

Άμεση και Έμμεση Coombs

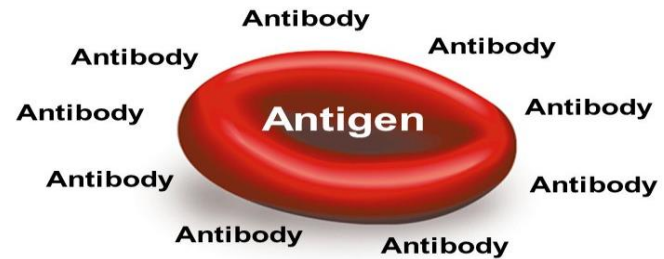


Παπέ Μαγδαληνή
Βιοπαθολόγος-Επιμελήτρια Α΄
Κέντρο Αίματος ΑΧΕΠΑ

Βασική Ανοσοαιματολογία

Η Ανοσοαιματολογία μελετά τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα και τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα καθώς και τις μεταξύ τους αντιδράσεις.

The Families of Blood



Antigen on the Red Blood Cell Membrane
Antibodies in the Plasma



ΑΣΦΑΛΗΣ ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ

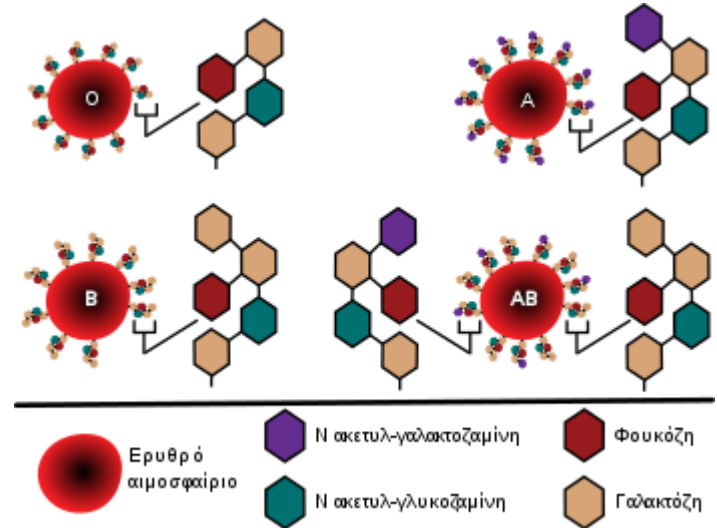
Πρόληψη

Ανεπιθύμητων Αντιδράσεων / HDN

Βασικές έννοιες - ερυθροκυτταρικά αντιγόνα

Αντιγόνο: οποιαδήποτε ουσία μπορεί να προκαλέσει τη δημιουργία αντισώματος:

- Πρωτεΐνες
- Υδατάνθρακες
- Γλυκοπρωτεΐνες
- Λιπίδια
- Λιποπρωτεΐνες



Η αντιγονική ή ανοσογόνα δράση των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων αποτελεί λειτουργική ιδιότητα, η παρουσία της οποίας εξαρτάται τόσο από το ίδιο το αντιγόνο όσο και από τις γενικότερες συνθήκες του βιολογικού συστήματος, που έρχεται σε επαφή:

- Ιδιότητα του ξένου
- Χημική δομή - Μοριακό μέγεθος
- Στερεοχημική διαμόρφωση
- Φορτίο - Διαλυτότητα
- Δόση χορήγησης
- Γενετικοί παράγοντες



Βασική Ανοσοαιματολογία

Αντίσωμα: χημική ουσία που παράγεται από τα Β λεμφοκύτταρα και συμμετέχει στο ανοσιακό σύστημα του οργανισμού αναγνωρίζοντας μόρια «ξένα» προς τον οργανισμό με σκοπό την καταστροφή τους

▶ «Φυσικά» αντισώματα (πχ. ABO)

▶ Ευαισθητοποίηση μέσω της επαφής με αντιγόνα του περιβάλλοντος (βακτήρια, μύκητες, κτλ) που προσομοιάζουν στη χημική δομή αντιγόνων των ερυθρών αιμοσφαιρίων

▶ Εστιάζουμε στην ανίχνευση «μη αναμενόμενων» αντισωμάτων

▶ Ευαισθητοποίηση μέσω:

▶ Μετάγγισης

▶ Εγκυμοσύνης

▶ Μεταμόσχευσης

αλλοαντισώματα

+

αυτοαντισώματα

▶ Παθητική μεταφορά αντισωμάτων μέσω ενδοφλέβιας χορήγησης παραγώγων αίματος που περιέχουν πλάσμα ή μέσω του πλακούντα από τη μητέρα στο έμβryo

Βασικές έννοιες - αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα

ΘΕΡΜΑ

Αντιδρούν σε 37°C

IgG

Μετά από έκθεση

Συγκολλούν ερυθρά παρουσία AHG

Προκαλούν αιμολυτική νόσο εμβρύου-νεογνού

Προκαλούν αιμολυτική αντίδραση μετά από μετάγγιση

Διαπερνούν τον πλακούντα

Κλινικά σημαντικά

ΨΥΧΡΑ

Αντιδρούν < 37°C

IgM

Φυσικά

Συγκολλούν ερυθρά σε διάλυμα φυσ. ορού

ΔΕΝ προκαλούν αιμολυτική νόσο εμβρύου-νεογνού*

ΔΕΝ προκαλούν αιμολυτική αντίδραση μετά από μετάγγιση*

Δεν διαπερνούν τον πλακούντα

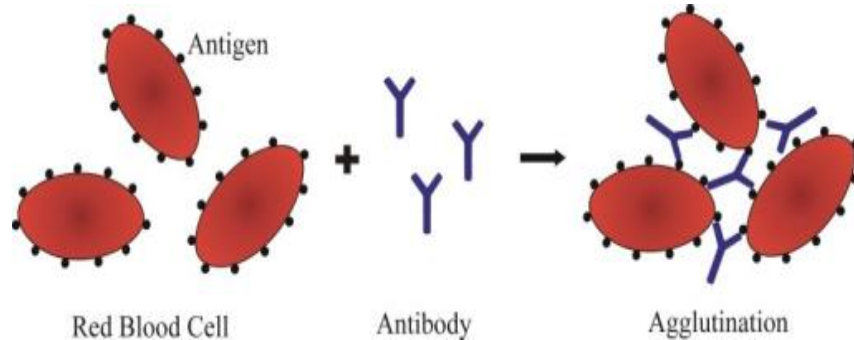
Κλινικά ΜΗ σημαντικά*

* εξαιρέσεις, πχ: ABO

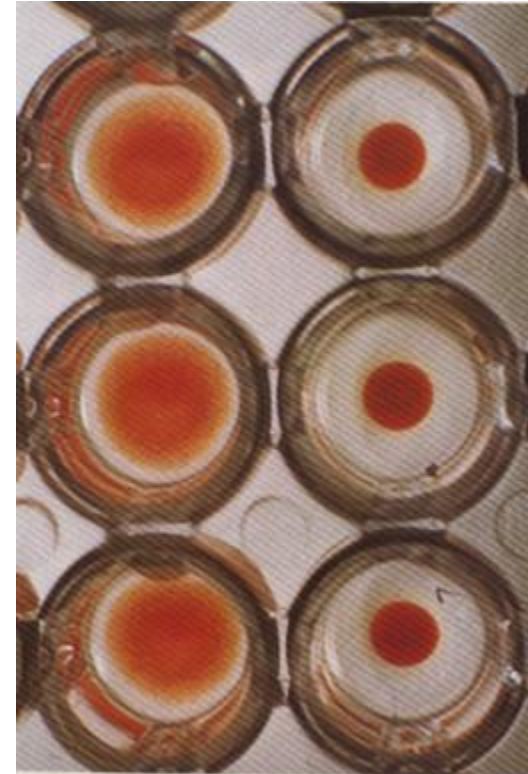
Αντίδραση αντιγόνου αντισώματος

Αιμοσυγκόλληση Ανάγνωση αποτελέσματος

1



- είδος ανοσοσφαιρίνης
- αναλογία αντιγόνου αντισώματος
- φυγοκέντρηση
- θερμοκρασία-pH
- ενισχυτικά μέσα

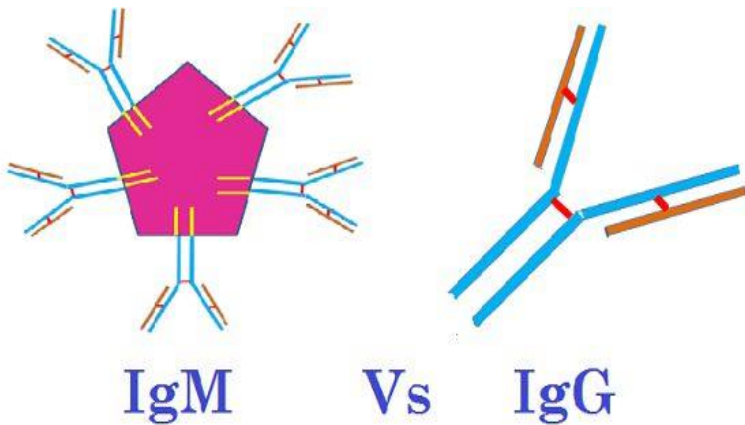


Hemolysis

2

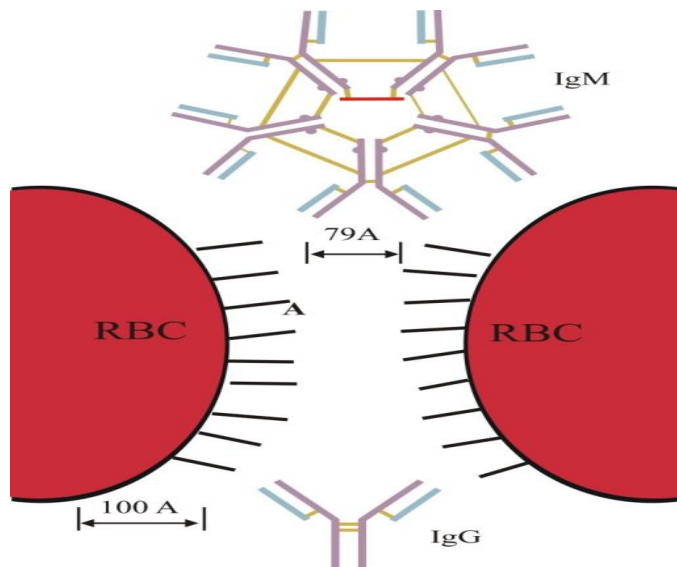


Ανοσοσφαιρίνες IgM / IgG



IgM

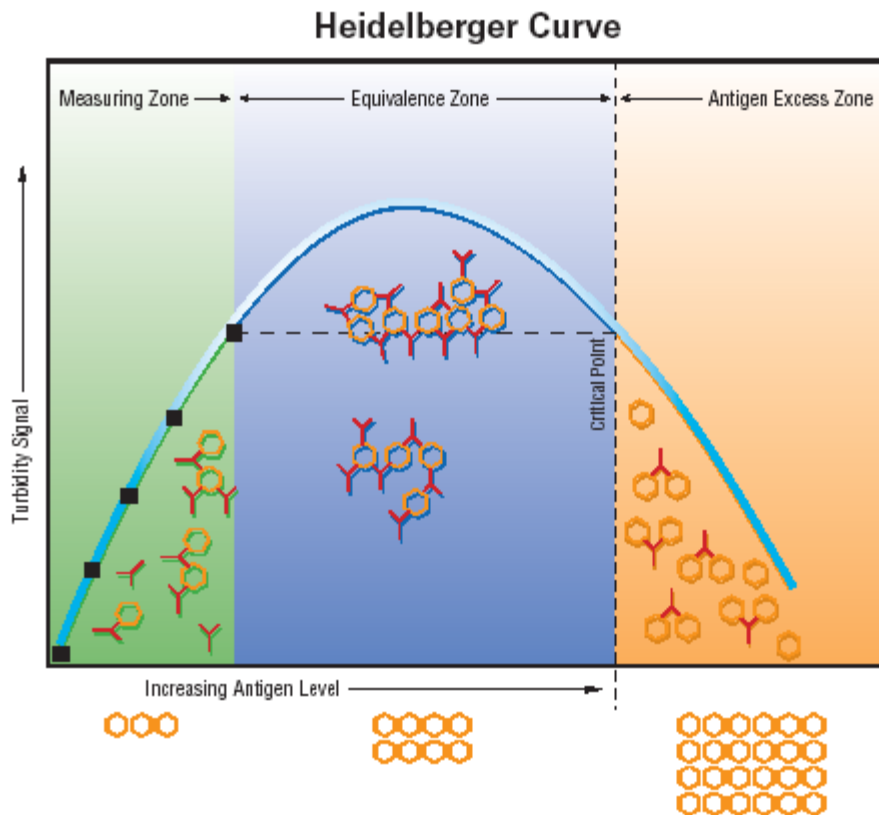
- Πενταμερές μόριο
- Διαθέτουν 10 θέσεις σύνδεσης
- Το μεγάλο μέγεθος διευκολύνει να συλλαμβάνουν δύο ή περισσότερα ερυθρά και να τα συγκολλούν.
- Μεγάλο εύρος θερμικής δράσης, αφού μπορούν να δράσουν σε θερμοκρασία 4°C (γι' αυτό το λόγο ονομάζονται ψυχροσυγκολλητίνες), σε θερμοκρασία 20°C, αλλά και σε θερμοκρασία 37°C.
- Καλούνται **πλήρη (complete)**, αφού μπορούν να προκαλούν συγκόλληση των ερυθρών χωρίς να χρειάζεται αντισφαιρινικός ορός.



IgG

- Διαθέτουν μόνο δύο θέσεις σύνδεσης με το αντίστοιχο αντιγόνο, με συνέπεια να έχουν τη δυνατότητα απλώς να ευαισθητοποιούν τα ερυθρά συγκολλώντας πάνω τους, χωρίς όμως να μπορούν να προκαλέσουν τη συγκόλληση τους.
- Καλούνται **''ατελή'' (incomplete)**, διότι η συγκόλληση των ευαισθητοποιημένων με IgG ερυθρών, επιτυγχάνεται μόνο μετά από επώαση στους 37°C παρουσία **''ενισχυτικού μέσου''** και προσθήκη αντιδραστήριου που περιέχει αντισώματα έναντι των IgG και/ή έναντι του C3d.

Αναλογία αντιγόνου αντισώματος



The Antibody Excess Zone:
The amount of precipitate increases as more antigen is added. The supernatant still contains free antibody.

The Equivalence Zone:
Maximum precipitation occurs. The supernatant contains neither free antigen nor free antibody at the peak of the curve.

The Antigen Excess Zone:
Due to high antigen concentration, the formation of small soluble immune complexes is favored rather than real precipitate. When insufficient amounts of antibody are available to bind with antigen, an erroneously low result can occur. Therefore, it is imperative that each assay system have some way to flag or test for antigen excess.

Ιδανικές συνθήκες αντίδρασης αντιγόνου/αντισώματος απαιτούν **ισοδύναμες** συγκεντρώσεις αυτών.

Περίσσεια αντισώματος οδηγεί στο φαινόμενο της προζώνης ενώ το αντίθετο στο φαινόμενο της μεταζώνης.



Ψευδώς αρνητικές ή ασθενώς θετικές αντιδράσεις



☀️ **Ασθενής έκφραση αντιγόνων**

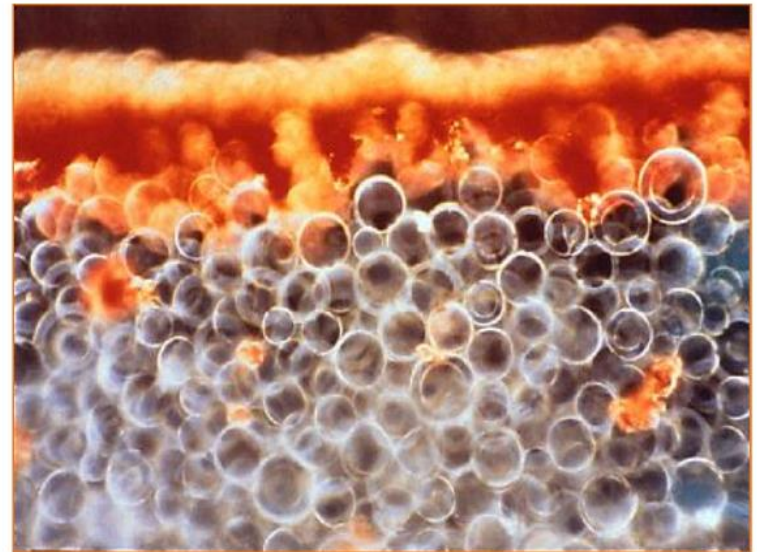
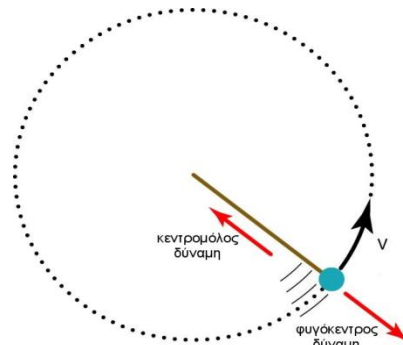
- Ετερόζυγη έκφραση αντιγόνων M και Kidd

Φυγοκέντρωση - Θερμοκρασία - pH

Η φυγοκέντρωση μέσω των δυνάμεων που αναπτύσσονται, επιτρέπει τη μείωση των απωθητικών δυνάμεων μεταξύ των ευαισθητοποιημένων με αντίσωμα ερυθροκυττάρων και την επακόλουθη συγκόλληση αυτών

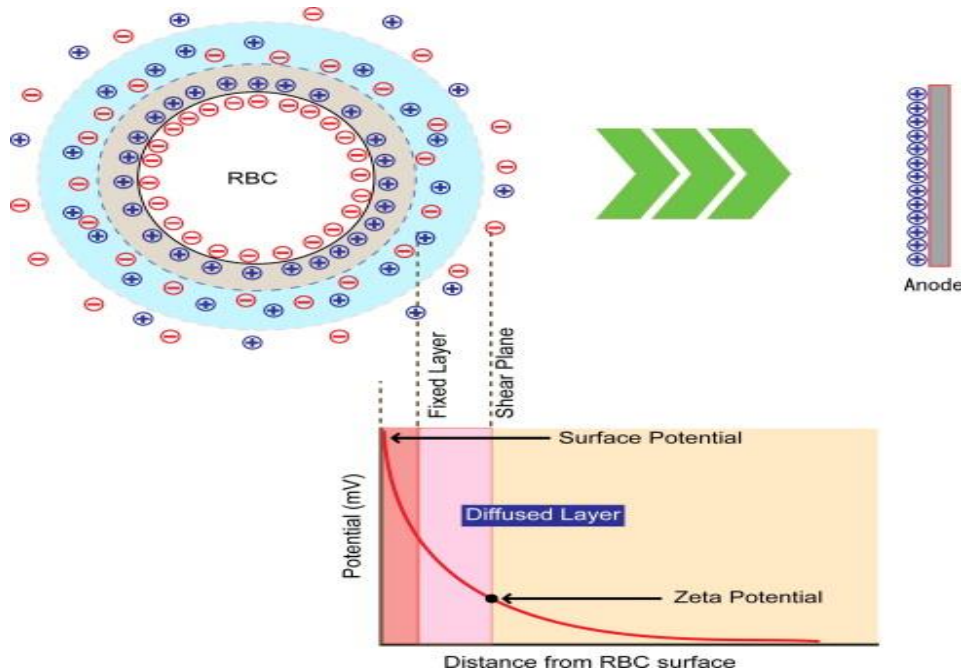
Ιδανικό pH αντίδρασης είναι 6.5-7.5, το οποίο είναι όμοιο με το pH του πλάσματος.

Αναλόγως των κλινικών και εργαστηριακών ενδείξεων, οι αντιδράσεις αντιγόνου/αντισώματος πρέπει να εκτελούνται στις κατάλληλες θερμοκρασίες.



Agglutinates trapped above gel

Ενισχυτικά μέσα

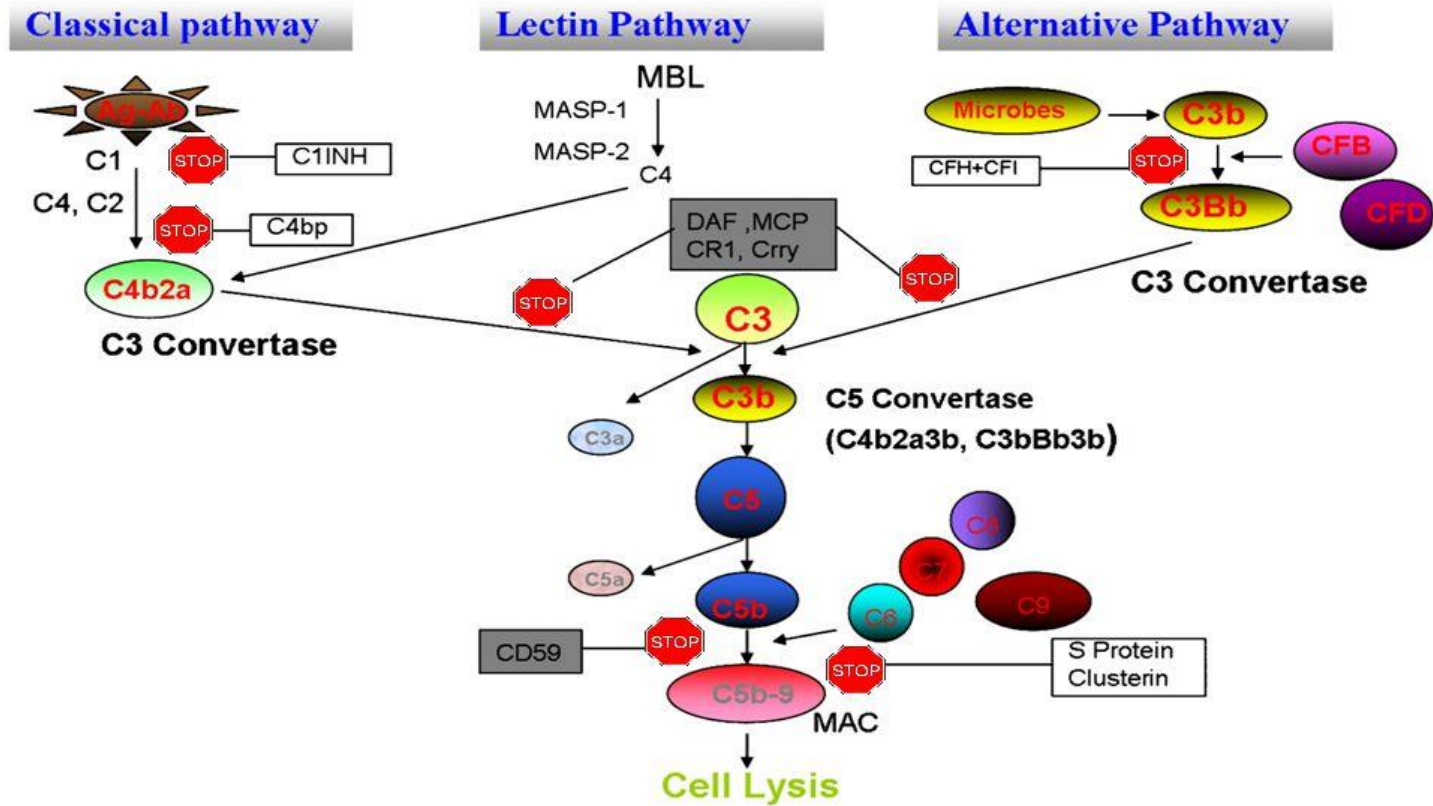


Ως ενισχυτικά μέσα (**potentiators**) για μείωση του δυναμικού ζήτα των ερυθρών (**zeta potential**) και επομένως ελάττωση της μεταξύ τους απόστασης, ώστε να συμπλησιάζουν ευκολότερα και να συγκολλώνται, μπορούν να χρησιμοποιηθούν:

- διάλυμα ιοντικής ισχύς (LISS) αλβουμίνη 22%
- πρωτεολυτικά ένζυμα (όπως παπαΐνη, θρυψίνη, βρωμελίνη, φυσίνη κ.α.)
- PEG
- φυσιολογικός ορός
- αντισφαιρινικός ορός

Συμπλήρωμα και καταστροφή των ερυθρών

Ρύθμιση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος

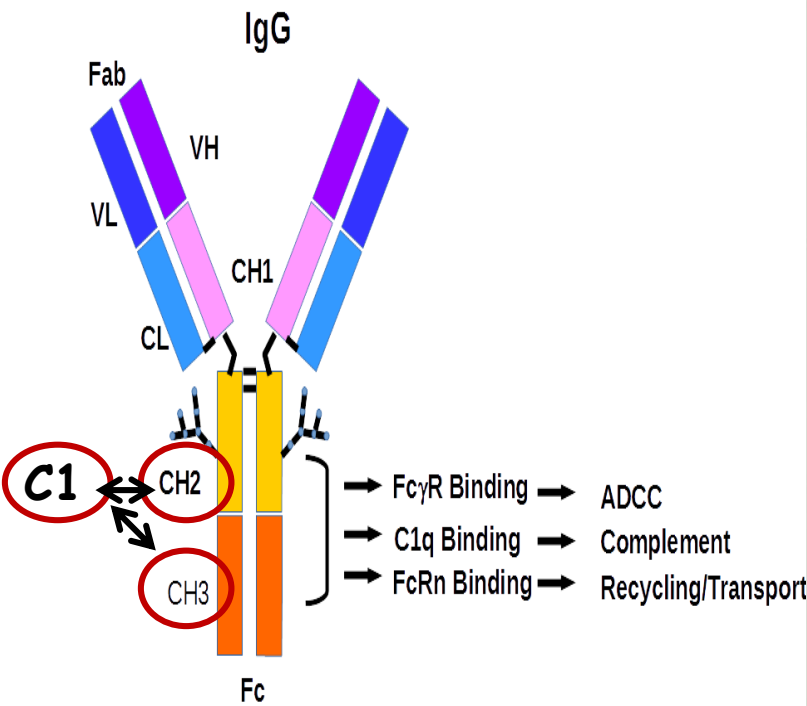


Συμπλήρωμα και καταστροφή των ερυθρών

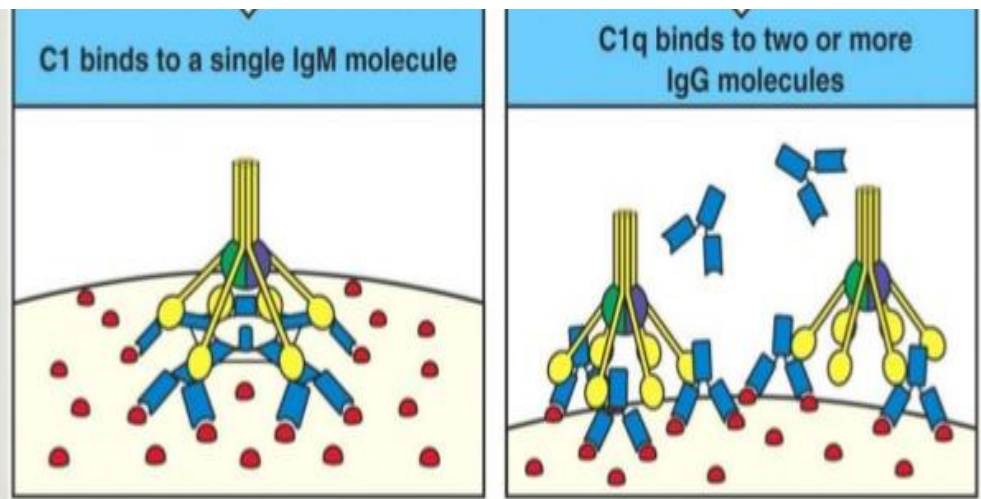
▪ Ένα πενταμερές μόριο IgM μπορεί να ενεργοποιήσει το C1 και επομένως τον καταρράκτη του συμπληρώματος, διότι προσφέρει επάρκεια κοντινών ενεργοποιημένων περιοχών CH3.

▪ Όσον αφορά τις ανοσοσφαιρίνες IgG, απαιτούνται δύο τουλάχιστον αντισώματα για να αντιδράσουν με δύο γειτονικά αντιγόνα ώστε να ενεργοποιηθεί το συμπλήρωμα.

Επομένως, παράγοντες που διαδραματίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση του C1 είναι η **συγκέντρωση και η χημική συγγένεια του Ab και η τοπογραφία του Ag.**



	Human	Mouse
ADCC	G1/G3>G2>G4	G2a/G2b/G3>G1
Complement	G3>G1>G2>G4	G2a/G2b>G3>G1



Υπάρχει και διαφορά ως προς τον τρόπο σύνδεσης του C με τις ανοσοσφαιρίνες IgG και IgM.

Επίδραση του συμπληρώματος στην καταστροφή των ερυθρών

Το συμπλήρωμα μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση των ερυθρών μέσω δύο μηχανισμών, την ενδοαγγειακή και εξωαγγειακή αιμόλυση.

ενδοαγγειακή αιμόλυση

Η ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος φτάνει στο τελικό στάδιο, δηλαδή μέχρι το C9, προκαλώντας τελικά λύση της συνέχειας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα.

εξωαγγειακή αιμόλυση

Οι αναστολείς του συμπληρώματος σταματούν την ενεργοποίηση του καταρράκτη, αφήνοντας C3b πάνω στα ερυθρά. Τα επενδυμένα με C3b ερυθρά προσκολλώνται στα φαγοκύτταρα μέσω υποδοχέων, χωρίς όμως να είναι '΄ικανά΄ να ενεργοποιήσουν την φαγοκυττάρωση.

Σοβαρή αιμολυτική αντίδραση λαμβάνει χώρα, όταν τα μεταγγιζόμενα ερυθρά αντιδράσουν με ήδη υπάρχοντα αντισώματα στον λήπτη (**μείζονα ασυμβατότητα**), χωρίς όμως να αποκλείεται και η σπάνια περίπτωση αιμόλυσης ερυθρών του λήπτη από αντισώματα του δότη, εξαιτίας υψηλού τίτλου αντι-A και αντι-B στο δότη (**ελάσσονα ασυμβατότητα**).

Ένζυμα μπορούν να διασπάσουν το συνδεδεμένο C3b, αφήνοντας ένα μικρότερο κλάσμα, το C3dg πάνω στο ερυθρό. Ερυθρά με το C3d επιβιώνουν φυσιολογικά, διότι τα φαγοκύτταρα δεν διαθέτουν υποδοχείς για το C3d. Το **C3d** στην επιφάνεια των ερυθρών **αποτελεί τον μόνο μάρτυρα προηγούμενης ευαισθητοποίησης** των ερυθρών και γι' αυτό το λόγο απαιτείται η χρήση αντισφαιρινικού ορού με αντι-C3d ειδικότητα.

Ο ρόλος του αντιγόνου στην αιμολυτική αντίδραση μετά από μετάγγιση (HTR) με συμμετοχή του συμπληρώματος

Συνήθως	Μερικές φορές	Σπάνια
ABO	Xg ^a	D
Le ^a , Le ^b	LKE	P ₁
Jk ^a , Jk ^b	Lan	Lu ^a , Lu ^b
Ii		Kell
P		Fy ^a , Fy ^b
Sc1		Co ^a , Co ^b
Co3		Di ^a
Ge2, Ge3		Ss
PP ₁ P ^k		Yt ^a
Vel		



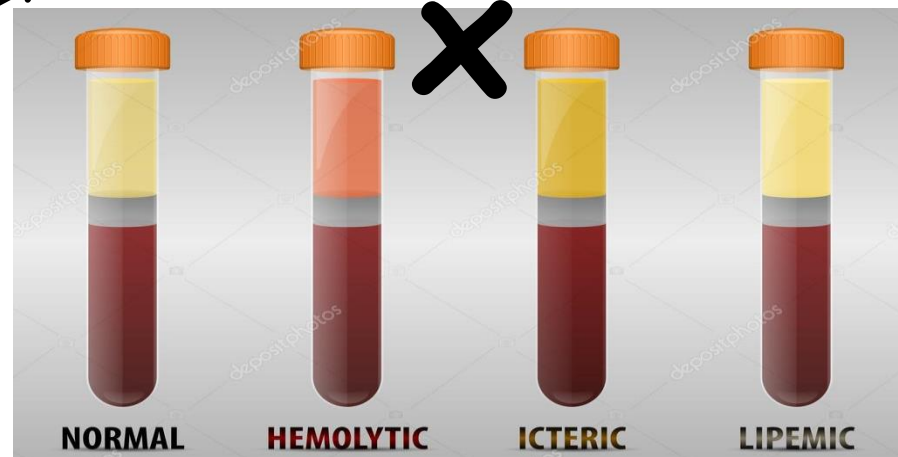
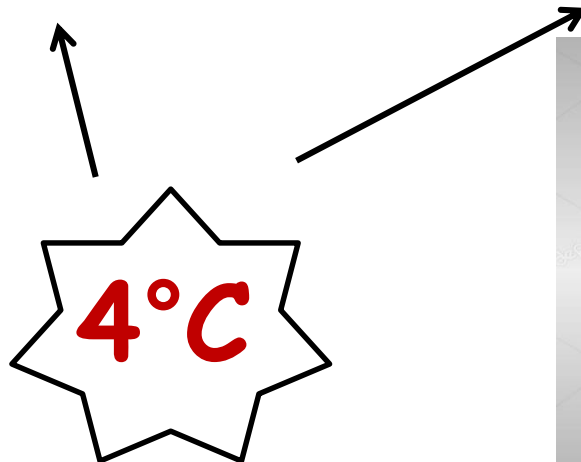
Η δράση του συμπληρώματος στο εργαστήριο

Για να διαπιστωθεί η αιμόλυση στο εργαστήριο χρειάζεται η χρήση βιοχημικού σωληναρίου, διότι όταν υπάρχει αντιπηκτικό αυτό δεσμεύει τα κατιόντα Ca και Na, που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος.

Άμεση Coombs



Δοκιμασία συμβατότητας- έμμεση Coombs



Δοκιμασία Αντισφαιρινικού ορού - Coombs Test

Η δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού (AHG) χρησιμοποιείται για την ανάδειξη των ατελών IgG αντισωμάτων, είτε είναι ελεύθερα στον ορό ή προσκολλημένα στα ερυθρά και για την ανίχνευση του προσκολλημένου στα ερυθρά συμπληρώματος.

1945 - Coombs, Mourant & Race

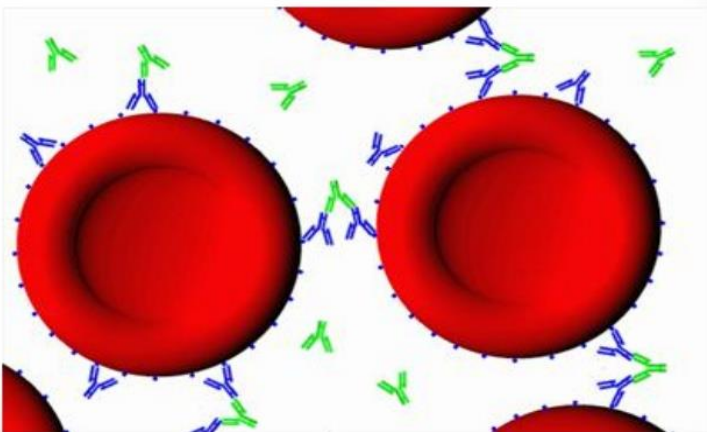
Αντιανθρώπινες σφαιρίνες που παραχθεί από ανοσοποιημένα ζώα αντιδρούν με ανθρώπινες σφαιρίνες ελεύθερες στον ορό ή προσκολλημένες στα ερυθροκύτταρα.

Πολυδύναμος AHG

Μονοδύναμος AHG

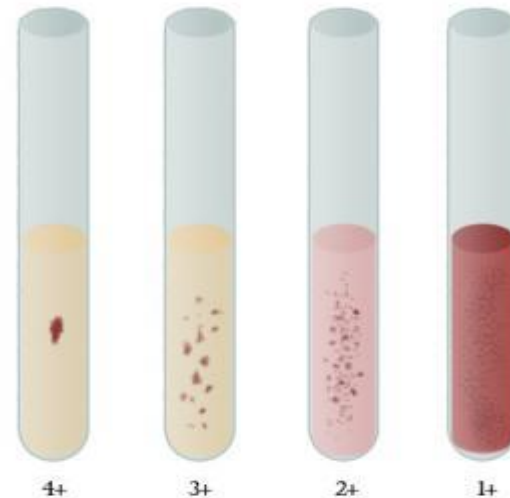


Showing a Complete Reaction with Coombs Serum



Dr. T.V. Rao MD

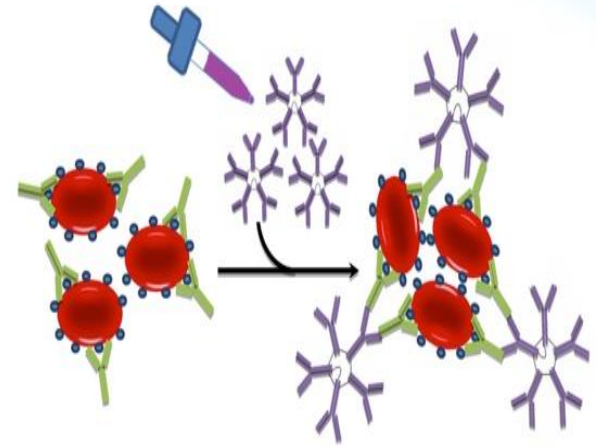
(7)



Άμεση δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού - Άμεση Coombs Direct Antiglobulin Test (DAT)

Εξετάζει την παρουσία αντισωμάτων ή πρωτεϊνών του συμπληρώματος που βρίσκονται συνδεδεμένα στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων του ασθενούς.
IgG ή/και C3d

DIRECT ANTIGLOBULIN TEST



Τα ερυθρά (αφού πλυθούν για να απομακρυνθούν μη συνδεδεμένα αντισώματα) αναμιγνύονται με AHG (αντιανθρώπινο σφαιρίνη = αντίσωμα έναντι των ανθρώπινων αντισωμάτων), και μετά τη φυγοκέντρηση παρατηρούνται συγκολλήσεις



(επί θετικού αποτελέσματος)

J. O'Connor



Θετική άμεση Coombs υποδηλώνει αν τα ερυθρά είναι καλυμμένα in vivo με ανοσοσφαιρίνες, ή συμπλήρωμα ή και τα δύο. Με τη DAT επομένως γίνεται ανίχνευση in vitro της ευαισθητοποίησης των ερυθρών με αντι-IgG ± αντι- C3d.

Άμεση δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού - Άμεση Coombs Direct Antiglobulin Test (DAT)

Δε μας πληροφορεί για το αν υπάρχει αιμόλυση ή όχι.



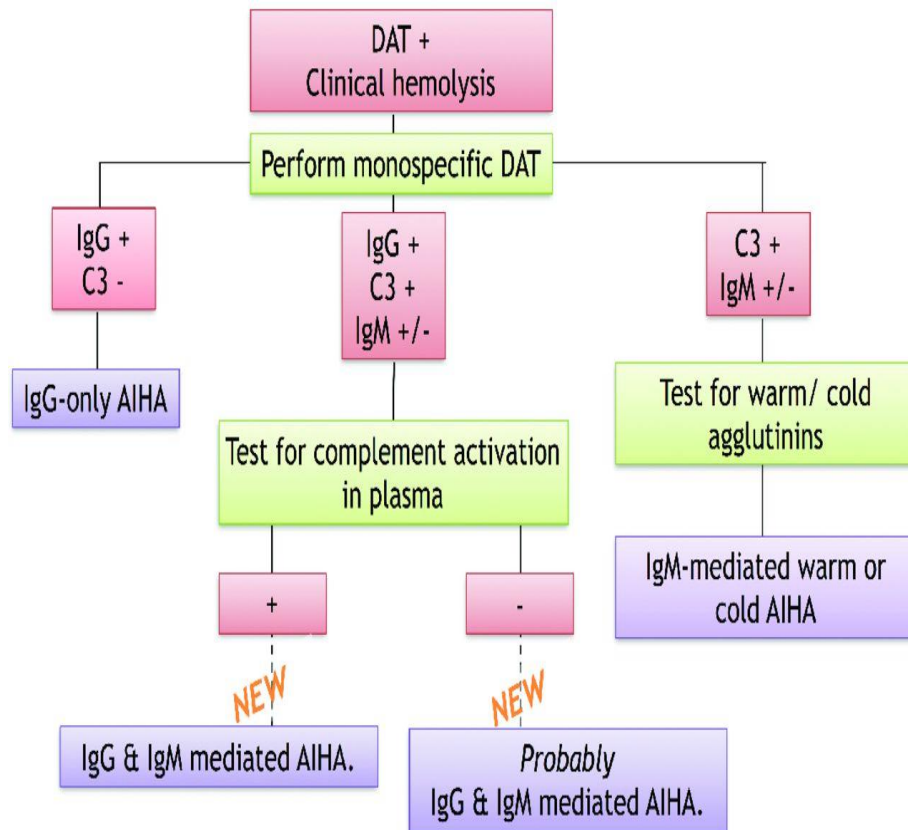
Το ενδεχόμενο αυτό το διευκρινίζουμε
βασιζόμενοι στο:

- ιστορικό του ασθενή
- και στα εργαστηριακά ευρήματα, (Ht, Hb, LDH, ΔΕΚ, χολερυθρίνη, απτοσφαιρίνη).

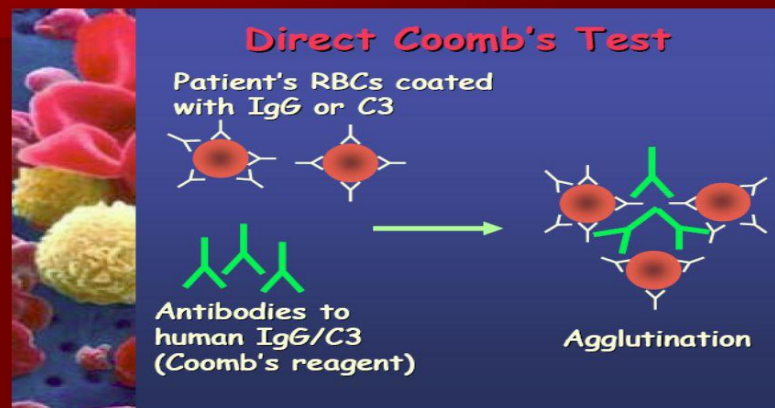
DAT - Direct Agglutination Test

DAT (+)

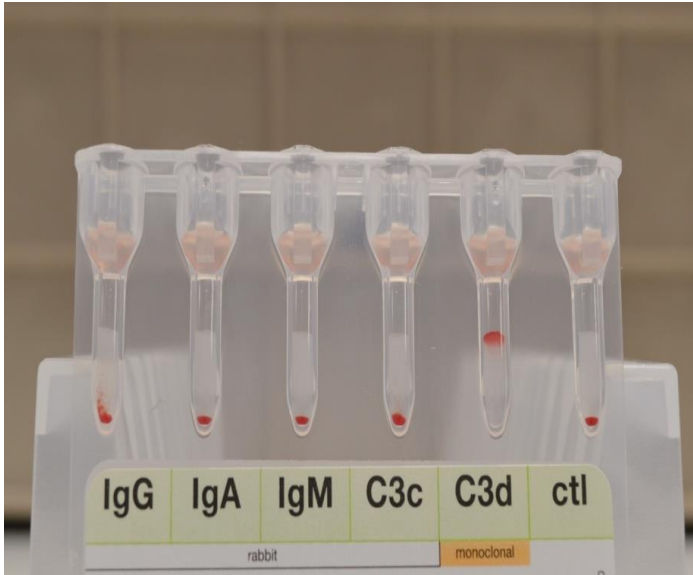
- Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία
- Μετάγγιση
- Αιμολυτική νόσος του νεογνού
- Λήψη φαρμάκων
- Χορήγηση υψηλής δόσης ενδοφλέβιας γάμμα-σφαιρίνης και υπεργαμμασφαιριναιμία
- Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων
- Μεταμόσχευση ABO-ασύμβατων οργάνων
- Αιματολογικές νεοπλασίες
- Αυτοάνοσα νοσήματα
- Φυσιολογικός πληθυσμός



Άμεση δοκιμασία Coombs



Το συμπλήρωμα ως μοναδικό εύρημα στη DAT



■ Στο 10-20% ασθενών με θερμού τύπου AAA.

➤ Ανιχνεύονται μόνο το C3 λόγω ύπαρξης χαμηλού αριθμού μορίων IgG. Τα C3 ανιχνεύονται γιατί είναι πολύ περισσότερα, καθώς για κάθε ένα μόριο IgG ενεργοποιούνται πολύ περισσότερα C3.

■ Στη νόσο των ψυχροσυγκολλητινών.

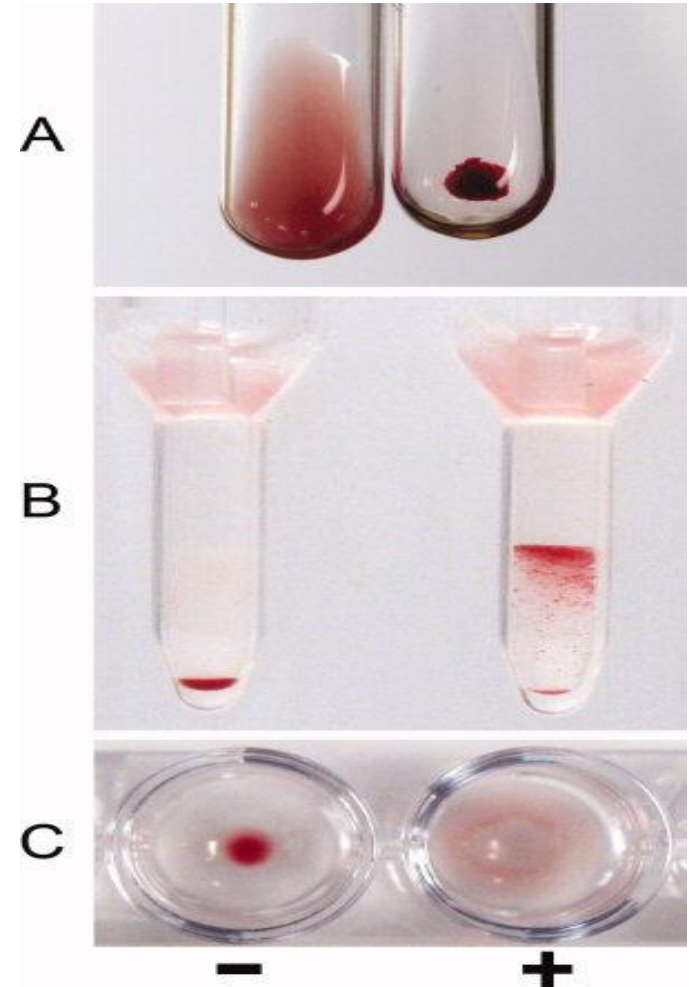
➤ Τα IgM αντισώματα προσκολλούνται στα ερυθρά σε περιφερικά σημεία του σώματος. Με την κυκλοφορία το σύμπλεγμα έρχεται σε κεντρικότερα και θερμότερα σημεία του σώματος, όπου τα αντίσωμα αποσυνδέεται από το ερυθρό και στην επιφάνεια του παραμένει το ενεργοποιημένο συμπλήρωμα ως ένδειξη παρουσίας του ψυχρού αντισώματος.

➤ Επίσης, η δυσκολία ανίχνευσης των IgM οφείλεται στο γεγονός ότι αποσυνδέονται εύκολα από το ερυθρό κατά το πλύσιμο και ο αντισφαιρινικός ορός περιέχει ελάχιστη ποσότητες αντι- IgM.

Αρνητική Άμεση Coombs

Δεν αποκλείεται η άνοση αιμόλυση

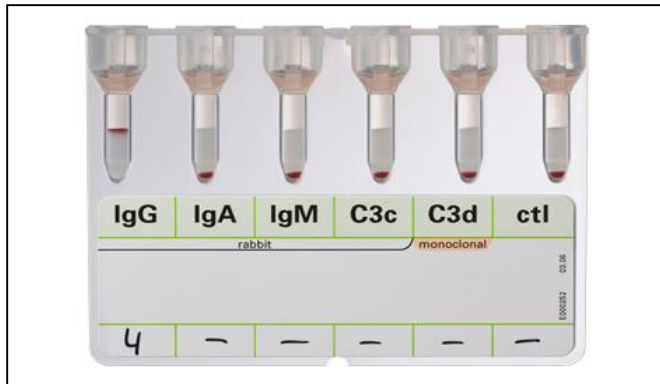
Ενδεχομένως, ο αριθμός των προσκολλημένων μορίων των ανοσοσφαιρινών να είναι μικρότερος από την ευαισθησία της μεθόδου, η ισχύς τους όμως να είναι μεγάλη και να προκαλείται αιμόλυση.



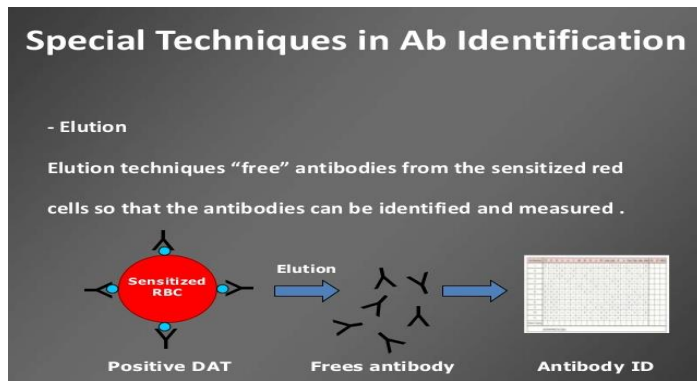
Έλεγχος και διερεύνηση της θετικής DAT

Σε περίπτωση θετικής DAT με AHG πρέπει να γίνει:

1. έλεγχος με μονοδύναμους αντιορούς



2. έλεγχος με έκλουμα (elution)



3. έλεγχος ορού για κλινικά σημαντικά αντισώματα

ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΕΜΠΛΕΚΟΜΕΝΑ ΜΕ ANN

- Rh group – D,c,C,E,e,Ce & C^W
- Kell group – K s k
- Duffy group – Fy^a
- Kidd group - Jk^a

Κλινικά σημαντικά αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα

Τι πρέπει να ξέρουμε ;

Κλινικά σημαντικά είναι τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα που προσθέτουν νοσηρότητα στον ασθενή λόγω βράχυνσης της επιβίωσης σημαντικού αριθμού των αλλογενών ερυθρών.

British Committee for Standards in Haematology.
Chapman et al., 2004

- Αν εμφανίζονται φυσικά ή μετά από αλλοανοσοποίηση (μετάγγιση, κύηση)
- Την κλάση της ανοσοσφαιρίνης (IgM, IgG τα οποία περνούν τον πλακούντα)
- Θερμικό εύρος (ψυχρά 4-22°C ή θερμά 37°C)
- Φάση δράσης: άμεση φυγοκέντρηση, αντισφαιρινικός ορός (AHG)
- Ενεργοποίηση του συμπληρώματος



Αιμολυτική αντίδραση (HTR), αιμολυτική νόσο νεογνού (HDN)

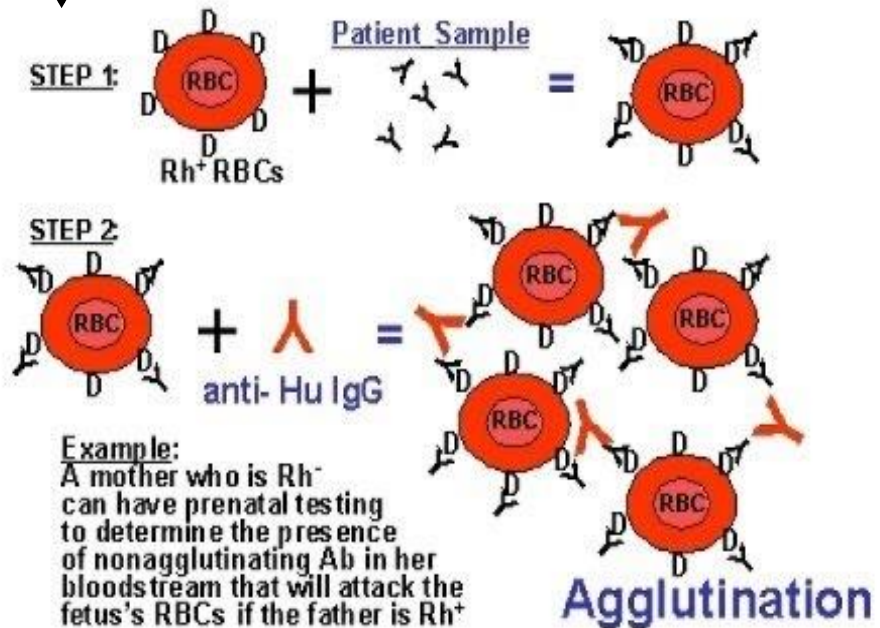


Έμμεση δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού - Έμμεση Coombs Indirect Antiglobulin Test (IAT)

▪ Ένα αρχικό στάδιο επώασης στους 37°C, κατά το οποίο αναμιγνύονται ερυθρά με δείγμα ορού, ώστε αν υπάρχουν ατελή αντισώματα έναντι ερυθροκυτταρικών αντιγόνων, να συμβεί ευαισθητοποίηση in vitro των ερυθρών.

▪ Στη συνέχεια προστίθεται αντιανθρώπιος αντισφαιρινικός ορός για να προκληθεί ορατό αποτέλεσμα, δηλαδή συγκόλληση και/ή αιμόλυση.

INDIRECT COOMB'S TEST



Χρησιμότητα της Έμμεσης Coombs

Η έμμεση Coombs αποτελεί τη βάση των ανοσοαιματολογικών δοκιμασιών

Ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των προς μετάγγιση ερυθρών του δότη (Δοκιμασία συμβατότητας-Διασταύρωση)

Ανίχνευση αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων στον ορό των ασθενών, χρησιμοποιώντας ερυθρά γνωστού φαινότυπου (Screening test)

Ταυτοποίηση αντισώματος

Τιτλοποίηση αντισώματος

Ερυθροκυτταρικός φαινότυπος

▪ Κλασσική μέθοδος

▪ Τεχνηκή μικροσωληναρίων γέλης

▪ Τεχνηκή μικροσφαιρίδιων

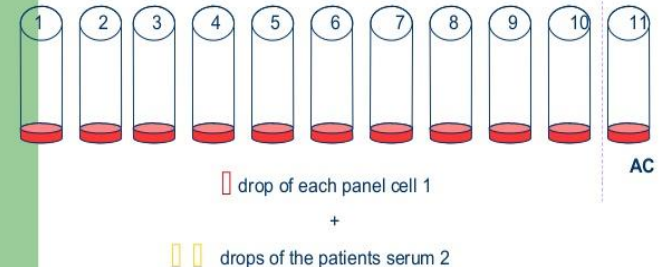
Βαθμονόμηση
Αντιδράσεων

INTERPRETATION OF GEL TEST



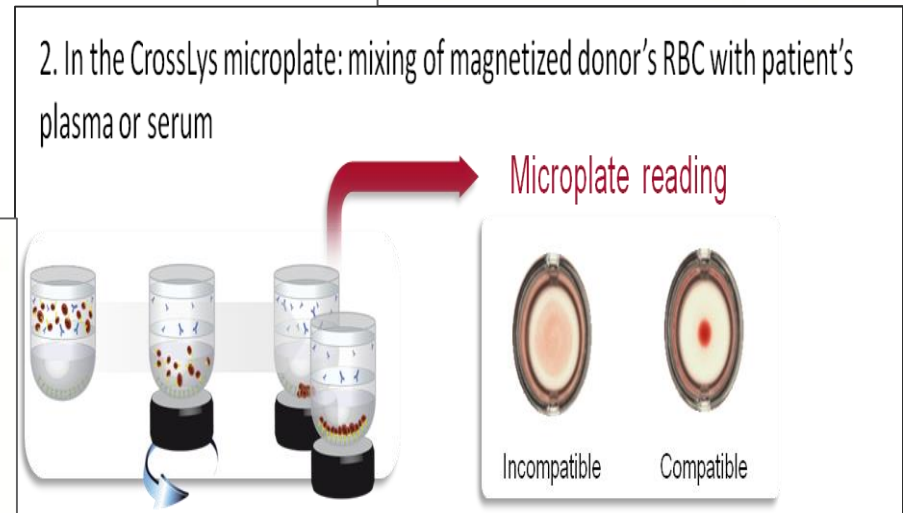
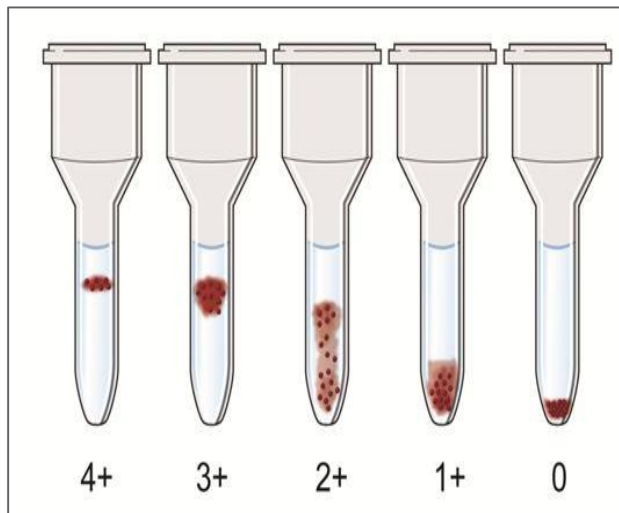
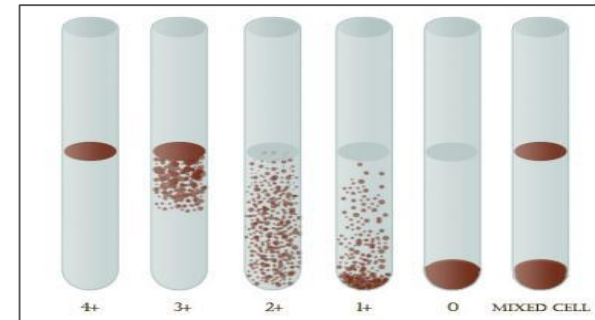
Antibody ID Testing

A tube is labeled for each of the panel cells
:plus one tube for AC

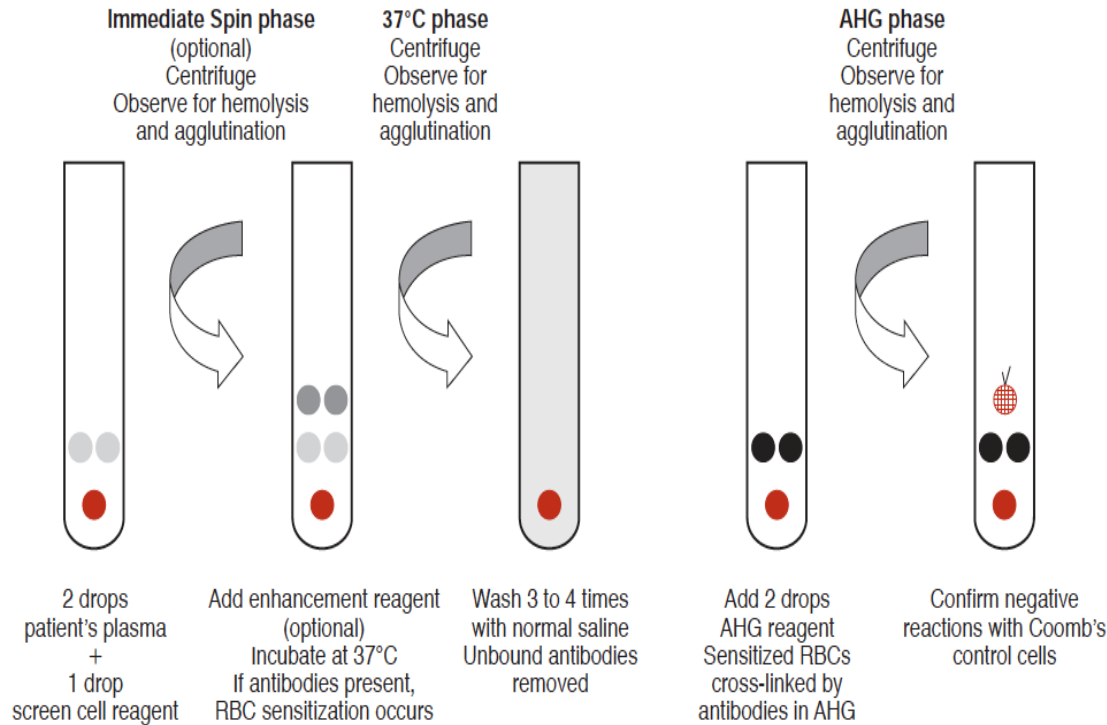


Τεχνικές για την ανίχνευση αντιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος

- ☀ Δοκιμασία σωληναρίων (tube testing)
- ☐ Εξέταση για συγκολλήσεις μακροσκοπικά ή στο μικροσκόπιο
- ☀ Δοκιμασίες στερεάς φάσης (solid phase testing)
- ☀ Μικροπλάκες (microplates)
- ☀ Δοκιμασίες μικροστήλης
- ☐ Gel και σφαιρίδια



Δοκιμασία σωληναρίων (tube testing)

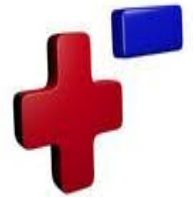


- 3 φάσεις**
- Άμεση φυγοκέντρηση: ψυχρά αντισώματα
 - Επώαση σε 37°C: ψυχρά & θερμά αντισώματα
 - Επώαση με AHG: θερμά αντισώματα

Figure 9-1. Steps for performing the tube antibody screen test.

Εξέταση για συγκολλήσεις ή/και αιμόλυση μακροσκοπικά ή στο μικροσκόπιο

Δοκιμασίες μικροστήλης

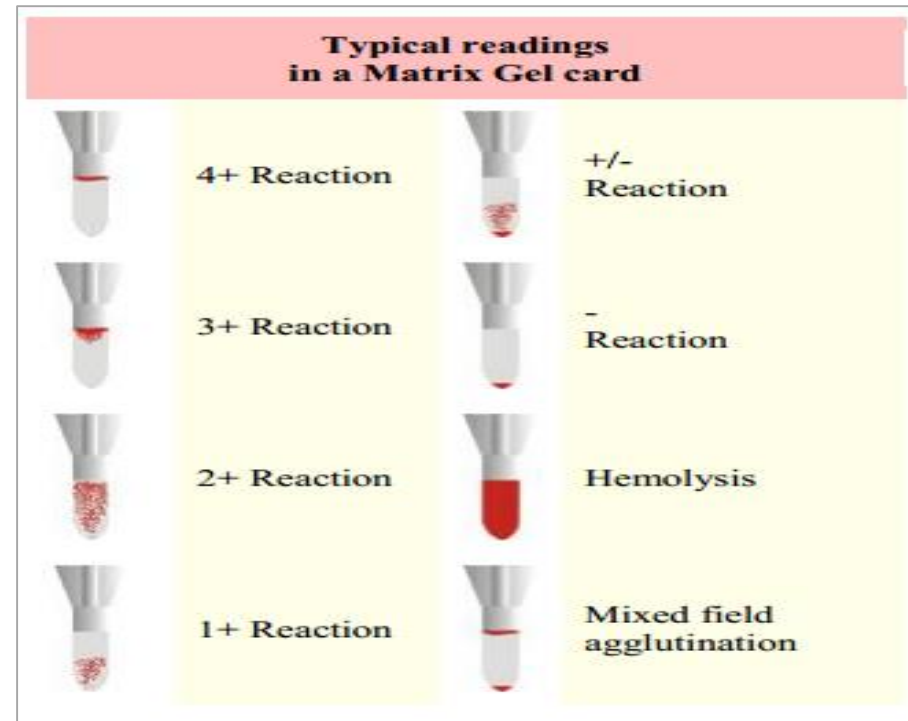
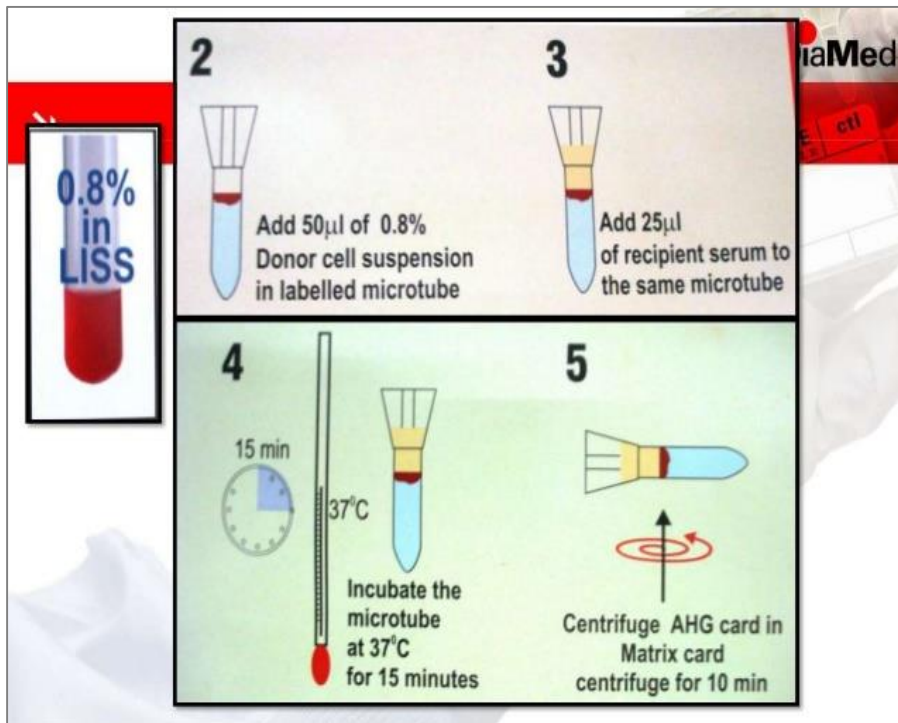


- Πλαστική κάρτα με 6 μικροσωληνάρια
- Θάλαμος για την αντίδραση στην κορυφή
- Σωληνάριο γεμάτο με σωματίδια από gel ή γυαλί και αντι-IgG
- Δρα σαν «φίλτρο» επιτρέποντας τη διέλευση σε σωματίδια μικρού μεγέθους
- Ανάμειξη ορού και ερυθρών στο θάλαμο, επώαση για 15-60
- min σε 37 °C
- Ξυγοκέντρηση για 10 min

Τα ευαισθητοποιημένα ερυθρά (συνδεδεμένα με αντίσωμα) σχηματίζουν συγκολλήσεις και παραμένουν στην κορυφή

Απουσία αντισωμάτων τα ερυθρά καθιζάνουν στον πυθμένα

Βαθμονόμηση αντιδράσεων



Δοκιμασίες στερεάς φάσης-microplate

Άμεση δοκιμασία

Αντίσωμα κινητοποιημένο στον πυθμένα, προσθήκη των ερυθρών του εξεταζόμενου

Έμμεση δοκιμασία

Πηγαδάκια που έχουν στον πυθμένα τους ακινητοποιημένο το αντιγόνο (μεμβράνες ερυθρών αιμοσφαιρίων)

Προστίθεται ο ορός του ασθενούς (που περιέχει το αναζητούμενο αντίσωμα) μαζί με LISS

Επώαση στους 37 °C

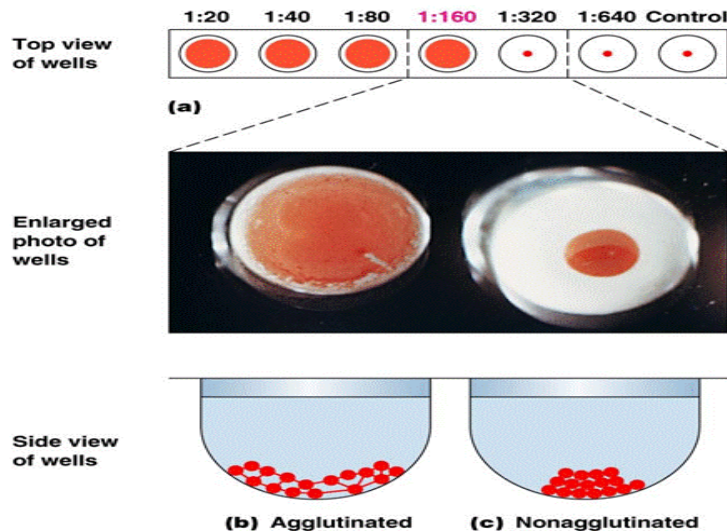
Αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος (εφόσον υπάρχει)

Ξέπλυμα των πηγαδιών και προσθήκη ερυθρών

Αιμοσφαιρίων «δεικτών» επενδυμένων με anti-IgG

Φυγοκέντρηση

- Ανίχνευση αντισωμάτων
 - Ταυτοποίηση αντισωμάτων
 - Τυποποίηση κατά ABO, Rh κλπ
 - Διασταύρωση (συμπλήρωμα ?)
- ☐ Δυνατότητες αυτοματοποίησης με χρήση barcode



Ανάγνωση αποτελέσματος

Θετικό αποτέλεσμα: τα ερυθρά καλύπτουν όλο τον πυθμένα του πηγαδιού

Αρνητικό αποτέλεσμα: τα ερυθρά συσσωρεύονται στο κέντρο

Διασταύρωση - crossmatching

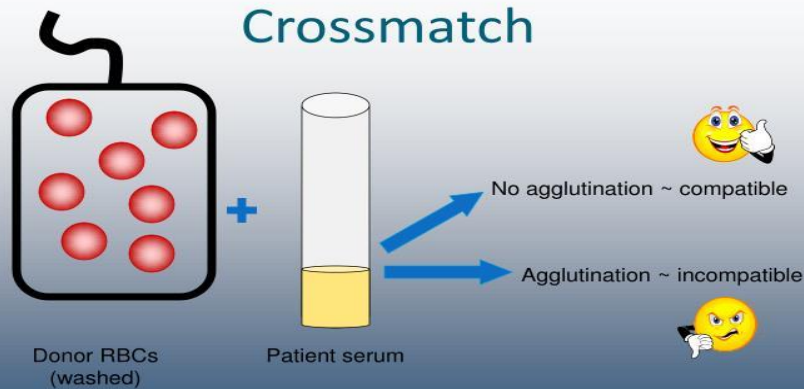
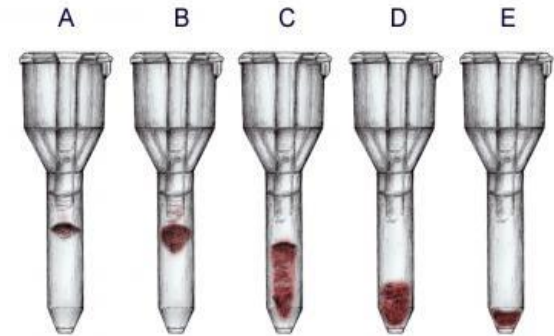
Η δοκιμασία συμβατότητας αποσκοπεί στην αποφυγή άμεσης ενδαγγειακής αιμόλυσης, λόγω ABO ασυμβατότητας και βραδύτερης εμφάνισης εξωαγγειακής ή και ενδαγγειακής αιμόλυσης από αντιερυθροκυτταρικά αλλοαντισώματα έναντι αντιγόνων άλλων συστημάτων.

Στη δοκιμασία λοιπόν ανιχνεύονται τυχόν αντισώματα του λήπτη έναντι ερυθρών του δότη (μείζονα διασταύρωση).

Η αρχή της τεχνικής στηρίζεται στην αποκάλυψη πλήρων ή ατελών αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων στον ορό του ασθενή σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με χρήση ενισχυτικών μέσων (π.χ. λευκωματίνη κ.α.) και τέλος με την προσθήκη αντισφαιρινικού ορού.

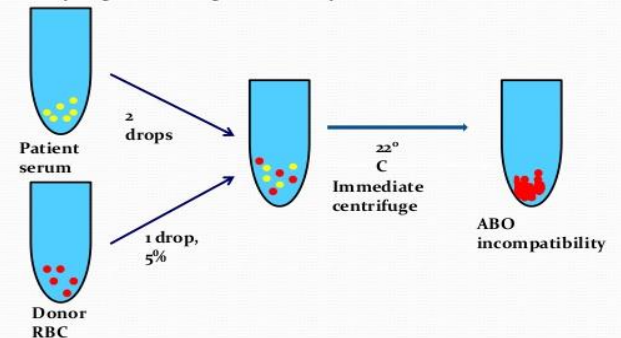
Τυχόν εμφάνιση **συγκόλλησης** και/ή **αιμόλυσης** μαρτυρεί την παρουσία των αντισωμάτων.

Όλες οι τεχνικές πρέπει να αναδεικνύουν την **ABO ασυμβατότητα**



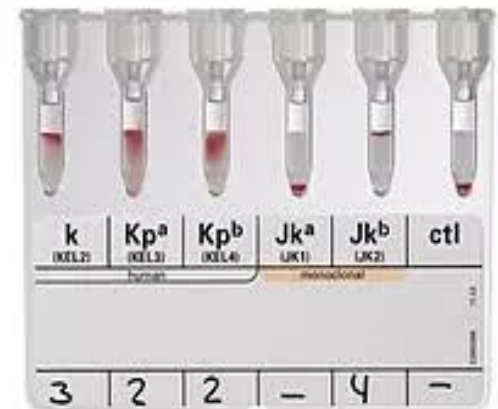
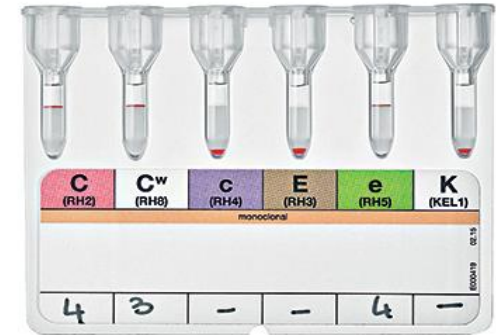
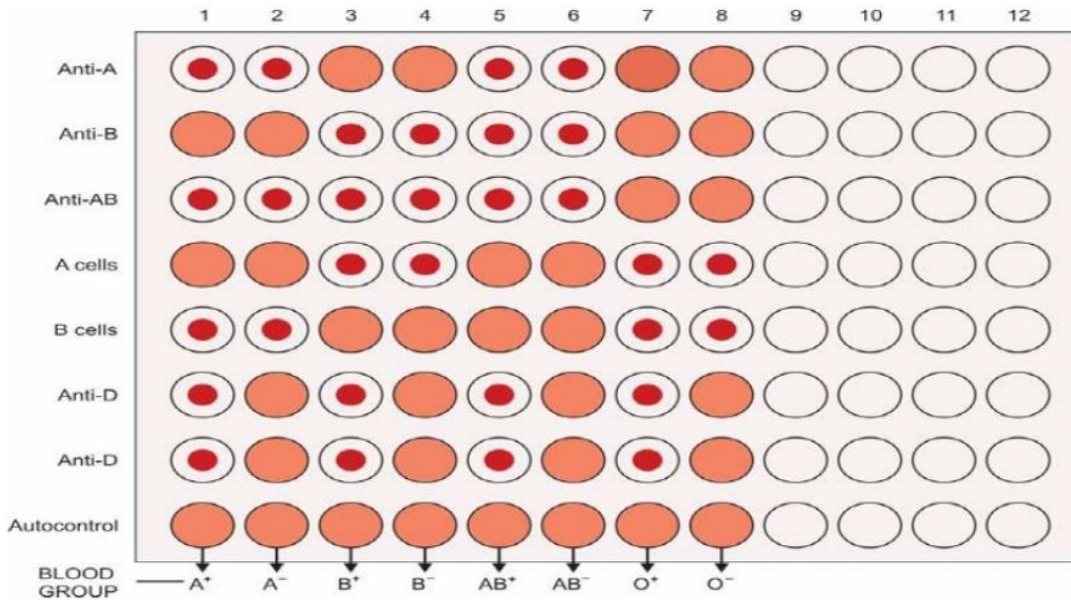
Immediate Spin Technique (IST)

- ✓ Detects only IgM antibody, reactive at 22°C.
- ✓ Clinically significant IgG antibody reactive at 37°C not detected



Ανίχνευση αντιγόνων των ερυθρών

Μπορούμε να καθορίσουμε τον αντιγονικό φαινότυπο ερυθροκυττάρων σε διάφορα συστήματα ερυθροκυτταρικών αντιγόνων. Χρησιμοποιούμε μεμονωμένα ή παράλληλα γνωστής ειδικότητας αντιορούς (π.χ. αντι-Kell, αντι-Fya κλπ) για επώαση με τα αγνώστου φαινοτύπου ερυθρά. Ως θετικό μάρτυρα χρησιμοποιούμε ερυθρά ετερόζυγα ως προς το ερευνώμενο αντιγόνο.



Τιτλοποίηση

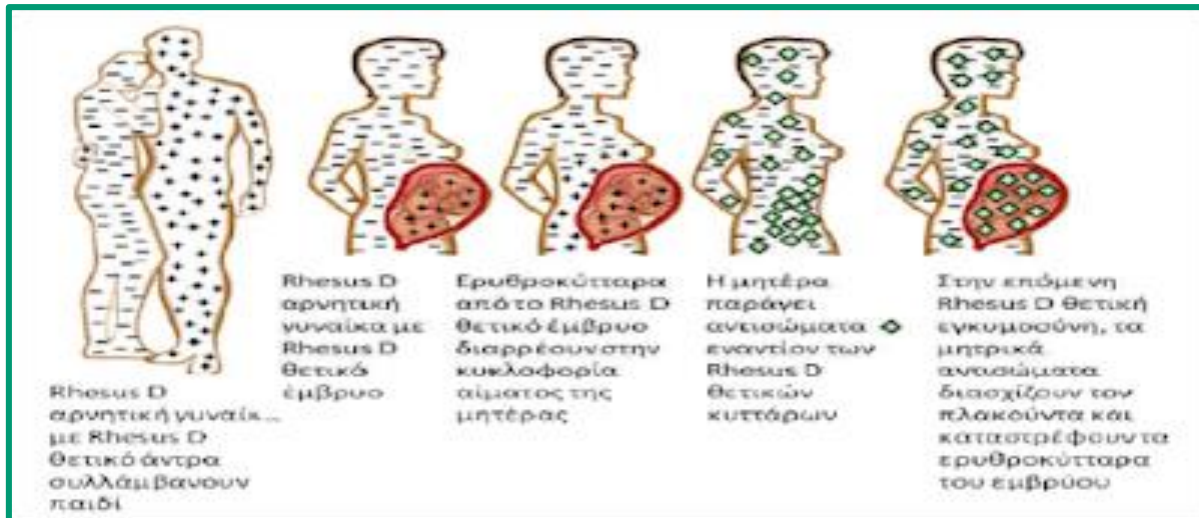
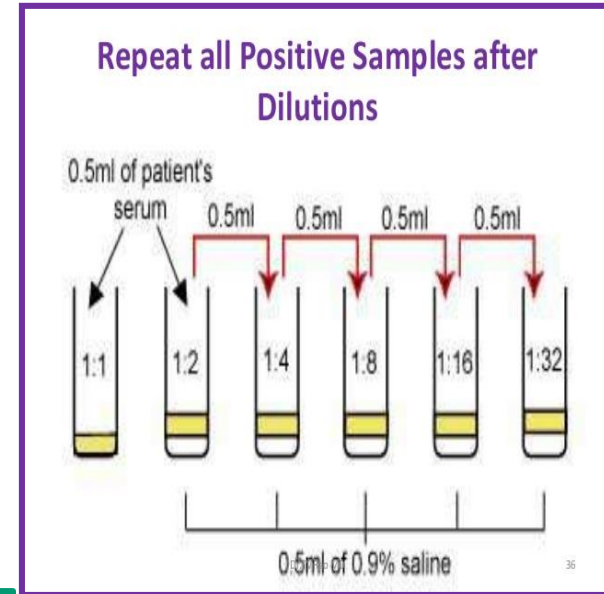
- Επι (+) έμμεσης Coombs μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα των αντισωμάτων στον ορό (ή στο αμνιακό υγρό εμβρύου με αιμολυτική νόσο) κάνοντας τιτλοποίηση.

- Γίνονται **διαδοχικές αραιώσεις** του δείγματος (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 κλπ) που εξετάζονται με τον ίδιο τύπου ερυθρού.

- Ο τίτλος είναι το αντίστροφο της τελευταίας αραιώσης που έδωσε θετικό αποτέλεσμα. Για παράδειγμα αν το αποτέλεσμα αρνητικοποιείται μετά την αραιώση 1/4, ο τίτλος είναι 4.

- Με την τιτλοποίηση μπορεί να αποκαλυφθεί φαινόμενο προζώνης, λόγω μεγάλης συγκέντρωσης αντισωμάτων. Η τιτλοποίηση με διαφορετικούς τύπους ερυθρών είναι πολύ χρήσιμη σε περιπτώσεις **μείγματος αλλοαντισωμάτων** διαφόρων ειδικοτήτων.

- Η παρακολούθηση του τίτλου αντισωμάτων στον ορό της μητέρας είναι πολύ χρήσιμη για την πρόβλεψη **αιμολυτικής νόσου εμβρύου-νεογνού** και λήψη απαραίτητων θεραπευτικών αποφάσεων.



Screening test - αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων

**Κλινικά σημαντικά
αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα**

Συχνότερα αντισώματα: anti-Kell, anti-c, anti-E, anti-D.
Ασθενείς με ένα αντίσωμα συχνά αναπτύσσουν και δεύτερο.



Πριν από τη διενέργεια συμβατότητας

Μετά από ανεύρεση ασυμβατότητας

Μετά από αιμολυτική αντίδραση που συμβαίνει μετά από χορήγηση συμβατού αίματος.

Στις έγκυες για την πρόληψη HDN

DAT +

Screening test - αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων

Διαδικασία ανίχνευσης κλινικώς σημαντικών αντισωμάτων

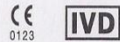
Ο ορός του ασθενή ελέγχεται συνήθως με 3 δείγματα ερυθρών ομάδας Ο που έχουν ισχυρή έκφραση των εξής αντιγόνων:

D, C, E, c, e, M, N, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb, Lea, Leb, P1

Αν το Screening test είναι **θετικό**, πραγματοποιείται panel 11 ή περισσότερων ερυθρών (φαινοτυπημένων, επεξεργασμένων και μη) για την τυποποίηση σε διάφορες φάσεις (θερμοκρασίας / ενζύμου) του/των αντισωμάτων.

Enhanced	Decreased	Unaffected
ABO-related -ABO/H Systems -Lewis System -I System -P1PK/GLOB Rh System Kidd System	MNS System Duffy System	Kell System





Antikörper-Suchtest / Antibody screening / Recherche d'anticorps / Screening anticorpale / Escrutinio de anticuerpos irregulares /
Teste pesquisa de anticorpos

Antigen-Tabelle / Antigen-Table / Table d'antigènes / Tabella antigenica / Tabla de antígenos / Tabela de antígenios

Rh-hr	Möglicher Genotyp Probable Genotype Genotype probable Probabile genotipo Genotipo probable Genótipo provável	Spender Donor Donneur Donatore Donante Dador	Rh-hr			Kell				Duffy	Kidd	Lewis	P	MNS			Luth.	Xg	Spez. Antigene Special types Antigènes part. Antigeni particolari Otros Antígenos Tipos especiais	Resultat / Result / Résultat / Risultato / Resultado / Resultado														
	D	C	E	c	e	C ^w	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	Xg ^b	IAT	Enzym	4° C				
I	CCC ^w D.ee	R ₁ ^w R ₁	119062	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	nt	nt	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	1+	1+	-
II	ccD.EE	R ₂ R ₂	626010	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	-	-	-
III	ccddee	rr	669539	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	nt	nt	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	3+	3+	-
																			Eigenkontrolle / Autocontrol / Autocontrôle / Autocontrollo / Auto-control / Auto-control			-	-	-										

Συνιστάται να υπάρχουν οι ακόλουθοι φαινότυποι:
R1R1 ή RI^wR1, Jk(a+b-), Jk (a-b+), S+s-, S-s+, Fy(a+b-), Fy(a-b+)

LOT

	I-II-III	IP-IIP-IIIP	
I	06084.59.x	06134.59.x	(Japan: 0608.59.xx/0613.59.xx)
II	06094.59.x	06144.59.x	(Japan: 0609.59.xx/0614.59.xx)
III	06104.59.x	06154.59.x	(Japan: 0610.59.xx/0615.59.xx)

Set I-II-III 45184.59.x (Japan: 4518.59.xx)
Set IP-IIP-IIIP 45194.59.x (Japan: 4519.59.xx)

2018.01.29 (Japan: 29.01.18)

V.I.P. Software: S200

Anmerkungen siehe rückseitig / Remarks see overleaf / Voir les remarques au verso / Per le note consultare il retro / Ver observaciones en el reverso / Ver observações no verso

Name / Name / Nom / Nome / Nombre / Nome	Blutgruppe + Antigene / Blood group + antigens / Groupe sanguin + antigènes / Gruppo sanguigno + antigeni / Grupo sanguíneo + antígenos / Grupo sanguíneo + antígenios	Interpretation / Interpretation / Interprétation / Interpretazione / Interpretación / Interpretação	Datum / Date / Date / Data / Fecha / Data
ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥ ΜΟ ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΟΥ	A (-) ccee K(-)) DATpoly: (-)		02/02/2018

Rh-hr	Möglicher Genotyp Probable genotype Genotype probable Probabile genotipo Genotipo probable Genótipo provável	Spender Donor Donneur Donatore Donante Dador	Rh-hr		Kell						Duffy	Kidd	Lewis	P	MNS				Luth.	Xg	Spez. Antigene Special types Antigènes part. Antigeni particolari Otros Antígenos Tipos especiais	Resultat / Result / Résultat / Risultato / Resultado / Resultado			Bemerkungen / Remarks / Remarques / Note Observaciones / Observações									
			D	C	E	c	e	C ⁺	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b		P ₁	M	N		S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	Xg ^b	LISS / Coombs	Enzyme	4°C
1	CCC ^W D.ee R ₁ WR ₁	243366	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+				1			
2	CCD.ee R ₁ R ₁	639208	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	nt	nt	0	+	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	nt				2		
3	ccD.EE R ₂ R ₂	758532	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0				3		
4	Ccddee r'r	431240	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0				4		
5	ccddEe r''r	143075	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+				5		
6	ccddee rr	106860	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	nt	nt	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+				6			
7	ccddee rr	185699	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	nt	nt	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+				7			
8	ccD.ee R ₀ r	073982	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	nt				8		
9	ccddee rr	857188	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0				9		
10	ccddee rr	550449	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+				10			
11	ccddee rr	132258	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	nt	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+				11		

Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων μας κατευθύνει στη σωστή ταυτοποίηση.

Anmerkungen siehe rückseitig / Remarks see overleaf / Voir les remarques au verso / Per le note consultare il retro / Ver observaciones en el reverso / Ver observações no verso

Name / Name / Nom / Nome / Nombre / Nome	Blutgruppe + Antigene / Blood group + antigens / Groupe sanguin + antigènes / Gruppo sanguigno + antigeni / Grupo sanguíneo + antígenos / Grupo sanguíneo + antígenos	Interpretation / Interpretation / Interprétation / Interpretazione / Interpretación / Interpretação	Datum / Date / Date / Data / Fecha / Data
ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ / ΗΛΙΚΙΑ	ΟΜΑΔΑ ABO ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ RHESUS/KELL ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ DAT		ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ

Συλλογή από **11-20 διαφορετικές σειρές ερυθρών** αιμοσφαιρίων τυποποιημένων ως προς τα αντιγόνα τους σε κάποια από τα πιο κύρια και σημαντικά συστήματα ομάδων αίματος.

Ένας πίνακας συνοδεύει κάθε παρτίδα (lot) ερυθρών, υποδεικνύοντας τα αντιγόνα που περιέχονται και μη σε καθεμιά, με χώρο για την καταγραφή των αντιδράσεων

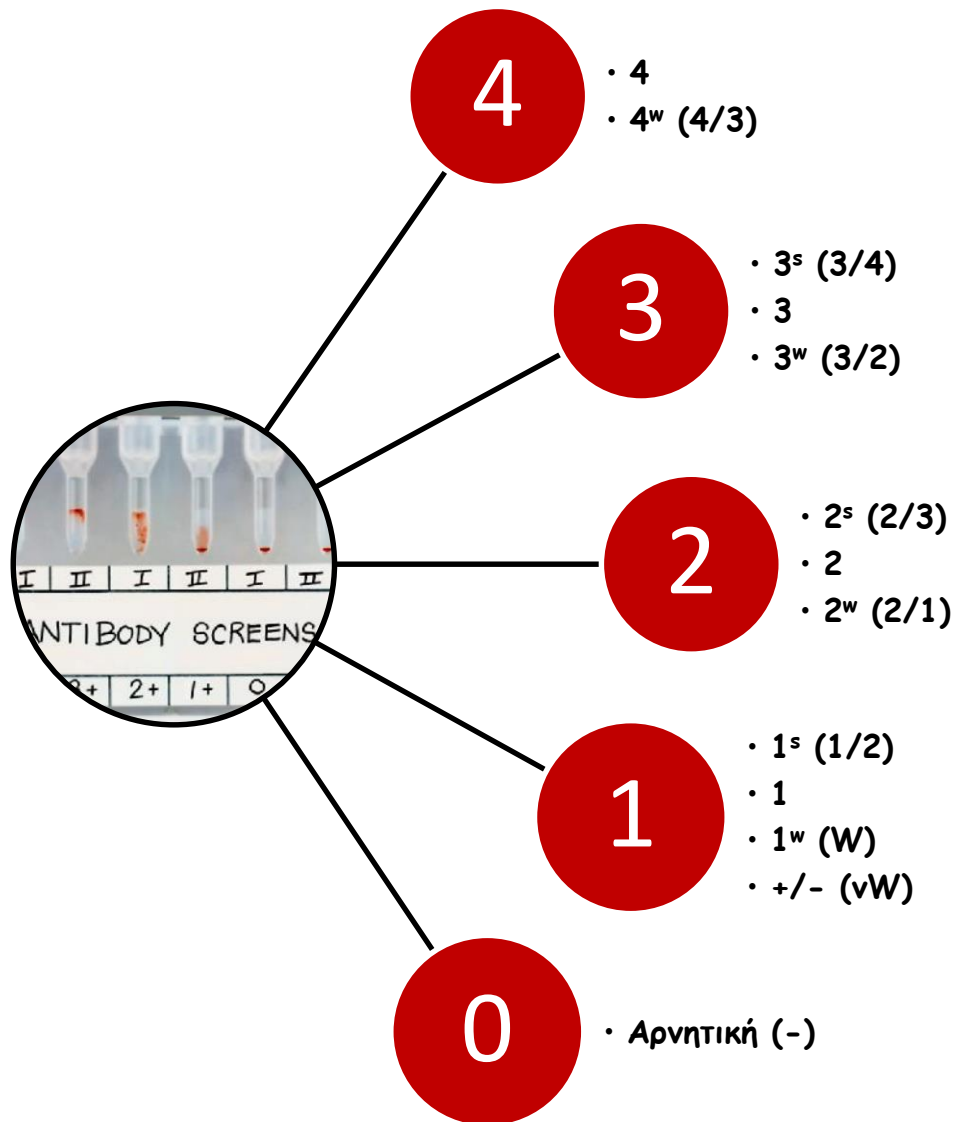
Ο ορός του ασθενούς αναμιγνύεται με κάθε σειρά ερυθρών ξεχωριστά ώστε το αντίσωμα που περιέχει να αντιδράσει με το αντίστοιχο αντιγόνα (σε όσα ερυθρά το φέρουν)

Ανάλογα με την τεχνική που χρησιμοποιείται και τα χαρακτηριστικά των αντισωμάτων, οι **αντιδράσεις μπορεί να γίνουν σε διάφορες φάσεις.**

Βαθμονόμηση αντιδράσεων

Πρόταση βαθμονόμησης

Παλιά	Νέα
4	4
4/3	4 ^w
3/4	3 ^s
3	3
3/2	3 ^w
2/3	2 ^s
2	2
2/1	2 ^w
1/2	1 ^s
1	1
W	1 ^w
vW	+/-
0	0



Βασικές οδηγίες

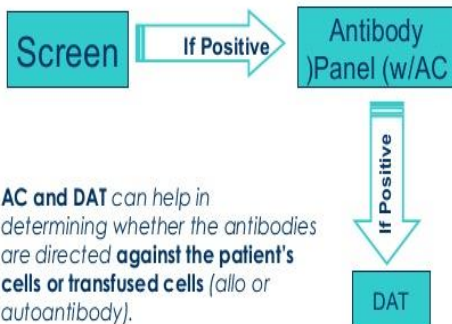
- Έλεγχος ιστορικού & τυποποίησης κατά ABO (ευθεία & ανάστροφη)
 - Κλινικές πληροφορίες, αναντιστοιχία αποτελεσμάτων
- Έλεγχος αυτόλογου μάρτυρα (autocontrol)
 - Πρόσφατη μετάγγιση (4 μήνες)/αυτοαντίσωμα
- Παρατήρηση γενικού μοτίβου αντιδράσεων
 - Ομοιόμορφες/ποικιλόμορφες
 - Ένα ή πολλαπλά αντισώματα
- Αποκλεισμός των αντιγόνων που απουσιάζουν από τις αντιδράσεις
 - Αντιγόνα (ομόζυγα) παρόντα στα κύτταρα που δεν εμφάνισαν αντίδραση
- Παρατήρηση των αντιγόνων που είναι παρόντα
 - Αντιγόνα παρόντα στα κύτταρα που εμφάνισαν αντίδραση
- Χρησιμοποίηση επιπλέον ειδικών τεχνικών εάν είναι απαραίτητο
 - Φάση ενζύμου, ψυχρή φάση, φαινότυπος, έκλουση, προσρόφηση, τιτλοποίηση

Διασφάλιση στατιστικής σημασίας

Κανόνας των 3: τουλάχιστον 3 θετικές και 3 αρνητικές αντιδράσεις με το υπεύθυνο αντιγόνο ($p=0,05$)

Αυτόλογος μάρτυρας - Autocontrol

Autocontrol



Προαιρετική διαδικασία
/
Περιπτώσεις Ασυμβατότητας

- Screening(+)/AC(-) = αλλοαντίσωμα
- Screening(+)/AC(+) = αυτοαντίσωμα
= αυτοαντίσωμα+αλλοαντίσωμα

Autocontrol vs. DAT

Autocontrol

Antibody-sensitization occurs *in vitro*

Contains any additive used in the test

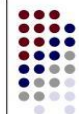
Incubated under the same conditions as the test, e.g. temperature

DAT

Antibody sensitization occurs *in vivo*

No additive

No incubation



Επισημάνσεις

Ψευδώς αρνητικά
αποτελέσματα



Ψευδώς θετικά
αποτελέσματα

- Κακή αναλογία αντιγόνου-αντισώματος

- Ανεπαρκές πλύσιμο ερυθρών

- Καθυστέρηση στην προσθήκη

- αντισφαιρινικού ορού

- Κακή επιλογή παραμέτρων φυγοκέντρησης

- Παρουσία θρόμβων ινικής ανάμεσα στα ερυθροκύτταρα

- Κακώς συντηρημένο ή ληγμένο αντιδραστήριο Coombs

- Ακατάλληλο δείγμα

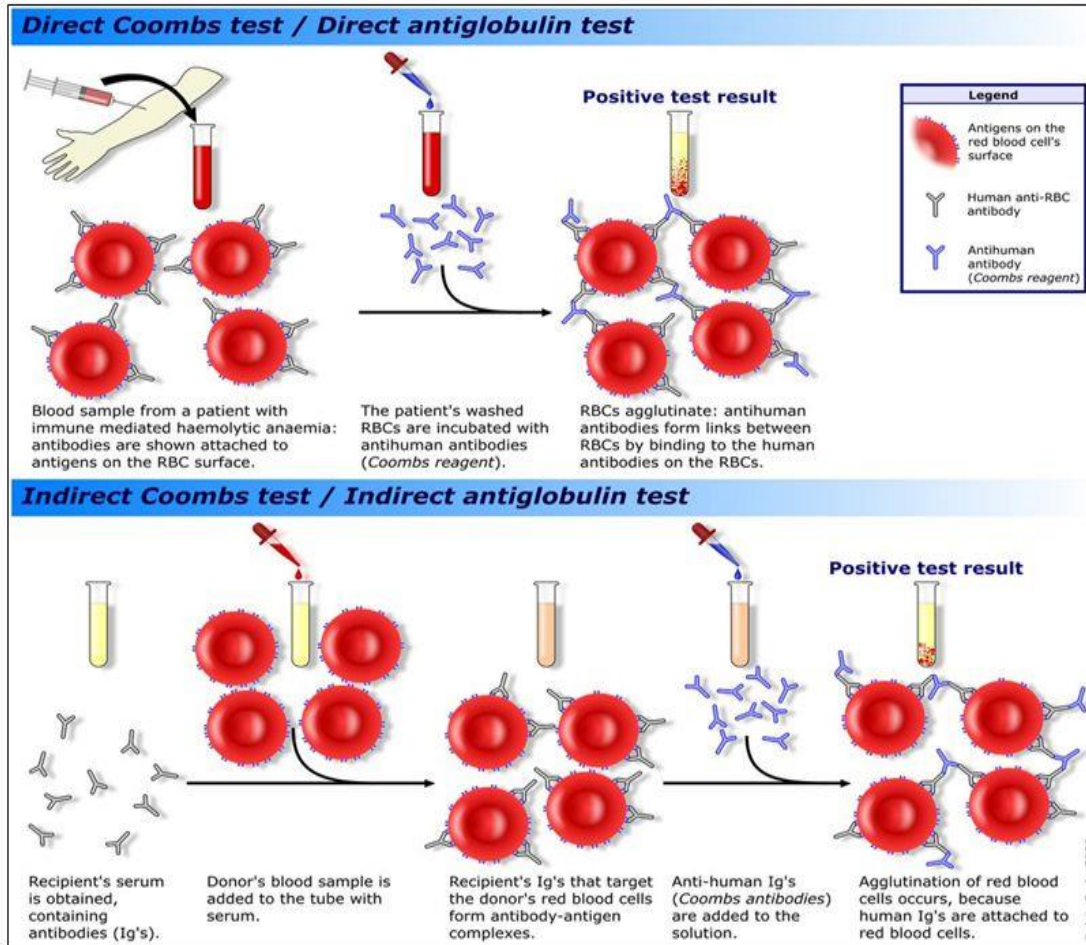
- Αυτόματη συγκόλληση, όπως όταν υπάρχει άφθονο αντίσωμα IgM στην επιφάνεια των ερυθρών

- μη ειδική συγκόλληση

- χρήση πολυδύναμου αντιδραστηρίου, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτικό μέσο PEG

DAT (Direct Agglutination Test) / IAT (Indirect Agglutination Test)

Coombs test



Άμεση Coombs (DAT):

Ανιχνεύει ευαισθητοποίηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων *in vivo*. (επικάλυψη με αντισώματα)

Έμμεση Coombs (IAT):

Ανιχνεύει αντιδράσεις *in vitro* μεταξύ ερυθρών και αντισωμάτων που τα ευαισθητοποιούν αλλά δεν προκαλούν συγκόλληση.

DAT (Direct Agglutination Test) / ΙΑΤ (Indirect Agglutination Test)

DAT

Ανιχνεύει ερυθρά συνδεδεμένα με IgG και συμπλήρωμα.

Η σύνδεση IgG και ερυθρών έχει συμβεί στον οργανισμό του ασθενούς.

ΙΑΤ

Ανιχνεύει ερυθρά συνδεδεμένα με IgG και συμπλήρωμα.

Η σύνδεση IgG και ερυθρών συμβαίνει κατά τη διάρκεια της επώασης.

Μια θετική DAT δε σημαίνει απαραίτητα αιμόλυση άνοσης αιτιολογίας, ούτε μια αρνητική DAT αποκλείει την παρουσία άνοσης αιμόλυσης



Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία ΑΑΑ

Παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό του ασθενούς που προκαλούν μειωμένη επιβίωση των ερυθρών

Πρώτη ένδειξη DAT(+)

➤ DAT(+) Ανιχνεύεται και σε υγιή πληθυσμό



Η διάγνωση προκύπτει από συνδυασμό κλινικών και εργαστηρικών ευρημάτων

Η διερεύνηση της ΑΑΑ είναι όμοια με τη διερεύνηση της DAT(+)



- Πολυδύναμος ΑΗΓ
- Μονοδύναμος ΑΗΓ
- Διενέργεια ΙΑΤ
- Δοκιμασία έκλουσης

- Ιστορικό μεταγγίσεων και κυήσεων
- Αλλοαντίσωμα μπορεί να καλύπτεται από από την παρουσία αυτοαντισώματος
- Χρήση φαρμάκων



Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία θερμού τύπου

▪ Πρωτοπαθής

▪ Δευτεροπαθής

- Λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα
- ΧΛΛ
- Νοσήματα κολλαγόνου (ΣΕ/RA)
- Καρκίνοι
- HIV
- N. Hodgkin's
- NHL
- Πολλαπλούν μύελωμα
- Κύηση
- Σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας
- Θύμωμα
- Ιογενείς λοιμώξεις

εξωαγγειακή αιμόλυση

LDH ↑

Απτοσφαιρίνες ↓

δικτυοερυθροκυττάρωση

▪ Η πιο κοινή μορφή της AAA (70%)

▪ DAT (+) - πολυδύναμο ορό

▪ IgG αντίσωμα (20%), IgG +C3d (70%)
C3d (13%)

▪ Εικόνα πανσυγκόλλησης με ενίσχυση στη φάση του ενζύμου.

▪ Το eluate (+) με εικόνα πανσυγκολλητίνης

▪ Ειδικότητα αυτοαντισώματος: κυρίως έναντι των αντιγόνων του συστήματος Rhesus (συχνότερα αντι-e).

▪ Η ειδικότητα του αυτοαντισώματος συνήθως είναι η ίδια στον ορό και στο έκλουμα.

▪ Αν τα ερυθρά καλύπτονται με συμπλήρωμα, το έκλουμα είναι (-).

Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία ψυχρού τύπου - νόσος ψυχροσυγκολλητινών

Ψυχρό αυτοαντίσωμα (IgM), δρα σε $<37^{\circ}\text{C}$ και εναποθέτει το συμπλήρωμα επί των ερυθρών .

1/3 πρωτοπαθής

2/3 δευτεροπαθής

Χρόνια μορφή: σε ηλικιωμένους

Οξεία μορφή: σε παιδιά και νεαρούς
ενήλικες με λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα ή
λοιμώξεις από *Mycoplasma pneumoniae* ή
EBV



▪ DAT (+) στο C3d

▪ IAT (+) 4°C

Έκλουσμα (-)

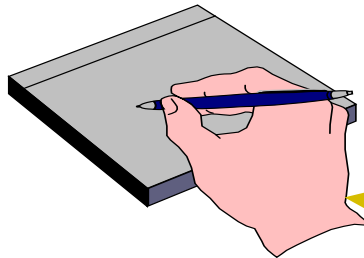
Η δοκιμασία διασταύρωσης και ο έλεγχος αλλοαντισωμάτων να εκτελούνται στους 37°C .

Η μετάγγιση να γίνεται με συσκευή θέρμανσης .

Ταυτοποίηση ασθενούς και λοιπά βασικά σημεία κατά την παραγγελία των παραγώγων

- Αναγνώριση-Σωστή ταυτοποίηση ασθενή
- Σωστή λήψη του δείγματος
- Αναγραφή των στοιχείων του ασθενούς στην ετικέτα του σωληνίσκου μετά τη δειγματοληψία δίπλα στο κρεβάτι νοσηλείας
 - ημερομηνία, ονοματεπώνυμο, πατρώνυμο, ημερομηνία γέννησης, κλινική, καθώς και υπογραφή του ιατρού/λήπτη
- Σωστή συμπλήρωση παραπεμπτικού
 - διάγνωση, ιστορικό προηγούμενων και κυήσεων, ιστορικό αλλοανοσοποίησης, εξετάσεις που απαιτούν την ανάγκη για μετάγγιση π.χ. Ητ ή χρόνος προθρομβίνης, αιμοπεταλίων
- Προσδιορισμός ποσότητας αιματος και η ποσότητά του
 - ΣΕ (πυρεμένα/ακτινοβολημένα), FFP, Αιμοπετάλια αφάιρεσης, άλλο
- Αποστειρωμένο δείγμα και παραπεμπτικού στην Αιμοδοσία

Άρνηση παραλαβής δειγμάτων ή παραπεμπτικών με ανακριβή στοιχεία



Ίδια στοιχεία στο παραπεμπτικό και στο δείγμα



Ηλικία Δείγματος Προμεταγγισιακού Ελέγχου (ΠΜΕ)

Διάστημα από την τελευταία μετάγγιση	Χρονικό διάστημα λήψης του δείγματος
3-14 μέρες	24 πριν τη μετάγγιση
15-28 μέρες	72 πριν τη μετάγγιση
29 μέρες-3 μήνες	1 βδομάδα πριν τη μετάγγιση

Τα δείγματα πρέπει να κρατούνται τουλάχιστον 7 μέρες μετά τη μετάγγιση, ώστε να είναι εφικτή η διενέργεια συμπληρωματικών εξετάσεων σε περίπτωση αντίδρασης κατά τη μετάγγιση

**THANK
YOU**

