

**IMMUNOLOGIA DI BASE REAGENTI E  
REATTIVI IN IMMUNOEMATOLOGIA :  
IMPATTO DEGLI ANTICORPI  
MONOCLONALI NEL LABORATORIO  
DI IMMUNOEMATOLOGIA**

**CRCC REGIONE LIGURIA**

**22-23 NOVEMBRE 2005**

**Dr. Paolo Strada**

# ANTIGENE

**L'ANTIGENE è la struttura sul globulo rosso che è in grado di legarsi con l'anticorpo specifico.**

**L'ANTIGENE può (dopo opportune modificazioni) stimolare la produzione di anticorpi specifici se introdotto in un soggetto che manca di quell'antigene**

# Blood groups structures

**Basics**

Legend:

- L-Fucose
- D-Galactose
- ▲ N-Acetylglucosamine
- ◆ N-Acetylgalactosamine

Antigen structures:

- O**: Red oval with a blue diamond at the top.
- A**: Red oval with a blue diamond, a red square, a yellow triangle, and a green circle at the top.
- B**: Red oval with a blue diamond, a red square, a yellow triangle, a red square, and a green circle at the top.

The blood group antigens are present in soluble form, known as glycoproteins (= a combination of sugar and protein). They are localised primarily on the surface of the erythrocytes.

In 1901 Karl Landsteiner first described the blood group antigens: A, B and O. Two years later one of his pupils also discovered the AB blood group.

**Basics**

- Blood
- Blood groups
- Isoagglutinins
- Rh system
- Antigen
- Antibody
- Epitope
- Specificity of Antibodies
- Agglutination
- Immunology
- Complement
- Summary
- Back

# FENOTIPO- GENOTIPO

- **Con FENOTIPO si intende la descrizione di quali antigeni sono presenti su un determinato globulo rosso e indica semplicemente i risultati di test sierologici.**
- **Con GENOTIPO si intende la determinazione dei geni che codificano per un determinato antigene.**

# ANTICORPI

- Sono prodotti dai linfociti B.
- La prima funzione è quella di distruggere il “ non self ”.
- Si attaccano all'antigene specifico con il Fab.
- Se due Fc sono sufficientemente vicini si attiva il Complemento.

# Structure of antibodies

**Structure**

## Immunoglobulin G

Structure of Immunoglobulin G (IgG) antibody:

- Domains:** C<sub>H</sub>3 - Domain, C<sub>H</sub>2 - Domain, C<sub>L</sub> - Domain, C<sub>H</sub>1 - Domain, V<sub>L</sub> - Domain, V<sub>H</sub> - Domain
- Regions:** Fc - Receptor binding site, Hinge Region, Fab - Antigen binding site
- Chemical Groups:** COOH, NH<sub>2</sub>
- Structural Features:** Disulfide bridge, Carbohydrates
- Chains:** light chain, heavy chain

**Antibody**

- IgG
- IgG Subclasses
- IgM
- IgA
- IgD
- IgE

**IgG**

The IgG antibodies are the main constituent of the immunoglobulins in the serum, representing about 75%.  
Of these, there are IgG1: 60-70%, IgG2: 14-20%, IgG3: 4-8% and IgG4: 2-6%.  
IgG antibodies are capable of crossing the placental barrier.  
They thus activate the antibody-induced protective action of the neonate.  
IgG of type IgG1 and IgG3 are capable of activating complement.

Back

# Basics in Haematology

**Basics**

### Blood Vessel (scheme)

Antibody (IgG)      Granulocyte      Antibody (IgM)

Endothelium

Monocyte      Thrombocyte      Lymphocyte      Erythrocyte

**Basics**

- Blood
- Blood groups
- Isoagglutinins
- Rh system
- Antigen
- Antibody
- Epitope
- Specificity of Antibodies
- Agglutination
- Immunology
- Complement
- Summary
- Back

**Blood**

Blood is the source of essential cellular and humoral components. Blood has long aroused the imagination of doctors, the faithful and mystics alike.

It was William Harvey (1578-1657), a physician at the English court, who wrote in 1628: "It is clear that by virtue of the structure of the heart the blood is conducted continuously through the lung into the aorta as if driven by two water pumps." He thus created the basis for our

# **POLICLONALI - MONOCLONALI**

- **Tutti gli anticorpi presenti nel sangue sono POLICLONALI in quanto sono il prodotto di diversi cloni di linfociti B che riconoscono diversi epitopi dello stesso antigene.**
- **Gli anticorpi MONOCLONALI sono prodotti, dal 1975, da un singolo linfocito in vitro e riconoscono un singolo epitopo dell'antigene.**

# ANTICORPI - CLASSI

- IgM vengono prodotte per prime nella risposta immune sono pentameri, fissano il Complemento, durano poche settimane, agglutinano direttamente, causano emolisi.
- IgG, sono suddivise in 4 sottoclassi(G1-4), sono monomeri, possono fissare il Complemento, durano anni, NON agglutinano direttamente, causano emolisi.

# REAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO

- Il legame Ag-Ab è reversibile.
- Esiste un equilibrio ottimale tra la quantità di Ag e quella di Ab.
- Risente di :
  - 1) Concentrazione Ag
  - 2) pH e forza ionica
  - 3) Concentrazione Ab
  - 4) temperatura.

# **AGGLUTINAZIONE**

## **DUE FASI**

### **PRIMA FASE**

**La sensibilizzazione ove l'Ab si attacca  
all'Ag**

### **SECONDA FASE**

**L'agglutinazione vera e propria**

# AGGLUTINAZIONE

- Le IgG hanno 2 siti di legame distanti 14 nm.
- Le IgM hanno 10 siti di legame distanti 30 nm.
- Con *potenziale Z* si intende la carica elettronegativa di superficie delle emazie data dalla presenza di Acido Sialico.

# AGGLUTINAZIONE

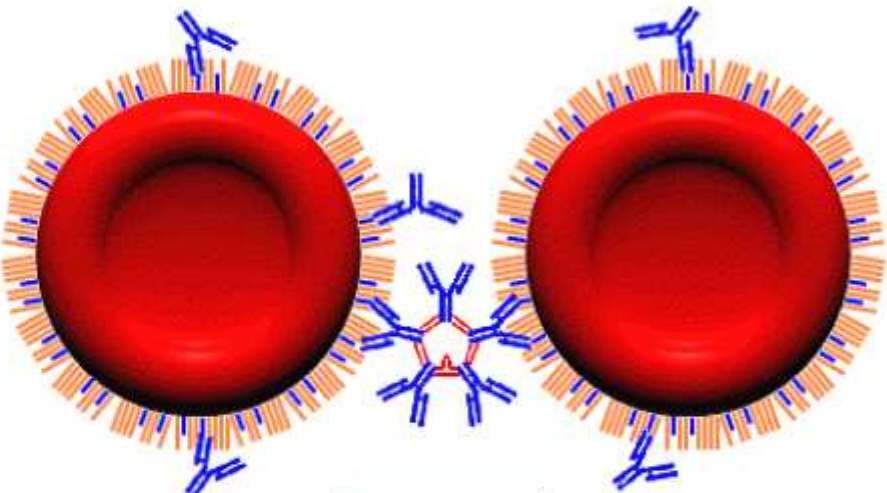
- **Le IgM agglutinano direttamente**
- **Le IgG di norma NO.**

**Per vedere l'agglutinazione diretta si deve modificare il *potenziale Z* o con soluzioni di albumina concentrata o con l'uso di soluzioni a bassa forza ionica.**

# Reaction environment NaCl

Test Milieu

NaCl - Milieu



0,9 % NaCl

Testmilieu

- NaCl Milieu
- Enzyme Milieu
- LISS Milieu

LISS Milieu

0 / 4

Back

NaCl medium

In the presence of complete antibodies (IgM) erythrocytes bearing the corresponding antigen agglutinate. Incomplete antibodies (IgG) can bind to antigen in the NaCl medium, but cannot agglutinate the erythrocytes.

The erythrocytes are suspended in a 3-5% physiological NaCl solution (0.9%, preferably buffered with phosphate to a pH of 7.2).

# POTENZIANTI DELLA AGGLUTINAZIONE

- **ALBUMINA BOVINA**
- **LISS**
- **POLYBRENE**
- **PEG**
- **ENZIMI**
- **GEL TEST**
- **FASE SOLIDA**

# LISS

- Abbassando la forza ionica del medium aumenta l'adesione degli anticorpi;
- Se si abbassa troppo le Ig precipitano in modo aspecifico sugli eritrociti;
- Si deve rispettare l'esatto rapporto LISS-Siero;
- Vengono ridotti i tempi da 60' a 10';
- Può non evidenziare alcuni Ab anti-Kell.

# **POLYBRENE**

**Il POLIBRENE viene aggiunto alla soluzione Anticorpi-emazie.**

**Causa la agglutinazione su tutti i campioni.**

**Solo quelli positivi restano tali gli altri si sciolgono aggiungendo Sodio Citrato.**

# POLIETILENGLICOLE

- Favorisce l'adesione Ag-Ab in modo simile al POLYBRENE ma non causa agglutinazione.
- Si deve sempre usare il siero di Coombs per evidenziare gli anticorpi della classe IgG.

# ENZIMI

**TRIPSINA, FICINA, PAPAINA, BROMELINA,  
PRONASE.**

- **Rimuovono porzioni di glicoproteine dalla superficie dei globuli rossi riducendo il *potenziale Z*.**
- **Riducono la quantità di acqua negli eritrociti avvicinandoli tra loro**
- **Favoriscono la presentazione di alcuni Ag**

**ALCUNI ANTIGENI VENGONO DISTRUTTI**

# Principle of gel technique

**Gel Techniques**

## Gel Technique

Gel card for blood group determination

Microtube

Agglutination

Gel

**Gel techniques**

- Gel Technique
- Principle
- Reagents and Equipment
- ABD Determination
- Centrifugation

IAT- Gel technique

0/8

Back

**GEL TEST**

The gel test dates back to 1986 and is based on the idea of Y. Lapierre. The basic idea was to develop a procedure in which the washing steps otherwise required in conventional Indirect Antiglobulin Tests methods were unnecessary. The determination is performed on a card with 6 microtubes. All microtubes are prefilled with gel.

# FASE SOLIDA

- **Sul fondo di una micropiastra vengono fatti aderire degli Ab o degli Ag.**
- **Si aggiungono gli Ag o Ab e dopo lavaggi il siero di Coombs.**

# TEMPERATURA

**+4° ANTICORPI FREDDI**

**Non importanti per la trasfusione del sangue**

**Di solito naturali, classe IgM.**

**+37° ANTICORPI CALDI**

**cl clinicamente importanti**

**se IgM immunizzazione recente**

**se IgG memoria immunologica**

# **SIERO DI COOMBS**

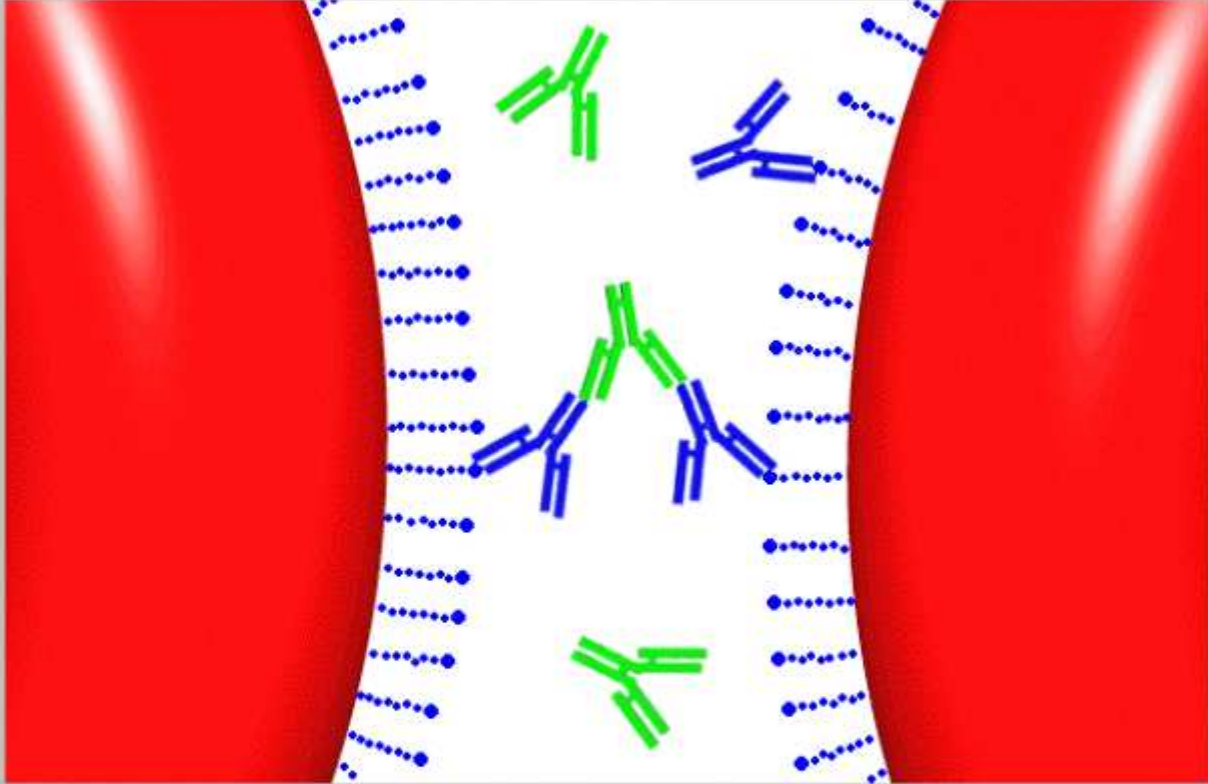
**Anticorpi anti-immunoglobuline umane + anti  
Complemento**

**STANDARD ANTI IgG+C3d**

**Monospecifici anti-IgG ,IgA, IgM, C3c, C3d**

# Principle of the IAT

**Direct Antihumanglobulin Test (DAT)**



**DAT**

Principle

**DAT**

3/5

**Error sources DAT**

0/4

Back

Antihuman globulin serum (AHG, "Coombs' serum") is now added in excess.  
The AHG with its Fab binding sites now binds to the bound anti-D antibodies by the Fc binding sites with its Fab binding sites.

# ANTICORPI MONOCLONALI

- Sono i più usati nella determinazione dei gruppi sanguigni, sono più avidi e più specifici.
- **NON POSSONO ESISTERE STANDARD DI REATTIVITA'**
- Hanno rivoluzionato la Immunoematologia classica che è scritta nei libri.