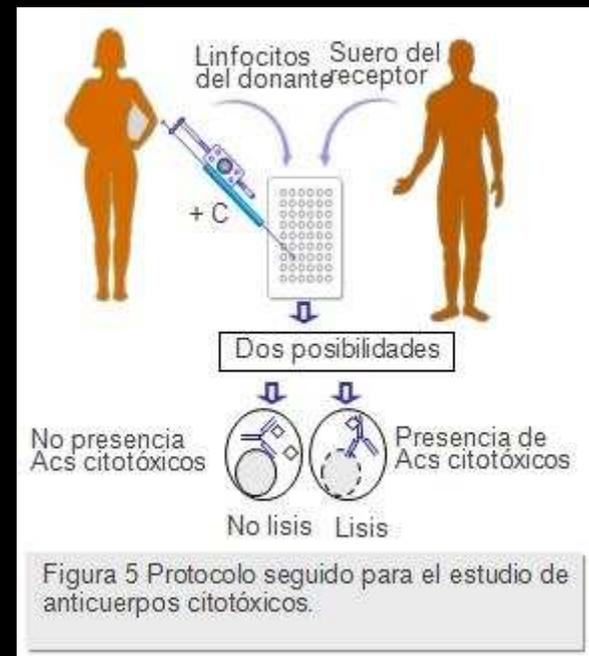
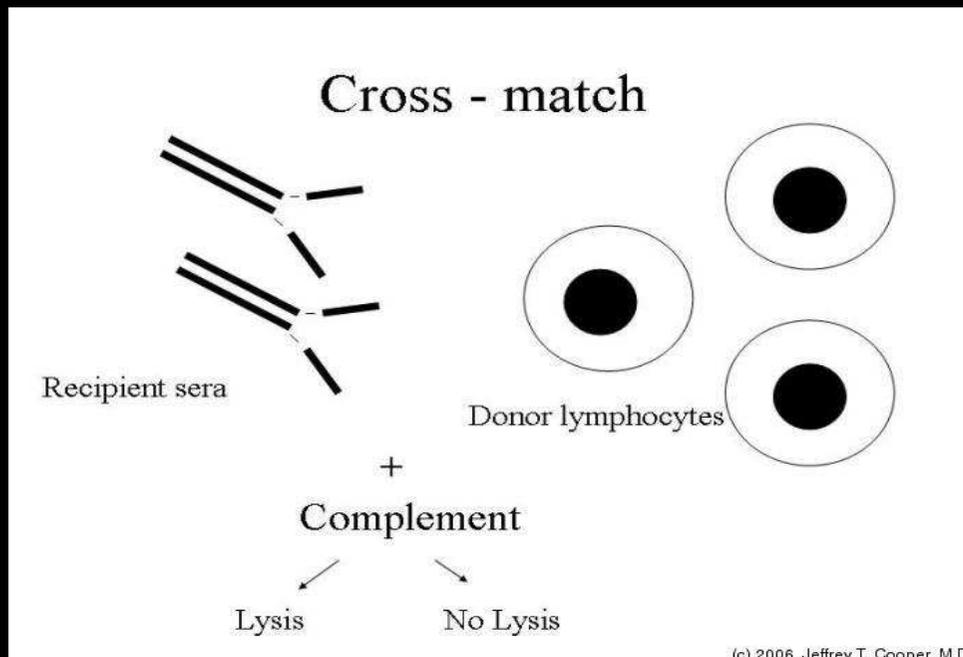


CROSS MATCH

QUE ES?

Es la búsqueda de anticuerpos preformados contra los linfocitos de un posible donante en el suero de un paciente.



Pueden estar específicamente dirigidos contra los antígenos HLA o contra cualquier otro antígeno del donante que éste no comparta con el receptor

El receptor potencial de un trasplante alogénico puede estar "sensibilizado" contra su donante potencial, es decir, puede tener en su suero anticuerpos contra las células de éste.

Estos Ac suelen ser consecuencia de la respuesta del receptor a

TRANSFUSIONES



EMBARAZO



TRANSPLANTE
PREVIO



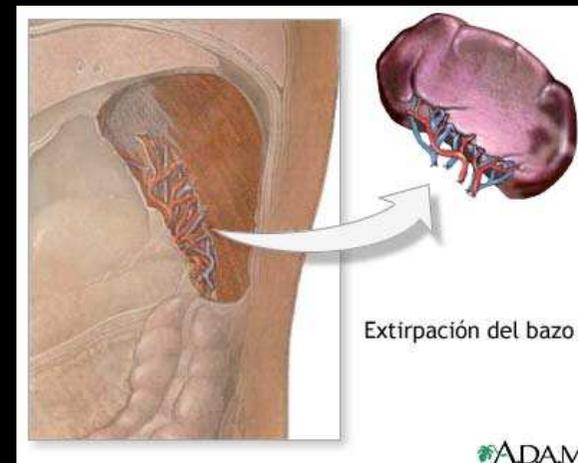
QUIENES SE DEBEN REALIZAR?

Aquellos pacientes incluidos en la lista de espera del incucai

Para este estudio, las muestras que deben enviarse son las siguientes:

Potenciales **receptores**: suero

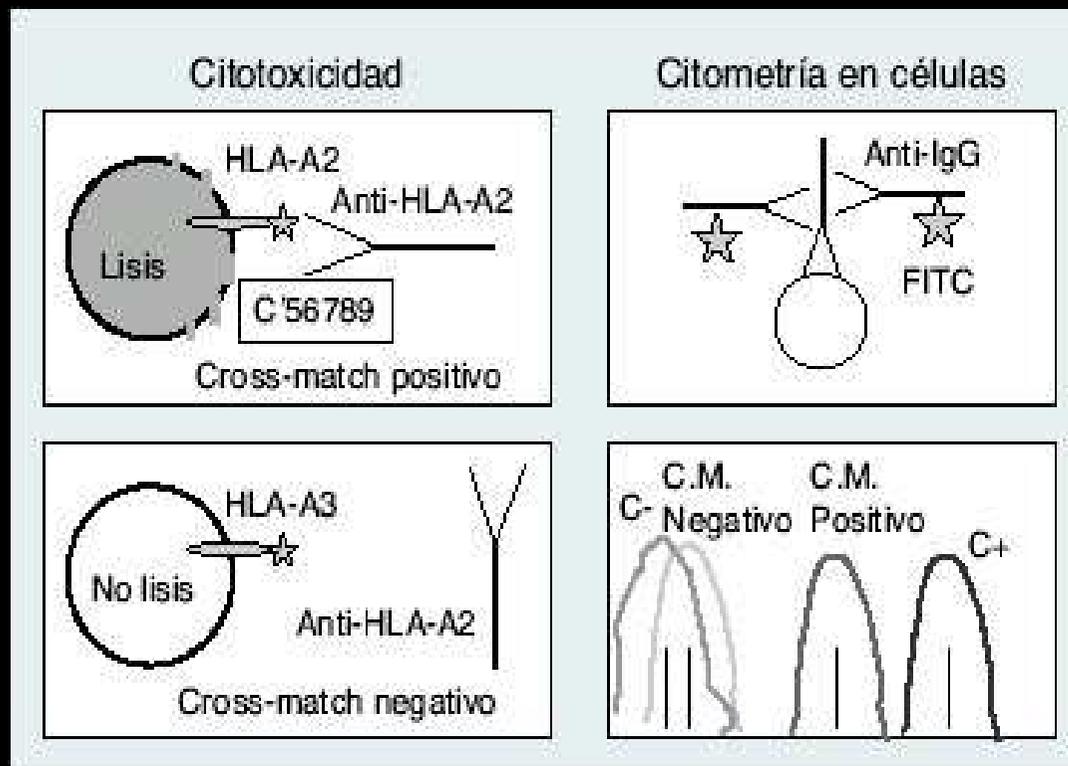
Donante **cadavérico**: bazo, sangre o ganglio



TIPOS DE CROSS MATCH

- CROSS MATCH FRENTE A PANEL
- CROSS MATCH DADOR RECEPTOR

TECNICAS :CITOMETRIA, ELISA, CITOTOXICIDAD



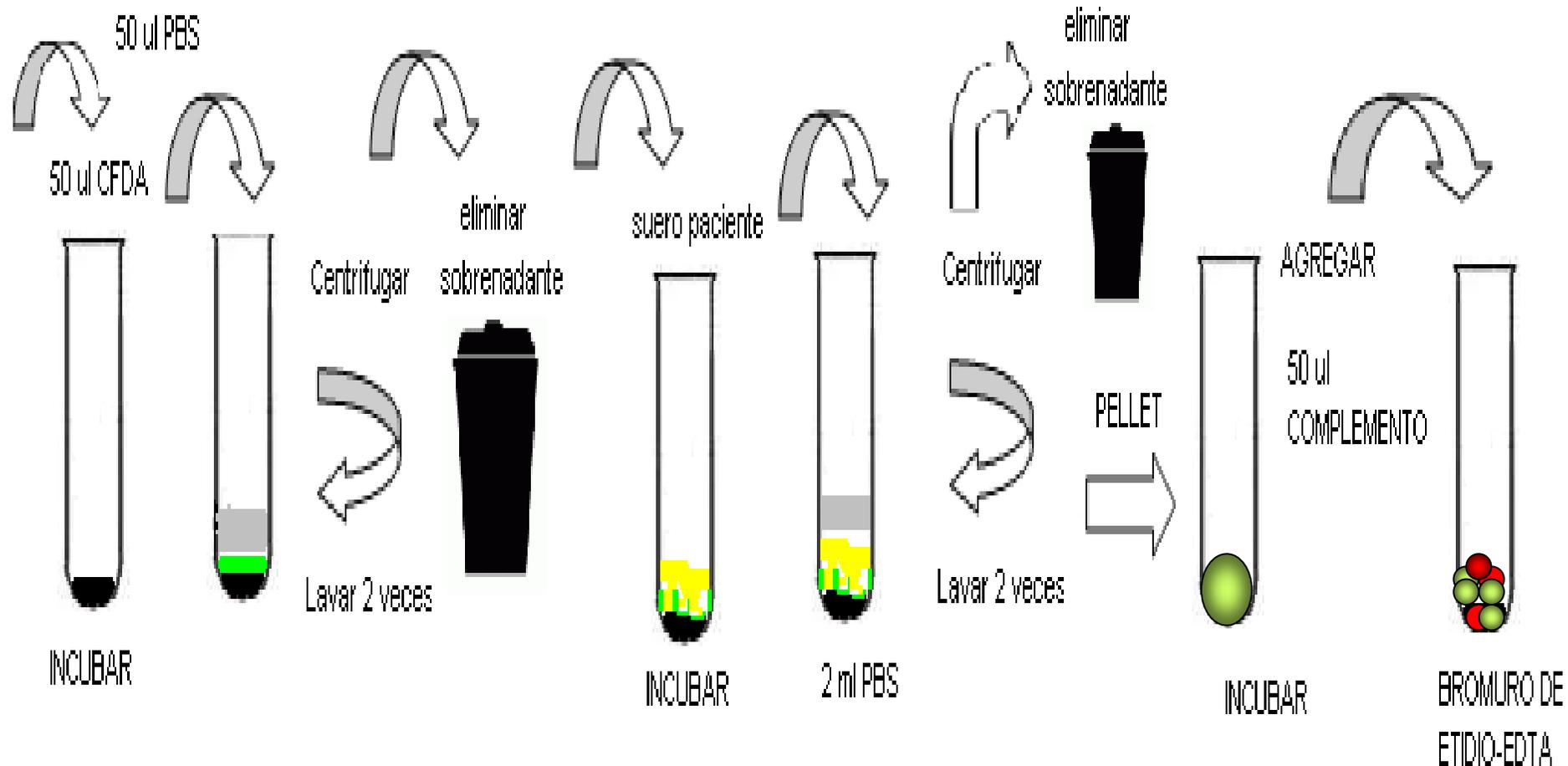
CROSS MATCH FRENTE A PANEL

El Cross-Match frente a panel se realiza en pacientes para los cuales no existen donantes vivos relacionados. Se llama "cross-match frente a panel" porque se enfrenta el suero del paciente con un panel de células provenientes de individuos no relacionados.

De esta forma, al no existir donantes vivos relacionados para estos pacientes, el número de personas contra quienes reacciona el suero indica el grado de sensibilización y la probabilidad que tiene de encontrarse un individuo al azar que pueda ser donante para él.

CROSS MATCH DADOR RECEPTOR

El principio de este método se basa en la lisis celular mediada por anticuerpos específicos en presencia de complemento.



COMO SE HACE?

- 1- 2ml de sangre entera con anticoagulante.
- 2- Centrifugar a bajas revoluciones: 10 minutos a 1500 rpm
- 3- Con pipeta Pasteur tomar aprox. 0,5 ml de la interfase.
- 4- Colocar en un tubo y agregar 1,5 ml de PBS (relación 1+ 3)
- 5- A 0,5 ml de Ficoll-Tryosom agregar 1,5 ml de sangre obtenida en el punto 4, lentamente por las paredes del tubo, para que queden bien delimitadas ambas fases y se pueda realizar un correcto gradiente.
- 6- Centrifugar en centrífuga de cabezal móvil durante 15' a 2500 rpm.
- 7- Después de la centrifugación quedan formadas 4 fases: plasma- mononucleares- Ficoll-Triyosom – eritrocitos y PMN. Separar la capa de mononucleares con pipeta Pasteur

SANGRE +
FICOLL

LUEGO DE LA
CENTRIFUGACION

B: BLOOD

F: FICOLL

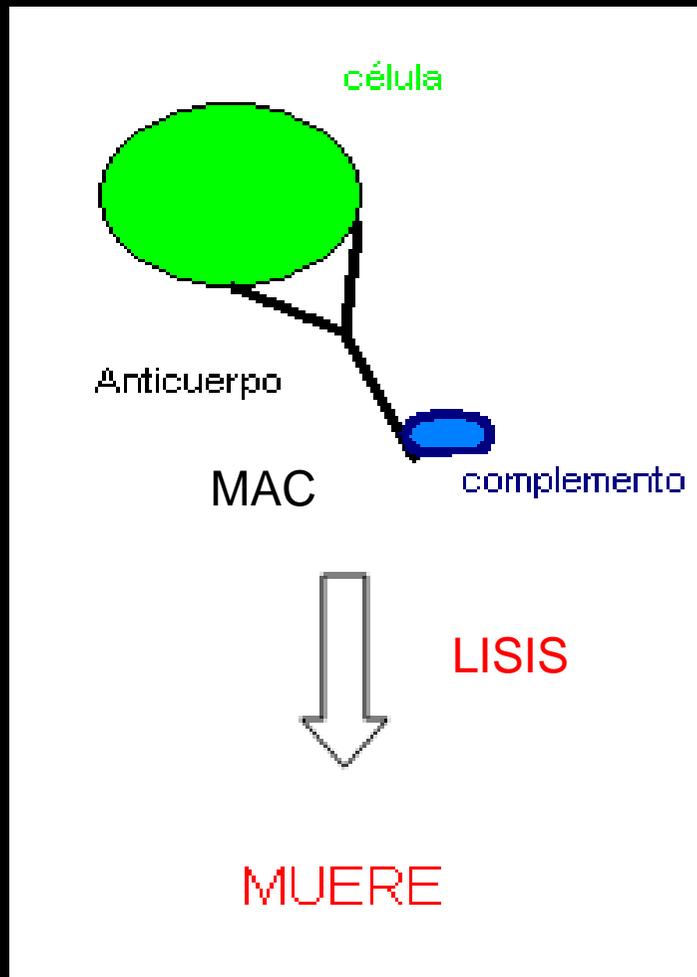


P: PLASMA

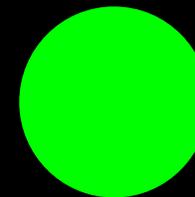
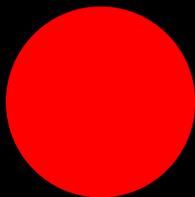
W: MONONUCLEARES

R: FICOLL +
ROJOS-PMN

- 8- Colocar en un tubo limpio y agregar 2 ml de PBS. Homogeneizar y centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos. Repetir el lavado.
- 9- El pellet del último lavado se resuspende en 50 µl de PBS y contar en cámara.
- 10- Colocar 10⁶ células en un tubo y centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- 11- Al pellet agregar 50 µl de CFDA (50 µg/ml en PBS). Incubar 15 minutos a 37°C en oscuridad.
- 12- Lavar con 2 ml de PBS. Centrifugar a 3500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
- 13- Agregar 20µl de suero (suero de paciente con anticuerpos anti- HLA). Incubar 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- 14- Lavar con 2 ml de PBS. Centrifugar a 3500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
- 15- Agregar 50µl de complemento. Incubar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
- 16- Agregar 50 µl de Bromuro de Etidio- EDTA.
- 17- Montar sobre porta y cubre con 1 gota de glicerina bufferada.
- 18- Observar en microscopio de Inmunofluorescencia.



BROMURO ETIDIO



CONCLUSION

La muerte celular es un indicador de especificidad común del antígeno y anticuerpo, constituyendo una prueba positiva.

Se utiliza como fuente de antígenos una suspensión de linfocitos y como fuente de anticuerpos suero.

Los linfocitos son obtenidos a partir de sangre periférica con el método de gradiente de densidad, utilizando Ficoll-Triyosom (densidad 1.077 g/ml), ajustando su concentración a 1×10^6 células .

Los linfocitos son incubados con el suero del paciente y con complemento procedente del conejo. Si el anticuerpo está presente, la adición del suero en presencia del complemento conduce a la lisis de los linfocitos. Esta se visualiza con un colorante (por ej., eosina). La valoración de los linfocitos lisados y vitales tiene lugar con un microscopio inverso de contraste de fases, óptico o con adaptación para inmunofluorescencia.

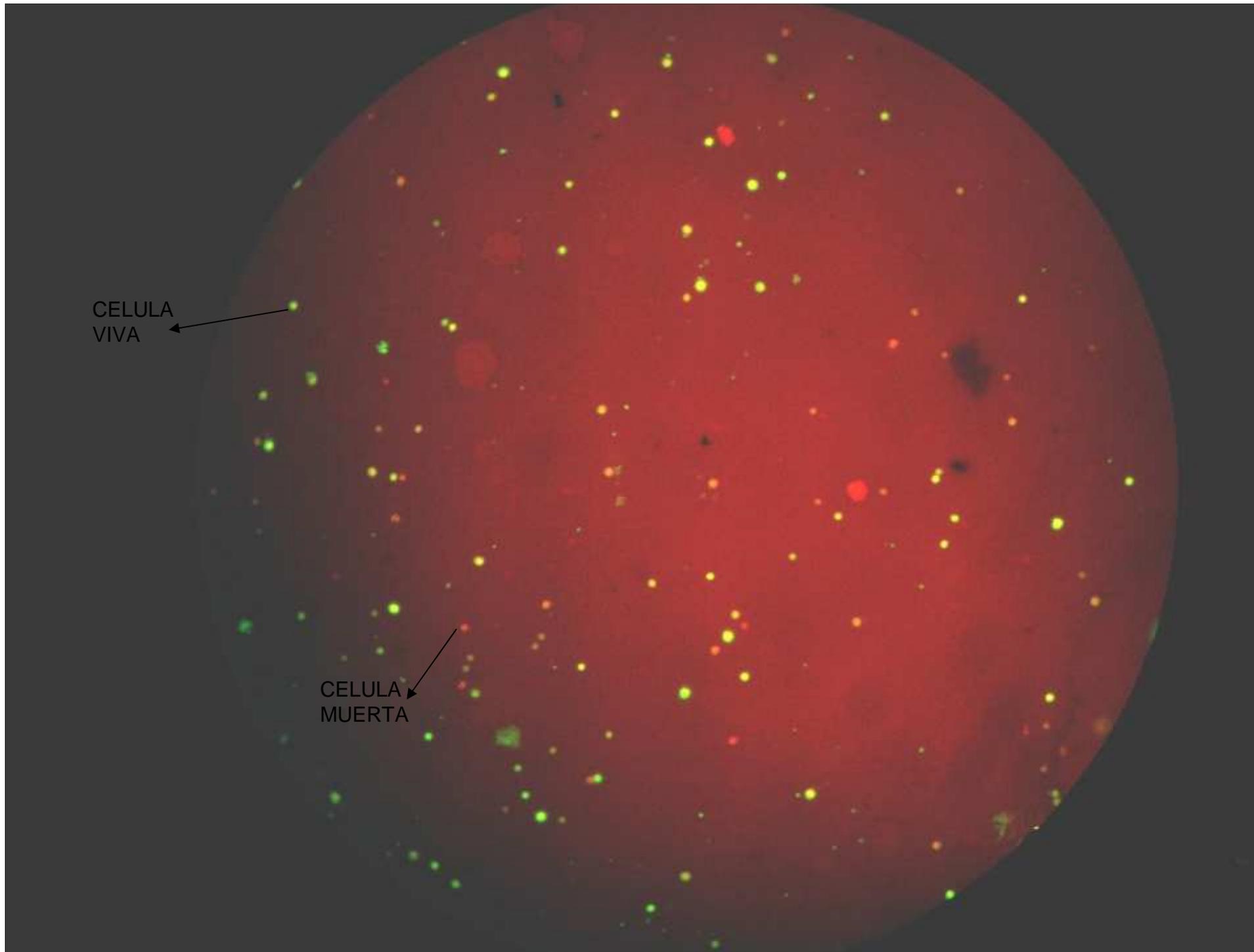
SI LA PRUEBA ES POSITIVA.... SE REALIZA EL TRASPLANTE????

NO!!!!!! Si se observa MAS DE 20% de célula muertas

SI!!!!!! Si se observa MENOS DE 20% de células muertas

CELULA
VIVA

CELULA
MUERTA



CITOTOXICIDAD Y OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO ÓPTICO

- (1 – 10) Se repiten los mismos pasos que se realizan en la determinación con microscopio de fluorescencia
- 11- Agregar 20 μ l del suero del paciente e incubar 45 minutos a temperatura ambiente.
 - 12- Lavar con 2 ml de PBS. Centrifugar a 3500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
 - 13- Agregar 50 μ l de complemento e incubar 60 minutos a temperatura ambiente.
 - 14- Agregar 50 μ l de azul de tripán
 - 15- Montar sobre porta y cubre.
 - 16- Observar en microscopio óptico común

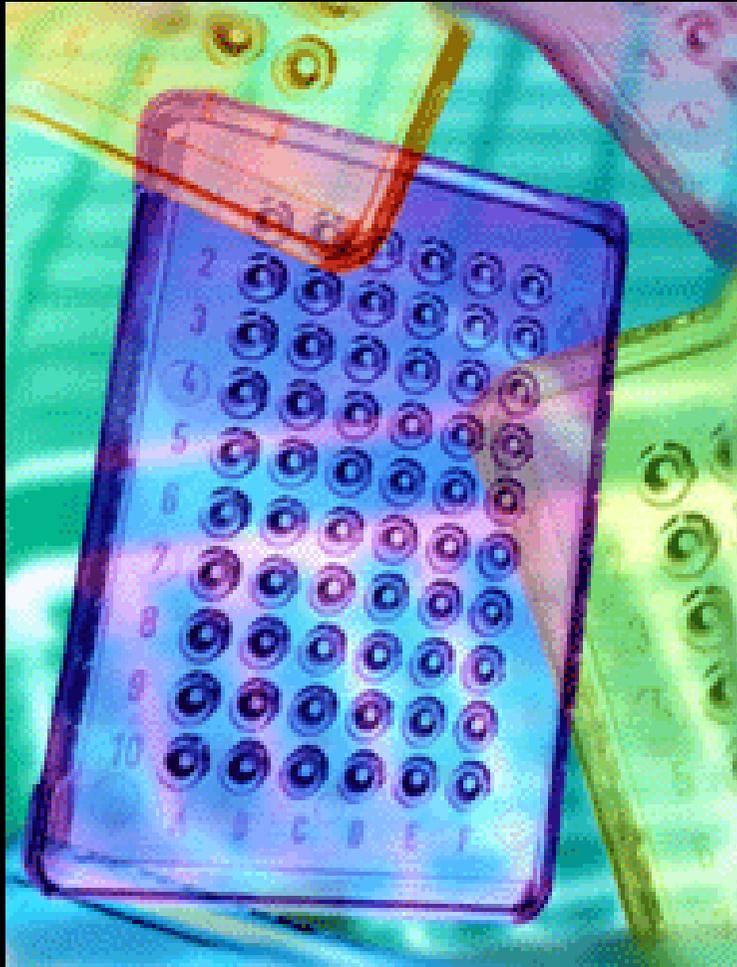


Linfocitos vivos

Linfocito muerto

10/11/2009

PLACAS DE TERASAKI



MICROSCOPIO CONTRASTE FASE



Gracias

