

Master di Medicina Trasfusionale

Firenze 9.6.2009

RICERCA ALLO-ANTICORPI

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

The diagram illustrates the Y-shaped structure of an IgG antibody. It consists of two heavy chains (outer, pink) and two light chains (inner, white). The heavy chains are divided into three domains: C_H3 (top), C_H2 (middle), and C_H1 (bottom). The light chains are divided into two domains: V_L (top) and V_H (bottom). The C_H1 domain is connected to the C_H2 domain by a hinge region. Disulfide bridges (black lines) connect the heavy and light chains. Carbohydrate groups (blue dots) are attached to the C_H2 domain. The C_H3 domain is labeled as the Fc - Receptor binding site. The V_H and V_L domains form the Fab - Antigen binding sites. The C-terminus (COOH) is at the top, and the N-terminus (NH₂) is at the bottom of the 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

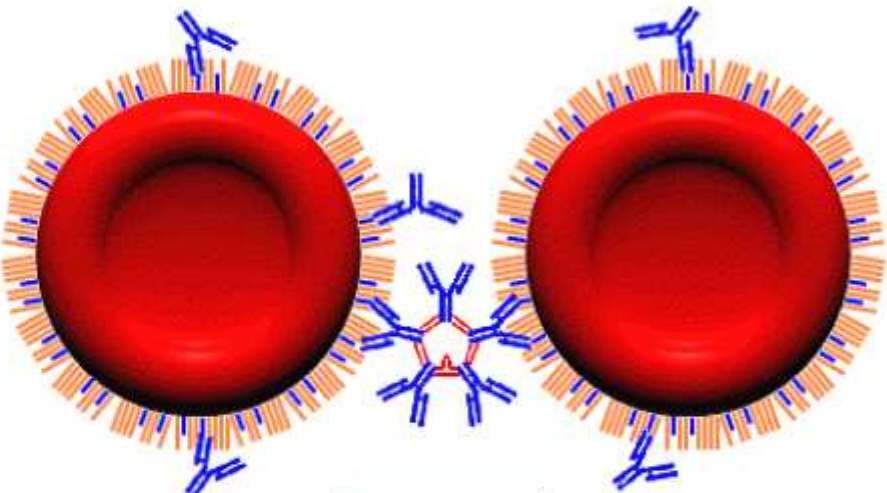
- **Le IgM agglutinano direttamente**
- **Le IgG di norma NO.**

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.**

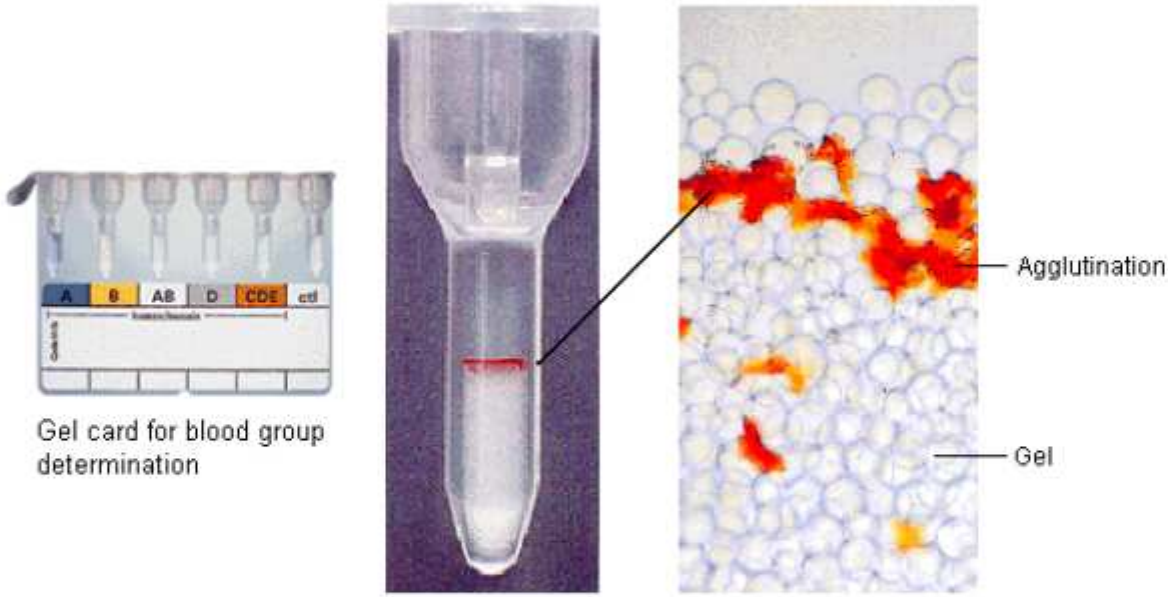
- **Rimuovono porzioni di glicoproteine dalla superficie dei globuli rossi riducendo il *potenziale Z*.**
- **Riducono la quantità di acqua negli eritrociti avvicinandoli tra loro**
- **Favoriscono la presentazione di alcuni Ag**

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

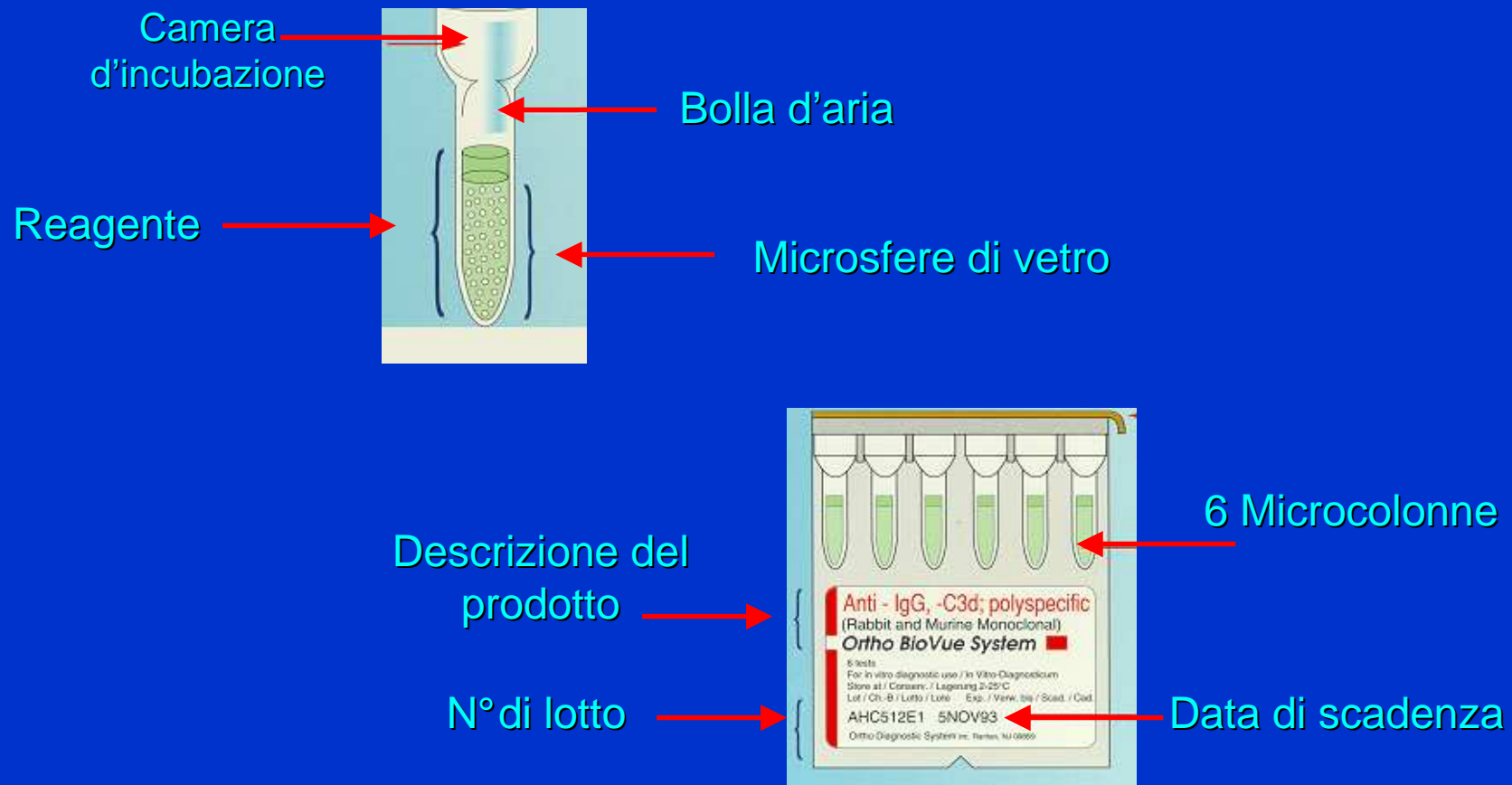
The gel test dates back to 1986 and is based on the idea of Y. Lapierre. The basic idea was to develop a procedure in which the washing steps otherwise required in conventional Indirect Antiglobulin Tests methods were unnecessary. The determination is performed on a card with 6 microtubes. All microtubes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

Sistema Ortho BioVue



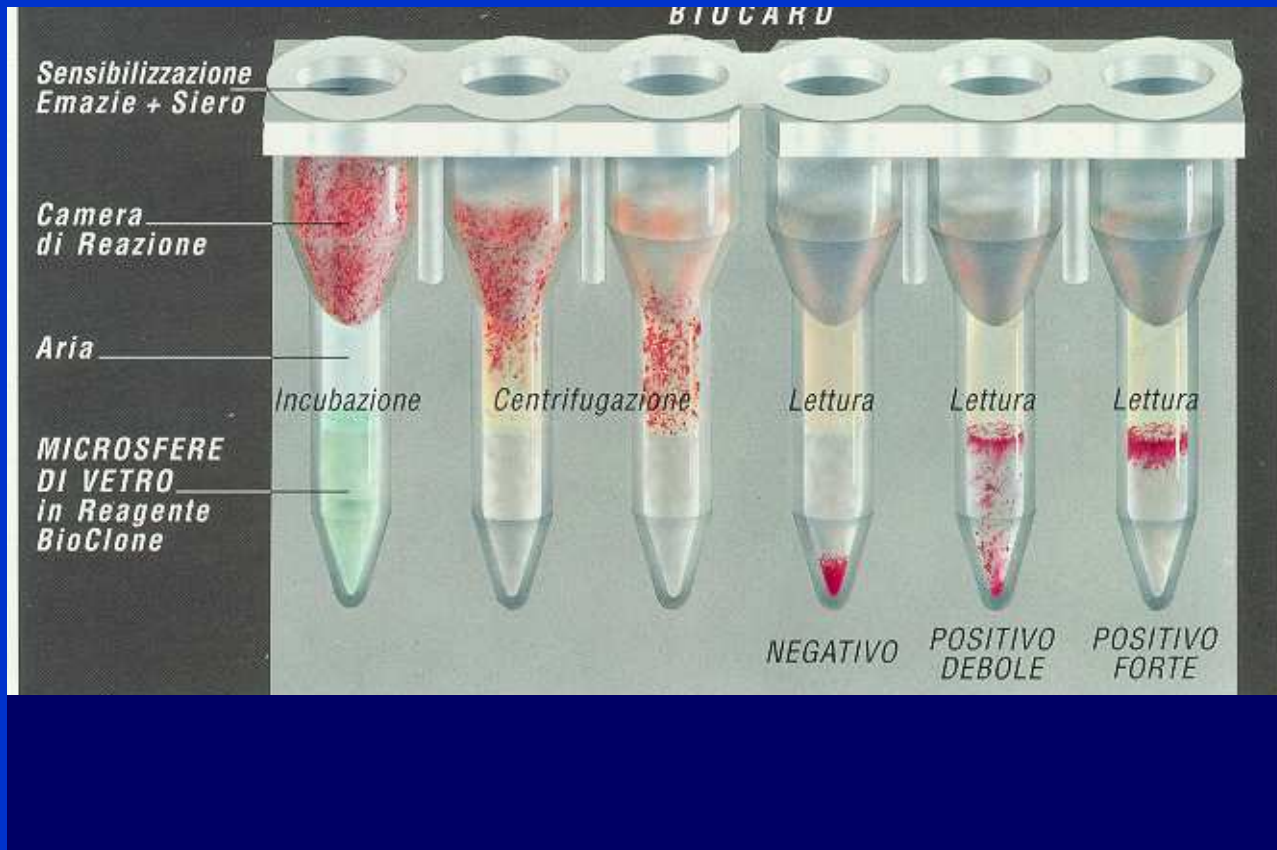
Sistema Ortho BioVue

Tecnologia di Agglutinazione su Colonna



Sistema Ortho BioVue

Tecnologia di Agglutinazione su Colonna



Centrifugazione

Sistema Ortho BioVue

Caratteristiche:

Agglutinazione su colonna in gradiente di densità.

Metodiche standardizzate.

Cassette pronte all'uso.

Interpretazione immediata dei risultati.

Centrifugazione di 5 minuti.

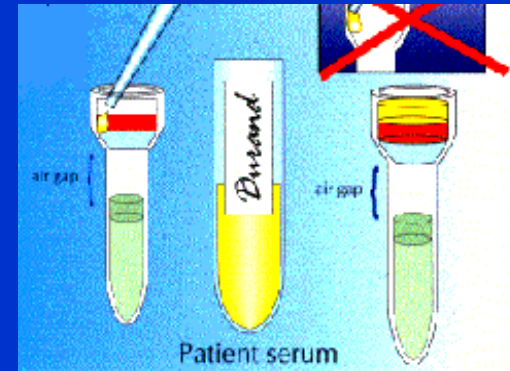
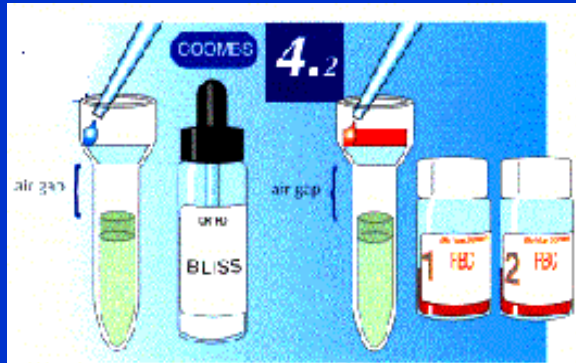
Test di Coombs a 37° con incubazioni di 10 min.

Assenza dei lavaggi nei test di Coombs.

Risultati stabili nel tempo.



Test di Coombs indiretto



Suggerimenti:

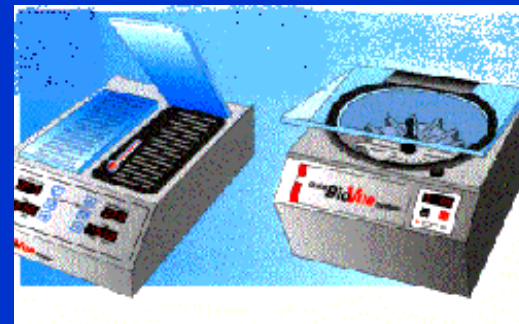
Verifica aspetto e scadenza pannello

Risospensione delicata ed omogenea del pannello

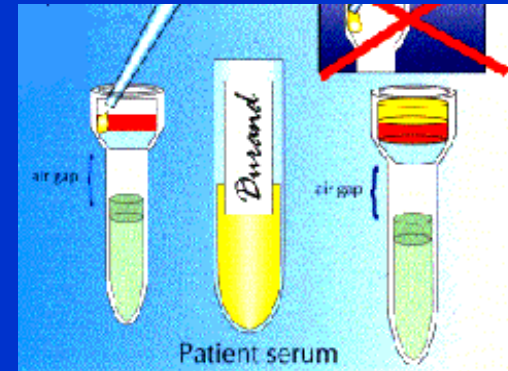
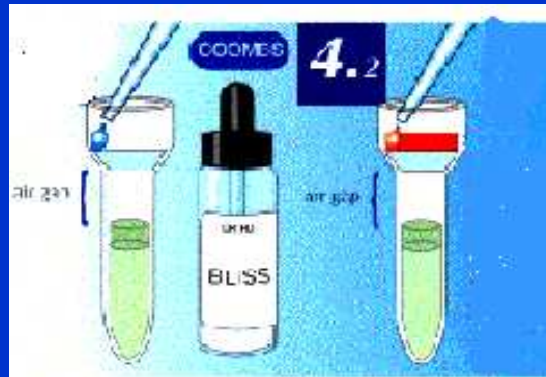
Dispensazione Bliss con gap d'aria

Miscelazione dei reagenti in camera di incubazione

Breve "incubazione" a T.A. per migliorare la reattività



Prova di compatibilità



Precauzioni:

Dispensazione Bliss con gap d'aria

Sospensione rbc donatore 3-5%

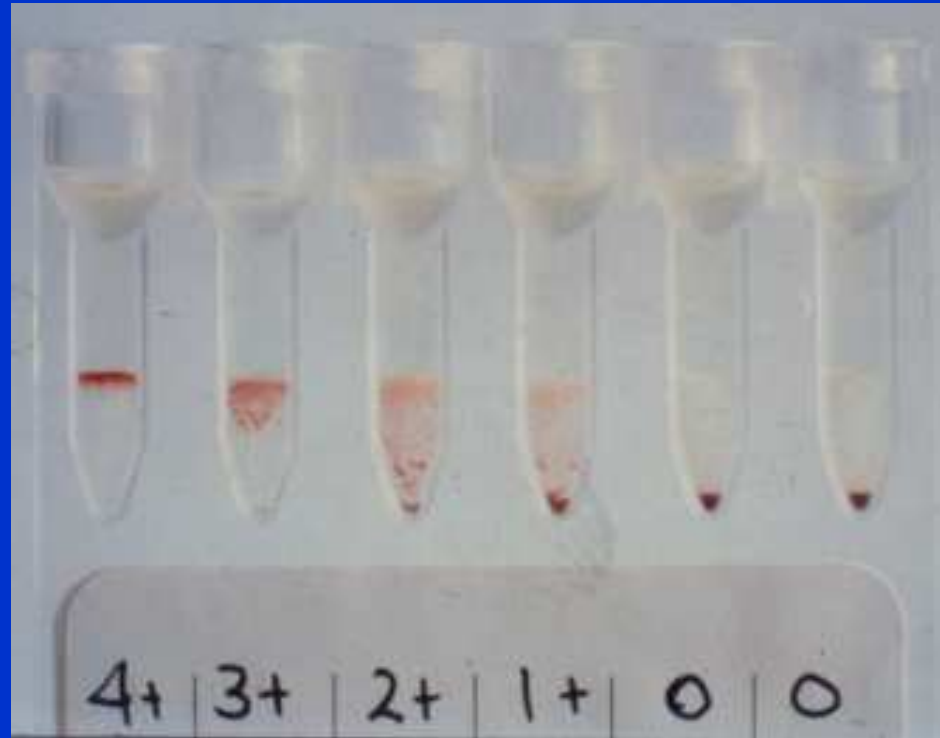
Strippaggio collarino sacca al prelievo

Diluizione manuale in 1 ml di salina o Bliss



Lettura scores risultati

++
miscelazion
e
rapporto
siero-emazie
freschezza
prelievo



--
congelamento
patologie paz.
farmaci
stato emazie
testo
incubazione
eccessiva

Precauzioni:
Verifica aspetto e scadenza
conc. rbc donatore

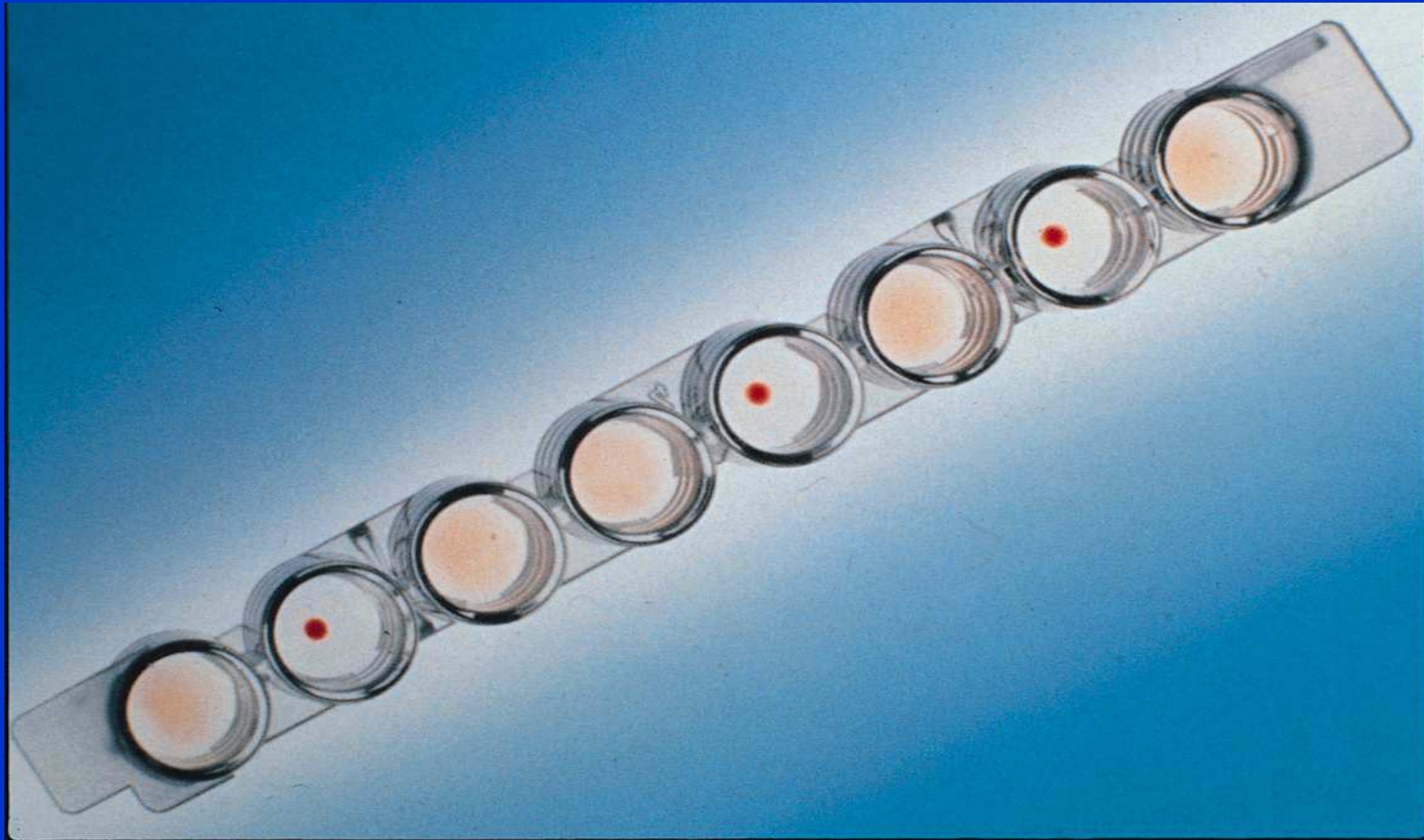
Rischi:
aspecificità
aspecificità

FASE SOLIDA

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

CAPTURE®

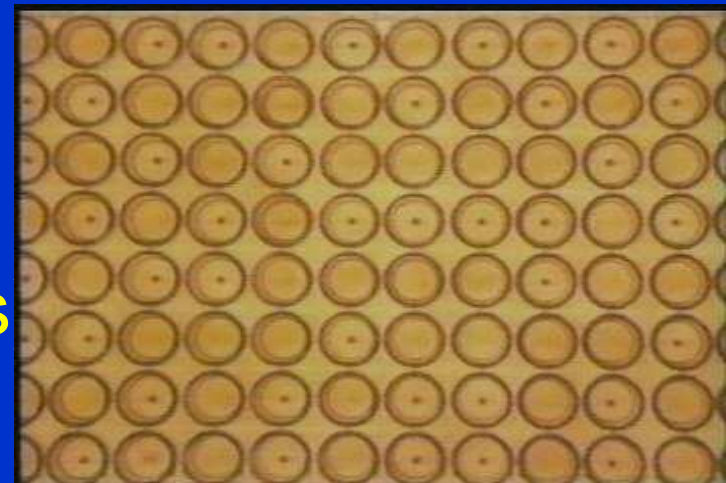
Sistemi in Fase Solida per l'Immunoematologia



CAPTURE[®]

Caratteristiche e vantaggi

- ✓ Elevata Sensibilità
- ✓ Alta Produttività
- ✓ Semplicità di esecuzione
- ✓ Automazione (Galileo - Preci



Capture R Ready Screen

Principi del metodo

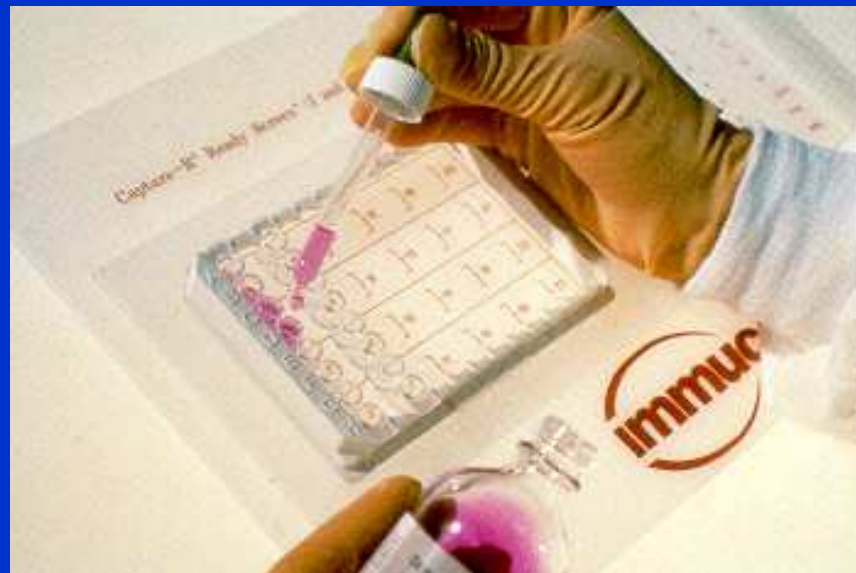
Capture R Ready-Screen® :

- ✓ Ricerca di anticorpi irregolari anti-eritrocitari.
- ✓ Stromi di emazie liofilizzati adesi sulla superficie di micropozzetti in polistirene.
- ✓ Ottimizzazione dell'esposizione antigenica
- ✓ Consistenza antigenica **COSTANTE** durante tutto il periodo di validità del pannello (...e oltre!)

Metodica Capture[®] manuale

Per Capture-R[®] Ready-Screen[®] e
Capture-R[®] Ready-ID[®] :

Aggiunta del LISS nei pozzetti



Metodica Capture[®] manuale

Per Capture-R[®] Ready-Screen[®] e
Capture-R[®] Ready-ID[®] :

Aggiunta siero o plasma



*Un indicatore proteico presente nel LISS
indica l'aggiunta del campione virando al blu.*

Metodica Capture[®]

Incubazione a
37°C per 15 Min



Metodica Capture[®] manuale



Lavaggio della
micropiastra

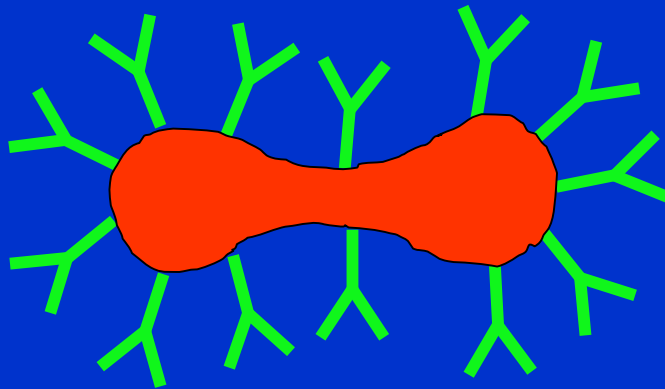
Metodica Capture[®] manuale

Aggiunta di una goccia di emazie indicatrici



Metodica Capture®

Mezzo di rivelazione utilizzato nel sistema Capture R® Ready-Screen:
emazie sulla cui superficie sono adese anti-IgG umane.

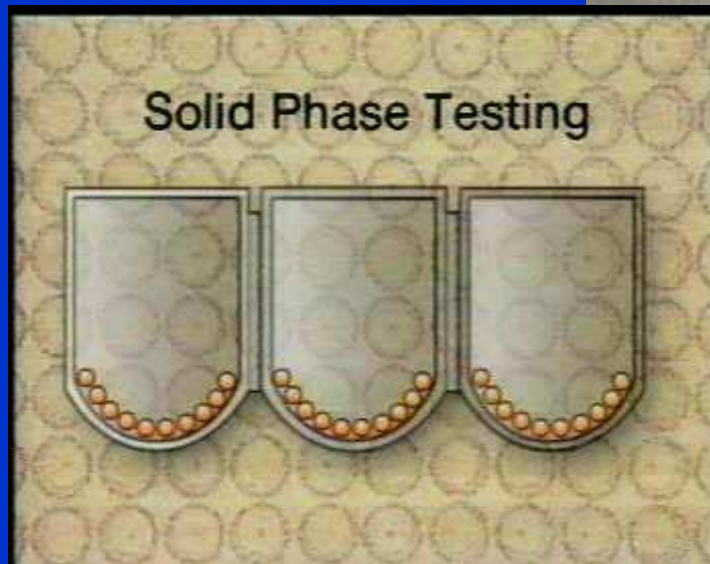


Capture R® Ready
Indicator red cells

EMAZIE INDICATRICI

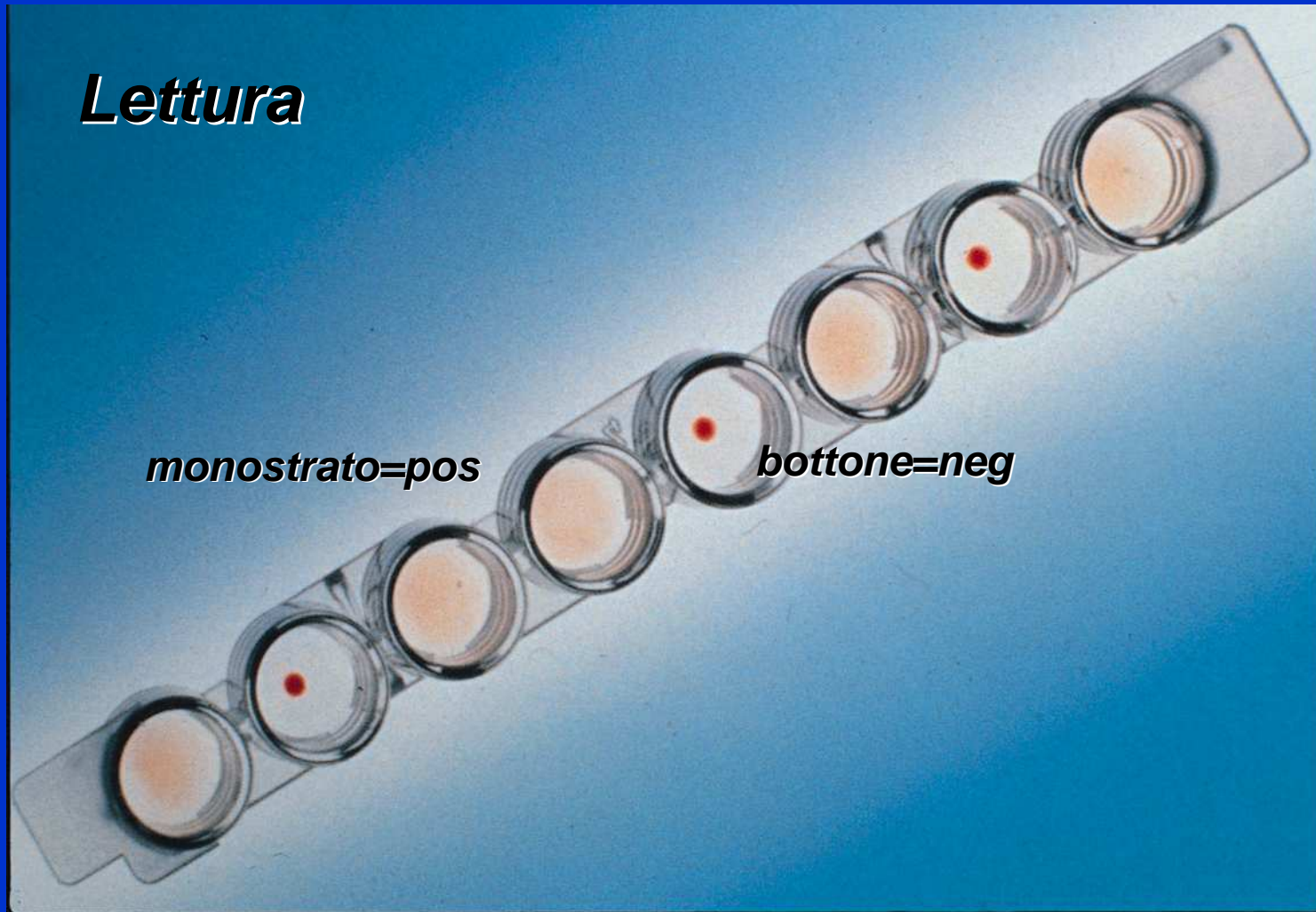
Metodica Capture[®] manuale

Centrifugazione



Metodica Capture®

Lettura



monostrato=pos

bottone=neg

Metodica Capture®

Lettura

Dall'alto



Profilo



Positivo
forte
(4+)

Positivo
debole
(2+)

Negativo

GALILEO



Consente la totale automazione dei test Capture® e di tutti i test immunoematologici:

- *Garanzia di standardizzazione di tutti gli step operativi*
- *Risultati ottimali*
- *Sicurezza dell'operatore*
- *Flessibilità operativa (accesso random, caricamento in continuo)*
- *Elevata cadenza analitica*

TEMPERATURA

+4° ANTICORPI FREDDI

Non importanti per la trasfusione del sangue

Di solito naturali, classe IgM.

+37° ANTICORPI CALDI

clinicamente importanti

se IgM immunizzazione recente

se IgG memoria immunologica

SIERO DI COOMBS

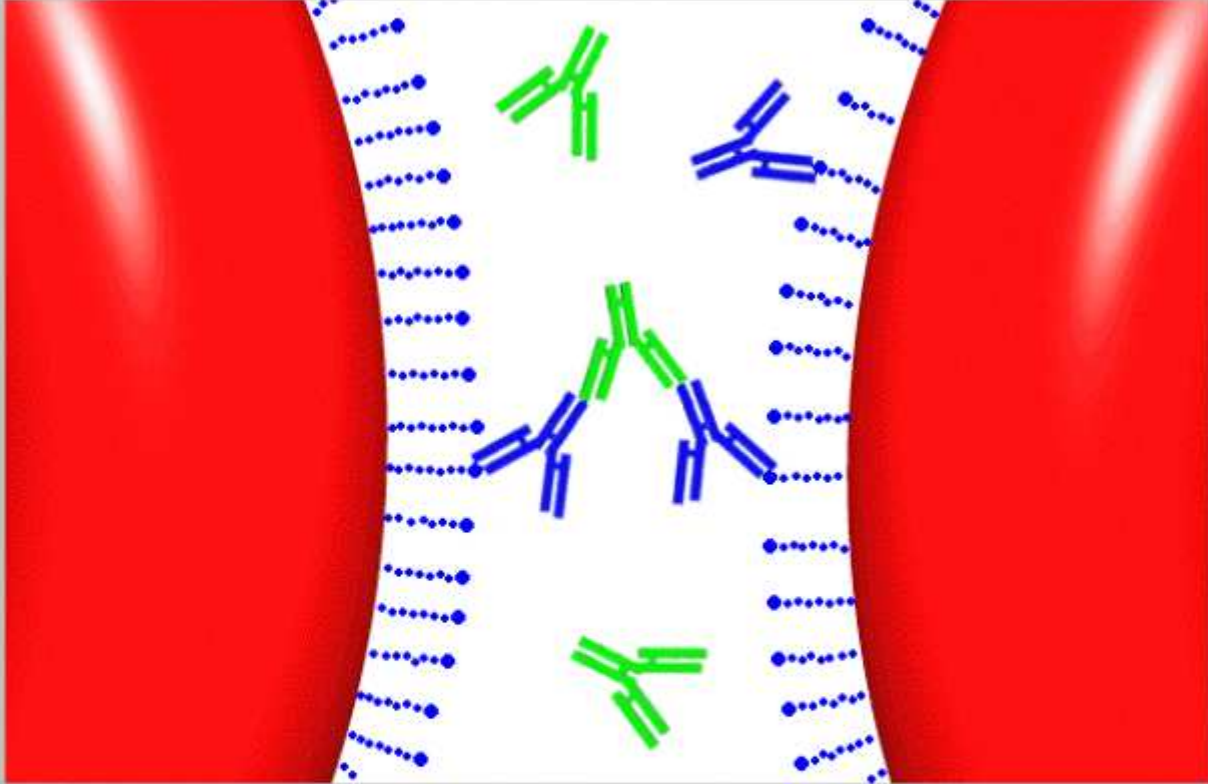
**Anticorpi anti-immunoglobuline umane + anti
Complemento**

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.

Decreto ministeriale 3 marzo 2005

"caratteristiche e modalità per la donazione di sangue e di emocomponenti"

articolo 14: prove pretrasfusionali

- La struttura trasfusionale predispone una procedura documentata per l'assegnazione di sangue e emocomponenti che garantisca.....l'esecuzione di *indagini idonee ad accertare la compatibilità fra il donatore e il ricevente*
-nelle procedure non urgenti ove le condizioni cliniche lo consentano la determinazione del gruppo ABO e del tipo Rh deve essere effettuato *su due campioni di sangue prelevati in due momenti diversi*

Decreto ministeriale 3 marzo 2005
**"caratteristiche e modalità per la donazione
di sangue e di emocomponenti"**

articolo 14: prove pretrasfusionali

-La negatività della ricerca di anticorpi irregolari di rilevanza trasfusionale *consente di omettere l' esecuzione delle prove di compatibilità tra i globuli rossi del donatore e il siero o plasma del ricevente, purchè siano attuate misure volte a garantire la sicurezza trasfusionale*
- Le prove di compatibilità debbono essere *obbligatoriamente eseguite* ogni qualvolta siano stati rilevati anticorpi irregolari anti eritrociti

Decreto ministeriale 3 marzo 2005
"caratteristiche e modalità per la donazione
di sangue e di emocomponenti"

articolo 13: prove pretrasfusionali

- Il campione deve essere raccolto in provetta sterile entro 72 h precedenti la trasfusione.....Se il paziente è stato trasfuso da più di 4 settimane , o non è mai stato trasfuso, il campione può essere raccolto entro 7 giorni precedenti la trasfusione

**The Type and Screen: A Safe
Alternative and Supplement in
Selected Surgical Procedures**

L.I. Boral and J.B. Henry

Transfusion n.° 2 vol. 17 mar.-apr. 1977

Il type and screen

- È una procedura per l'eventuale assegnazione dei concentrati eritrocitari a potenziali candidati alla trasfusione
- Prevede la determinazione del gruppo ematico (ABO- D) e la ricerca di anticorpi irregolari, comprendente obbligatoriamente il test dell'antiglobulina indiretto (TAI)
- La negatività del TAI comporta l'assegnazione delle unità di sangue mediante un controllo rapido di corrispondenza dei gruppi donatore/ricevente

Come garantirsi la sicurezza per la compatibilità ABO ?

- **Immediate spin: test rapido di compatibilità, in fase liquida, tra una sospensione di emazie del donatore ed il siero/plasma del ricevente**
- **Il computer cross-match**
- **Il controllo manuale dei gruppi don/ricev eseguito al momento della consegna**

Quando il type & screen ?

- Valutazione della propria realtà :
 1. Configurazione della struttura (monoblocco, padiglioni, presidi e cliniche esterne collegate, più moduli trasfusionali, ecc.)
 2. Tipologia delle "prestazioni erogate" (specialità chirurgiche e mediche, D.H e D.S., presenza di tipologie speciali di pazienti)
 3. Organizzazione dell' urgenza/emergenza trasfusionale (guardia e reperibilità medico/tecnico)
 4. Frequenza e tipo di urgenza/emergenza

Quando il type & screen ?

- Tipo di dotazione tecnologica dedicata alla immunoematologia :
 1. Strumenti automatici,semi automatici
 2. Esecuzione manuale dei test
 3. Interfacciamento strumenti con il gestionale del trasfusionale e tra questo e i reparti
 4. Collegamento via web o linee dedicate tra centro e periferia

Quando il type & screen ?

- Possibilità di ricorrere eventualmente alla validazione ed assegnazione a distanza (firma digitale)
- Fare i conti con la propria storia, non essere troppo conservatori e non innamorarsi di modelli astratti che poco si adattano alle nostre realtà e tenendo conto innanzi tutto della sicurezza sia dei pazienti che degli operatori
- Sapere che organizzare il T&S vuol dire predisporre rigide linee guida a cui attenersi poichè l' errore di incompatibilità ABO è l' evento più temuto

Quando il type & screen ?

- Nell' urgenza/emergenza prevedere a seconda del tipo di paziente e della valutazione delle richieste (storia trasfusionale, gravidanze, pregresse reazioni, ecc.) la possibilità di eseguire anche il cross match
- Il medico responsabile deve essere quello che nella urgenza decide la strategia migliore

Type & Screen: VANTAGGI

- Valuta l'esistenza di un'immunizzazione di rilevanza trasfusionale
- *Se negativo*: permette di trasfondere qualsiasi unità ABO-Rh compatibile
- Limita l'immobilizzazione delle unità per pazienti a basso rischio di necessità trasfusionale
- In caso di necessità: assegnazioni rapide e sicure
- *Se positivo*: fornisce una prima indicazione sull'Ab coinvolto
- Automazione

Type & Screen: VANTAGGI

- Standardizzazione:
 - allestimento di 3 cellule dei pannelli contro preparazione di diluizione da segmenti delle sacche che possono avere concentrazioni diverse di globuli rossi con possibilità di falsi negativi se la concentrazione dell' antigene fosse bassa
- Minore possibilità che le unità di sangue giungano a scadenza
- Migliore gestione delle scorte

Type & Screen: LIMITI

- Rischio di alloimmunizzazione misconosciuta dello *0.06%* (*circa 1 su 1.600*)
- Rischio di **FALSI NEGATIVI** per:
 1. *Ag privati (Bishop, Box, Batty, Hey, Radin, Swann, Webb, ecc. ecc.)*
 2. *Ag a bassa frequenza (C^v , Lu^a , Kp^a , Kp^b , Bg^a)*
 3. *Concentrazione Anticorpale varia nel tempo*
- Utilizzando emazie di gruppo 0, non svela le incompatibilità ABO
- Test di Coombs diretto sulle emazie del donatore

Caratteristiche di un pannello a tre cellule

- L' utilizzo del T&S quale unica indagine pretrasfusionale deve prevedere l' utilizzo di pannelli eritrocitari a tre cellule (o più) che rappresenti gli antigeni clinicamente più significativi allo stato omozigote (in particolare quelli ad "effetto dose"), e che contengano alcuni antigeni più rari (C^w , Kp^a , Lu^a , Js^a ,

Cross-Match: vantaggi

- *Garantisce la compatibilità tra ricevente ed unità da trasfondere*
- *Può evidenziare la presenza di Ab irregolari*
- *Ha il compito di svelare eventuali incompatibilità ABO derivate da errori di identificazione o etichettatura di donatore o ricevente*
- *Automazione*
- *Favorisce procedure più agevoli di assegnazione del sangue crociato là dove non esiste una guardia attiva*

Cross-Match: limiti

- Studio immunoematologico incompleto
- Se POSITIVO: non identifica l'Ab e l'Ag coinvolti
- Se NEGATIVO: potrebbe restare misconosciuta un'alloimmunizzazione (anche per anni)
- Falso negativo in caso di antigeni debolmente espressi sulle emazie del donatore
- Rende più complessa la gestione delle urgenze in caso di successive richieste di sangue
- Immobilizza unità di sangue anche per alcuni giorni