



Herramientas complementarias en la investigación inmunoematológica

Disociación, elución, adsorción, citometría de flujo

Lic. TM Edvin Santiago Trujillo

Inmunohematológica

Estudia los antígenos presentes en la membrana de los hematíes, PQ y GB, el **comportamiento serológico** de los mismos (formación de ac) y los desórdenes hematológicos inmunes (AHAI)



Exámenes de rutina



Situaciones especiales

Inmunohematología en la rutina

Situaciones clínicas

Transfusión de GR, TMO

Sospecha EHRN, RTHR, AHAI

Mujer gestante Rh (-)
Inmunoprofilaxis anti-D

Hemorragias

Exámenes rutina

- GS. ABO/Rh + inverso
- Fenotipo Rh
- Coombs Directo Poly
- Detección de anticuerpos
- Identificación de anticuerpos
- Título de anticuerpos
- Prueba cruzada mayor

antígenos

anticuerpos

complemento

Inmunohematológica en la rutina

Pruebas especiales

Discrepancias ABO

- Uso de Enzimas: Papaína, Bromelina, Ficina
- Pruebas de antiglobulina precalentadas
- Uso de AGH Monoespecífica anti-IgG Tratamiento del suero con 2-ME/DTT

Incompatibilidades

- Inactivación antigénica: ZZAP, DTT (kell)
- Sustitución con salina
- Tratamiento de los hematíes con cloroquina

Ac. múltiples

- Elución – Disociación de anticuerpos
- Adsorción autóloga-alóloga
- Neutralización de antígenos (HTLA, Ch/Rg, Lewis)

Ejemplos

Determinación de Grupo ABO / Rh + inverso

Anti-A	Anti-B	Anti-D	Ctl	AI	B
0	4+	4+	0	4+	0



B positivo
Resultado normal

Determinación de Grupo ABO / Rh + inverso

Anti-A	Anti-B	Anti-D	Ctl	AI	B
4+	4+	4+	4+	4+	4+



indeterminado
Resultado anormal

Autoanticuerpos IgM ?

Plan de trabajo de resolución

- Lavar con SSF 37°C
- Tratamiento con DDT / 2-ME

Ejemplos

Determinación de Grupo ABO / Rh + inverso

Anti-A	Anti-B	Anti-D	Ctl	AI	B
0	0	4+	0	0	4+



Discrepancia
Resultado anormal

Error técnico, Ag débil, TMO ?

Plan de trabajo de resolución

- Incubación a T° 4°C
- Inverso a 4°C, GR tratados con enzimas + control
- Adsorción / Elución de GR problema con anti-A
- Neutralización de saliva

Ejemplos

Prueba cruzada mayor (2U)

	AGH
PC1	C
PC2	C



Podemos Transfundir
Resultado normal.

Prueba cruzada mayor (2U)

P. Cruzada	AGH
PC1	4+
PC2	4+
PC3	4+
PC4	4+



Detección Ac	
GR 1	4+
GR 2	4+
GR 3	4+
AC	4+

No Transfundir (*)
Resultado anormal.

Plan de trabajo de resolución
- CD, fenotipo, Autoadsorción, la menos incompatible

Conceptos

Adsorción de anticuerpos

Fijar anticuerpos a su respectivo antígeno hemático

Ejm. Eliminar autoanticuerpos, investigar ag débiles,

Elución

Obtener los anticuerpos para identificarlos y descartar los hematíes

Ejm. Investigar una RHPT_r

Disociación:

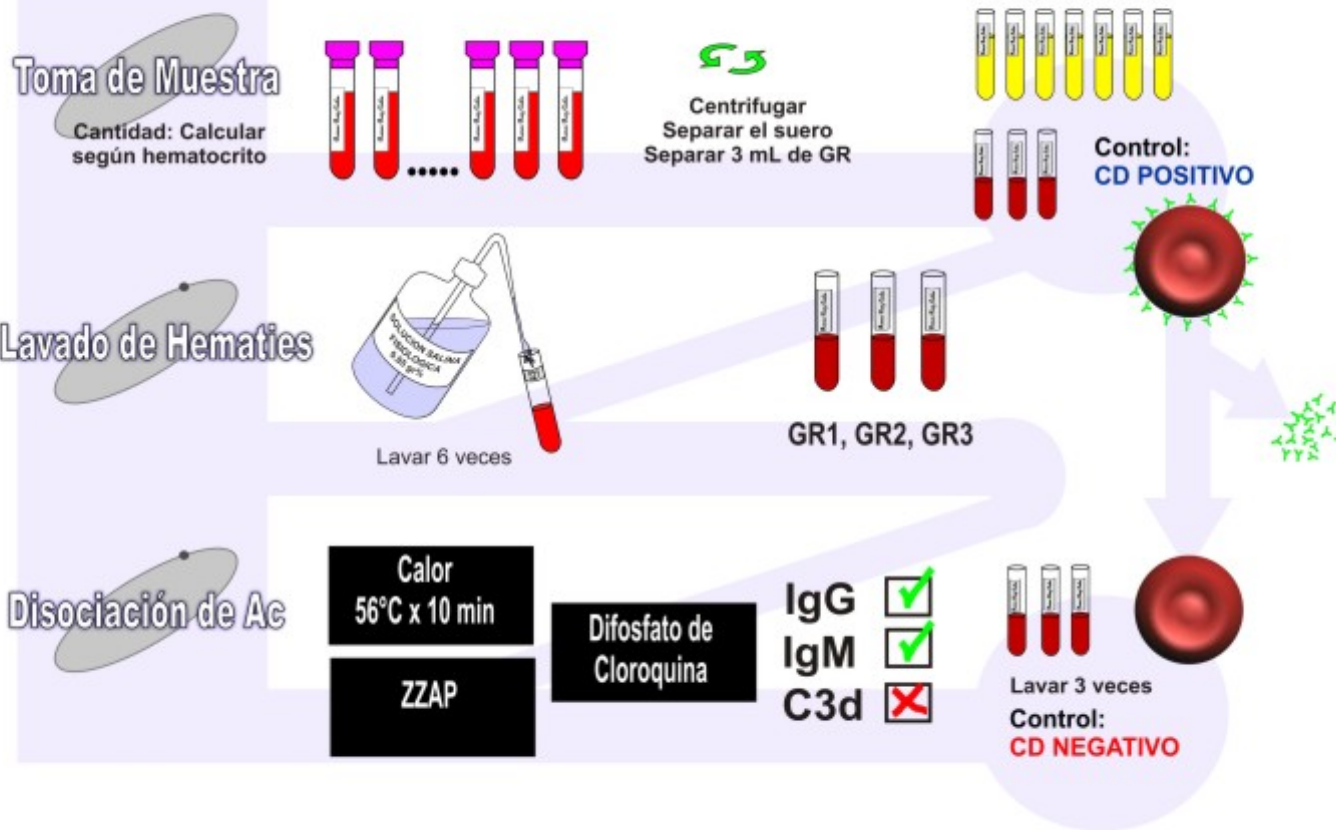
Conservar los hematíes para estudiarlos y descartar los anticuerpos

Ejm. Estudiar ag. en GR CD (+)

Adsorción autóloga

- Finalidad: eliminar el autoanticuerpo y luego detectar aloanticuerpos
- Válido: si no fue TF recientemente (3 meses)
- Preparar previamente los GR (elución)
 - Calor: 45-50°C por 10 a 15 min.
 - Difosfato de cloroquina: 1 hora
 - ZZAP: inconveniente Ag enzima-sensibles

Preparación de GR para Autoadsorción



Repetir si es necesario....

Adsorción homóloga

Condiciones:

- Paciente severamente anémico
- Transfundido recientemente
- Si fracasa la AutoAdsorción
- Debe usarse GR de fenotipo igual al del paciente

GR isogrupo con el paciente

- R1R1 (DCe) K- Jka-
- R2R2 (DEc) K- Jkb-
- rr (dce) K-

Tratados con enzimas

Si **no** asegurarse que los Ag Fya, Fyb y S estén ausentes en al menos una de los tres GR

Elución - Disociación

Objetivos

- Purificar y/o concentrar anticuerpos a partir de mezclas
- Detectar antígenos débilmente expresados
- Confirmar la especificidad de un anticuerpo
- Confirma anticuerpos en una AHA_{lc} con CD “negativo”

Métodos

- Químicos: DF de cloroquina, digitonina acida, cloroformo, eter, DTT, 2-ME
- Físicos: congelamiento (lui moodificado), calor controlado desde 45 a 56°C

Elución - Disociación

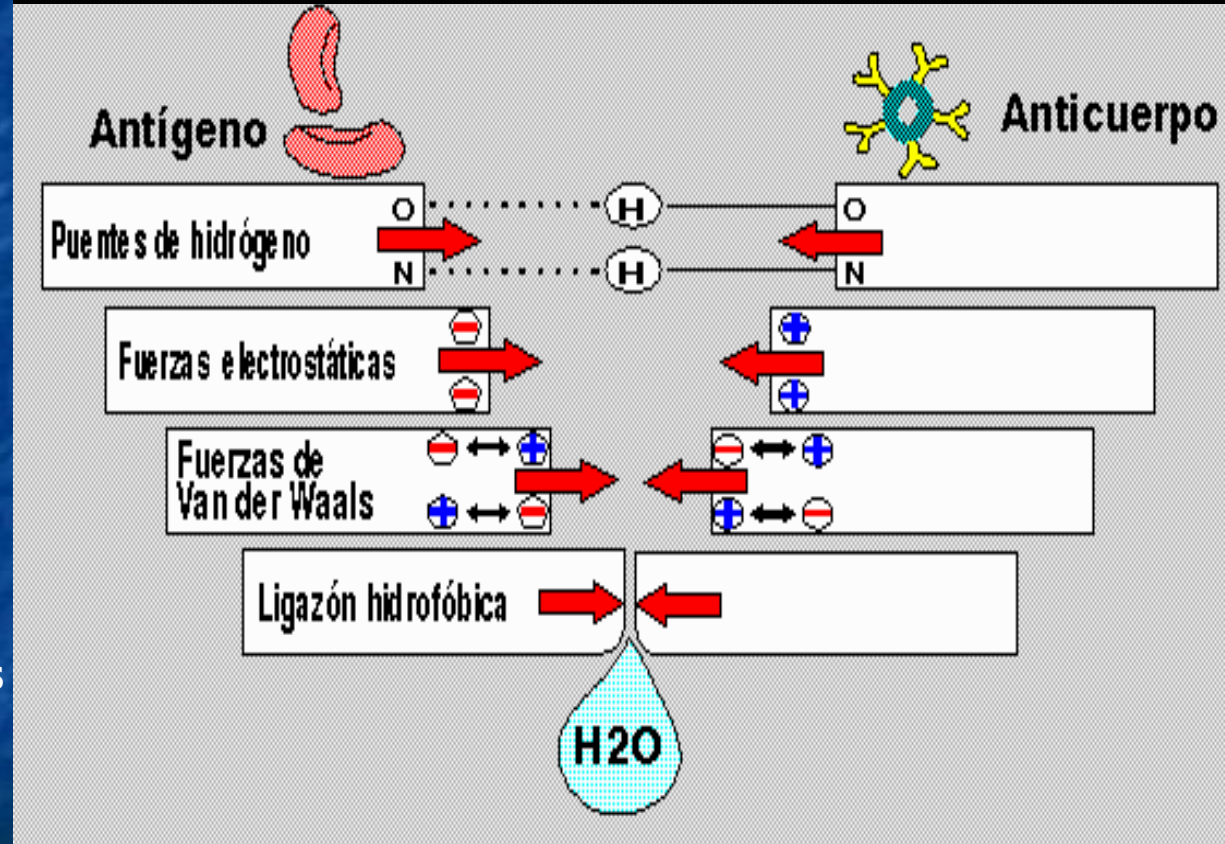
PRINCIPIOS

- Las uniones son **NO COVALENTES**
- Se revierten con facilidad
- Depende fuerza de unión
- Cantidad de energía (H+)
- Cambios estructurales

Principio de reversibilidad



Fuerzas de unión Ag - Ac



Difosfato de Cloroquina

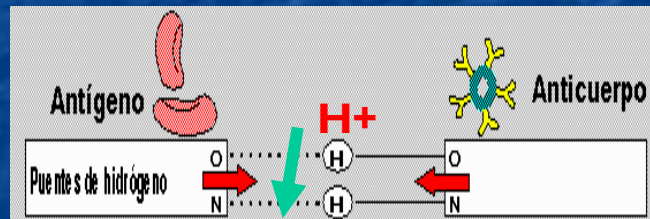
- Permite la disociación de los anticuerpos adheridos a los GR
- Es una solución iso-osmótica (300 ± 20 mOsm), a pH 7
- El complejo ag-ac es fracturado por el difosfato de cloroquina
- Mantiene intacta la membrana
- Permite la determinación de ag y autoadsorción
- No siempre disocia (puede variar en el mismo Ac)

TECNICA

- GR lavados 3X
- Colocar 0.5 mL de GR
- Añadir 2 mL de DFC
- Incubar a T° ambiente por 2 horas
- Lavar 3 veces y controlar: CD

Glicina ácida

- Eluye los ac adheridos a los GR
- Daña irreversiblemente la membrana
- Hay un exceso de H^+ y reemplaza a los puentes de H^+
- Se neutraliza por la adición de un buffer



ELUCION ACIDA

Lavar hematíes 3 veces



ClNa
0,9 %



Guardar
último
lavado

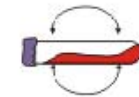
Adicionar 1.0 ml de hematíes
Adicionar 1.0 ml de sol. de elución
Mezclar suavemente
Centrifugar 1 min a 3400 rpm.



Hematíes
lavados
1.0 ml

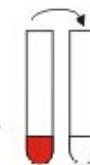


Sol ELUCION
1.0 ml



Mezclar por
inversión
Centrifugar 1 min
a 3400 rpm

Transferir el eluato a un tubo
limpio. Adicionar 5 gotas de
Buffer Mezclar bien.
Observar color azul. Centrifugar
a 3400 rpm 1 minuto.



Transferir
a tubo limpio



Adicionar
Buffer



Centrifugar
a 3400 rpm
1 minuto

ZZAP

- Reduce las uniones disulfuro (-S-S-) mediante un H⁺ (-SH, HS-)
- Subunidades IgM se separan de la cadena "J" y pierden su actividad.
- DTT y 2-ME inactiva los antígenos Jsa y Jsb
- DTT inactiva todos antígenos del sistema Kell (excepto Kx), Kna, Yta, JMh

ZAAP

Dithiotreitol 0,2 M	2,5 mL
• 1 gr DTT qp	
• 32 mL de Solución 2 (LISS)	
Papaína activada con cisteína	0,5 mL
Solución LISS	<u>2,0 mL</u>
Total	5,0 mL

DISOCIACION CON ZZAP

- 1.- Lavar 3 veces con SSF.
- 3.- Dispensar en un tubo 1 volumen de GR empacados
- 3.- Adicionar ZZAP
- 4.- Incubar 10 minutos a 37°C
- 5.- Lavar 3 veces con SSF. Empacar (GR tratados)
- 6.- Control:
 - Coombs Directo de los GR tratados = NEGATIVO
 - Si continua positivo repetir desde el paso 3.

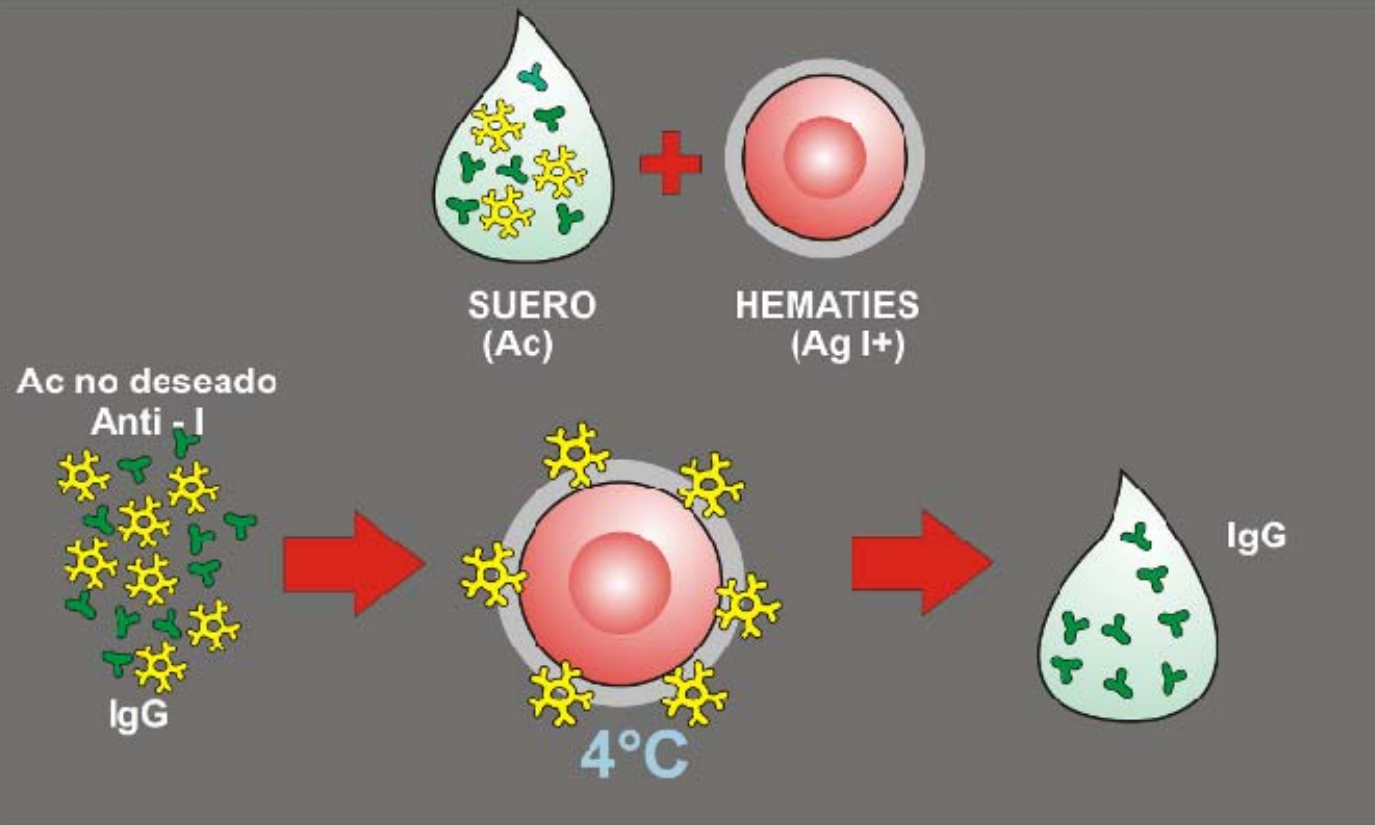
LUI modificado

- Se basa en la congelación (-20°C y -70°C), el que produce un cambio estructural
- Libera los anticuerpos y se usa principalmente para EHRN
- Es de tiempo corto y facil
- Solo recupera anticuerpos ABO

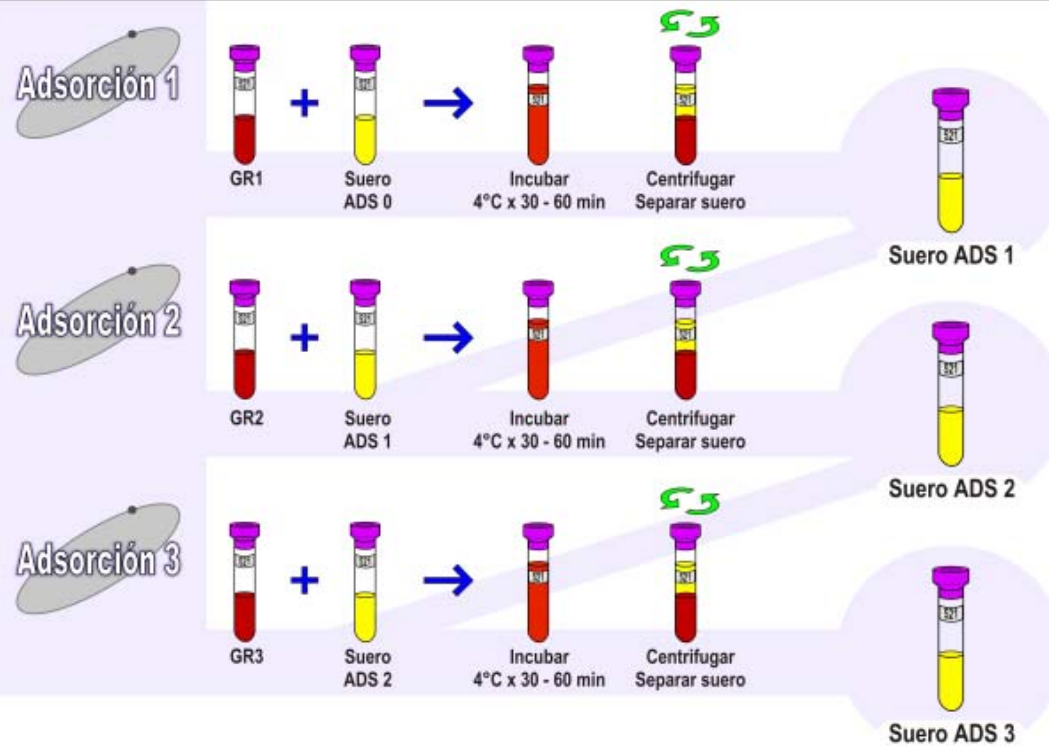
TECNICA

- GR lavados 6X
- Colocar 4 – 6 gotas del GR al 50% en 3 o 4 tubos
- Embeber las paredes del tubo
- Congelar a -20 a -80°C (5 min)
- Descongelar rápidamente
- Centrifugar y transferir el eluido

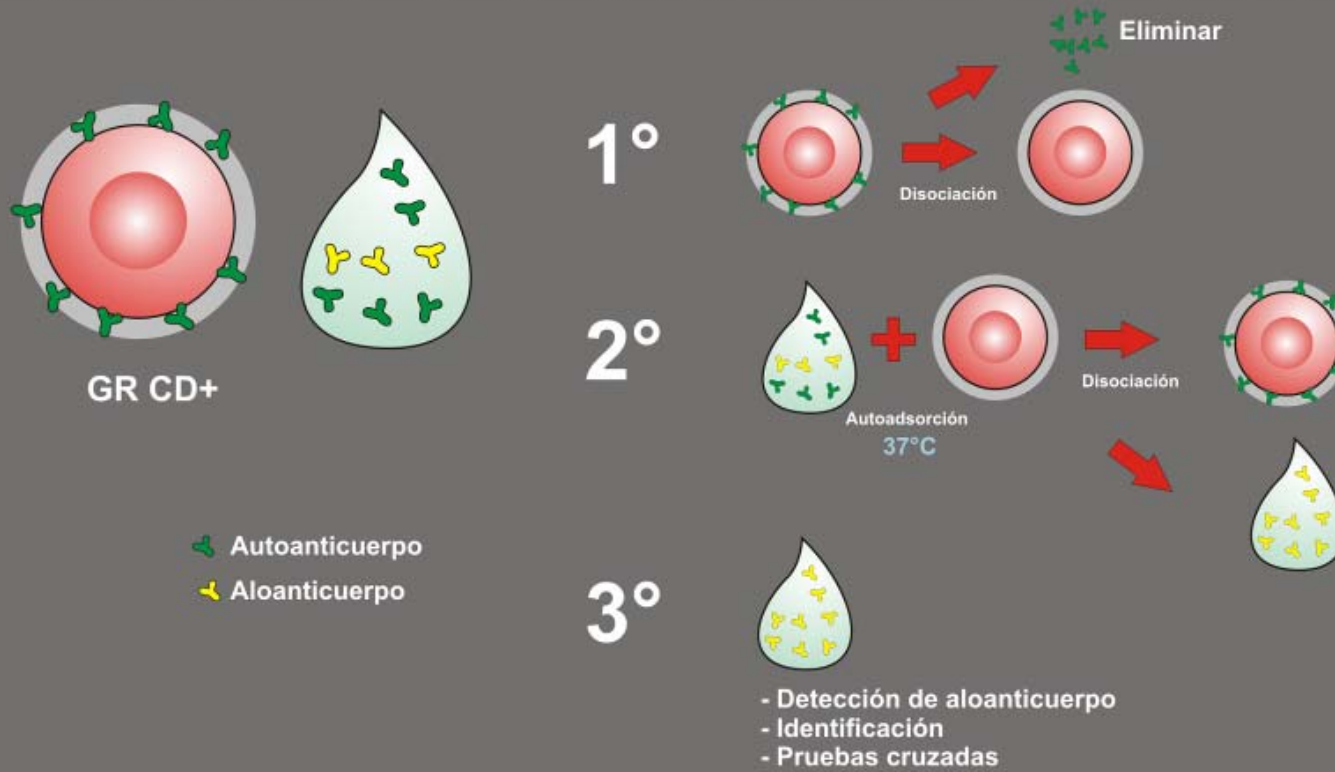
ADSORCION EN FRIO



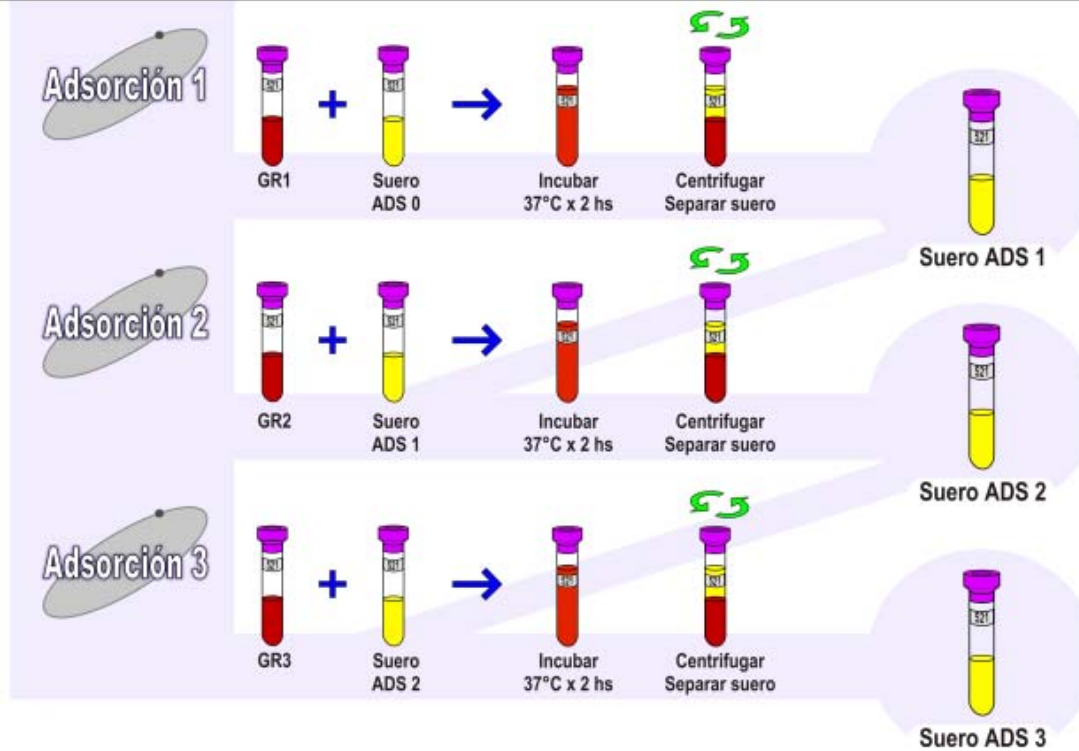
Autoadsorción en frío (4°C)



PACIENTE CON AHAlc - Autoadsorción



Autoadsorción en caliente (37°C)



Uso de la citometria de flujo

- Detección y cuantificación de Ag eritrocitarios: D debil
- Detección de IgG /C en pac. Con AHAI CD (-)
- Cuantificación de subclases de IgG
- Detección de quimerismo (dos poblaciones celulares)
- Detección de GR transfundidos recientemente
- Detección de Hemorragia fetomaterna

DEL

Expresión débil del Ag D

Se detecta por adsorción / elución

Es negativo con AGH

Densidad: CMF < 50 AgD/GR

