

## Gaceta Médica de México

Volumen  
Volume 139

Suplemento  
Supplement 3

Septiembre-Octubre  
September-October 2003

*Artículo:*

### Simposio innovaciones en inmunohematología

Derechos reservados, Copyright © 2003:  
Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

**Otras secciones de  
este sitio:**

- 👉 **Índice de este número**
- 👉 **Más revistas**
- 👉 **Búsqueda**

***Others sections in  
this web site:***

- 👉 ***Contents of this number***
- 👉 ***More journals***
- 👉 ***Search***



**Medigraphic.com**

## I. Introducción

Malva H. Mejía-Arreguí

La medicina transfusional ha sido revolucionada por diversas disciplinas, en particular por la genética la biología molecular y la inmunología, puede decirse que el primer gran salto se da cuando Landsteiner descubre el sistema ABO,<sup>1</sup> a partir de ese momento su desarrollo ha ido siempre en ascenso.

La demostración de los anticuerpos producidos por los pacientes contra los antígenos eritrocitarios y en general contra los antígenos sanguíneos son la base de la inmunohematología, se han buscado por ello las técnicas adecuadas para ponerlos en evidencia y así proporcionar a los pacientes una transfusión que no les cause perjuicio.

Uno de los grandes descubrimientos básicos en este sentido fue la reacción de Coombs que tiene un lugar muy importante en diversas áreas de la medicina y desde luego preponderante en la inmunohematología, aún algunas técnicas modernas siguen basándose en ese descubrimiento.<sup>2</sup>

El buen manejo de la reacción antígeno anticuerpo en inmunohematología implica conocer perfectamente los factores que la afectan como son: la constante de equilibrio de las reacciones, la influencia de la temperatura, del pH, del tiempo de incubación, de la fuerza iónica del medio, de las proporciones de antígeno y anticuerpo<sup>1</sup> etc.; así como de los factores que pueden inhibir, aumentar, o deshacer dicha reacción. El jugar sabiamente con todos estos elementos nos facilita el ayudar a los pacientes en su diagnóstico o en su soporte transfusional.

Como ya mencionamos la prueba de antiglobulina humana fue un descubrimiento básico con una amplia aplicación hasta nuestros días, en 1945 Coombs, Mourant y Race<sup>2</sup> describieron los procedimientos para detectar los anticuerpos que no producían aglutinación.

El antisuero mayormente utilizado en esta técnica es

el poliespecífico que contiene anticuerpos contra IgG y contra C3d humanos, pueden contener también anti C3b, anti C4b y anti C4d, su papel en la mayoría de los procedimientos es la detección de IgG, la actividad anticomplemento tiene mayor importancia en el estudio de las anemias hemolíticas autoinmunes, ya que en algunos pacientes lo único detectable sobre los eritrocitos es el C3d. Los reactivos monoespecíficos son útiles para caracterizar a las proteínas que están cubriendo a los eritrocitos, de tal manera que nos ayudan a distinguir los patrones de reactividad en los casos en que un suero contiene tanto anticuerpos activadores de complemento, como aquellos no activadores de complemento.<sup>3</sup>

Otro elemento primordial en el avance del diagnóstico adecuado de los pacientes ha sido el uso de paneles de eritrocitos de fenotipo conocido, que permiten identificar la especificidad de los anticuerpos encontrados, de tal manera que nos facilita la búsqueda de sangre adecuada para los pacientes haciendo uso del conocimiento de la frecuencia antigénica en las diferentes poblaciones nos permite planificar una búsqueda exitosa de sangre compatible.<sup>4</sup>

Además de los aspectos básicos que aquí hemos mencionado someramente se han buscado nuevas tecnologías para detección de reacciones antígeno anticuerpo, tal como las pruebas de adherencia en fase sólida en las que se inmoviliza el antígeno o el anticuerpo en una microplaca, aglutinación en columna en las que se usa una pequeña columna cargada con un medio de separación, en la parte superior de la columna se lleva a cabo la reacción entre el suero y los eritrocitos y al pasar las células a través de la columna después de centrifugación se separan las células no aglutinadas de las aglutinadas, en algunas pruebas se incluye antisueros dentro del medio

de la columna de tal manera que puede realizarse la prueba de antiglobulina humana o bien utilizarse para realizar el fenotipado de los eritrocitos, estos métodos fueron desarrollados gracias a los estudios de Lapiere en 1986;<sup>3,5</sup> otra tecnología que se ha desarrollado en relación con la anterior ha sido la automatización de la detección de reacciones antígeno anticuerpo para inmunohematología, la inmunofluorescencia se esta usando con citometría de flujo para la detección de hemorragia fetomaterna, para medir niveles muy bajos de IgG unida a las células y para distinguir la expresión de antígenos sanguíneos homocigotos y heterocigotos<sup>6</sup> entre otras muchas aplicaciones; también se ha usado en radioinmunoensayo, las pruebas de ELISA y la inmovilización específica de antígenos eritrocitarios por anticuerpos monoclonales, MAIEA por sus siglas en inglés, esta metodología ha sido utilizada para aislar estructuras específicas de la membrana que permiten realizar estudios de antígenos de grupos sanguíneos.<sup>3</sup>

Hemos comentado las tecnologías más conocidas entre las que no debemos perder de vista las bondades y

limitaciones de las técnicas básicas y preguntarnos porque nos hemos detenido, si es que ha si ha sido como lo discutirá con su agudo estilo el químico Javier Bautista, sin embargo aún se abre un panorama mucho mas amplio como nos comentara en doctor George Garratty que permitirá un desarrollo aún mayor de la Inmunohematología.

## Referencias

1. **Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M.** Blood transfusion in clinical medicine. Oxford UK: Blackwell Scientific Publications; 1993.
2. **Coombs RRA, Mourant AE, Race RR.** A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. Br J Exp Pathol 1945;26:255-266.
3. **Brecher ME.** Technical Manual. American Associations of Blood Banks. Bethesda MD, USA. 2003.
4. **Quintanar-García E.** Uso del panel de eritrocitos de fenotipo conocido. Experiencia nacional, En Memorias 35 aniversario Banco Central de Sangre del CMN Siglo XXI. Rodríguez MH, Mejía A MH, Novelo GB, Escobar H ML, Hernández CT, Rivera RL México: IMSS;1997.
5. **Lapiere Y, Rigal D, Adam J et al.** The gel test: anew way to detect red cell antigen-antibody reactions. Transfusion 1990;30:109-13.
6. **Garratty G, Arnt P.** Applications of flow cytofluorometry to transfusion science. Transfusion 1994;35:157-178.

## II. Diagnóstico

# inmunohematológico por biología molecular en México. ¿Por qué nos hemos detenido?

Javier Bautista-Juárez

La biología moderna se basa en el conocimiento de las moléculas internas de las células y de las interacciones que permiten construir organismos multicelulares. La totalidad de los conceptos de la biología celular molecular derivan en el presente de experimentos, y en forma constante se desarrollan poderosas herramientas experimentales que permiten el estudio de las células y los organismos vivos con resolución creciente. En la actualidad en varios países, y con subsidios empresariales y gubernamentales, los investigadores se han embarcado en una carrera con el objetivo de crear nuevos descubrimientos y tecnologías; como descifrar la secuencia del genoma humano, crear la bioinformática, crear maquinarias multiproteicas para la síntesis de macromoléculas, etcétera.<sup>1</sup> En nuestro país, sin embargo, los trabajos o protocolos de investigación en cuanto la medicina transfusional, solo son en la mayoría de los casos, para ratificar la funcionalidad o validación que ya se han

realizado a ciertos productos y/o equipos en su lugar de origen, por lo que solo se repiten procedimientos. Lo anterior nos muestra que la unificación de criterios, mal llamada *globalización*, en esta rama de la Medicina no ha sido tan efectiva en nuestro medio, ya que nos ha orillado a copiar protocolos de trabajo de otros lugares, a consumir y utilizar exactamente sus reactivos y equipos, lo cual no es malo pero tampoco muy bueno, ya que nos ha imposibilitado a crear las necesidades de nuestra población tecnológico-económicas y el poder aplicar nuestras ideas de innovación para la investigación. Por lo cual trataré de ampliar desde mi punto de vista algunos de los puntos que podemos atacar para facilitarnos el diagnóstico o resolución de problemas relacionados con la inmunohematología y que espero nos deje sacar mas ideas que le den mayor calidad a nuestro trabajo, además de abrírnos a las Universidades y Tecnológicos que cuentan en muchos de los casos con la tecnología,

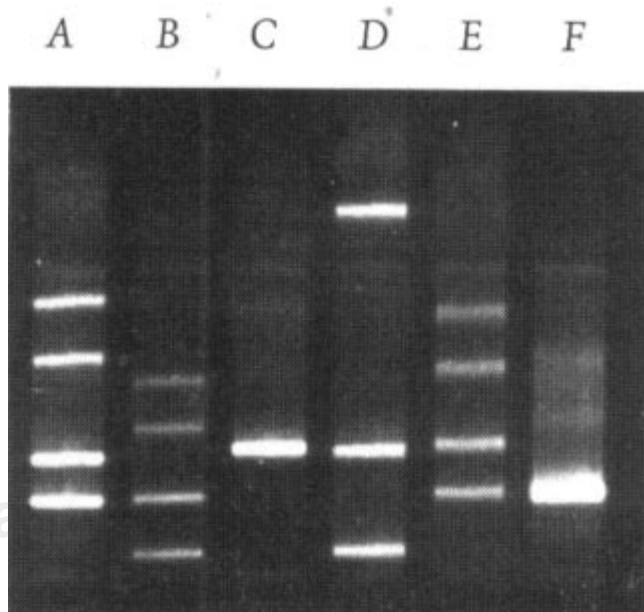
procesos y testistas que conocen en algunos casos equipos y reactivos que en los bancos de sangre no se cuentan. Otro grupo que debemos de allegarnos sin lugar a dudas son las empresas productoras de equipos y reactivos que deben de interesarse por los nuevos procesos.

El impacto en el desarrollo de la tecnología en la biología celular, la genética, la inmunología y la biología molecular han ayudado en el diagnóstico y tratamiento de ciertos padecimientos relacionados con estas ciencias,<sup>2</sup> además de dar más armas y abrir los campos de la investigación concernientes a varias áreas de la medicina como sería la Medicina Transfusional. Esta se ha convertido en un campo multidisciplinario al cual se va incorporando los más recientes desarrollos tecnológicos que desafían a las metodologías clásicas actualmente en uso, por ejemplo: La combinación de técnicas como es la de PCR alelo específicas; ha permitido establecer genotipos y dilucidar los mecanismos molecular involucrados en la diversidad de grupos sanguíneos como son las mutaciones puntuales; En la predicción de la EHRN tomando el binomio de madre portadora de un anticuerpo circulante y la determinación del genotipo del antígeno correspondiente en el DNA del feto, éste se puede obtener de diferentes formas; la producción de inmunoglobulinas por tecnología con hibridomas. Otro aspecto en la aplicación de la tecnología recombinante es la producción de antígenos eritrocitarios mediante transfección, reactivos aplicables en la detección de anticuerpos circulantes. No es de dudar que en un futuro próximo se produzca un panel de antígenos recombinantes.<sup>3-5</sup>

Es importante antes que nada mencionar a los grupos que trabajan en México aplicando la biología molecular y su tecnología como punta de lanza para sus investigaciones; Baptista y colaboradores en el Instituto Nacional de Perinatología con su trabajo de los Antígenos del Sistema Rh en el humano y animales con genes relacionados y no relacionados; La Facultad de Medicina de UNAM campus Ciudad Universitaria, en el área de investigación con el estudio de delecciones de los antígenos A,B del Sistema ABO en la población de la ciudad de México. Grupos que han sacado a la luz sus trabajos con la gran importancia de aplicarlos a la población Mexicana.

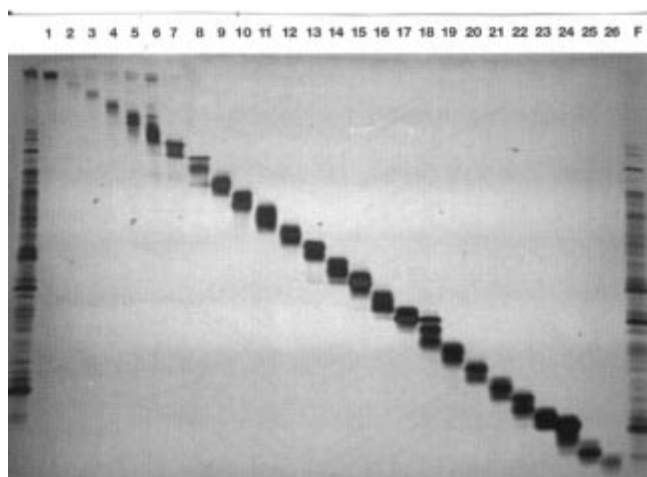
Relacionando ahora a todas las ciencias que engloban a la Biología molecular con la Inmunohematología, podemos analizar cuidadosamente algunos puntos que pueden ser ampliados o modificados que junto con las nuevas tecnologías relacionadas con la biología molecular han aparecido sean un arma de mejora en la medicina transfusional y que puedan ayudar a los grupos interesados en la investigación y/o producción de moléculas o equipos allegados a la inmunohematología que además sean de interés para nuestra población se sugiere lo siguiente.

- En cuanto a la citometría de flujo, la utilización de anticuerpos monoclonales para la detección de Grupos débiles del sistema ABO, demostrado en nuestra población tener una gran importancia y que en ninguna parte del mundo se ha reportado el resultado encontrado. El estudio de las reacciones transfusionales con anticuerpos monoclonales que nos ayuden a distinguir entre reacciones por plaquetas, eritrocitos, leucocitos o proteínas plasmáticas y que es una práctica común en países del llamado primer mundo y cuyo único reactivo especial para utilizarse es suero anti-IgG monoespecífico y que en la pantalla de la computadora nos marcará todas las células sanguíneas separadas pero nos marcará a las que tienen al anticuerpo pegado, lo cual nos ayudara a diferenciar el tipo de reacción ocurrido en el paciente sobre todo en el caso de reacciones transfusionales inespecíficas, con *Coombs* directo negativo, y/o que en la búsqueda de anticuerpos irregulares el resultado sea negativo. Y en el caso de sospechar de algún anticuerpo en especial se debería de contar con este anticuerpo monoclonal para poderlo detectar, el cual podría producirse como se indica en el siguiente punto o se podría mandar a las empresas dedicadas a la citometría de flujo.
- La tecnología de hibridación para la producción de anticuerpos monoclonales, puede aplicarse para la producción de anticuerpos difíciles de conseguir ya sea por su precio o por su traslado de otro país, como los anti-Diego obligatorio tenerlo en los bancos de sangre de alta especialidad; los anti-Gerbich que ahora se han presentado en número considerable en nuestra pobla-



Life Science Research Products. BIORAD Laboratories, inc. CA, USA; Illustrations: 2002-2003.

ción y que se han tenido que maquilar al extranjero para su confirmación; la producción de antisueros anti-A, anti-B, anti-A,B y anti-D los cuales en el IMSS se era casi autosuficiente, y que en el instituto se gastan grandes cantidades para su consumo; la producción de anticuerpos antitumorales que se puedan utilizar como neutralizantes en sueros de pacientes oncológicos y que nos eviten los resultados falsos positivos en los rastreos de anticuerpos. Además de la producción de anticuerpos monoclonales especiales para la citometría de flujo que no se producen normalmente por las casas dedicadas esto.



Life Science Research Products. BIORAD Laboratories, inc. CA, USA; Illustrations: 2002-2003.

- La tecnología de columna con hibridación de anticuerpos monoclonales, para la producción de anticuerpos para la purificación de células progenitoras hematopoyéticas en el trasplante de médula ósea alogénico o autólogo con anticuerpos anti-CD34 o anti-tumorales tecnología necesaria para el éxito del trasplante ayudando a disminuir el rechazo injerto contra hospedero y en el caso del trasplante autólogo disminuir las recaídas. Tecnología que en la actualidad solo cuenta el Hospital Infantil de México y existen ya varios centros que trabajan con este tipo de células.
- Crear los equipos necesarios para la detección del anticuerpo de chagas y su prueba comprobatorio, importante para nuestro territorio nacional, y que en la actualidad se compra conteniendo cepas diferentes a las de nuestro territorio, creando por Biología Molecular mezclas de antígenos de diferentes cepas para el aseguramiento de un resultado ideal.

- Combinando la transferencia recombinante (transfección) y la electroforesis se ayudaría a crear un *panel de antígenos* en tiras reactivas que tendrían una caducidad muy larga y se podría conservar antígenos de alta o baja frecuencia sin tantos problemas de almacenaje utilizando para la detección de anticuerpos no frecuentes de detectar en los paneles comunes o mezclas de anticuerpos difíciles de descifrar utilizando para esto una técnica de detección semejante a la que se utiliza para la determinación por WB, teniendo por lo tanto mejor resolución y especificidad de lo encontrado. Esta tecnología nos ayudaría a diagnosticar mezclas de anticuerpos que normalmente con las técnicas actuales ya sea en tubo o en gel esto es más subjetivo.

Para todos estos procesos además de un equipo de investigación adecuado y que camine a la par de las necesidades de una banco de sangre y de células progenitoras hematopoyéticas, es necesario el tener la ayuda de las industrias (casas comerciales) interesadas en crear nuevos proyectos que les den un rango y confianza ante los clientes nacionales e internacionales y/o además el empezar a tener convenio de ayuda mutua con las Universidades las cuales como se marco inicialmente tienen los equipos que normalmente no manejamos en bancos de sangre, la capacitación para su uso, alumnos dispuestos a realizar sus tesis o servicio social en este tipo de proyectos y el hambre de aprender y enseñar. Los convenios con las Universidades en un punto importante para trabajar, ya que en México es casi nula la relación de las Instituciones-Universidades que integren a los profesionales-investigadores que se dediquen a la Medicina Transfusional en especial a la Inmunoematología. Por lo que un punto importante y que se debe de seguir apoyando es la Capacitación y la Enseñanza la cual nos ayudara a abrir nuestras mentes para relacionar otros estudios interpolándolos a nuestras necesidades. Ya que cuando el hombre tiene más preguntas que respuestas esta listo para crear investigar y producir.

## Referencias

1. **Lodish H.** Biología celular y molecular. Prefacio. España: Editorial Médica Panamericana: 2002.
2. **Mayani H.** Impacto de las ciencias básicas en la hematología actual. *Gac Med Mex* 2000;136:139-142.
3. **Escamilla G.** Biología molecular en banco de sangre. *Gac Med Mex* 2002;138:159-160.
4. **Anstee DJ, Carron JP.** Toward an understanding of red cell surface In: Garraty G, editor *Applications of molecular biology to blood transfusion medicine*. AABB; 1997.
5. **Harrison CR.** Technologic advances and future trends in blood banking. *Modern blood banking and transfusion practices* 27:496-515.

### III. Applications of flow cytometry to immunohematology

George Garratty

**Detection and Quantitation of RBC-Bound Proteins (e.g., IgG, IgG subclasses, IgM, IgA, C3):** FC is usually no more sensitive than the antiglobulin test (AGT), but in special situations it can detect RBC-bound IgG or IgM when the AGT fails. RBC-bound IgM can be particularly difficult to detect by the direct AGT (DAT), but is easily detected by FC where sensitization, not agglutination, is the endpoint. FC can be used to quantitate RBC-bound immunoglobulins. Garratty and Nance showed that D+ RBCs sensitized with different amounts of anti-D, so that the RBCs all reacted strongly by routine (test tube) AGT (4+) could be differentiated using FITC anti-IgG and FC. Thus, FC has the advantage over serology of making quantitative differences clearer. The number of IgG molecules per RBC can be calculated from a standard curve using IgG-coated beads of known concentrations. Using FC, Van der Meulen et al found a quantitative threshold for IgG-mediated in vivo RBC destruction, but this could not be confirmed by Garratty and Nance when a larger group of patients was studied.<sup>1</sup>

**Detection and Quantitation of RBC Antigens:** FC has been used to study a number of blood group antigens. Studying ABH antigens on RBCs can be technically difficult due to the strong agglutination caused by anti-A and anti-B. Such agglutination can be avoided by chemically pretreating the RBCs and/or can be dispersed by mechanical means. FC has been used to show the variation in antigen strength on RBCs of differing phenotypes (e.g, increasing D antigen strength on DCcee [R1r], DccEE [R2R2], and the rare -D- RBCs), and for quantitating antigens on RBCs.

**Detection and Quantitation of RBC Antibodies:** FC can be used to quantitate antibody in serum. The serum antibody is incubated with antigen positive RBCs and the amount of IgG on the RBCs is then determined by the addition of a fluorochrome-labeled anti-IgG. When D+ RBCs are incubated with different amounts of anti-D, then FITC anti-IgG, and analyzed by FC, a clear quantitative difference in the amount of anti-D on the RBCs (and thus the amount of anti-D in the serum) can be seen. In pregnant women with anti-D, the amount of anti-D is determined in the U.S. by titration using the AGT. The result of this testing (e.g., titer) determines whether a woman should have an invasive test (e.g., amniocentesis) to assess whether the fetus is affected by hemolytic disease of the newborn. In

Europe, the amount of anti-D is quantitated in international units (IU) using an AutoAnalyzer and a standard anti-D curve. More recently, Europeans have been evaluating FC methods as alternatives to the AutoAnalyzer method.<sup>2</sup>

**Detection and Quantitation of Minor RBC Populations:** FC is an efficient method for studying minor cell populations. Because each cell is analyzed individually, those with different levels of fluorescence can be differentiated and quantitated.

■ **Fetal-maternal hemorrhage (FMH) detection and quantitation:** It is important to be able to detect and quantitate a FMH > 15 mL (~ 0.6%) fetal blood so that the appropriate dose of Rh immune globulin (RhIG) can be administered (in the U.S., one 300-(g dose covers a 15 mL fetal bleed). The rosetting method is a sensitive means for detecting an FMH but a quantitative method must then be used. The commonly used Kleihauer-Betke acid elution method for quantitating an FMH is subjective and has poor reproducibility. A number of papers have described methods using FC to quantitate FMH. The methods that have been used involve labeling fetal D+ cells with a fluorescent-labeled anti-D by either a direct or indirect method, or labeling fetal hemoglobin with FITC anti-HbF. The anti-D method is only useful when there is a D antigen difference between the mother and fetus. In contrast, the anti-HbF method could be used in quantitating a fetal bleed in a trauma case where there may not be a difference in D antigen typing between the mother and fetus. The anti-HbF method requires that the RBCs be permeabilized (using glutaraldehyde and Triton X-100) so that the antibody can have access to the intracellular HbF, and is commercially available as a kit. Both the anti-D and anti-HbF methods of FMH quantitation have been shown to have good sensitivity, precision, and accuracy. The correlation with Kleihauer-Betke results also have been good, although it has been noted in several publications that FC results by the anti-D method tend to be lower than acid elution results. Hereditary persistence of HbF in adult cells can be the cause of falsely elevated results by the acid elution methods, but the FC anti-HbF method can differentiate these cells from fetal RBCs (the adult RBCs with hereditary persistence of HbF are less fluorescent than fetal cells).

- **Detection and Quantitation of Genetic Chimerism and Mosaicism:** Some rare individuals have two populations of cells. Genetic chimeras are twins who shared blood-forming tissue in utero. Cellular mosaicism can occur when a somatic mutation occurs in a stem cell (e.g., the Tn antigen) or in carrier females of X-linked genes (e.g., the Xk locus, which is associated with weak expression of Kell antigens [McLeod phenotype]) due to the Lyon phenomenon of X chromosome inactivation. By FC, the two populations can be clearly differentiated and quantitated, e.g., a chimeric blood donor whose RBCs showed mixed field agglutination with anti-B could be shown, using FC, to have a minor population (35%) of B, Fy(a-), Jk(b-) RBCs and a major population (65%) of O, Fy(a+), Jk(b+) RBCs. An FC study on RBCs from 12 female carriers of the McLeod phenotype showed the proportion of RBCs with depressed Kell antigens to vary from 8-82% in the different women.
- **Detection and Quantitation of Transfused RBCs (RBC survival studies):** FC has been used to follow the survival of transfused RBCs. Usually this involves following an antigen that is present on the transfused RBCs and not present on the recipient's RBCs, although the opposite approach has also been used. Samples are collected from the patient's pre-transfusion and at different times post-transfusion, and the percentage of transfused RBCs is determined. The sensitivity of the assay depends upon the strength of the antigen and antibody that are being studied; not all antigens are good choices to be studied. In one case, two-color fluorescence was used to differentiate RBCs with acquired B antigen from RBCs with genetically determined B antigen, and to follow the survival of these RBCs in a patient suffering from an ABO hemolytic transfusion reaction. 13FC also has been used to follow the survival of a small aliquot of transfused RBCs (e.g., 10 mL), similar to survival studies performed with 51Cr-labeled aliquots of RBCs.  
3
- **Phenotyping Recipient's RBCs (Reticulocytes) Following Transfusion:** It is difficult to determine a patient's true phenotype when transfused RBCs are present. Most approaches involve physical separation of younger (recipient's) RBCs from older (transfused and recipient's) RBCs using centrifugation with and without density gradients. These methods are labor intensive, subjective, not reliable and require a significant amount of sample. Griffin et al described a two-color method using FC to phenotype recipient RBCs following transfusion. Thiazole orange (a green fluorochrome) was used to label reticulocytes and phycoerythrin (an orange-red fluorochrome) was used in an indirect method to label the antigen of interest. Antigen positive reticulocytes would fluoresce red and green and antigen negative reticulocytes would

fluoresce only green; no physical separation of cells is necessary. Their in vitro and in vivo data showed that this method could be performed successfully with most antibodies and their limit of detection was 0.3% reticulocytes. As with any of the methods used to type reticulocytes, it is important to wait 48-72 h after transfusion to perform the typing so that the transfused reticulocytes have time to mature.

- **Detection and Quantitation of Chimerism Associated with Bone Marrow Transplantation:** There are a number of methods that have been used to follow bone marrow transplant (BMT) engraftment. Methods that involve DNA are preferred because they are not affected by transfusion, but agglutination and FC methods have been used to follow the disappearance and appearance of RBC antigens on the recipient's and transplanted donor's RBCs, respectively. Single-color and two-color, direct and indirect FC methods have been used by different investigators. A sensitivity level of 0.1% could be reached using a two-color indirect method. FC was found to be particularly useful in differentiating the presence of a relapse in a group A1 patient who had received an O bone marrow transplant from the phenomenon of soluble plasma antigen uptake. This phenomenon of uptake of A or B plasma antigens onto O RBCs has been noted in A and B recipients of O transfusions or BMTs and in ABO chimeras. The patient was typed as group O 1 month post-transplant, but 3-4 months later the patient's RBCs were reacting weakly with some monoclonal and polyclonal anti-A and anti-A,B. FC was used to determine whether the patient was having a relapse (i.e., a chimera) or whether soluble A antigen had been taken up by his O RBCs and was being detected. The patient's RBCs were incubated with anti-A and FITC anti-Ig. If the patient were having a relapse, then a small population of brightly fluorescent A cells would have been detected. If the transplanted O cells had taken up small amounts of soluble plasma A antigen, then all cells would be shown to be weakly fluorescent (similar to what is seen when testing weak A subgroup RBCs). FC testing showed weak fluorescence of this patient's RBCs, thus confirming uptake of A antigen onto the transplanted O RBCs.

## References

1. Garratty G, Arndt P. Applications of flow cytometry to transfusion science. *Transfusion* 1995;35:157-178.
2. Freedman J, Lazarus AH. Applications of flow cytometry in transfusion medicine. *Transfus Med Rev* 1995;IX:87-109.
3. Garratty G, Arndt PA. Applications of flow cytometry to red blood cell immunology. *Cytometry* 1999;38:259-267.