

A.O.U. SAN MARTINO  
SERVIZIO TRASFUSIONALE

CORSO AVANZATO DI MEDICINA  
TRASFUSIONALE

Titolo:

*Prove pratiche di identificazione di  
alloanticorpi*

Nadia Patrone

Genova: 17/10/2007

# CASO CLINICO

- **Un paziente di sesso maschile di 50 anni di età si presenta al PS con emorragia gastrointestinale, Hb 6,4.**
- **Viene inviata al SIT la richiesta di sangue**

# FASE DI ANALISI AL SIT

a) Gruppo e Rh del paziente:

**A Rh POSITIVO**

b) Politrasmfuso in passato, EMONET

c) TCI screening: **POSITIVO** su 3  
pazzetti ( ++++-, ++-- , ++++-)

# PRIMA FASE DI SVILUPPO

1) TCD: Negativo

2) Fenotipo Rh CCDee,

3) Sistema Kell: kk

- Eseguire la identificazione su panel A e, se occorre, su panel B



Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.

a Johnson & Johnson company

©OCD 1998 Raritan, NJ 08869

PATIENT NAME: M. D.

PATIENT ID: P.S.

DATE: \_\_\_\_\_ TECH: \_\_\_\_\_

CONCLUSION: \_\_\_\_\_

Lot No. 8RA213 Exp. Date 2007-10-16

CCYY-MM-DD

**Panel A**

Reagent Red Blood Cells  
0.8% Resolve® Panel A  
Antigram® Antigen Profile

6935200233

Cell 4 may exhibit variable reactivity with different examples of anti-Xga. Cell 7 of this lot is designated with an A.

Cell#	Rh-hr	Donor Number	Rh-hr								KELL				DUFFY		KIDD			Sex Linked	LEWIS		MNS				P	LUTHERAN		Special Antigen Typing	Cell#	Test Results
			D	C	E	c	e	f*	C <sup>w</sup>	V	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	S	s	M	N	P <sub>1</sub>	Lu <sup>a</sup>			
1	R1wR1	300514	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+s	0	+		1	- + - -
2	R1R1	108521	+	+	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+s	0	+		2	- + + -	
3	R2R2	111585	+	0	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+s	0	+		3	- + + + -		
4	Ror	302857	+	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+		4	- + - -	
5	r'r	117445	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+s	0	+	@	5	-		
6	r'r	71362	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+s	+	+	@	6	- + + + -		
7	rr	114603	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	@	7	- + + + -		
8	rr	114999	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	@	8	- + + - -		
9	rr	110564	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+		9	-		
10	rr	118437	0	0	0	+	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+		10	- + + - -		
11	R1R1	302865	+	+	0	0	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+s	0	+		11	-	
Patient Cells																																
Mode of Reactivity			37°C/Antiglobulin								Antiglobulin				Variable		Cold				Var.											

\* f antigen status may have been determined presumptively based on Rh-rr phenotype.

Shaded columns indicate those antigens which are destroyed or depressed by enzyme treatment.

Cell#	Rh-hr	Donor Number	Rh-hr								KELL				DUFFY		KIDD			Sex Linked	LEWIS		MNS				P	LUTHERAN		Special Antigen Typing	Cell#	Test Results
			D	C	E	c	e	f*	C <sup>w</sup>	V	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	S	s	M	N	P <sub>1</sub>	Lu <sup>a</sup>			



# ANALISI DEI RISULTATI

- Dall'analisi del primo pannello si possono escludere i seguenti Ab: anti-c, Kpb, Fy(b), Jka, Jkb, Lea, Leb, Lub, M, N, S, s.
- Dall'analisi del secondo pannello si nota che l'anti-Kpa e l'anti-Lua non sono rappresentati.
  - **presunta presenza di anti-K + anti-E + altro Ab (anti Fya ???).**

# SECONDA FASE DI SVILUPPO

- Assorbimento con emazie ccDEE kk Fy (a) neg.
- Studio eluato : identificazione Ab → **anti-E**
- Assorbimento con emazie CCDee, Kk, Fy (a) neg.
- Studio eluato : identificazione Ab → **anti-Kell**
- Assorbimento con emazie CCDee kk Fy (a)  
Studio eluato : **NEGATIVO**

# TERZA FASE DI SVILUPPO

- Poiché si continua a sospettare la presenza di un Ab anti – Fya, si procede a denaturare l'Ag bersaglio con papaina e poi si esegue nuovamente la ricerca con le cellule precedentemente risultate positive CCDee, kk, Fy (a+b-) risultato: **NEGATIVO**

**L'antigene viene distrutto dalla papaina !**

# QUARTA FASE DI SVILUPPO

- Per avere conferma della presenza dello alloanticorpo anti-Fy (a) applichiamo la regola del tre:
- Eseguiamo i test con tre cellule Fy(a) POSITIVE
- Eseguiamo i test con tre cellule Fy(a) NEGATIVE
- I primi risultano positivi , i secondi negativi, l'enzima distrugge l'antigene

**E' UN ANTI DUFFY a !**

# ANTICORPO ANTI KELL (1)

- **Generalmente costituito da IgG, si può trovare anche di classe IgM e, più raramente di classe IgA**
- **In caso di debolissimi Ab si possono avere score più elevati con emazie KK ed addirittura apparire negativi con emazie Kk**

# ANTICORPO ANTI KELL (2)

- **Reattività non modificata da pretrattamenti delle emazie test con enzimi proteolitici**
- **Talvolta può essere utile il test all'antiglobulina senza LISS ma in salina. Possibili falsi negativi in fase solida.**
- **L'antigene Kell è normalmente espresso sulle emazie di cordone**

# ANTICORPO ANTI KELL (3)

- **Può essere causa di gravi reazioni trasfusionali emolitiche immediate o ritardate, anche con esito letale**

# ANTICORPI ANTI E (1)

- Sono solitamente IgG, fortemente reattive al Coombs
- Se ne possono rilevare anche di classe IgM, reattivi in sz. Salina ( ab naturali??)
- Talvolta deboli anticorpi sono in grado di reagire solo con emazie trattate con enzimi proteolitici
- La reattività è fortemente incrementata dal trattamento con ficina e papaina, molto meno con tripsina.

# ANTICORPI ANTI E (2)

- Talvolta sono presenti in associazione con Ab anti-c in soggetti CC ee
- Sono raramente causa di MEN, solitamente moderata
- Possono determinare moderate reazioni trasfusionali emolitiche
- L'antigene E è normalmente espresso sulle emazie di cordone

# ANTICORPI ANTI Fya (1)

- Solitamente di classe IgG
- Nel 50% dei casi circa fissano il complemento
- Sono variamente reattivi al Coombs
- Alcuni deboli Ab reagiscono con score più elevati con emazie omozigoti Fya rispetto ad emazie eterozigoti Fya/Fyb
- *La reattività anticorpale è annullata dal pretrattamento delle emazie con ficina o papaina (denaturazione dell'Ag bersaglio), non con tripsina.*

## ANTICORPI ANTI Fya (2)

- **Si conoscono in letteratura casi di MEN da moderati a severi.**
- **Si possono avere reazioni trasfusionali emolitiche ritardate o immediate , solitamente moderate, raramente severe.**
- **Gli antigeni Duffy sono normalmente espressi sulle emazie di cordone**

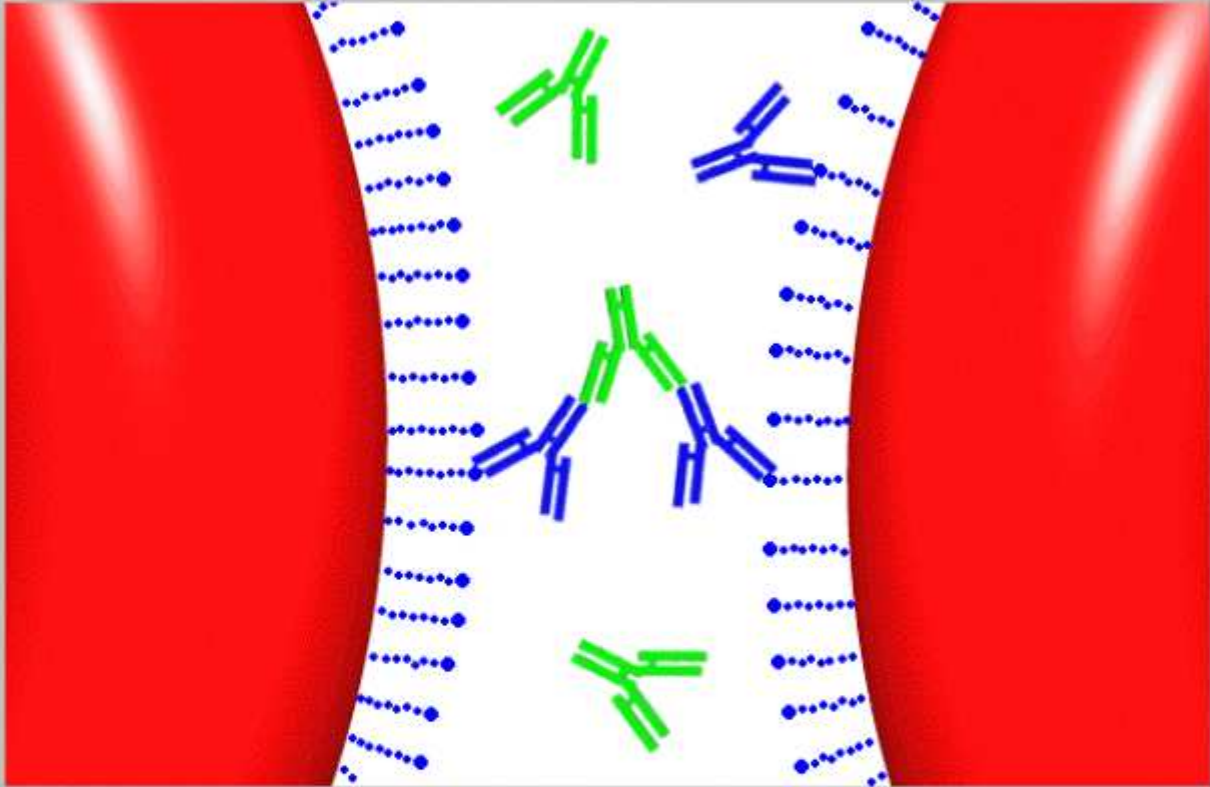
# TRATTAMENTI CON ENZIMI PROTEOLITICI - cenni (1)

## Scopi principali:

- 1) *Rafforzamento o determinazione della reazione di agglutinazione in presenza di Ab in grado di sensibilizzare ma non di agglutinare direttamente gli eritrociti :*
  - *evidenziare IgG in assenza del siero di Coombs*
  - *confermare la presenza di Ab altrimenti poco reattivi*

# 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.

# TRATTAMENTI CON ENZIMI PROTEOLITICI - cenni (2)

- *2) Per distruggere alcuni antigeni eritrocitari mediante denaturazione degli stessi .*

*Gli antigeni distrutti sono:*

***M N Fy(a) Fy(b)***

*La negativizzazione di un precedente test positivo potrebbe confermare la presenza di un anticorpo*

# TRATTAMENTI CON ENZIMI PROTEOLITICI - cenni (3)

- *Gli enzimi possono essere impiegati in 2 modi diversi:*
  - 1) **Aggiunti direttamente al sistema campione – emazie**
  - 2) **Utilizzati per pretrattare le emazie test, che verranno poi utilizzate, dopo lavaggio, per la ricerca (metodo più sensibile)**

# TRATTAMENTI CON ENZIMI PROTEOLITICI - cenni (4)

- *Poiché gli enzimi proteolitici sono particolarmente efficienti nel mettere in evidenza auto anticorpi freddi, si tende a consigliare di utilizzare le ricerche di allo anticorpi esclusivamente a 37°C*

# TRATTAMENTI CON ENZIMI PROTEOLITICI - cenni (5)

- **Enzimi più potenti: ficina e papaina**
- **Altri enzimi: tripsina e bromelina**

Questi prodotti sono presenti sul mercato ad idonee concentrazioni; per il loro uso è necessario seguire le indicazioni fornite dal produttore e scegliere il prodotto che più si adatta al caso da risolvere.

Alcune ditte, forniscono kit di emazie già trattate.

# TECNICA DI ADSORBIMENTO DI ALLOANTICORPI DA UN SIERO (1)

- *Scopo principale della procedura*

**Separazione di miscele di anticorpi per l'identificazione delle singole unità anticorpali**

# TECNICA DI ADSORBIMENTO DI ALLOANTICORPI DA UN SIERO (2)

- *Principio della procedura*

Si usano emazie selezionate da donatore opportunamente lavate:

- **Che presentino la massima espressività possibile per gli Ag bersaglio degli Ab che si desidera adsorbire**
- **Negative per gli Ag corrispondenti agli altri Ab certamente presenti**

## **TECNICA DI ADSORBIMENTO DI ALLOANTICORPI DA UN SIERO (3)**

- **Si mette a contatto un dato volume di emazie con lo stesso volume del siero campione**
  - **Si lascia incubare per almeno 1h miscelando la provetta ogni 10-15'**  
**(la temperatura ed il tempo di incubazione variano in funzione dell'Ab da adsorbire)**

# TECNICA DI ADSORBIMENTO DI ALLOANTICORPI DA UN SIERO (4)

**Si centrifuga, e si separa il siero dalle  
emazie**

**Adesso l'anticorpo è adsorbito sulle  
emazie, legato al corrispondente  
antigene**

## TECNICA DI ADSORBIMENTO DI ALLOANTICORPI DA UN SIERO (5)

*A questo punto è necessario  
effettuare una procedura di  
eluizione degli anticorpi  
adsorbiti sulle emazie*

# PROCEDURA DI ELUIZIONE ACIDA DEGLI Ab DALLE EMAZIE (1)

(metodica usata presso il SIT)

- *Scopo della procedura*

**Scindere il legame Ag – Ab dalle emazie e riportare l'anticorpo in fase liquida**

# PROCEDURA DI ELUIZIONE ACIDA DEGLI Ab DALLE EMAZIE (2)

(metodica usata presso il SIT)

- Eseguire un lavaggio in salina di circa 1 ml di emazie concentrate
- Lavare ancora le emazie per 3 volte con soluzione a bassa forza ionica
- Trattare le emazie con soluzione a pH acido per scindere il legame Ag-Ab
- Centrifugare

# PROCEDURA DI ELUIZIONE ACIDA DEGLI Ab DALLE EMAZIE (3)

(metodica usata presso il SIT)

- Separare e trattare il surnatante con sz tamponata basica , contenente un indicatore, fino a viraggio → pH fisiologico, poi centrifugare.

**ESEGUIRE IL/I TEST DI  
IDENTIFICAZIONE DELL'ANTICORPO,  
SULL'ELUATO COSI' OTTENUTO**

A scenic view of a coastline with mountains and a harbor, seen from a boat on the water. The water is a deep blue, and the sky is clear. The text "Grazie per l'attenzione" is overlaid in the center in a bright green font.

**Grazie per l'attenzione**