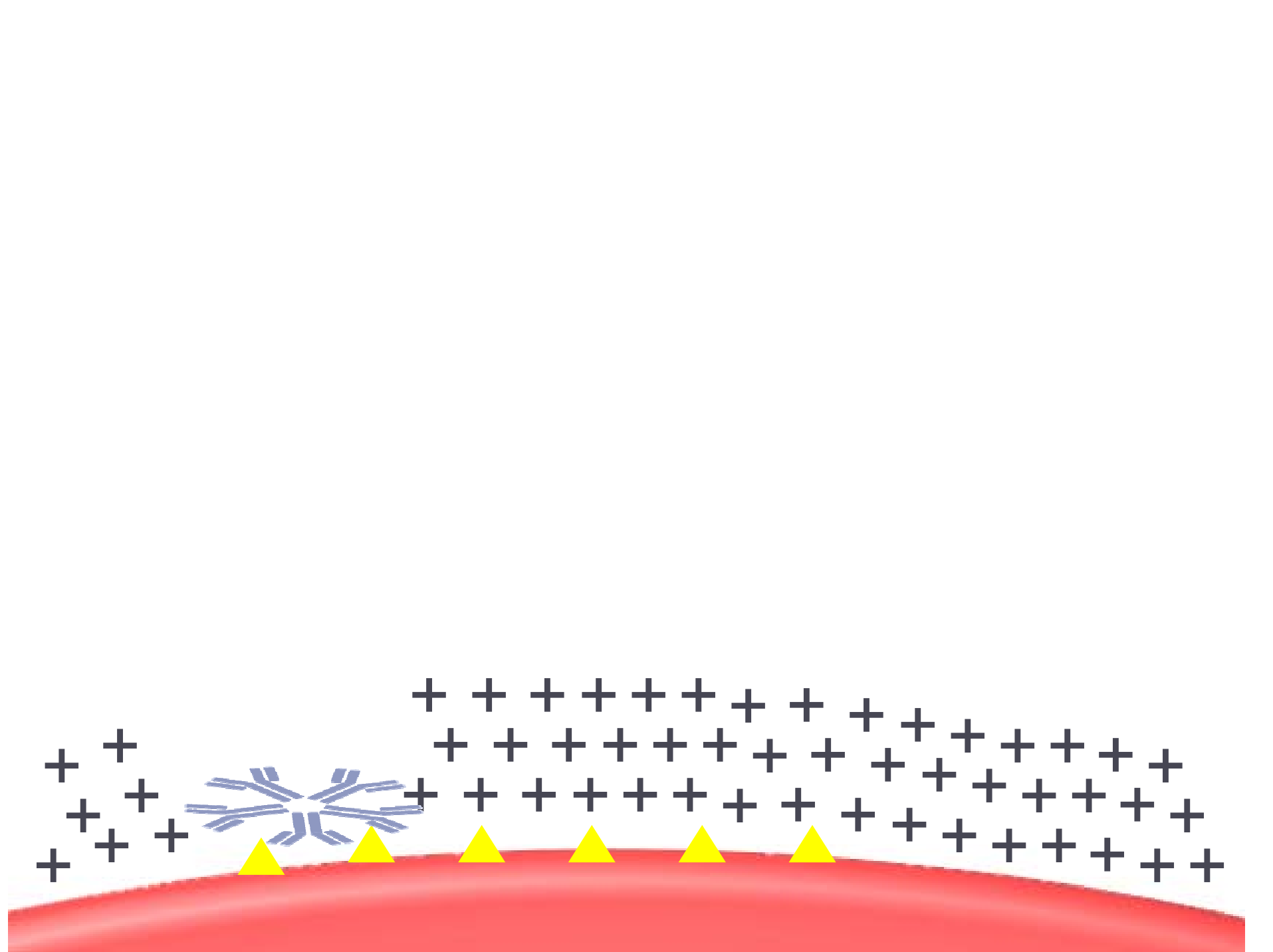
- ▶ Tratamiento de los glóbulos rojos por enzimas proteolíticas:
- ▶ Adición de sustancias macro-moleculares
- ▶ Cambio de la fuerza iónica del medio
- ▶ Prueba de la antiglobulina humana o prueba de Coombs:

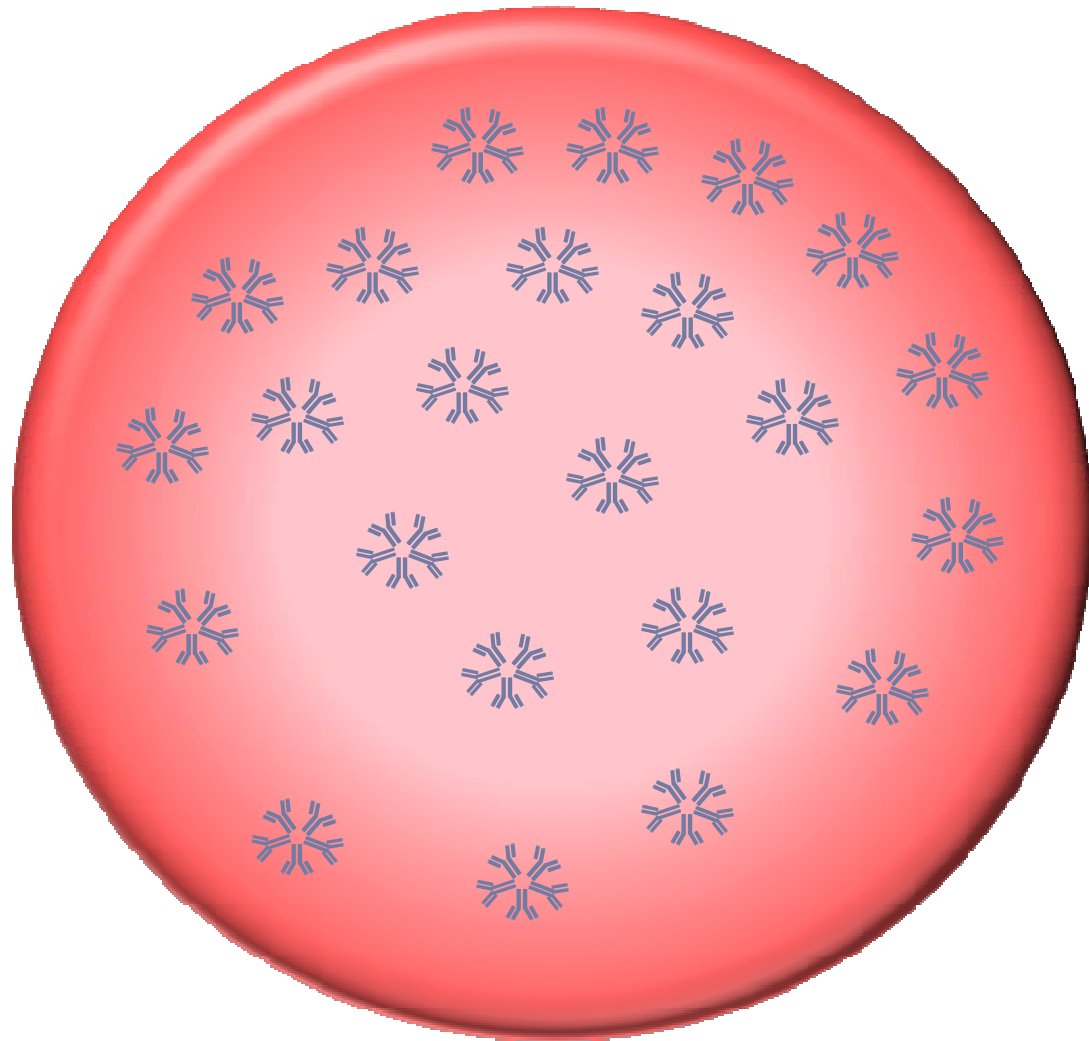


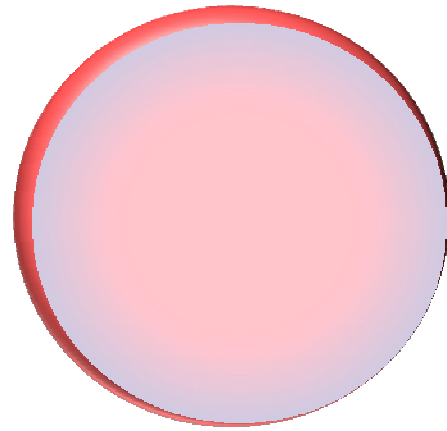
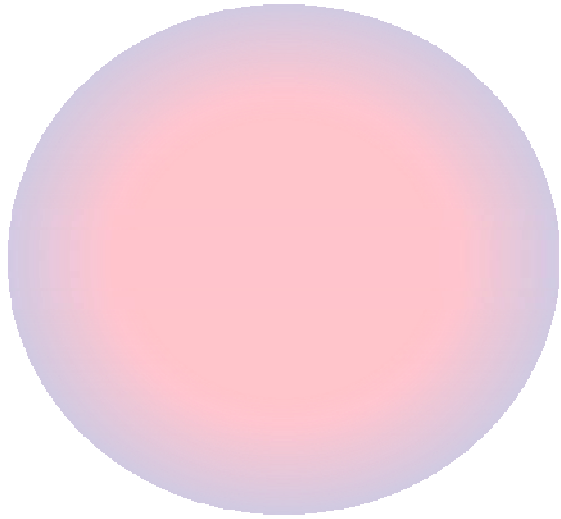


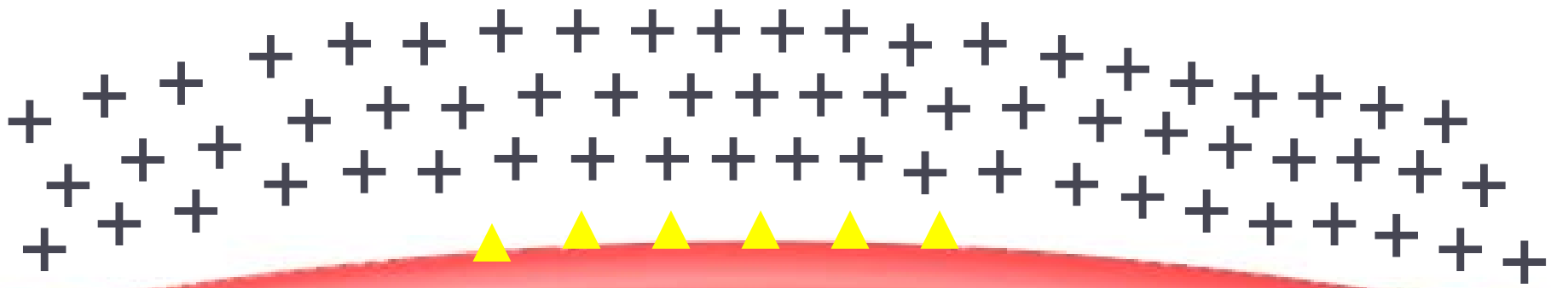


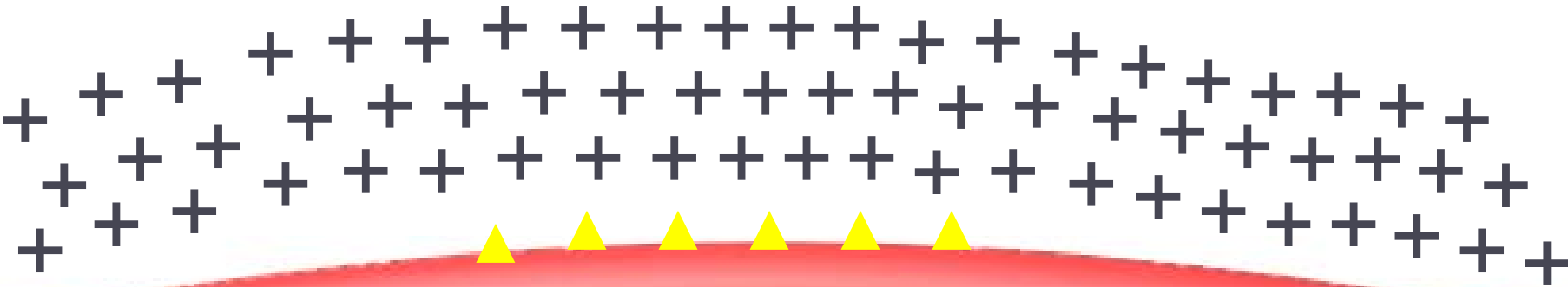


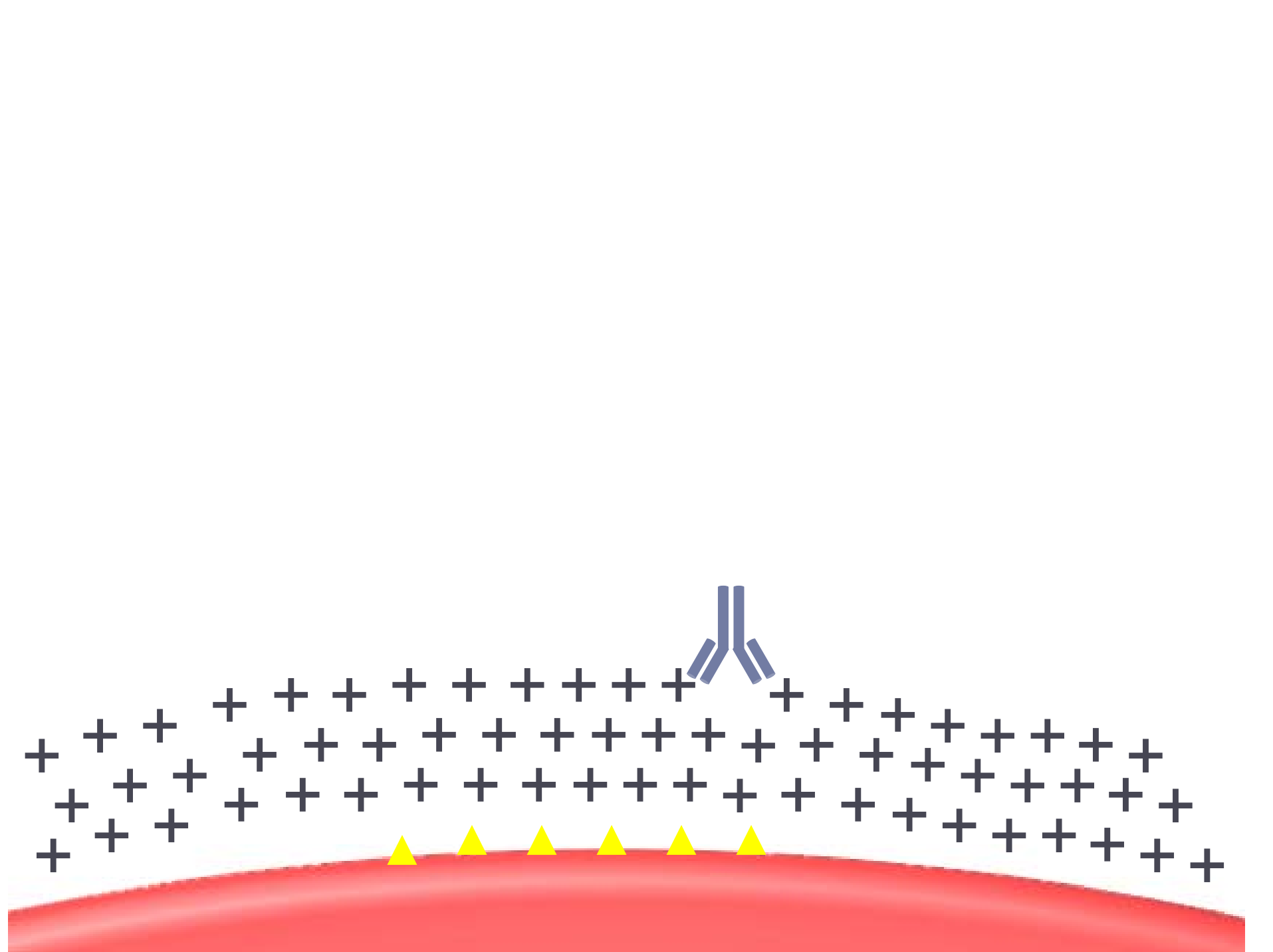


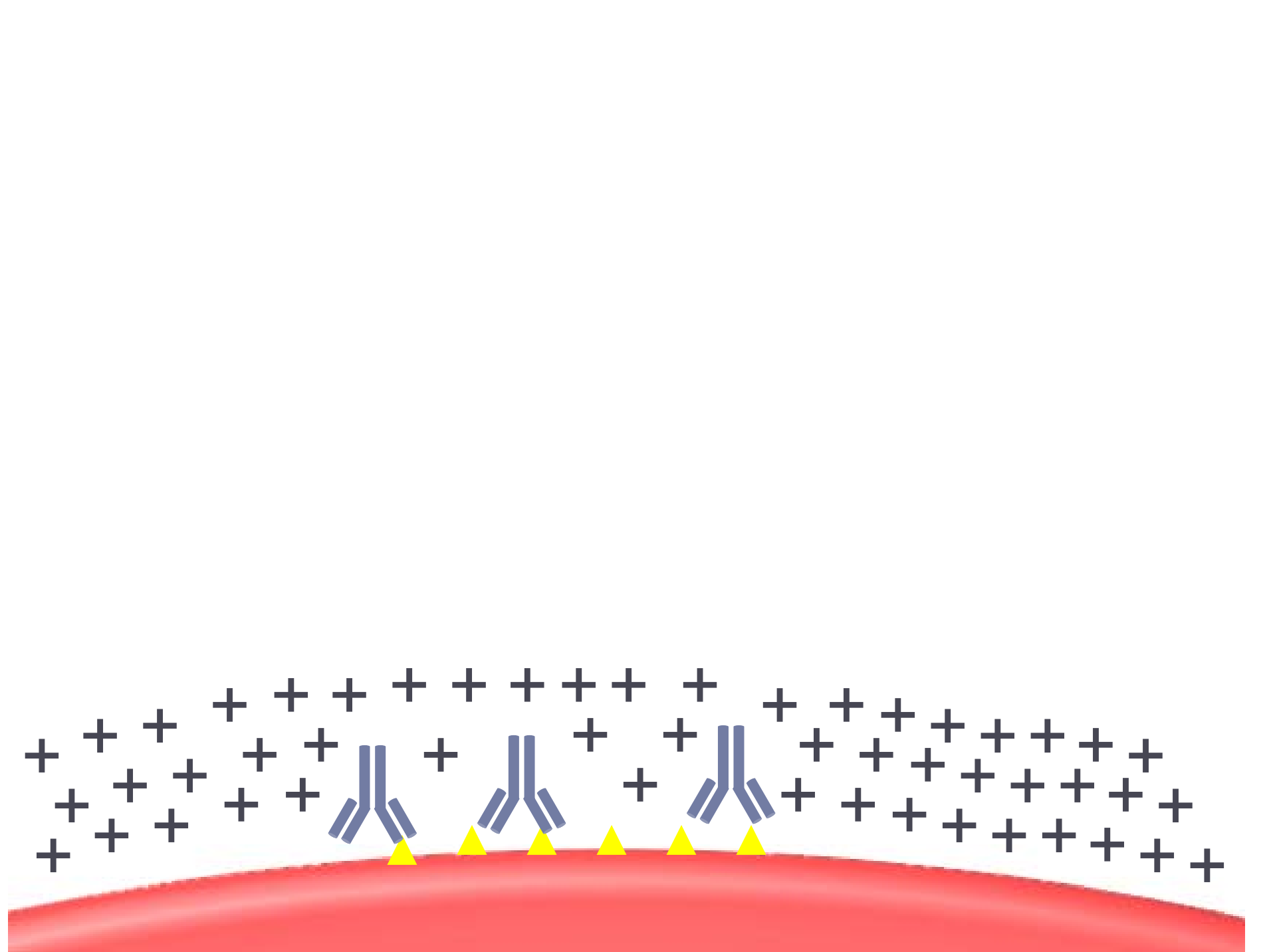


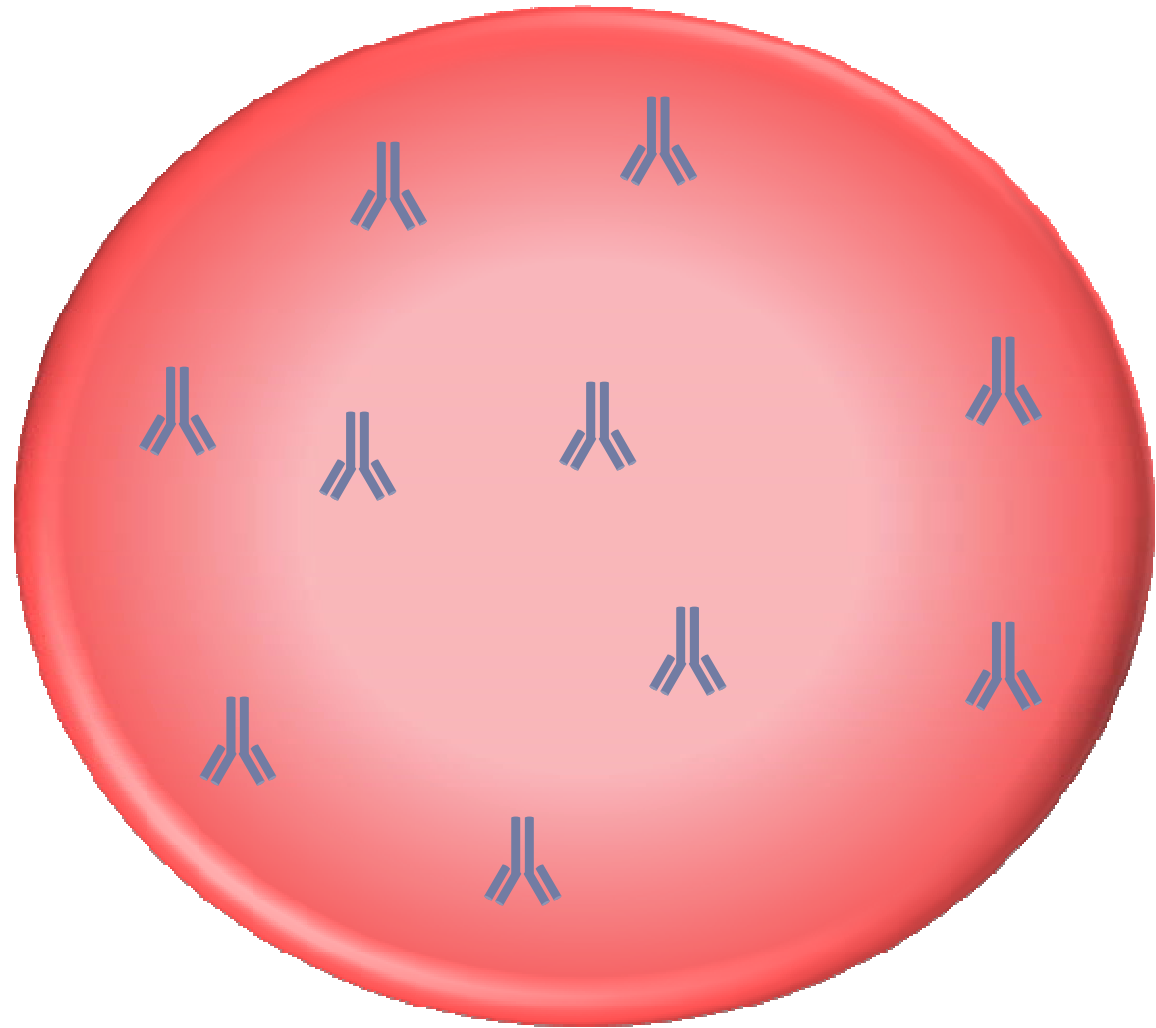


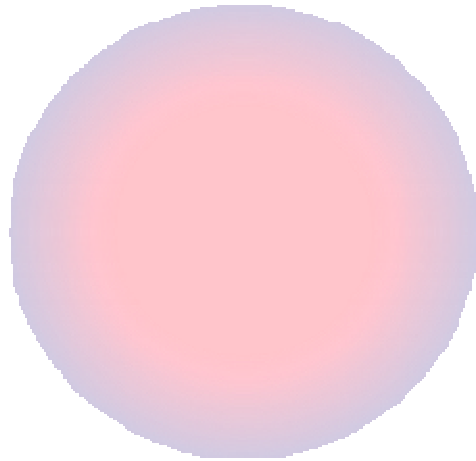
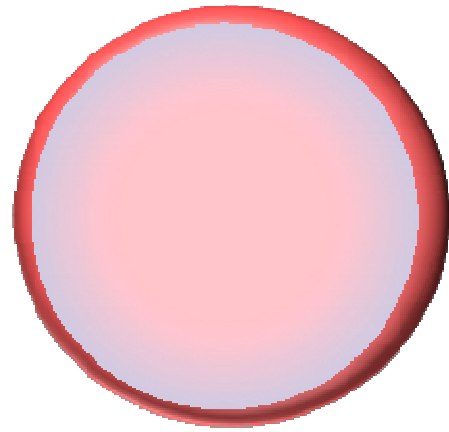
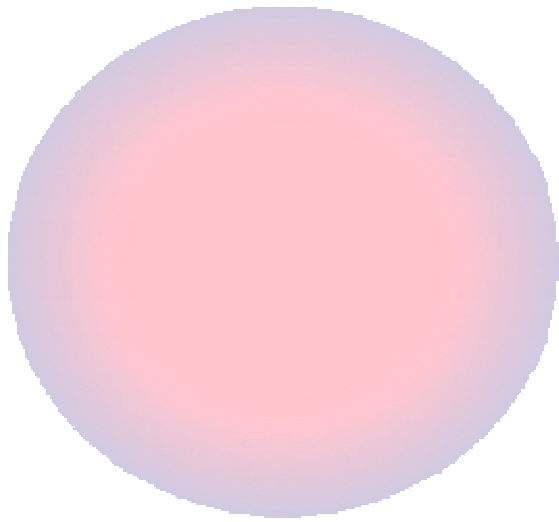












POTENCIADORES

Adición de sustancias macromoleculares

- ▶ Pollack: primero en ofrecer un modelo plausible de aglutinación en medio macromolecular: papel de la constante dieléctrica del medio (D).
- ▶ Albúmina, dextran, ficol, PEG y otras (macromoléculas hidrosolubles), poseen un extremo positivo (amínico) y otro negativo (carboxílico), cuando son añadidas al medio de suspensión de los glóbulos rojos se polarizan en el campo eléctrico (aumenta su constante dieléctrica: D) son atraídas para cerca de los glóbulos neutralizando sus cargas negativas y promoviendo la dispersión de iones positivos (Na^+) cerca de ellos. La disminución de este escudo de cargas positivas, baja el valor del potencial zeta y disminuye la fuerza de repulsión interglobular.

Albumina Sérica Bovina

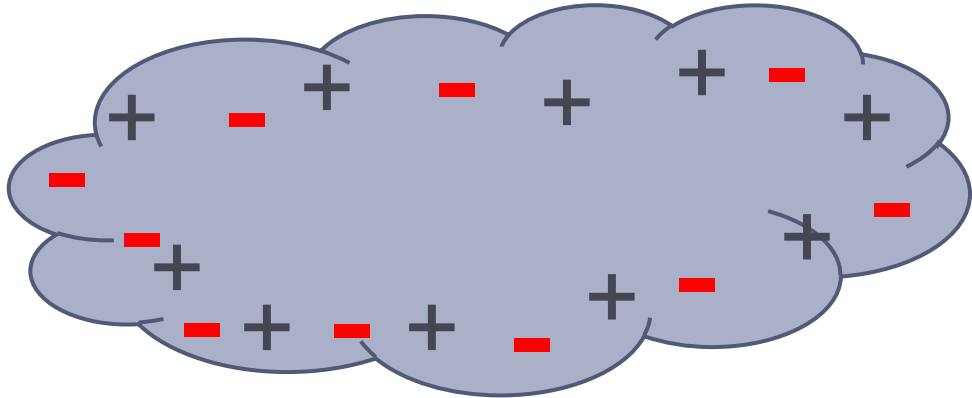
- ▶ Las soluciones de albúmina bovina ejercen un efecto potenciador gracias a que aumentan la constante dieléctrica del medio en el que se hallan los hematíes y los anticuerpos; esto tiene como resultado la disminución del potencial Z y, en consecuencia disminuye, también la repulsión electrostática existente entre los hematíes cuando se hallan en suspensión en un medio salino.

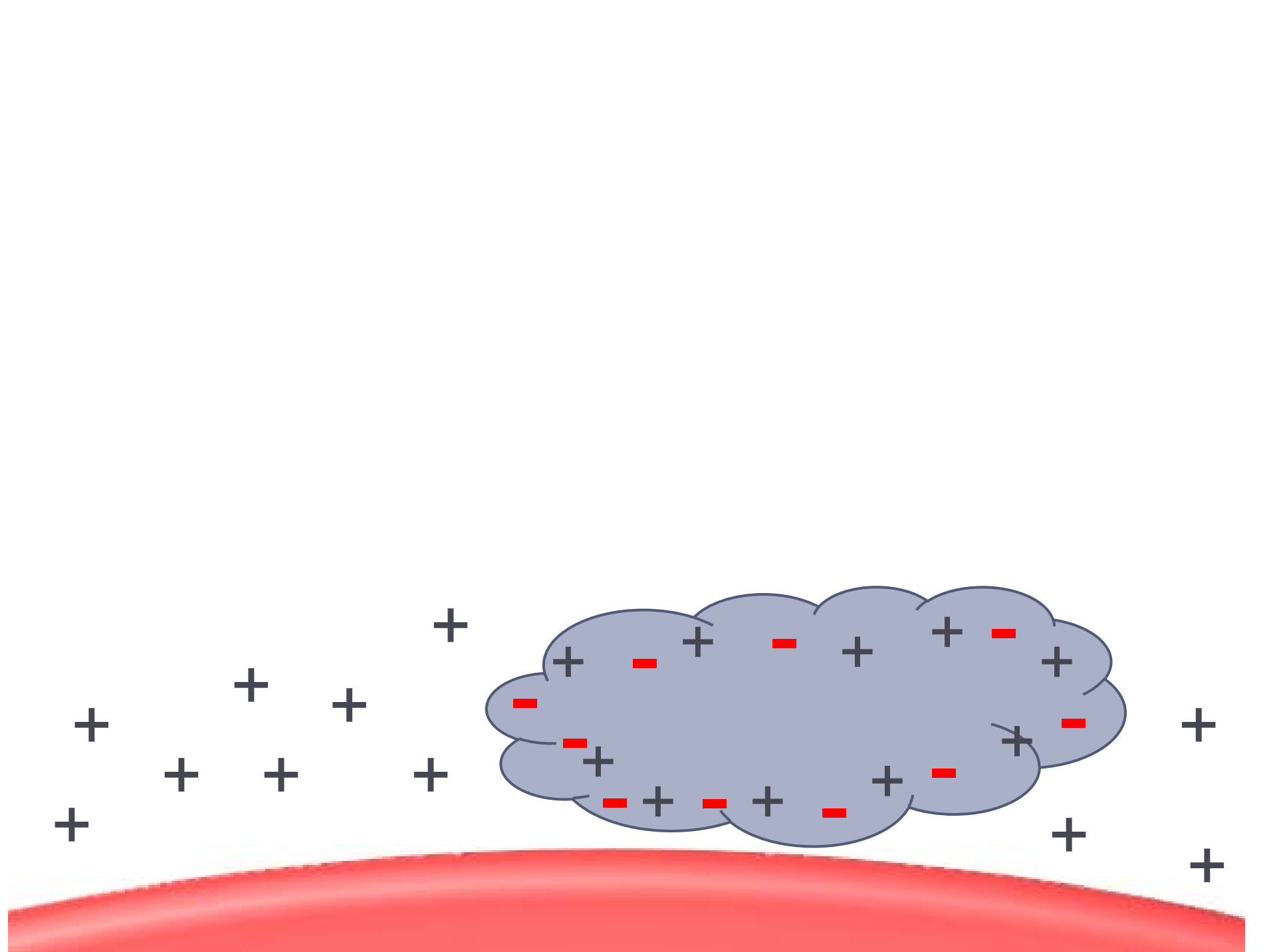


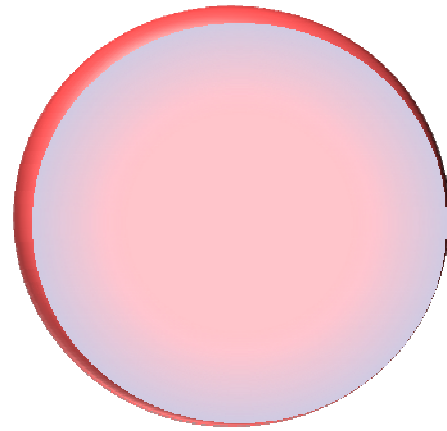
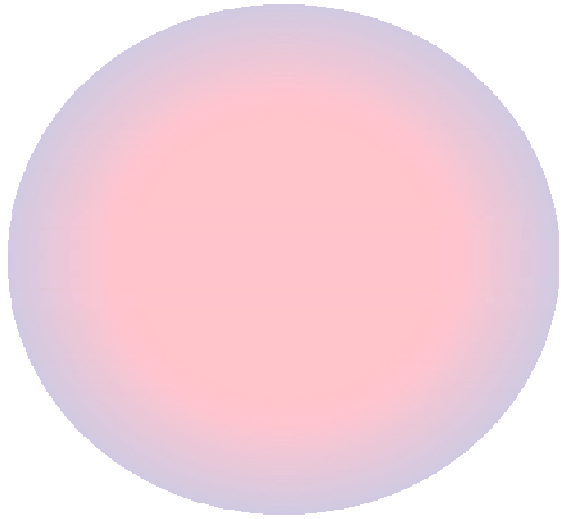
Albúmina Sérica Bovina

- ▶ Concentraciones más empleadas: 30%, 22%, 6%, 3% (más usada en microplaca).
- ▶ La temperatura más adecuada para la conservación de las soluciones de albúmina es de 4°C. Además, para evitar la contaminación bacteriana se utiliza la azida sódica (N₃Na) al 1:1 000.







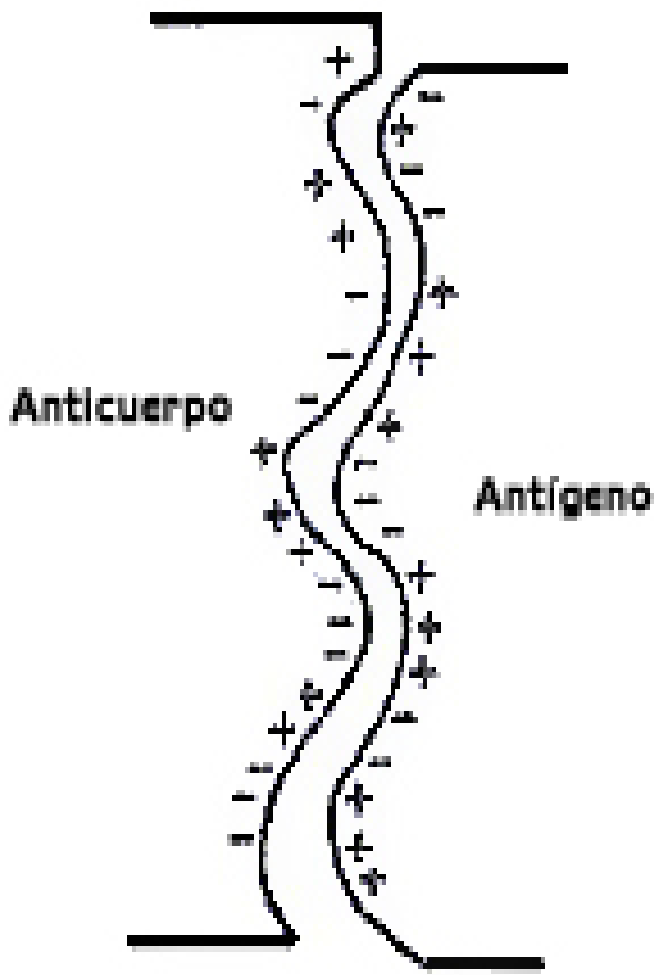
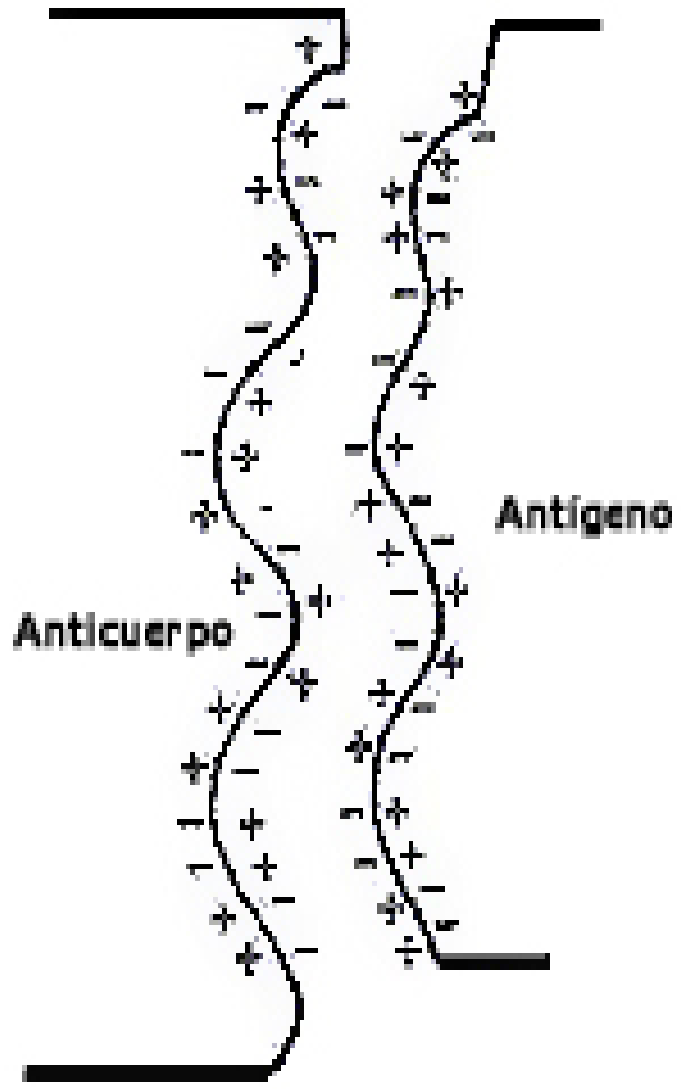


LISS (Low ionic Strength Saline)
Solución de baja fuerza ionica (sbfi)

Liss

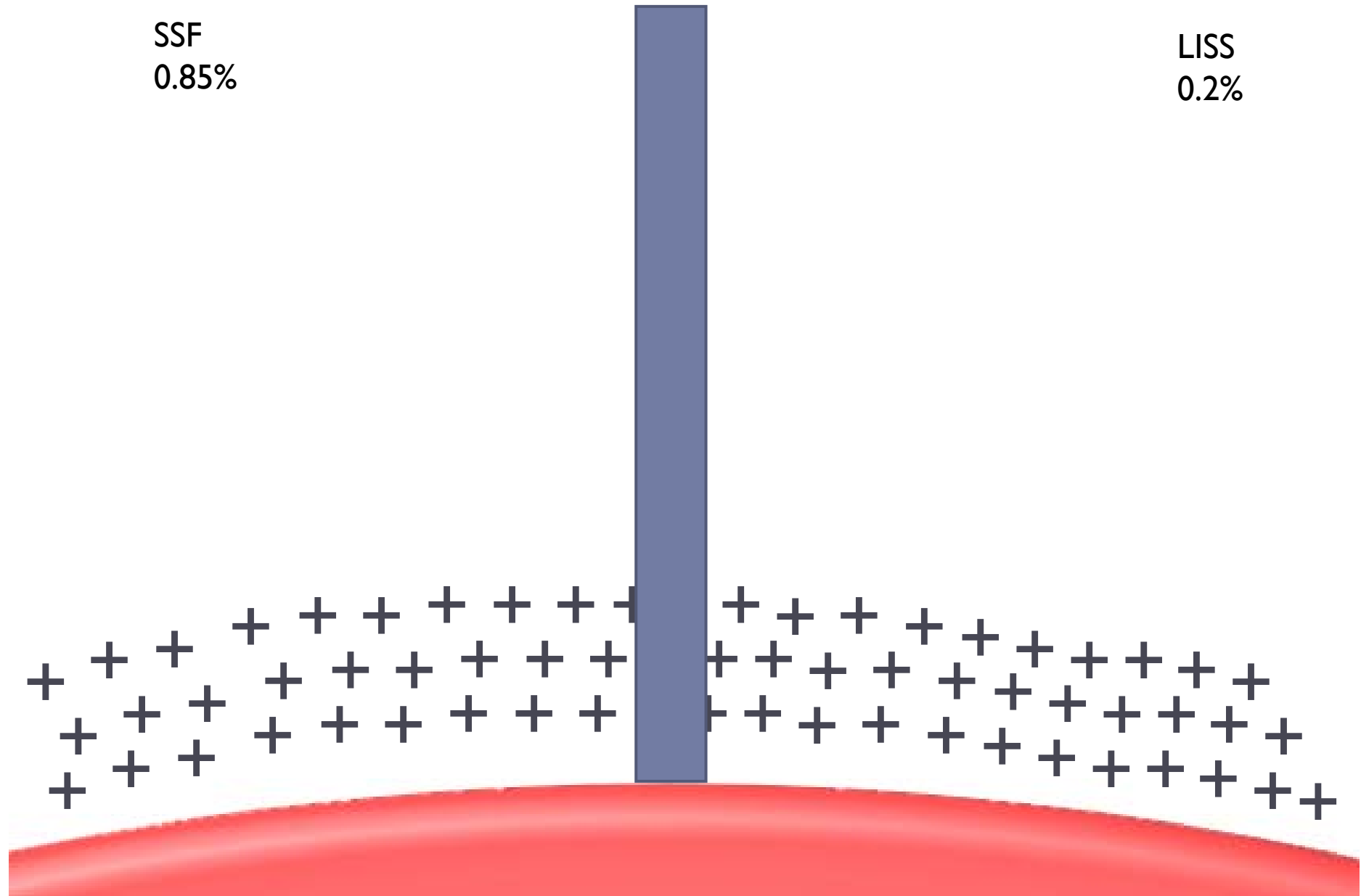
- ▶ La carga de iones positivos y negativos que poseen es inferior a la que contiene la solución salina fisiológica normal, por ello, la interacción de los iones del medio dificulta menos las uniones antígeno/anticuerpo (sensibilización de los hematíes) permitiendo tiempos de incubación más cortos





SSF
0.85%

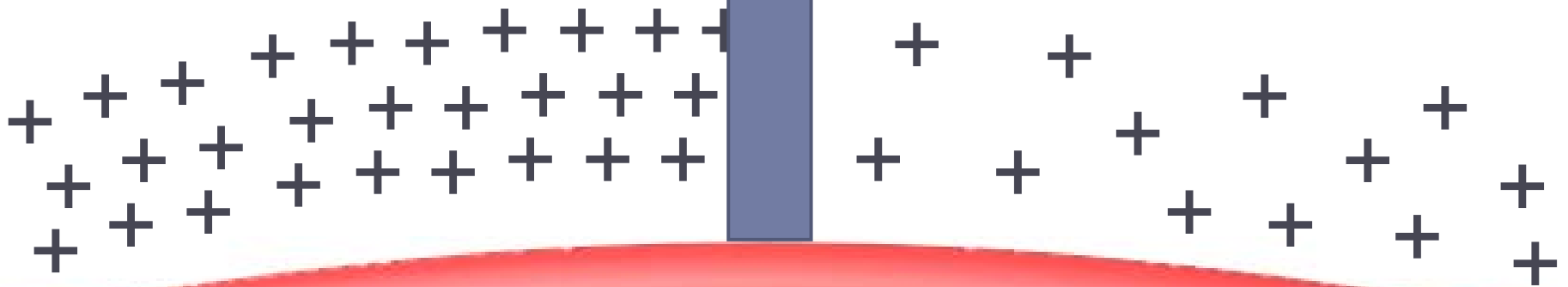
LISS
0.2%



SSF
0.85%

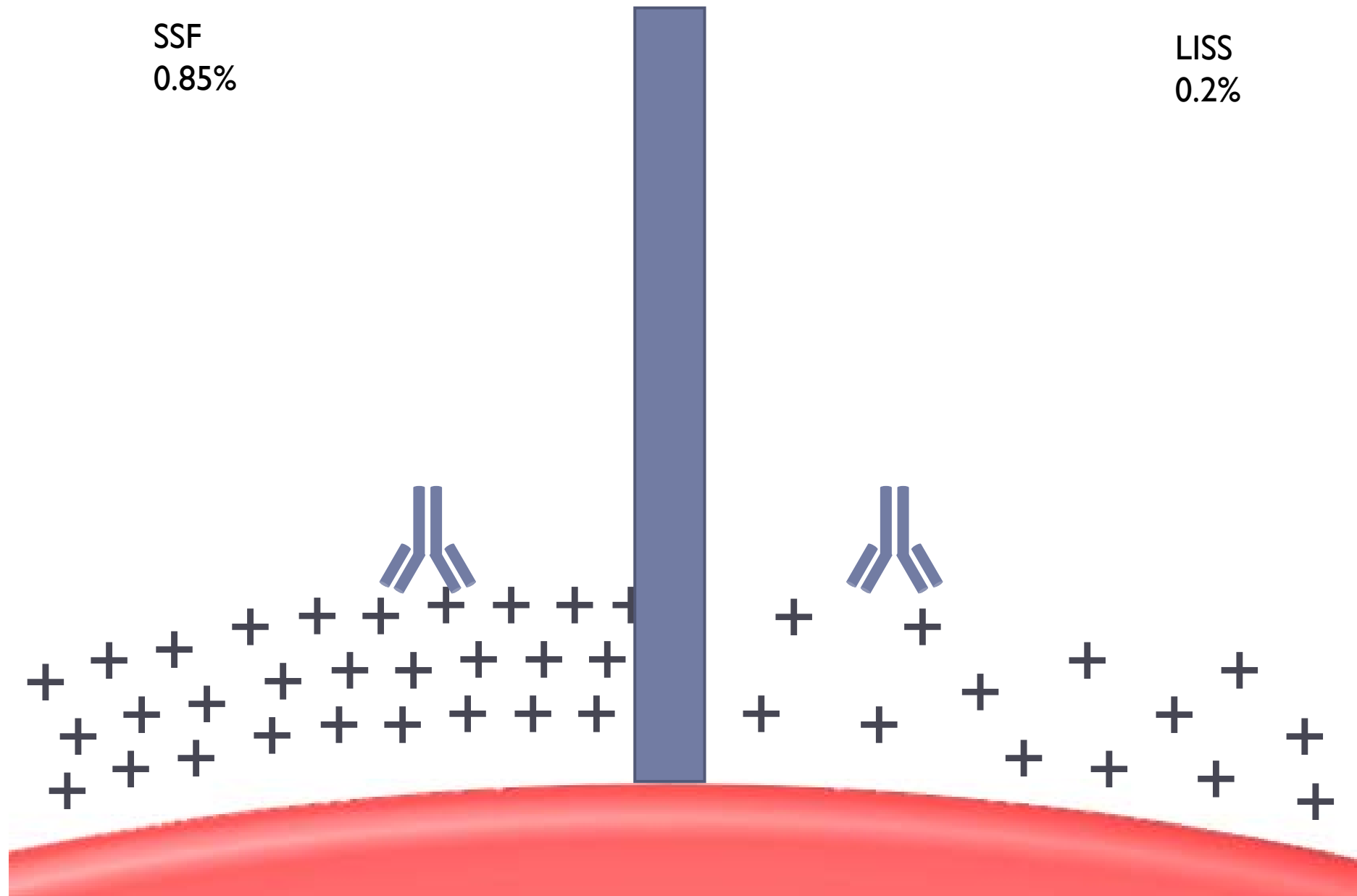


LISS
0.2%



SSF
0.85%

LISS
0.2%



LISS

- ▶ Low Ionic Strength Saline 0.2 % ClNa, glucosa al 7%
- ▶ Aumentan la cinética de la reacción antígeno anticuerpo con lo que reducen el periodo de incubación:
 - ▶ Incrementa la captación de Anticuerpos por Ag
 - ▶ Incrementa la velocidad de asociación Ag-Ac.
 - ▶ Disminuye el tiempo de incubación.
- ▶ Posibilita detectar anticuerpos débiles que no pueden detectarse por otros medios.
- ▶ Formación de aglutinados más fuertes que los producidos con otras técnicas
- ▶ Puede potenciar anticuerpos fríos.





POLYBRENE

Polybrene

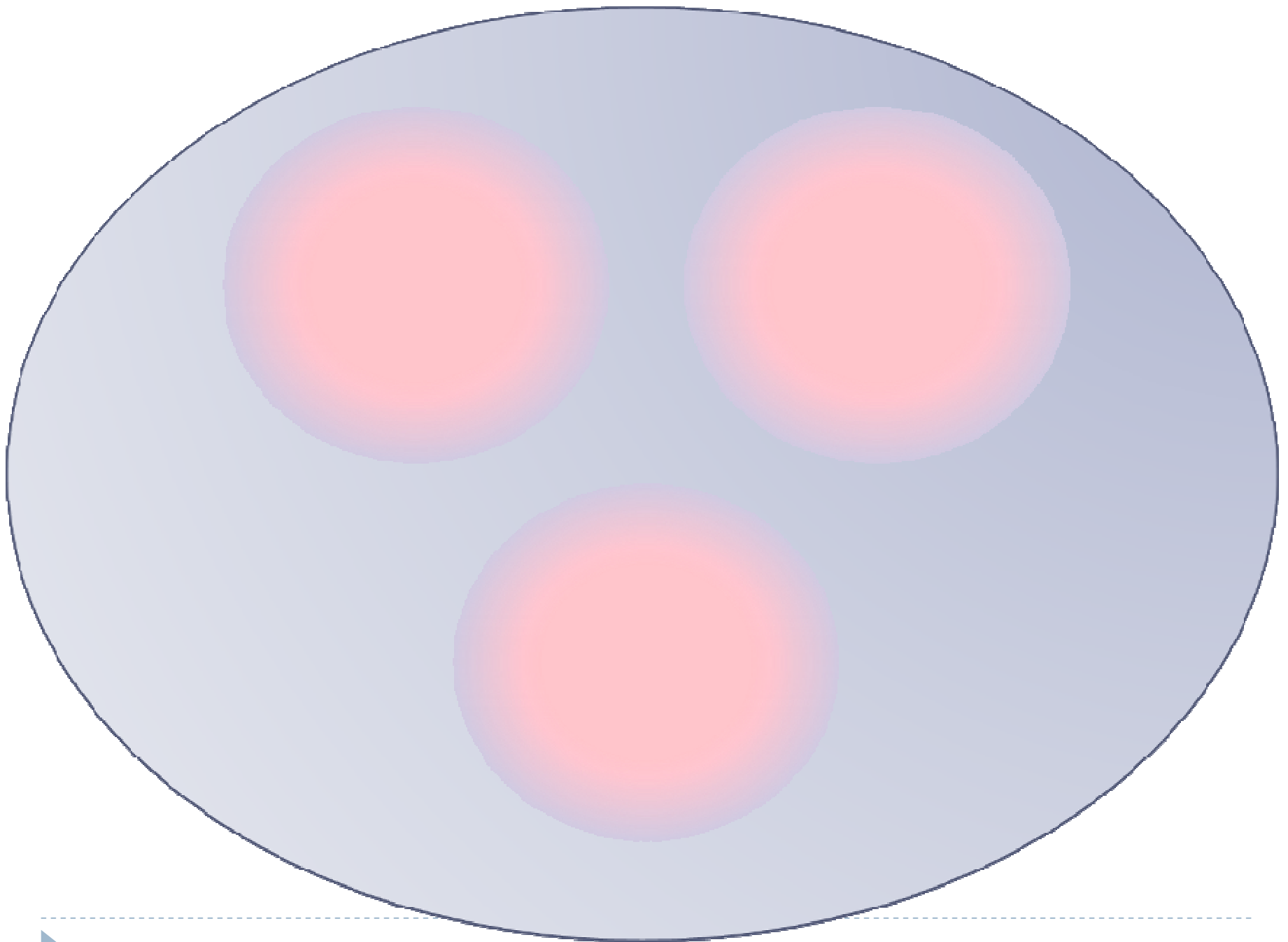
- ▶ Es un polication (polímero positivamente cargado) de amonio cuaternario (bromuro de exadimetrina) en cuya presencia, en baja fuerza iónica y a pH bajo, los hematíes normales agregan espontáneamente, la cual puede ser disgregada mediante citrato de sodio, Si los hematíes están sensibilizados esta aglutinación persiste
- ▶ Esto puede deberse a la neutralización de la carga negativa aportada por los residuos de Acido siálico, que se fundamentó en la observación que el Polybrene no afecta a las células que les falta el ácido siálico (por causas genéticas o por tratamiento con Enzimas).

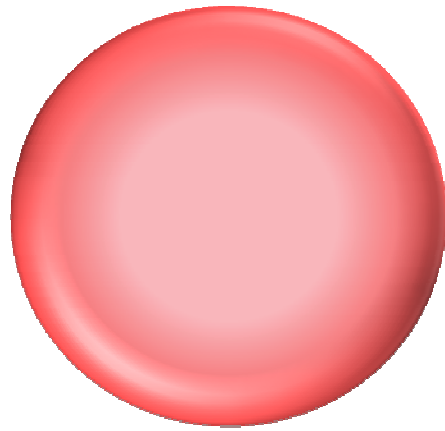
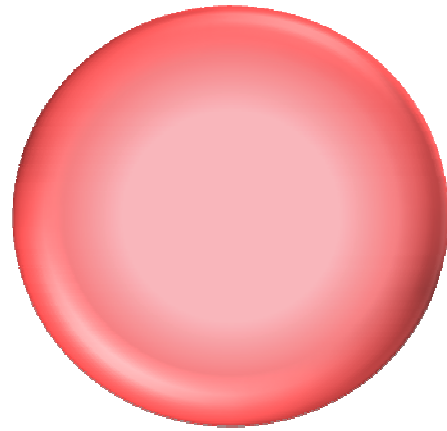
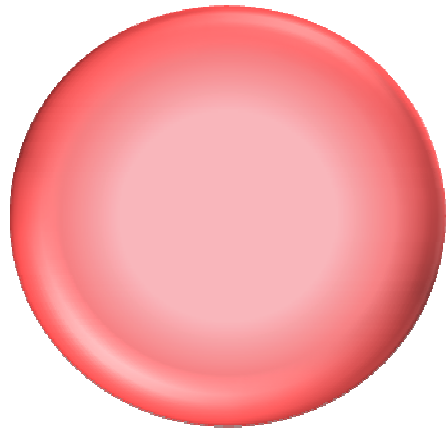


Polybrene

- ▶ Otra explicación para la agregación inducida por este polícatión es que la asociación de las macromoléculas con moléculas cargadas en la membrana celular expulsa a las moléculas de agua que forman la capa de hidratación.
- ▶ Problemas con detección de Anti Kell



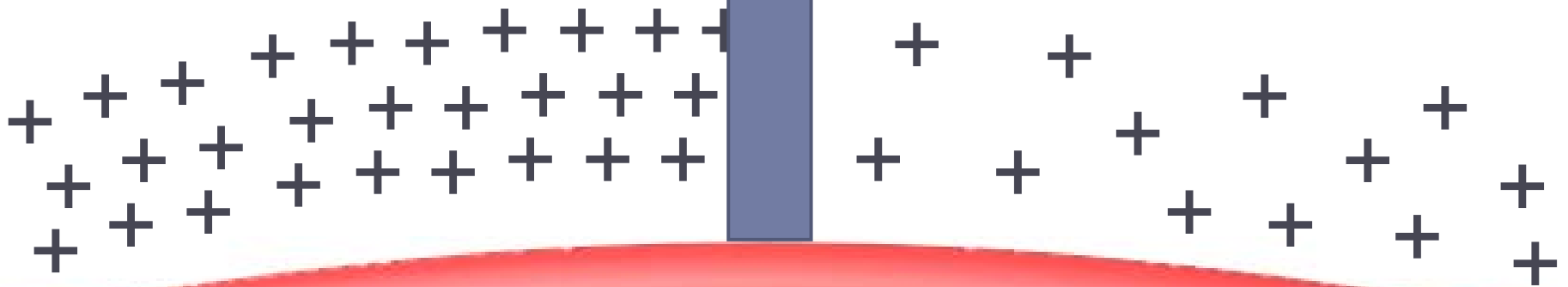




SSF
0.85%



LISS
0.2%



LISS
0.2%



PEG

- ▶ Polímero lineal que desplaza al diluyente, por lo que aumenta la concentración de Anticuerpo.
- ▶ PEG especialmente en un medio de baja fuerza iónica, agrega los hematíes y aumenta la sensibilidad de las técnicas de detección de anticuerpos, consiguiendo la disminución del tiempo de incubación. Tiene una sensibilidad y especificidad superior a la Albúmina.
- ▶ Lectura solo en fase de Antiglobulina, no se debe efectuar lectura después de la incubación a 37°C.
- ▶ Reacciones inespecíficas con Antiglobulina humana poliespecífica



PEG

- ▶ Aumenta la sensibilidad de la prueba para la detección de Ac clínicamente significativos mediante la Prueba Antiglobulina indirecta
- ▶ Empleada como aditivo, mejora de manera espectacular la sensibilidad de las pruebas de detección. La mayoría de los anticuerpos IgG se pueden detectar a niveles de potencia más bajos que por métodos convencionales.
- ▶ Puede requerir mayor número de lavados antes de añadir la Antiglobulina.



Tratamiento por Enzimas proteolíticas

Tratamiento por enzimas proteolíticas


- ▶ Descritas en 1946 por Pickles: son capaces de retirar de la superficie del hematíe fragmentos polipeptídicos de las glicoproteínas de membrana, tales como el ácido siálico (disminuyen “ γ ”) y por consiguiente disminuyendo el Potencial Zeta permitirá un mayor acercamiento de los hematíes facilitando su aglutinación por los anticuerpos de tipo IgG.
- ▶ De esa manera los hematíes pueden ser aglutinados por anticuerpos de clase IgG (no aglutinantes), como IgG anti-Rho(D), en medio salino.



Técnicas enzimáticas

- ▶ Las enzimas mas utilizadas: bromelina, papaína y ficina
- ▶ Aumentan la sensibilidad de detección de algunos antígenos (Rh, Kidd)
- ▶ Destruyen antígenos de la membrana eritrocitaria (M, N, S, Fy)
- ▶ Incrementan la detección de anticuerpos fríos
- ▶ Las pruebas para la investigación de anticuerpos mediante enzimas proteolíticas son muy sensibles para determinados anticuerpos pero tienden a dar resultados falsos positivos, por ello los anticuerpos reactivos solo con enzimas no suelen tener significación clínica.



-
- ▶ Tripsina Primera enzima descrita, da muchos falsos positivos. Las células tratadas con tripsina son especialmente sensibles a la hemólisis, sobre todo en pacientes con enfermedad de aglutininas frías.
-
- 

Ficina

- ▶ Se obtiene desecando el látex de la higuera. La ficina en polvo produce, en muchas personas erupciones cutáneas, y si accidentalmente penetra en un ojo, puede producir lesiones graves. Las células tratadas con ficina dan con frecuencia resultados positivos falsos, por lo que se recomienda trabajar con controles positivos y negativos. Debe usarse sólo para pretratar las células, ya que aún no se han descrito métodos de un solo paso para esta enzima.



Papaina

Obtenida de la papaya, se utiliza mucho porque reúne las propiedades de una adecuada sensibilidad junto con una buena selectividad. Como sucede con todas las Enzimas, si las células se tratan por exceso con papaina se produce falsas reacciones positivas, pero no tan frecuentemente como con la tripsina o la ficina. Puede usarse para pretratar células o, cuando se activa con la l-cisteína, para técnicas de una sola fase. Es especialmente útil para detectar anticuerpos del sistema Rh.



Bromelina

Se obtiene del tronco de la piña, se emplea en técnica de una sola fase. Las células tratadas con esta enzima detectan la mayoría de anticuerpos del sistema Rh sin mostrar sensibilidad a la cantidad de aglutina fría que normalmente hay en el suero.

Eficacia en la eliminación del Acido siálico: Ficina > papaina > bromelina > tripsina



Modificaciones del Potencial Zeta (Z) y de la carga eléctrica del hematíe (γ) por el tratamiento enzimático

Hematíes	Potencial (Z) (mV)	Carga Eléctrica del hematíe ($\gamma \times 10^3$ ues/cm ²)	% de reducción de (z) y (γ)
No tratados	- 19,6	- 3,27	0.0
Tripsina	- 15,6	- 2,59	24.4
Bromelina	- 14,1	- 2,35	28.1
Papaína	- 10,1	- 1,68	48.0
Ficina	- 9,00	- 1,51	53.9

Adaptación de: P. Rouger, y C. Salmon; La Pratique de l'Agglutination des Érythrocytes et du Test de Coombs



Tratamiento por enzimas proteolíticas

- ▶ Es importante señalar que ciertos grupos antígenos de grupo sanguíneo son destruidos o inactivados por el tratamiento enzimático: M, N, S, s, Fy^a, Fy^b, Xga.
- ▶ Esta inactivación exacerba la presencia de los determinantes antigénicos residuales, pudiendo provocar efectos no deseados de aumento de reactividad de anticuerpos sin importancia clínica





**MUCHAS
GRACIAS**