ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ -ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΑΜΕΣΗ-ΕΜΜΕΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ COOMBS ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΑΛΑΝΤΖΗΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ-ΜΟΝΑΔΑ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ

ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ-ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

- Μέγεθος
- Χημική δομή
- Πολυπλοκότητα
- Διαλυτότητα
- Φορτίο

- ✓ Ένα αντιγόνο αποτελείται από πολλούς επιτόπους
- ✓ Μπορεί να είναι πρωτεΐνη ή γλυκολιπίδιο

- ➢ Όλα τα παραπάνω καθιστούν ένα αντιγόνο περισσότερο ή λιγότερο ανοσογόνο

ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ-ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

- **Φυσικά αντισώματα**

  - ανευρίσκονται στον ορό ατόμων, τα οποία δεν έχουν εκτεθεί ποτέ σε ερυθροκυτταρικά αντιγόνα
  - παράγονται ως απάντηση, μετά από έκθεση σε περιβαλλοντικές ουσίες, οι οποίες μιμούνται ερυθροκυτταρικά αντιγόνα
  - συνήθως είναι IgM αντισώματα τα οποία δρούν σε χαμηλές θερμοκρασίες
  - αντι-ABH, -Ii -Lewis,-MN,-P

- **Άνοσα αντισώματα**

  - παράγονται μετά από μετάγγιση ή κύηση
  - συνήθως είναι IgG και δρούν στους 37^{o} C
  - απαιτούν τη χρήση ενισχυτικών μέσων για την ανάδειξή τους
  - αντι-Rh,-Kell,-Duffy,-Kidd,-Ss

- **Αλλοαντισώματα/αυτοαντισώματα**

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

- **Αιμοσυγκόλληση**

  - η κύρια τεχνική με την οποία ανιχνεύονται ερυθροκυτταρικά αντιγόνα, αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα καθώς και οι μεταξύ τους αντιδράσεις

- Στην αρχική φάση(ευαισθητοποίηση), επίτοποι αντιγόνων στην επιφάνεια των ερυθρών, συνδέονται με τις αντίστοιχες περιοχές των αντισωμάτων και συγκρατούνται με ειδικούς δεσμούς, ενώ δεν παρατηρείται ορατή συγκόλληση
- Στη δεύτερη φάση, σχηματίζεται ένα πλέγμα από πολλαπλές γέφυρες αντιγόνου/αντισώματος μεταξύ των ερυθρών και προκαλείται ορατή συγκόλληση ερυθροκυττάρων

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

- **Καθίζηση**

  - σχηματισμός ενός,συνήθως ορατού, αδιάλυτου συμπλέγματος μετά από αντίδραση διαλυτού αντιγόνου με διαλυτό αντίσωμα

  - αποτελεί την κατάληξη τεχνικών όπως, η ανοσοδιάχυση και η ανοσοηλεκτροφόρηση

- **Αιμόλυση**

  - Προκύπτει από αντίδραση αντιγόνου/αντισώματος,η οποία προκαλεί ενεργοποίηση του συμπληρώματος, λύση του ερυθροκυττάρου και απελευθέρωση της ενδοκυττάριας αιμοσφαιρίνης

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ

- **<u>Αναλογία αντιγόνου αντισώματος</u>**

  - επηρεάζει την ταχύτητα της αντίδρασης

  - συνήθης αναλογία αντιγόνου/αντισώματος→ 2 σταγόνες ορού και μία σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών 3-5%

  - ασθενής έκφραση αντιγόνου επηρεάζει την αντίδραση(π.χ ετερόζυγη έκφραση του Jka αντιγόνου)

- **<u>PH</u>**

  - ιδανικό PH αντίδρασης 6.5-7.5

- **Φυγοκέντρηση**

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ

- **Θερμοκρασία**

  - τα IgM αντισώματα δρούν ιδανικά σε θερμοκρασίες 4°-27°C
  - τα IgG αντισώματα δρούν στους 37°C
  - αναλόγως ενδείξεων, οι δοκιμασίες αντίδρασης αντιγόνου /αντισώματος γίνονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες

- **Τύπος ανοσοσφαιρίνης**

- ✓ τα IgM αντισώματα προκαλούν άμεση συγκόλληση ερυθροκυττάρων σε διαλύματα φυσιολογικού ορού(NaCl 0.9%) χωρίς προσθήκη ενισχυτικών μέσων
- ✓ Η ανίχνευση των κλινικά σημαντικών IgG αντισωμάτων απαιτεί τη χρήση ενισχυτικών μέσων

- **Ενισχυτικά μέσα**

- ➢ τα περισσότερα ενισχυτικά μέσα δρουν, μειώνοντας το **zeta-δυναμικό** των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ

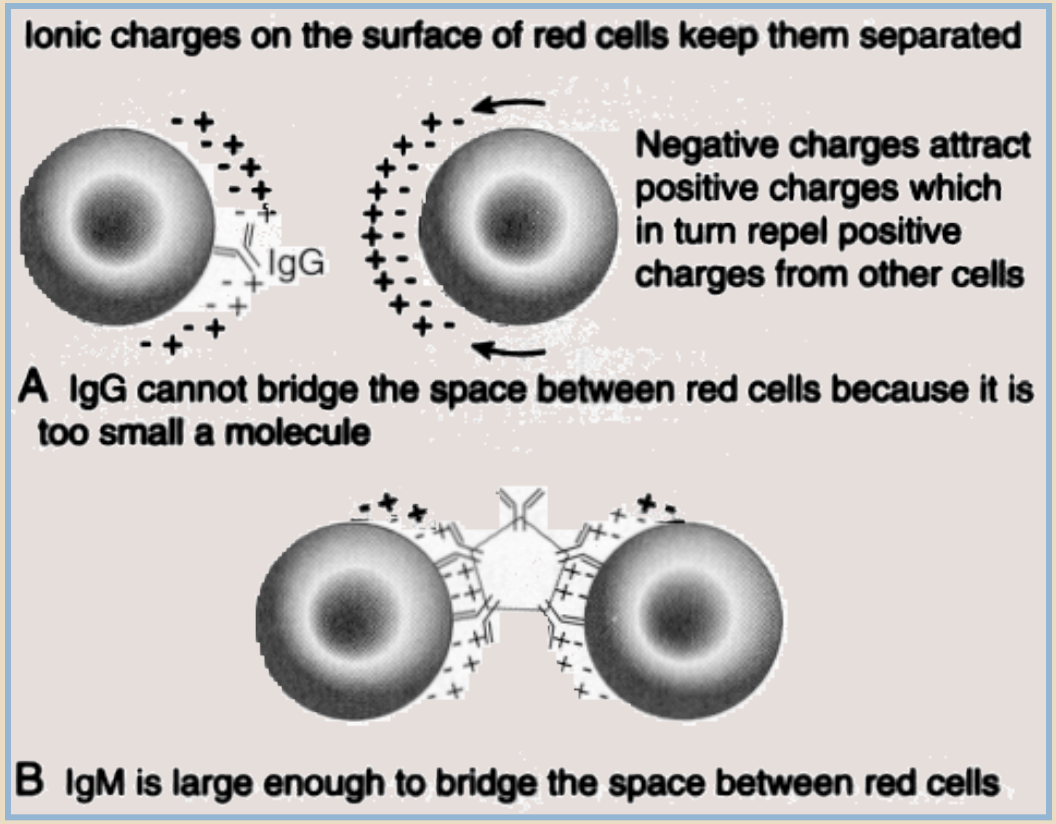
- Τα ερυθροκύτταρα, λόγω της παρουσίας σιαλικών οξέων στη μεμβράνη τους, περιβάλλονται από αρνητικά φορτισμένα ιόντα, απωθούνται μεταξύ τους και παρεμποδίζεται με αυτόν τον τρόπο η συγκόλλησή τους στο περιφερικό αίμα

- Η αρνητικά φορτισμένη ζώνη προσελκύει θετικά φορτισμένα ιόντα και προκύπτει ένα δυναμικό το οποίο καλείται **zeta-δυναμικό**

- Τα IgM και IgG αντισώματα διαφέρουν στον τρόπο αλληλεπίδρασης τους με το zeta-δυναμικό

- Μειώνοντας το zeta-δυναμικό, επιτρέπουμε στα περισσότερο θετικά φορτισμένα αντισώματα να αντιδράσουν με τα αρνητικά φορτισμένα ερυθρά

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΟΙ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΙΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ



ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ ΕΝΙΣΧΥΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Αντιδραστήριο	Μηχανισμός δράσης	Τεχνική	Ανίχνευση αντισωμάτων
Φυσιολογικός ορός		4-22° C(IgM)/άμεση φυγοκέντρηση 37° C(IgG) /επώαση 45-60'	IgM IgG
Αντισφαιρινικός ορός(AHG)	Προκαλεί ορατή συγκόλληση ευαισθητοποιημένων με αντισώματα ερυθρών	- Άμεση δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού(DAT) - Έμμεση δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού(IAT)	-Πολυδύναμος(IgG και C3d) - μονοδύναμος(IgG)
Αλβουμίνη 22%	Τροποποίηση zeta δυναμικού	Επώαση στους 37° C για 15-30'/IAT	IgG
LISS	Επιταχύνει την πρόσληψη του αντισώματος από τα ερυθρά	Επώαση στους 37° C για 5-15'/IAT	IgG
PEG	Αφαιρεί νερό από το διάλυμα της αντίδρασης, συμπυκνώνει το αντίσωμα, αυξάνει την αλληλεπίδραση αντιγόνου/αντισώματος	Επώαση στους 37° C για 10-30'/IAT Δεν απαιτείται φυγοκέντρηση	IgG
Ένζυμα ***-παπαίνη*** ***-βρωμελίνη*** ***-φυσίνη*** ***-θρυψίνη***	-Μειώνουν το αρνητικό φορτίο των ερυθρών -Καταστρέφουν ή μειώνουν την έκφραση κάποιων αντιγόνων, ενώ ενισχύουν την έκφραση κάποιων άλλων	-Άμεση προσθήκη ενζύμου στο μείγμα ερυθρών/ορού -Χρήση ερυθρών επεξεργασμένων με ένζυμα	Καταστρέφουν τα αντιγόνα MNS, Duffy Ενισχύουν τα αντιγόνα Rh, Kidd,P,Lewis

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ(COOMBS΄TEST)

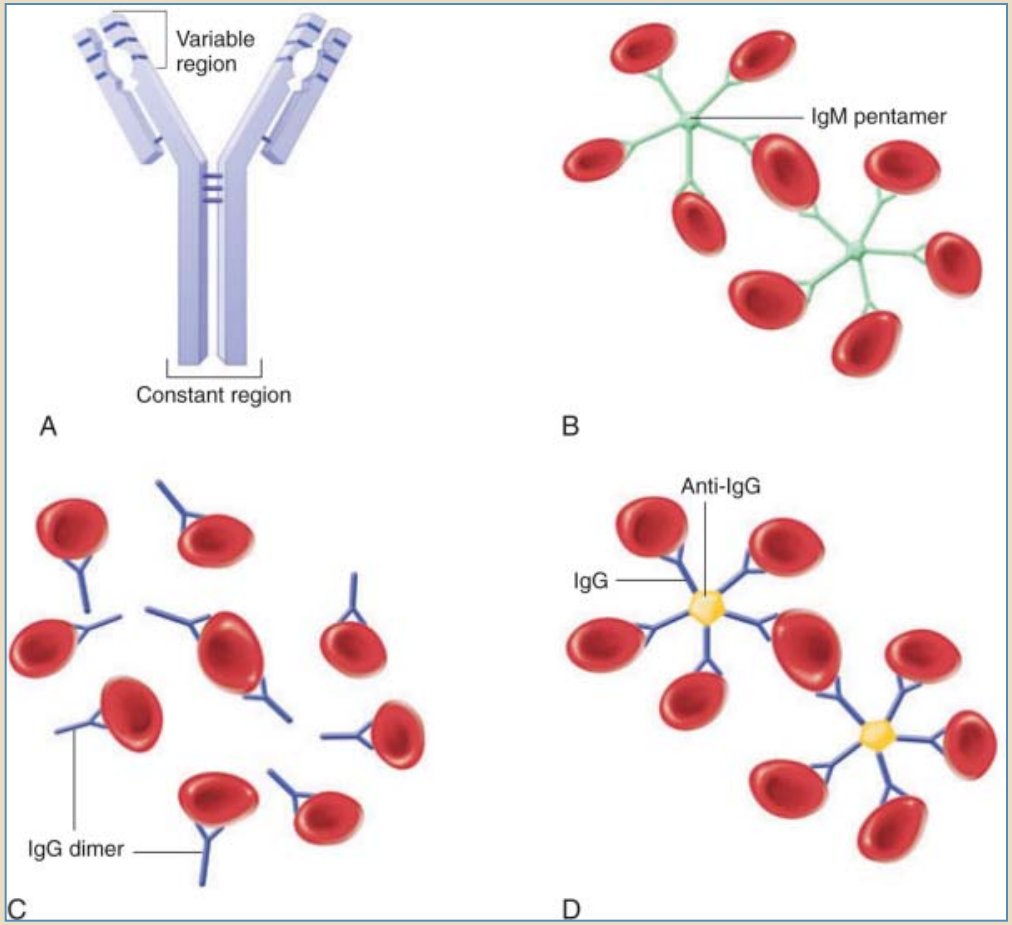
- Η δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού (AHG) χρησιμοποιείται για την ανάδειξη των ατελών IgG αντισωμάτων είτε αυτά είναι ελεύθερα στον ορό ή προσκολλημένα στα ερυθρά ,καθώς και για την ανίχνευση του προσκολλημένου στα ερυθρά συμπληρώματος.

- Η δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού στηρίζεται στην αρχή σύμφωνα με την οποία, αντιανθρώπινες σφαιρίνες οι οποίες έχουν παραχθεί από ανοσοποιημένα ζώα, αντιδρούν με ανθρώπινες σφαιρίνες(IgG ή συμπλήρωμα) ελεύθερες στον ορό ή προσκολλημένες στα ερυθροκύτταρα

- Πριν από την ανακάλυψη του AHG, μόνο IgM αντισώματα είχαν καταδειχθεί

- Η δοκιμασία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1945 από τον Coombs και συν.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ(COOMBS΄TEST)



ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. **Πολυδύναμος AHG**

   - περιέχει αντισώματα για τις ανθρώπινες IgG ανοσοσφαιρίνες και για το C3d κλάσμα του ανθρώπινου συμπληρώματος

   - μπορεί να περιέχει ίχνη από αντι-C3b,C4b,C4d

   - μπορεί να περιέχει μικρή ποσότητα αντισωμάτων έναντι βαριών αλύσεων των IgA και IgM

   - εάν περιέχει ίχνη αντισωμάτων έναντι των κοινών σε όλες τις ανοσοσφαιρίνες κ και λ ελαφρών αλύσεων μπορεί να αντιδρά με IgA και IgM μόρια

2. **Μονοδύναμος AHG**

   - περιέχει μόνο αντι- IgG ή αντι- C3d /C3b

   - ο αντι- IgG AHG περιέχει αντισώματα έναντι του Fc κλάσματος των βαριών αλύσεων των IgG μορίων

   - ο αντι- C3d /C3b δεν παρουσιάζει αντίδραση με τις ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ-ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

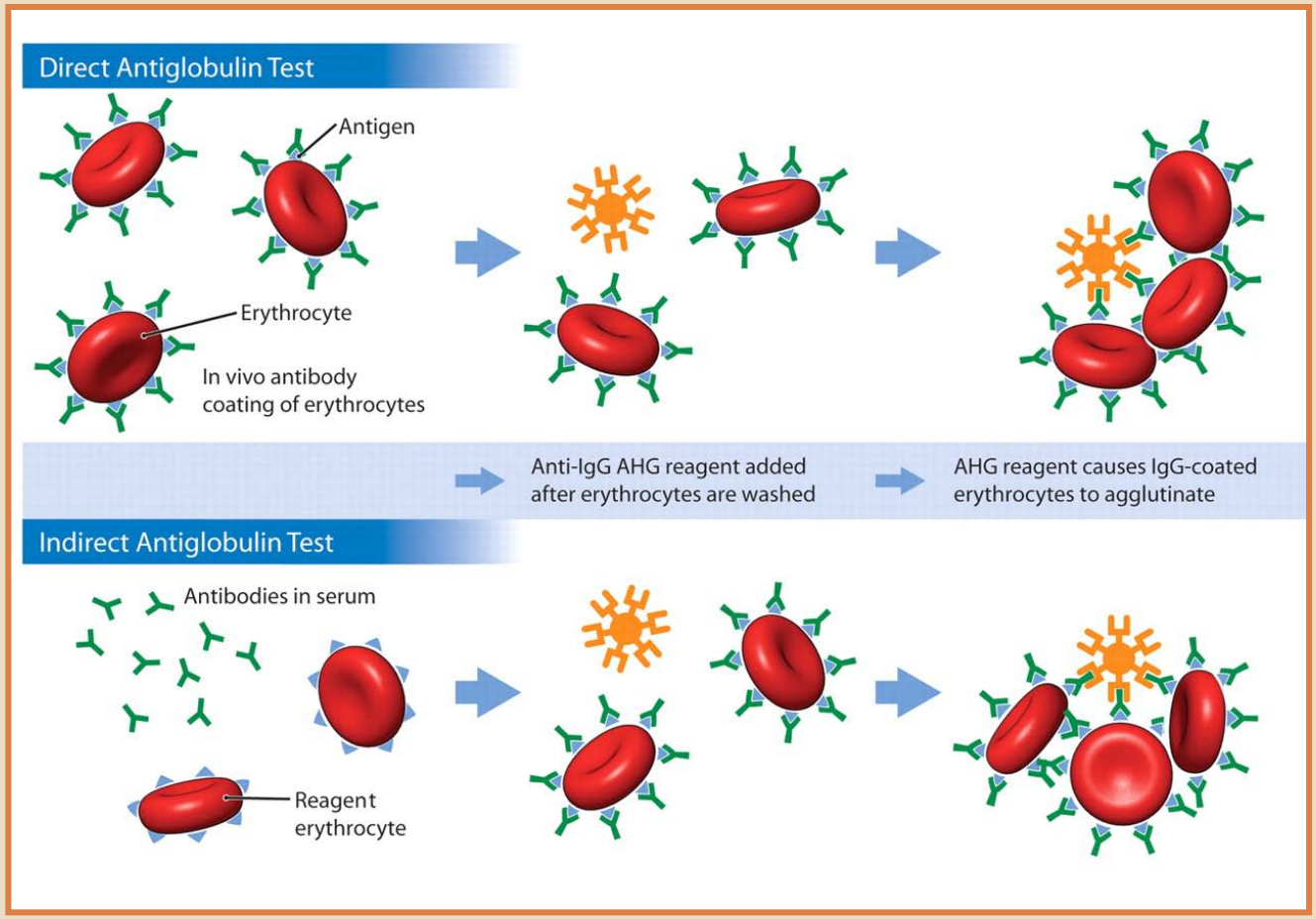
- Η κλασσική μέθοδος παραγωγής AHG ξεκινά με τη χορήγηση ανθρώπινου ορού ή κεκαθαρμένης σφαιρίνης σε πειραματόζωα, κυρίως κουνέλια

- Η ανθρώπινη σφαιρίνη λειτουργεί ως ξένο σώμα και προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων από τα κουνέλια

- Αυτή η τεχνική προκαλεί την παραγωγή **πολυκλωνικού αντισφαιρινικού ορού**, ο οποίος περιέχει μείγμα αντισωμάτων από διαφορετικούς κλώνους Β-λεμφοκυττάρων και αναγνωρίζει διαφορετικούς επιτόπους ενός αντιγόνου ή το ίδιο τμήμα ενός αντιγόνου αλλά με διαφορετικές συγγένειες

- Με την τεχνική της υβριδοποίησης, μπορεί να παραχθεί **μονοκλωνικός αντισφαιρινικός ορός**, ο οποίος προκύπτει από ένα κλώνο Β-λεμφοκυττάρων και αναγνωρίζει μόνο ένα επίτοπο του αντιγόνου

ΑΜΕΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ(DAT)
ΕΜΜΕΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ(IAT)

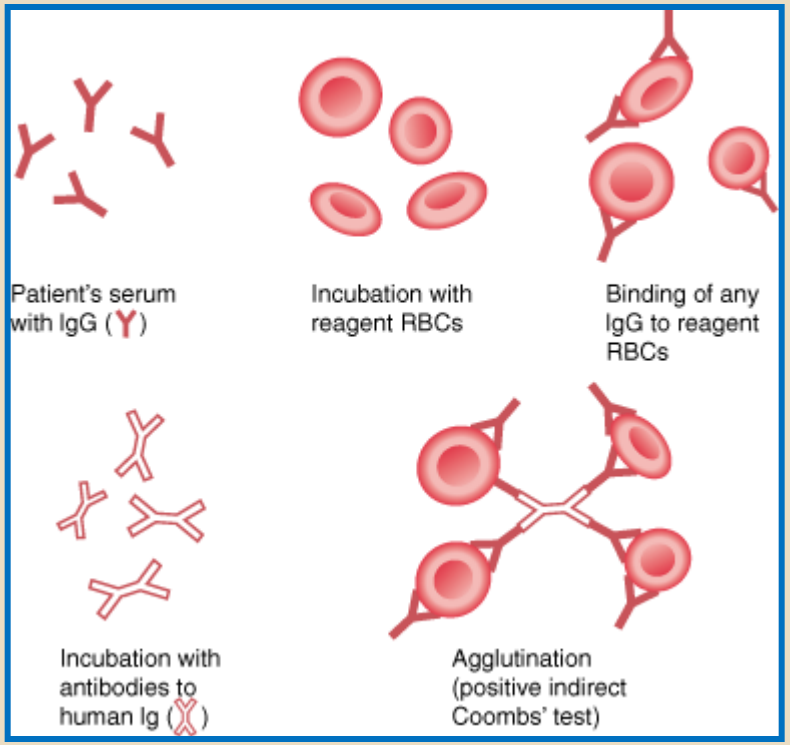


ΕΜΜΕΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ(IAT)

- Η IAT ανιχνεύει ευαισθητοποίηση ερυθροκυττάρων με αντισώματα, η οποία έχει συμβεί in vitro

- ✓ - ανίχνευση αντιερυθροκυτταρικών αντισωμάτων στον ορό ασθενών, χρησιμοποιώντας ερυθρά γνωστού φαινοτύπου(screening test)
- ✓ - ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των προς μετάγγιση ερυθρών του δότη(διασταύρωση)
- ✓ - ταυτοποίηση και τιτλοποίηση αντισωμάτων
- ✓ - πλήρης φαινότυπος ερυθρών χρησιμοποιώντας γνωστούς αντιορούς

ΕΜΜΕΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ(IAT)



ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ(screening test)

- Κλινικά σημαντικά, θεωρούνται τα αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα(ΑΑ) τα οποία προκαλούν μειωμένη επιβίωση των μεταγγιζομένων ερυθρών ή αιμολυτική νόσο του νεογνού

- Δρούν στους 37◦C και ανιχνεύονται με έμμεση δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού(IAT)

- Η ανίχνευσή τους αποτελεί μέρος του προμεταγγισιακού ελέγχου ή του ελέγχου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ(screening test) ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- **ΚΛΑΣΣΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ**

- Ορός + ερυθρά ελέγχου(3 κύτταρα)→ άμεση φυγοκέντρηση(ψυχρά ΑΑ)→ επώαση στους 37◦C→ πλύσιμο με φυσ. Ορό→ προσθήκη AHG→ φυγοκέντρηση→ παρατήρηση για ύπαρξη συγκόλλησης ή αιμόλυσης
- Προσθήκη αντιδραστηρίων τα οποία ενισχύουν την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος ή μειώνουν το χρόνο επώασης

  -22% αλβουμίνη

  - Liss

  - PEG
- Τα ερυθρά ελέγχου είναι ομάδας Ο, συνήθως υπάρχουν σε σετ των 2 ή 3 κυττάρων και συνοδεύονται από έντυπο το οποίο αναφέρει την ακριβή αντιγονική τους σύσταση
- Τα ερυθρά ελέγχου πρέπει να εκφράζουν τα πιο σημαντικά ερυθροκυτταρικά αντιγόνα: D,C,c,E,e,K,k,Fya,Fyb,Jka,Jkb,S,s,M,N,Lea,Leb,P1,Lua,Lub
- Επειδή κάποια αντισώματα αντιδρούν πιο έντονα με τα αντίστοιχα αντιγόνα όταν αυτά βρίσκονται σε ομόζυγη κατάσταση πάνω στα ερυθρά, θα πρέπει κάποια από τα ερυθρά ελέγχου να εκφράζουν και τους εξής φαινότυπους:

  Jk(a+b-), Jk(a-b+),Fy(a+b-),Fy(a-b+),S+s-,S-s+

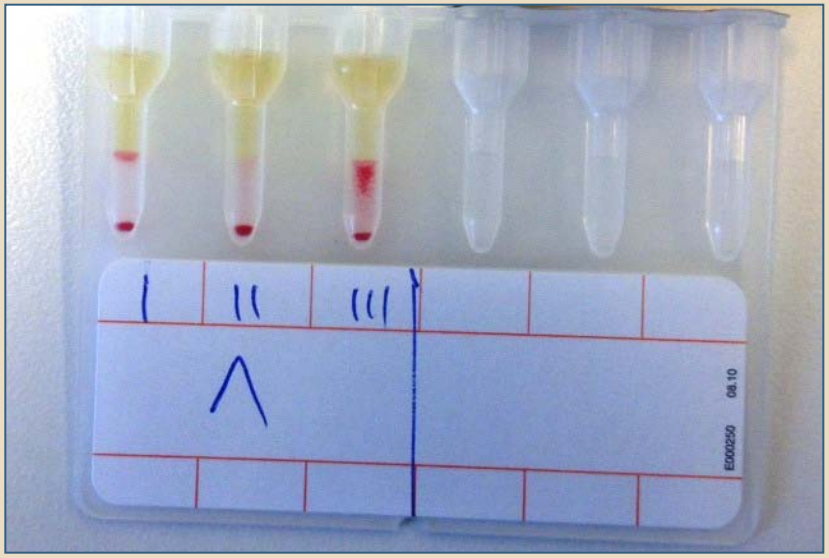
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ(screening test) ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- **ΤΕΧΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΩΛΗΝΑΡΙΩΝ ΓΕΛΗΣ/ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ**

- Ο ορός και τα ερυθρά ελέγχου τοποθετούνται σε ειδικά βυθίσματα σε κάρτες οι οποίες περιέχουν μικροσωληνάρια γέλης/μικροσφαιριδίων και ακολουθεί επώαση στους 37◦C
- Τα ερυθρά ελέγχου εναιωρούνται σε Liss και οι κάρτες έχουν ενσωματωμένο στη γέλη, πολυδύναμο AHG
- Στο τέλος της διαδικασίας ακολουθεί φυγοκέντρηση και ανάγνωση του αποτελέσματος

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ(screening test) ΤΕΧΝΙΚΕΣ

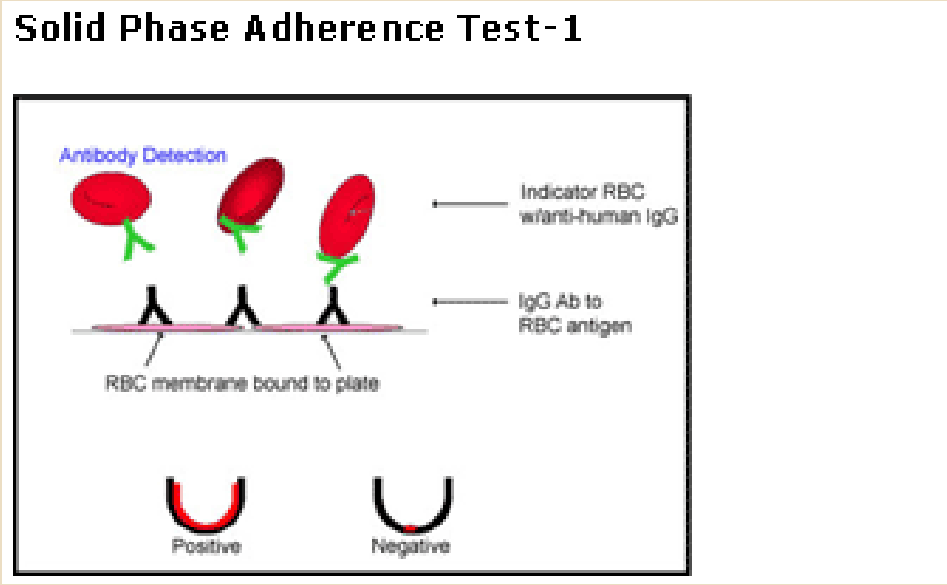
- Για την ανίχνευση ψυχρών αντισωμάτων ή όταν χρησιμοποιούμε ερυθρά επεξεργασμένα με ένζυμα, οι κάρτες είναι ουδέτερες, χωρίς αντισφαιρινικό ορό



ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ(screening test) ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ(screening test) ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- **ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ**
- Στη μέθοδο αυτή τα αντιγόνα των ερυθρών ελέγχου είναι καθηλωμένα σε ειδικά βυθίσματα
- Ακολουθεί προσθήκη του ορού καθώς και του διαλύματος Liss
- Επώαση στους 37◦C και πλύσιμο με φυσιολογικό ορό για την απομάκρυνση του ασύνδετου αντισώματος
- Προσθήκη ερυθρών καλυμμένων με αντι-IgG
- Φυγοκέντρηση και ανάγνωση αποτελέσματος



ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΘΕΤΙΚΟΥ SCREENING TEST

- Συγκόλληση ή αιμόλυση σε οποιοδήποτε στάδιο του screening test,θεωρείται θετικό αποτέλεσμα και απαιτείται περαιτέρω έλεγχος για την ταυτοποίηση των αντισωμάτων

- Συνιστάται η διενέργεια **αυτόλογου control**, η θετικότητα του οποίου υποδεικνύει παρουσία αυτοαντισωμάτων, αντισωμάτων έναντι φαρμάκων ή κυκλοφορία μεταγγισθέντων ερυθρών τα οποία είναι καλυμμένα με αλλοαντισώματα του δέκτη

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

ΙΣΤΟΡΙΚΟ

- ✓ Ηλικία,φύλο
- ✓ Φυλή
- ✓ Διάγνωση
- ✓ Ιστορικό μεταγγίσεων/κυήσεων
- ✓ Ιστορικό μεταμόσχευσης
- ✓ Ιστορικό χορήγησης IVIG, RhIG, ALG
- ✓ Φάρμακα

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

- Σε ασθενείς με θετικό screening, για την ταυτοποίηση του αντισώματος χρησιμοποιούνται panels συνήθως 11 ερυθρών ελέγχου, γνωστής αντιγονικής σύστασης και ίδιων χαρακτηριστικών με αυτά που χρησιμοποιούνται και στο screening test

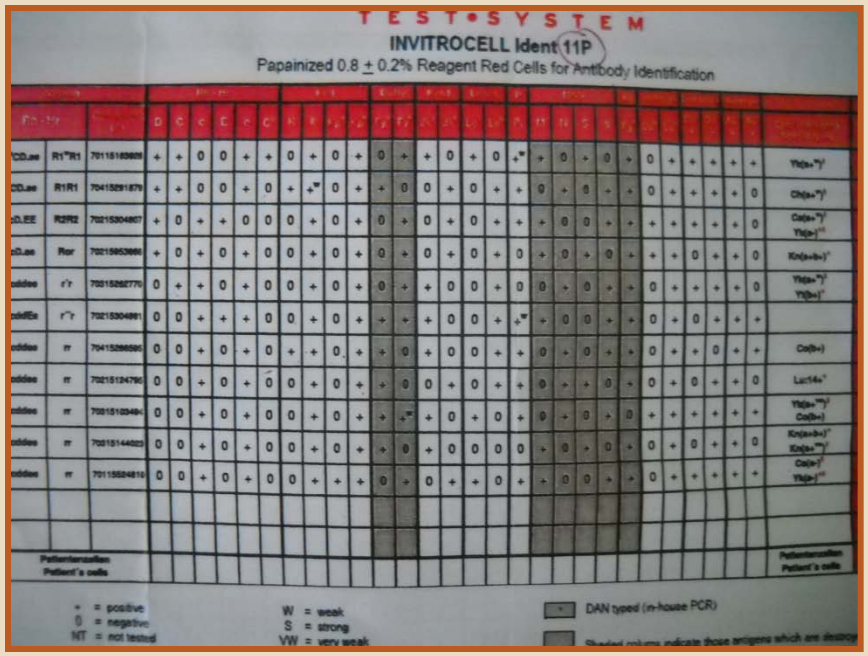
- Ο φαινότυπος των ερυθρών θα πρέπει να είναι κατάλληλα επιλεγμένος ώστε, για το αντίστοιχο αντιγόνο, να υπάρχουν τουλάχιστον 2 ερυθρά θετικά και 2 ερυθρά αρνητικά

- Τόσο οι θετικές όσο και οι αρνητικές αντιδράσεις με τα κύτταρα του panel είναι σημαντικές για την ταυτοποίηση των αντισωμάτων

- Τα μονήρη αντισώματα συνήθως παρουσιάζουν ξεκάθαρη εικόνα

- Εάν υπάρχουν περισσότερα του ενός αντισώματα, ο ορός μπορεί να παρουσιάζει θετικές και αρνητικές αντιδράσεις στο panel οι οποίες δεν αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο αντίσωμα

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ



ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ
ΘΕΤΙΚΟ PANEL ΜΕ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΥΤΟΚΟΝΤΡΟΛ

1. **Μερικά κύτταρα θετικά με ίδιας έντασης θετικότητα και μερικά κύτταρα αρνητικά**
   - Συνήθως ύπαρξη μονήρους αντισώματος
2. **Όλα ή μερικά κύτταρα θετικά, με διαφορά έντασης στη θετικότητα και κάποια αρνητικά ή όχι**
   - Συνήθως ύπαρξη πολλαπλών αντισωμάτων
3. **Όλα τα κύτταρα θετικά, με ίδια έντασης θετικότητα**
   - Συνήθως ύπαρξη αντισώματος έναντι αντιγόνου υψηλής συχνότητας (k,Lub,Kpb,Chido/Rodgers)
4. **Ασθενής θετικότητα σε μερικά κύτταρα, ενώ δεν ταυτοποιείται αντίσωμα**
   - Συνήθως αντίσωμα δοσοεξαρτώμενο (θετικότητα μόνο με κύτταρα ομόζυγα για το αντίστοιχο αντιγόνο)
5. **Θετικότητα μόνο σε ένα κύτταρο του panel**
   - Συνήθως αντίσωμα έναντι αντιγόνου χαμηλής συχνότητας ή έναντι HLA

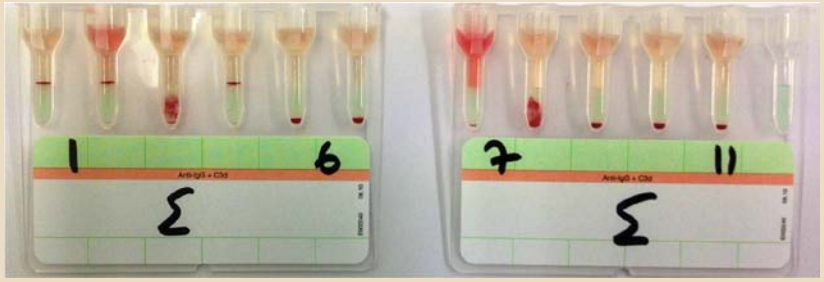
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

αντι-D

αντι-D, αντι-Jka

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Αντι-D, anti-C



ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑ

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΠΙΛΥΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

- Έλεγχος του ορού με επιλεγμένα ερυθρά, τα οποία εκφράζουν ισχυρά το αντιγόνο έναντι του οποίου υπάρχει πιθανό αντίσωμα
- Χρήση panels με περισσότερα κύτταρα, τα οποία βοηθούν στο διαχωρισμό πολλαπλών αντισωμάτων
- Χρήση ερυθρών ελέγχου επεξεργασμένων με ένζυμα (παπαΐνη, φυσίνη,βρωμελίνη) τα οποία ενισχύουν(αντιγόνα Rh,Kidd) ή αδρανοποιούν συγκεκριμένα αντιγόνα των ερυθρών(MNS,Duffy)
- Χρησιμοποίηση μεθόδων προσρόφησης/έκλουσης οι οποίες διευκολύνουν το διαχωρισμό πολλαπλών αντισωμάτων
- Τυποποίηση των κυριότερων ερυθροκυτταρικών αντιγόνων του ασθενούς(πλήρης φαινότυπος) εφόσον δεν υπάρχει ιστορικό πρόσφατων μεταγγίσεων

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΟΝΑΔΩΝ ΑΙΜΑΤΟΣ

- Εάν έχουν ταυτοποιηθεί κλινικά σημαντικά αλλοαντισώματα στον ασθενή,θα πρέπει να επιλεγεί για μετάγγιση,μονάδα αίματος αρνητική για το αντίστοιχο αντιγόνο(αντισώματα έναντι των αντιγόνων D,C,c,E,e,K,k,Jka,Jkb,Fya,Fyb,S,s,U,M)

- Η ίδια τακτική ακολουθείται και για τους ασθενείς στους οποίους υπάρχει ιστορικό ύπαρξης αλλοαντισωμάτων στο παρελθόν, ακόμα και αν ο παρών έλεγχος είναι αρνητικός

- Για τους ασθενείς με μη κλινικά σημαντικά αλλοαντισώματα ή αντισώματα έναντι αντιγόνων χαμηλής συχνότητας, αρκεί η συμβατή διασταύρωση στους 37◦C(αντισώματα έναντι των αντιγόνων A1,Cw,Kpa,M,N,P1,Lea,Leb,Lua)

ΑΜΕΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ(DAT)

- Η DAT ανιχνεύει αντισώματα ή συμπλήρωμα στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, η προσκόλληση των οποίων έχει συμβεί in vivo

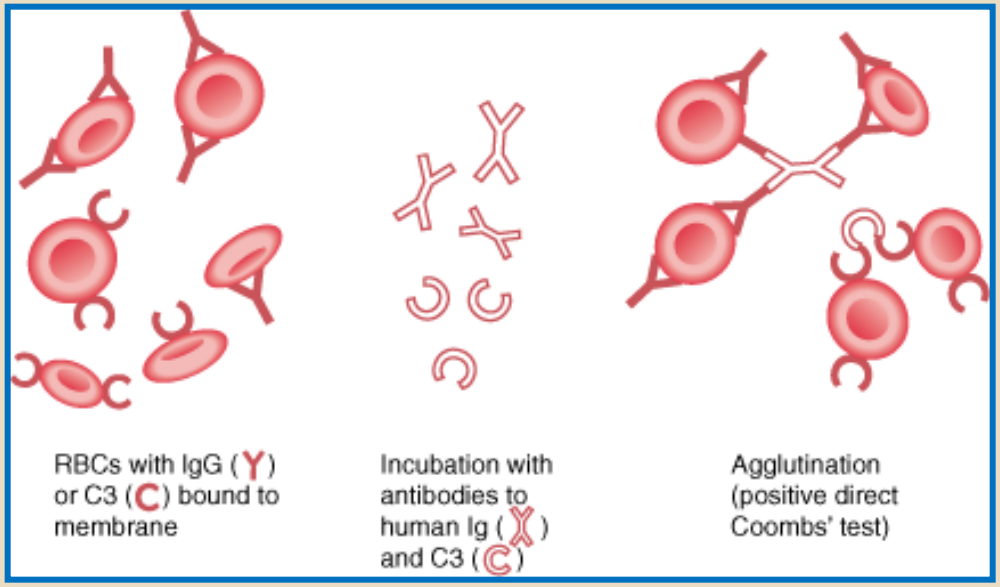
- Κλινικές καταστάσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από ευαισθητοποίηση των ερυθρών με αντισώματα ή συμπλήρωμα είναι:

✓ - η αιμολυτική νόσος του νεογνού

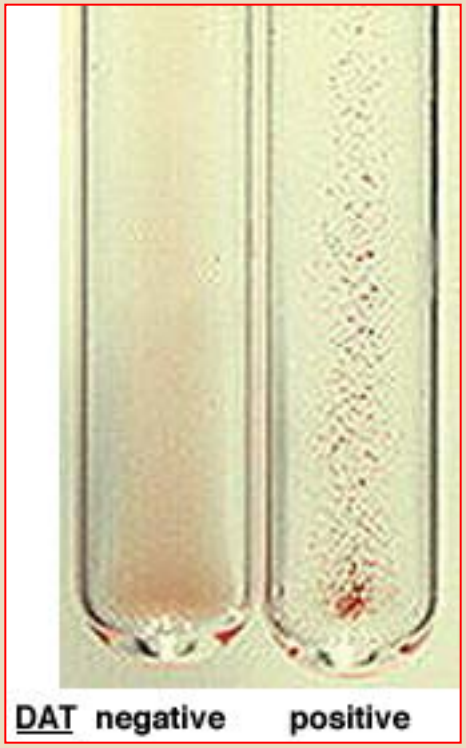
✓ - οι αιμολυτικές αντιδράσεις από μετάγγιση

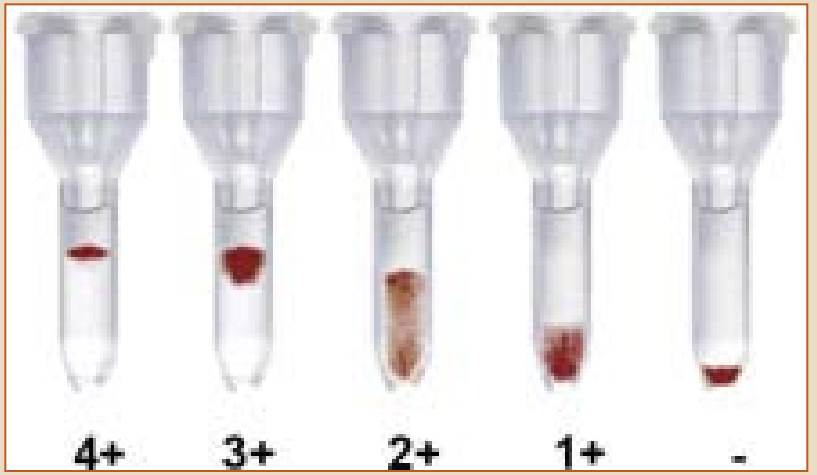
✓ - η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία

ΑΜΕΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ(DAT)



ΑΜΕΣΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ(DAT)

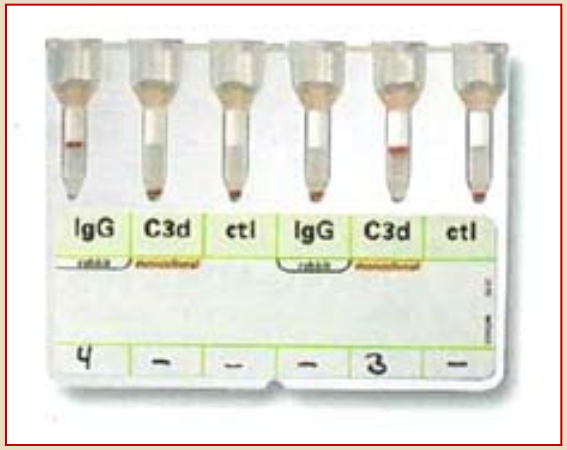


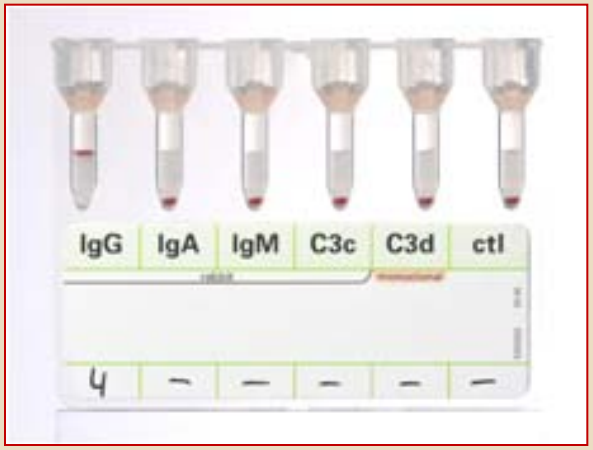


ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΘΕΤΙΚΗΣ DAT

- Η θετικότητα της DAT με πολυδύναμο AHG αναλύεται με τη χρήση μονοδύναμων αντιορών,κυρίως αντι-IgG και αντι-C3d
- Η ανάλυση της DAT γίνεται, είτε με την κλασσική τεχνική, είτε συνηθέστερα με κάρτες γέλης/μικροσφαιριδίων
- Οι κάρτες γέλης/ μικροσφαιριδίων μπορεί να περιέχουν και άλλους μονοδύναμους αντι-ορούς, όπως αντι-IgA, αντι-IgM αντι-C3c

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΘΕΤΙΚΗΣ DAT





ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΘΕΤΙΚΗΣ DAT

- **Κλινικές πληροφορίες**

  - ✓ Ηλικία, φύλο
  - ✓ Διάγνωση
  - ✓ Ιστορικό κυήσεων
  - ✓ Ιστορικό μεταγγίσεων
  - ✓ Χρήση φαρμάκων
  - ✓ Ιστορικό μεταμόσχευσης
  - ✓ Χορήγηση ALG/ATG/IVIG/RhIG

- **Εργαστηριακά ευρήματα**

  - ✓ Hb,Hct
  - ✓ ΔΕΚ
  - ✓ Χολερυθρίνη
  - ✓ Απτοσφαιρίνες ορού
  - ✓ LDH
  - ✓ Hb ούρων

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΘΕΤΙΚΗΣ DAT

- **Ψευδώς θετική DAT**
- ✓ Αυτόματη συγκόλληση ερυθρών
- ✓ Επιμόλυνση/κακή φύλαξη αντιδραστηρίων
- ✓ Υπερφυγοκέντρηση
- ✓ Ακατάλληλο δείγμα
- **Θετική DAT χωρίς κλινική σημασία**
- ✓ Παθητική χορήγηση αντισωμάτων
- ✓ 0.3-15% των νοσηλευομένων ασθενών
- ✓ 1:1000-1:14000 αιμοδότες

- **Ψευδώς αρνητική DAT**
- ✓ Κακή τεχνική
- ✓ Ανεπαρκής φυγοκέντρηση
- ✓ Αδρανή αντιδραστήρια(AHG)
- ✓ Κρυοσφαιρίνες
- ✓ < 100-500 μόρια IgG ή < 400-1100 μόρια C3d πάνω στα ερυθρά

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΘΕΤΙΚΗΣ DAT

- **Μία θετική DAT δε σημαίνει απαραίτητα άνοσης αιτιολογίας αιμόλυση, ούτε μία αρνητική DAT αποκλείει την παρουσία άνοσης αιμόλυσης**

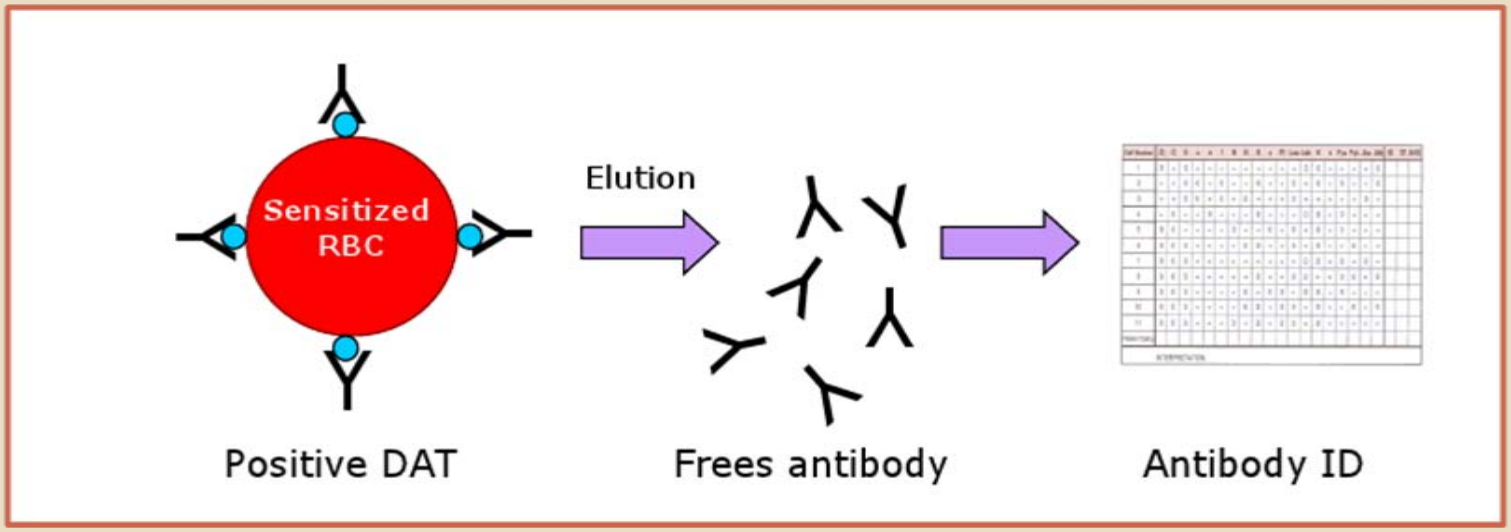
- Ο περαιτέρω έλεγχος θα βασιστεί στα παρακάτω
- ✓ Ενδείξεις in vivo αιμόλυσης
- ✓ Βαθμός αναιμίας και ανάγκη μετάγγισης
- ✓ Πρόσφατες ή παλαιότερες μεταγγίσεις
- ✓ Παρουσία αλλοαντισωμάτων στον ορό
- ✓ Φάρμακα
- ✓ Διάγνωση
- ✓ Ιστορικό μεταμόσχευσης/χορήγησηATG,ALG

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΘΕΤΙΚΗΣ DAT

- **ΙΑΤ**
- **ΕΚΛΟΥΣΜΑ**

- Το έκλουσμα είναι μία τεχνική η οποία μας επιτρέπει να απομακρύνουμε τα προσκολλημένα στα ερυθρά αντισώματα έτσι ώστε να τα ταυτοποιήσουμε με τεχνική ΙΑΤ
- Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι απομάκρυνσης των αντισωμάτων, όπως, θέρμανση, ψύξη, χρήση οργανικών διαλυτών ή διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης σε άλατα, αλλαγές του PH
- Σε όλες τις τεχνικές, το αντίσωμα απομακρύνεται ,είτε αλλάζοντας τις δυνάμεις σύνδεσης Ag/Ab, είτε τροποποιώντας τη δομική συγγένεια Ag/θέση σύνδεσης Ab

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΘΕΤΙΚΗΣ DAT-ΕΚΛΟΥΣΜΑ



ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΘΕΤΙΚΗΣ DAT

- **ΕΚΛΟΥΣΜΑ**

- Heat elution, Lui-freeze-thaw elution ⟶ κατάλληλα για ABO αντισώματα
- Όξινο έκλουσμα / αιθέρας → κατάλληλα για θερμά αυτο- ή αλλοαντισώματα
- Το έκλουσμα χρησιμοποιείται όπως και ο ορός στην έμμεση Coombs (screening test, panel)

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΝΟΣΗΣ ΑΙΜΟΛΥΣΗΣ

- Επιβραδυνόμενες αιμολυτικές αντιδράσεις μετά από μετάγγιση (DHTR)
- Αιμολυτική νόσος του νεογνού(HDFN)
- Αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία(AAA)

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ(ΑΑΑ)

- Η παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό ενός ασθενούς, μπορεί να ευθύνεται για μειωμένη επιβίωση των ερυθροκυττάρων
- Συνήθως η πρώτη ένδειξη για την παρουσία αυτοαντισωμάτων είναι η θετική DAT, η προγνωστική αξία της οποίας είναι 83%
- Θετική DAT μπορεί να ανιχνεύεται σε υγιή πληθυσμό χωρίς ενδείξεις αιμόλυσης, όπως και εικόνα ΑΑΑ με αρνητική DAT
- **Η διάγνωση ΑΑΑ προκύπτει από συνδυασμό κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων**

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ(ΑΑΑ)

- Η αρχική διερεύνηση της ΑΑΑ είναι όμοια με τη διερεύνηση μιας θετικής DAT
- ✓ Χρήση πολυδύναμου AHG
- ✓ Χρήση μονοδύναμου AHG
- ✓ Διενέργεια IAT
- ✓ Έκλουσμα των ερυθρών

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ(ΑΑΑ)

- Όταν ανιχνεύεται αυτοαντίσωμα στον ορό, προτείνεται η αξιολόγηση των παρακάτω για τη διενέργεια περαιτέρω ελέγχου

- Εάν ο ασθενής δεν εμφανίζει σημεία αιμόλυσης και δεν απαιτείται μετάγγιση, ο περαιτέρω ορολογικός έλεγχος δεν αποτελεί προτεραιότητα

- Ιστορικό μεταγγίσεων και κυήσεων διότι
  - -Ένα αλλοαντίσωμα μπορεί να καλύπτεται από την παρουσία του αυτοαντισώματος
  - -Εάν υπάρχει στο ιστορικό μετάγγιση τους τελευταίους 3 μήνες, μπορεί ο εξειδικευμένος έλεγχος να μην είναι αξιόπιστος(π.χ αυτόλογη προσρόφηση)
  - -Μία πρόσφατη μετάγγιση αυξάνει τον κίνδυνο για παρουσία DHTR
  - -Η απουσία μετάγγισης/κύησης, μειώνει τον κίνδυνο από μία ενδεχόμενη μετάγγιση

- Η διάγνωση μπορεί να μας καθοδηγήσει

- Η χρήση συγκεκριμένων φαρμάκων μπορεί να σχετίζεται με άνοση αιμόλυση

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ

- Αποτελεί την πιο κοινή μορφή ΑΑΑ με ποσοστό εμφάνισης περίπου 70%
- Το αντίσωμα είναι κυρίως IgG με ιδανική θερμοκρασία δράσης τους 37◦C / σπάνια μπορεί να συνυπάρχει IgM ή/και IgA αντίσωμα
- Οι υποτάξεις IgG1 και IgG3 προκαλούν σοβαρότερου βαθμού αιμόλυση

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ

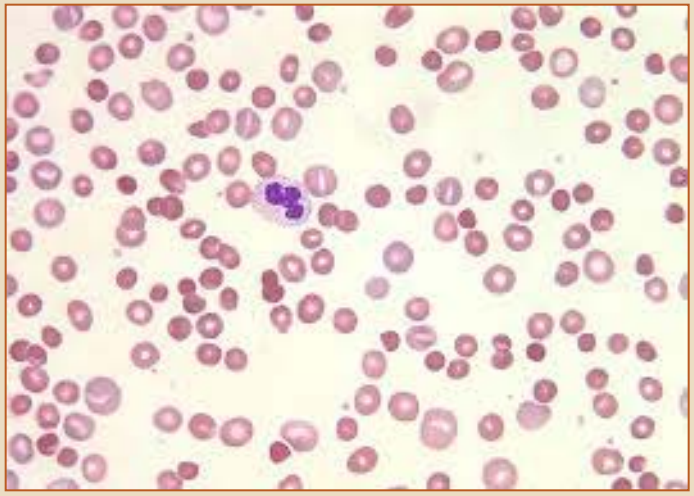
- **Πρωτοπαθής**
- **Δευτεροπαθής**
  - Λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα
  - ΧΛΛ
  - Νοσήματα κολλαγόνου /ΣΕΛ/RA
  - Καρκίνοι
  - Αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο
  - HIV
  - N.Hodgkin's
  - NHL
  - Πολλαπλούν μυέλωμα
  - Συγγενής μυϊκή δυστροφία
  - Κύηση
  - Σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας
  - Θύμωμα
  - Ιογενείς λοιμώξεις

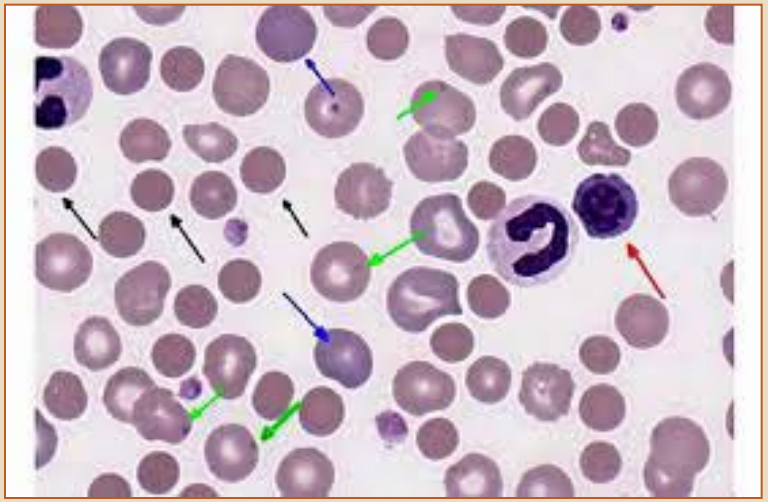
ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

- Τα κλινικά συμπτώματα σχετίζονται με το βαθμό της αναιμίας και τα υποκείμενα νοσήματα και έτσι οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν κόπωση, αδυναμία, δύσπνοια, ταχύπνοια, ταχυκαρδία ωχρότητα, ίκτερο, ενίοτε σπληνομεγαλία και καρδιακή ανεπάρκεια

- Τα κυριότερα εργαστηριακά ευρήματα σχετίζονται με την υφιστάμενη εξωαγγειακή αιμόλυση και είναι η αυξημένη LDH και η έμμεση χολερυθρίνη, η ελάττωση των απτοσφαιρινών και η δικτυορεθροκυττάρωση, ενώ στο επίχρισμα αίματος εμφανίζεται πολυχρωματοφιλία, σφαιροκυττάρωση και παρουσία εμπύρηνων ερυθρών

ΑΑΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ





ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

- Στις περισσότερες περιπτώσεις, η DAT είναι θετική με τη χρήση πολυδύναμου αντισφαιρινικού ορού
- Στο 20 % των περιπτώσεων ανευρίσκεται μόνο IgG, στο 67% IgG και C3d, ενώ στο 13% μόνο C3d
- 50% των περιπτώσεων έχουν θετική IAT με εικόνα πανσυγκόλλησης, λόγω παρουσίας αυτοαντισώματος, ενώ το ποσοστό ανεβαίνει στο 90% όταν χρησιμοποιούνται ερυθρά επεξεργασμένα με ένζυμα
- Το έκλουσμα είναι θετικό με εικόνα πανσυγκολλητίνης στην περίπτωση DAT- IgG(+)

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

- Σπάνια το αυτοαντίσωμα μπορεί να έχει ειδικότητα κυρίως έναντι αντιγόνων του συστήματος Rhesus (πχ αυτό-αντι-e)
- Ο ορός ασθενών με θερμού τύπου ΑΑΑ εκτός από αυτοαντισώματα, μπορεί να περιέχει και αλλοαντισώματα εάν υπάρχει ιστορικό μετάγγισης ή κύησης
- Σε αυτή την περίπτωση η παρουσία του αλλοαντισώματος πρέπει να αποκλειστεί για να δοθεί μια ασφαλής μετάγγιση
- Σε περιπτώσεις με ισχυρά θετική DAT ο ορός μπορεί να περιέχει μικρή, μη ανιχνεύσιμη ποσότητα αυτοαντισώματος λόγω υψηλής συγγένειάς του με τα ερυθρά
- Στην παραπάνω περίπτωση, η IAT μπορεί να είναι αρνητική και έτσι η ύπαρξη αλλοαντισώματος αποκλείεται εύκολα με αποτέλεσμα την ανεύρεση συμβατών ερυθρών προς μετάγγιση

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

- Η απομάκρυνση του αυτοαντισώματος από τον ορό μπορεί να γίνει είτε με αυτόλογη είτε με αλλογενή προσρόφηση

- **Αυτόλογη προσρόφηση**
- Εάν ο ασθενής έχει επαρκή όγκο ερυθρών και δεν έχει μεταγγισθεί πρόσφατα, η αυτόλογη προσρόφηση αποτελεί την κατάλληλη μέθοδο για την απομάκρυνση του αυτοαντισώματος από τον ορό και την ανάδειξη πιθανής ύπαρξης αλλοαντισώματος
- Εάν γίνει αυτόλογη προσρόφηση σε ασθενή με πρόσφατη μετάγγιση, τα μεταγγισθέντα ερυθρά θα προσροφήσουν το αλλοαντίσωμα, δίνοντας έτσι ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα

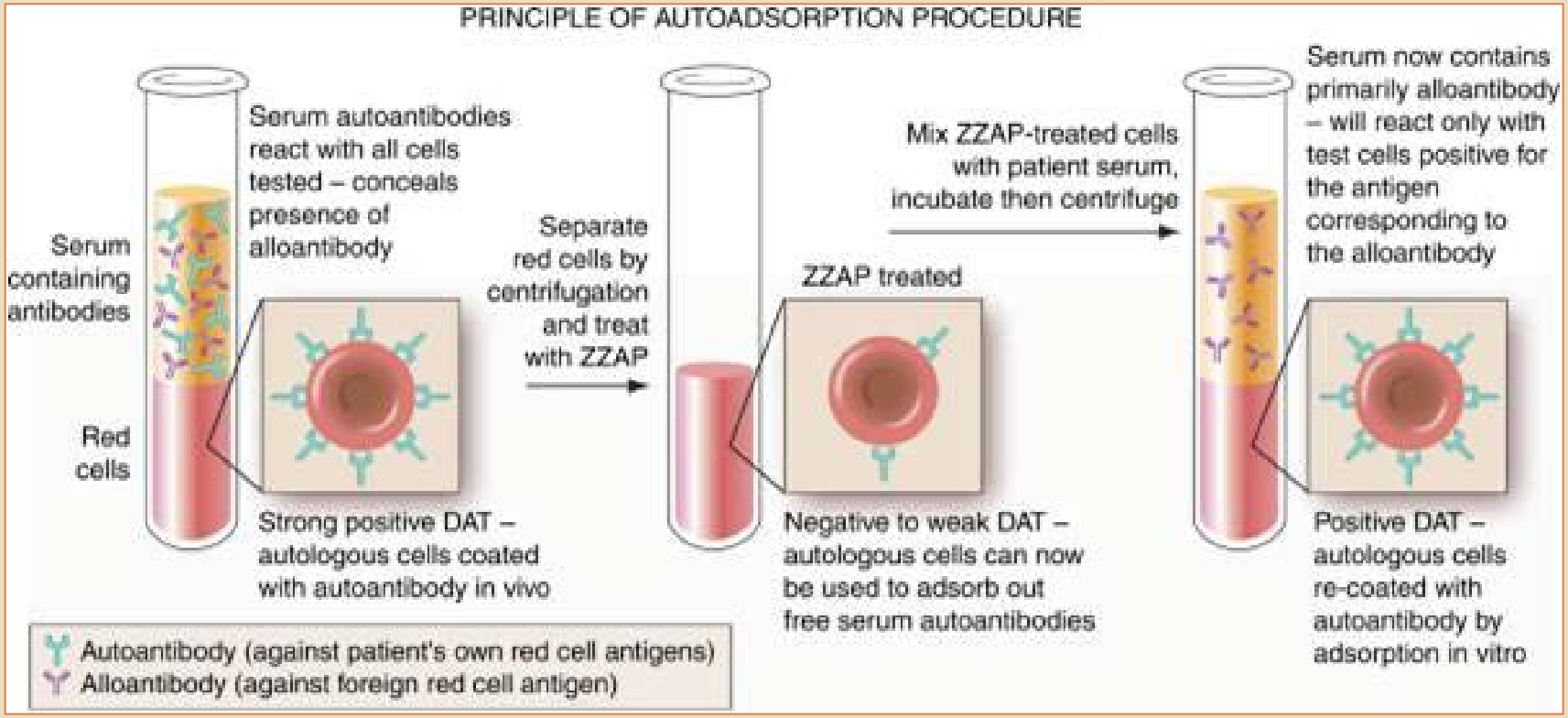
ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

- **Αυτόλογη προσρόφηση**
- Επεξεργασία των ερυθρών με ειδικά αντιδραστήρια(ZZAP, χλωροκίνη) τα οποία απομακρύνουν τα αυτοαντισώματα από την επιφάνειά τους, επιτρέποντας, μετά την επώαση με τον ορό του ασθενή, την απομάκρυνση του αυτοαντισώματος από τον ορό και την παραμονή σε αυτόν του αλλοαντισώματος

- Συνήθως απαιτούνται περισσότερες από μία προσροφήσεις για την πλήρη απομάκρυνση του αυτοαντισώματος

- Ο προσροφημένος ορός χρησιμοποιείται για διενέργεια IAT
  - Εάν είναι αρνητική, τότε πιθανώς δεν υπάρχει αλλοαντίσωμα
  - Εάν εμφανίζεται θετικότητα με το αυτόλογο control και με όλα τα κύτταρα του screening test, τότε χρειάζονται και άλλες προσροφήσεις
  - Εάν υπάρχει θετικότητα με ειδικότητα, ακολουθεί ανάλυση με panel ερυθρών για ταυτοποίηση του αλλοαντισώματος

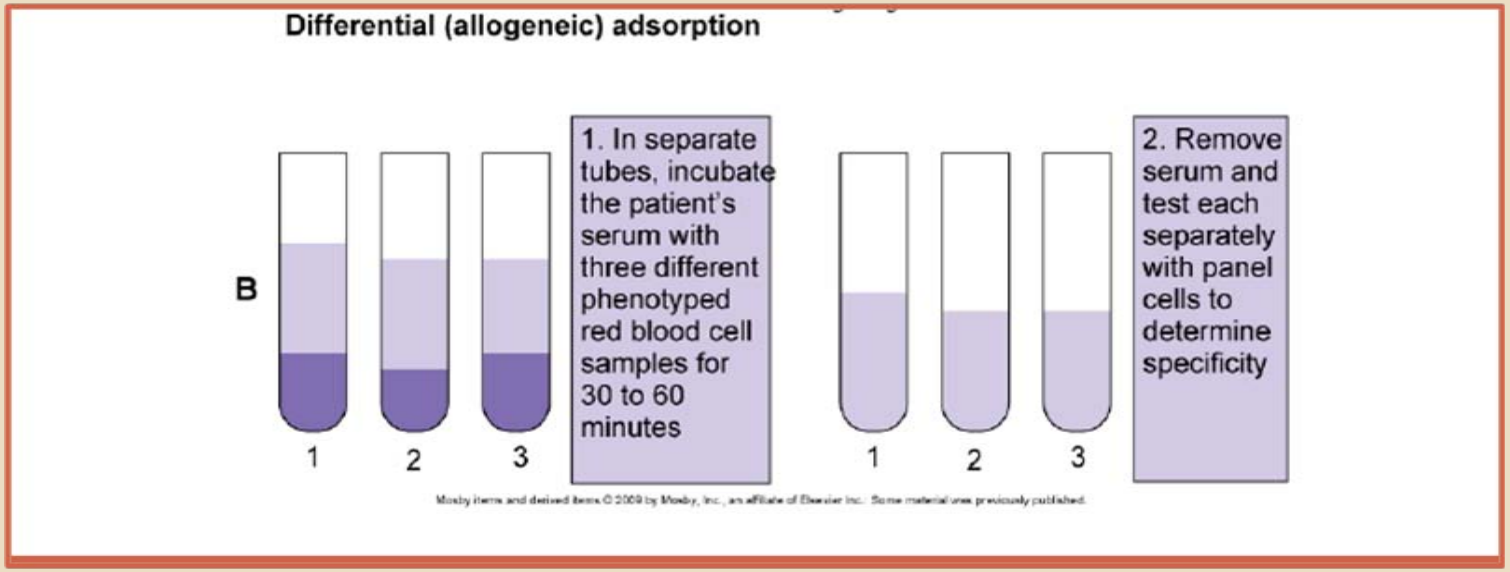
ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ



ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

- **Αλλογενή προσρόφηση**
- Γίνεται σε περιπτώσεις ασθενών με βαριά αναιμία ή σε αυτούς που έχουν μεταγγισθεί πρόσφατα ή όταν η αυτόλογη προσρόφηση ήταν ανεπιτυχής
- Εάν είναι γνωστός ο ερυθροκυτταρικός φαινότυπος του ασθενή, τότε προτιμούνται φαινοτυπικά ταυτόσημα ερυθρά για την αλλογενή προσρόφηση
- Επιλέγονται 3 δείγματα Ο ερυθρών με φαινότυπους CCDee, ccDEE, ccdee, εκ των οποίων το ένα κύτταρο δεν εκφράζει το Jka, το δεύτερο δεν εκφράζει το Jkb και το τρίτο το s, ενώ τα αντιγόνα Fya, Fyb και S πρέπει να εκφράζονται σε τουλάχιστον ένα από τα 3 δείγματα αλλογενών ερυθρών
- Μειονέκτημα της αλλογενούς προσρόφησης θεωρείται το γεγονός ότι μπορεί να προσροφηθεί από τα αλλογενή ερυθρά, αντίσωμα έναντι αντιγόνου υψηλής συχνότητας

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ



ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΘΕΡΜΟΥ ΤΥΠΟΥ

- Η παρουσία του θερμού αυτοαντισώματος μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στον προσδιορισμό πλήρους φαινοτύπου ερυθρών εάν χρησιμοποιούνται τεχνικές αντισφαιρινικού ορού. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να γίνει ειδική επεξεργασία των ερυθρών με αντιδραστήρια τα οποία απομακρύνουν το αυτοαντίσωμα(πχ EGA-kit) και επιτρέπουν την πλήρη ταυτοποίηση του φαινοτύπου ερυθρών

- Η παρουσία του θερμού αυτοαντισώματος μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στον προσδιορισμό της ομάδας ειδικά όταν χρησιμοποιούνται κάρτες με ενσωματωμένους αντιορούς. Σε αυτή την περίπτωση η διενέργεια της ομάδας με πλυμμένα ερυθρά στην πλάκα ή σε σωληνάρια, επιλύει το πρόβλημα

ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

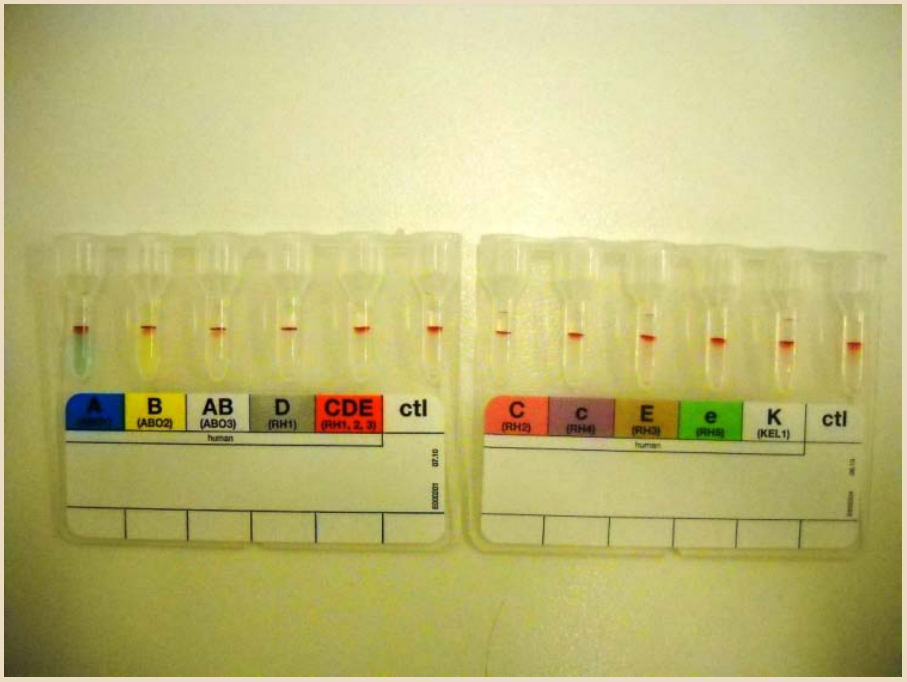
- Γυναίκα 23 ετών προσέρχεται λόγω αδυναμίας, καταβολής και αισθήματος παλμών
- Ωχρότητα, ταχυκαρδία
- Ενημέρωση από το Αιματολογικό Εργαστήριο: Hb=6.1g/dl, Hct=18%,ήπια λευκοκυττάρωση, φυσιολογικά PLT ενώ στο επίχρισμα παρατηρείται πολυχρωματοφιλία, σφαιροκυττάρωση και εμπύρηνα ερυθρά
- ↑LDH, έμμεση χολερυθρίνη
- **Ευρήματα αιμολυτικής αναιμίας**

ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

- Στην Αιμοδοσία στέλνονται δείγματα για προσδιορισμό ομάδας και διενέργεια άμεσης δοκιμασίας Coombs

- Ενημερώνεται ο Ιατρός της Αιμοδοσίας ότι υπάρχει πρόβλημα στον προσδιορισμό της ομάδας και θετικά ευρήματα στη δοκιμασία Coombs

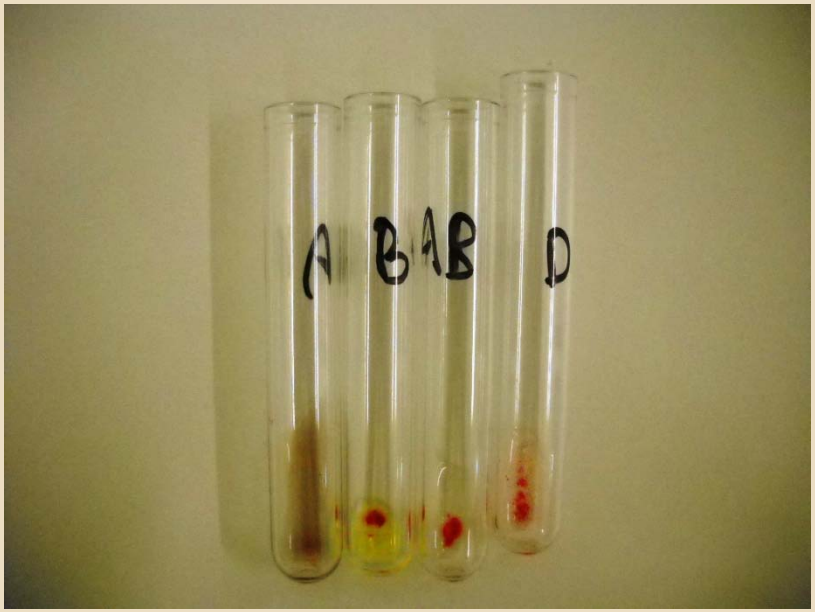
ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ



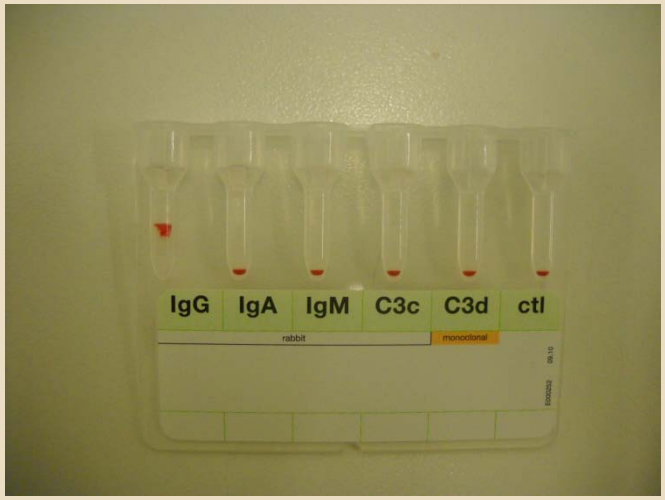
ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

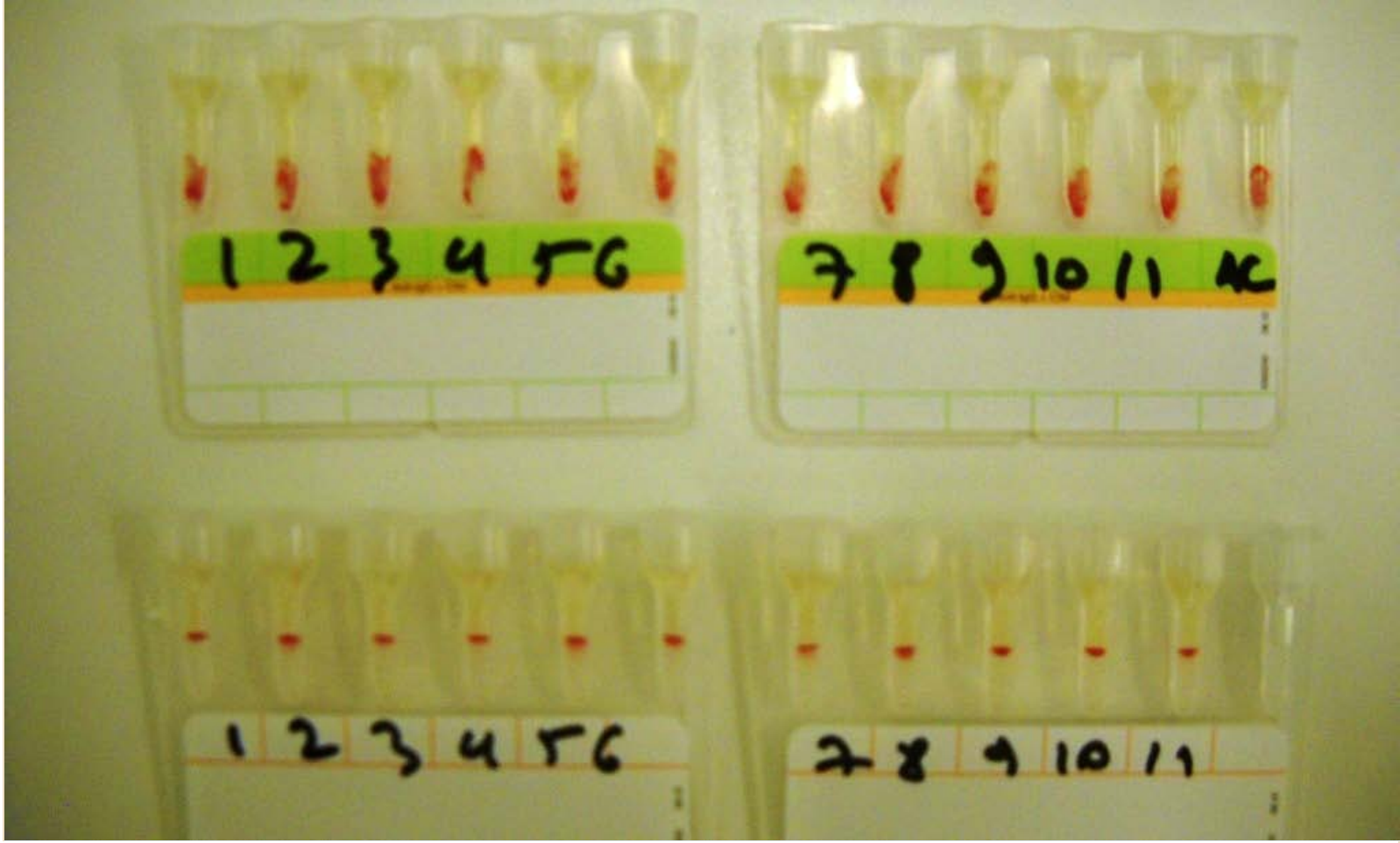
- Ενέργειες
- Διενέργεια ομάδας με πλυμμένα ερυθρά σε σωληνάρια ή στην πλάκα
- Ανάλυση άμεσης Coombs με μονοδύναμους αντι-ορούς
- Διενέργεια έμμεσης Coombs

ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ



ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ





PANEL 11 ΕΡΥΘΡΩΝ- ΑΥΤΟΛΟΓΟ CONTROL

ΕΙΚΟΝΑ ΠΑΝΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΗΣ

ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

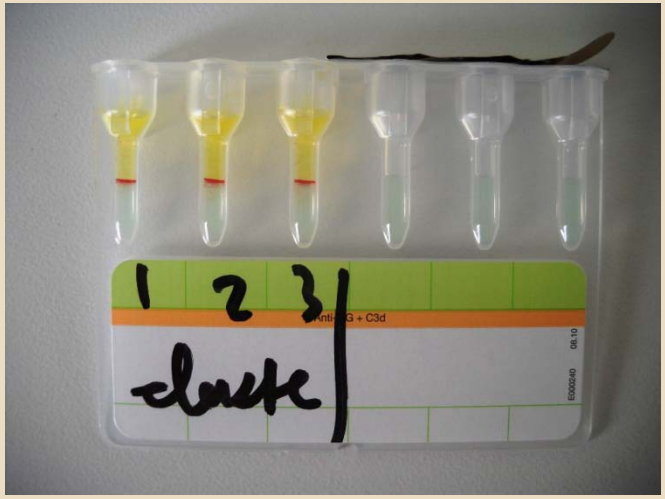
- Συμπέρασμα
- Ομάδα B(+) Ccee Kell(-)
- Θερμού τύπου αυτοαντίσωμα στα ερυθρά με περίσσεια αυτού στον ορό και εικόνα πανσυγκολλητίνης
- Απαραίτητες οι κλινικές πληροφορίες για το ιστορικό μεταγγίσεων/κυήσεων, για τη λήψη φαρμάκων και για την αναγκαιότητα μετάγγισης
- Το ιστορικό μεταγγίσεων/κυήσεων είναι αρνητικό, ενώ οι θεράποντες αναφέρουν ότι η ασθενής είναι αιμοδυναμικά σταθερή και δεν απαιτείται επείγουσα μετάγγιση

ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

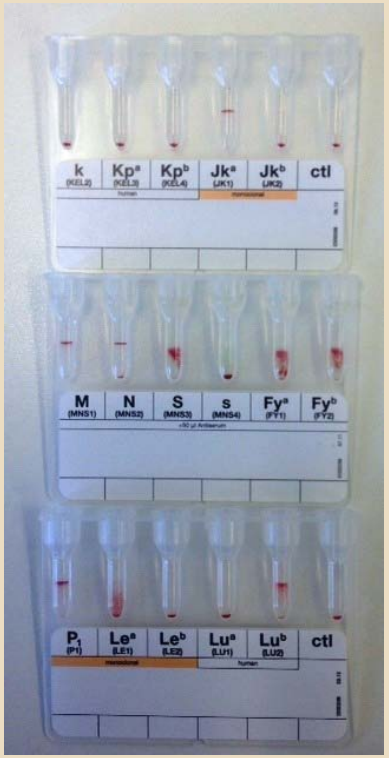
- Υπάρχει χρόνος για
- Έκλουσμα
- Πλήρη φαινότυπο ερυθρών για προσδιορισμό των κλινικά σημαντικών αντιγόνων
- Δεν απαιτούνται διαδικασίες προσρόφησης γιατί η παρουσία αλλοαντισωμάτων δεν είναι πιθανή

ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

ΕΚΛΟΥΣΜΑ



ΠΛΗΡΗΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΜΕ EGA-Kit



ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ-ΝΟΣΟΣ ΨΥΧΡΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΩΝ

- Περίπου το 16% όλων των ΑΑΑ
- 1/3 των περιπτώσεων είναι **πρωτοπαθής**
- 2/3 των περιπτώσεων είναι **2παθής**
- ✓ *Χρόνια μορφή*, σε ηλικιωμένους ασθενείς οι οποίοι εμφανίζουν ήπια ή μετρίου βαθμού αιμόλυση(μονοκλωνική)
- ✓ *Οξεία μορφή*, κυρίως σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες με λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα ή λοιμώξεις από Mycoplasma pneumoniae ή EBV(πολυκλωνική)

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ-ΝΟΣΟΣ ΨΥΧΡΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΩΝ

- Το αντίσωμα είναι IgM και συνδέεται με τα ερυθρά στην περιφερική κυκλοφορία όπου η θερμοκρασία του σώματος είναι χαμηλότερη, συνδέοντας το συμπλήρωμα

- Περνώντας το αίμα από θερμότερες περιοχές, το αντίσωμα αποκολλάται, αφήνοντας στην επιφάνεια των ερυθρών μόνο το συμπλήρωμα, το οποίο συνήθως είναι η μοναδική πρωτεΐνη η οποία ανιχνεύεται με την DAT

- Η αιμόλυση συνήθως είναι εξωαγγειακή , με καταστροφή των καλυμμένων με C3b ερυθρών, στα μακροφάγα του ήπατος
- Εάν η ενεργοποίηση του C3b ενεργοποιήσει τον παράγοντα C5 τότε προκαλείται ενδαγγειακή αιμόλυση η οποία συνήθως συμβαίνει σε εξάρσεις της νόσου

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ-ΝΟΣΟΣ ΨΥΧΡΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΩΝ

- Οι ασθενείς με ΝΨ συνήθως έχουν μια χρόνια ήπια πορεία με μικρού βαθμού αιμόλυση, η οποία μπορεί να επιδεινωθεί κατά τους χειμερινούς μήνες ή κατά τη διάρκεια λοιμώξεων

- Τα συμπτώματα τα οποία επιδεινώνονται με το ψύχος είναι η ακροκυάνωση και το σύνδρομο Raynaud, ενώ ο ασθενής μπορεί να εμφανίζει ίκτερο και στα πλαίσια υποκείμενου νοσήματος μπορεί να έχει σπληνομεγαλία ή λεμφαδενοπάθεια

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ-ΝΟΣΟΣ ΨΥΧΡΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΩΝ

- Τα ψυχρά αντισώματα στην πλειονότητα των περιπτώσεων έχουν ειδικότητα για το αντιγονικό σύστημα Ii.
- Άλλες ειδικότητες αφορούν στα αντιγόνα H, IH, Pr, M
- Η λήψη του δείγματος για έλεγχο ψυχροσυγκολλητινών πρέπει να γίνεται σε θερμές συνθήκες και να παραμένει στους 37^{o} C μέχρι τη φυγοκέντρηση
- Ο τίτλος μπορεί να ποικίλει από <64 σε φυσιολογικούς ενήλικες έως >1000 στους 4^{o} C σε περιπτώσεις ΝΨ
- Ο τίτλος δεν συμβαδίζει πάντα με τη σοβαρότητα της νόσου διότι μπορεί ένα αντίσωμα με σχετικά χαμηλό τίτλο να έχει μεγάλο θερμικό εύρος και να προκαλεί σοβαρού βαθμού αιμόλυση
- Η DAT είναι κατά κανόνα θετική λόγω ύπαρξης συμπληρώματος
- Το έκλουσμα είναι αρνητικό

ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ-ΝΟΣΟΣ ΨΥΧΡΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΩΝ

- Τα ψυχρά αυτοαντισώματα συχνά ανευρίσκονται στον ορό, ειδικά όταν στο screening test χρησιμοποιούνται ερυθρά επεξεργασμένα με ένζυμα
- Συνήθως πρόκειται για καλοήθη αυτοαντισώματα χωρίς κλινική σημασία
- Είτε καλοήθη είτε παθολογικά, μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στον προμεταγγισιακό έλεγχο(καθορισμός ομάδας αίματος, ανίχνευση αλλοαντισωμάτων, διασταύρωση)

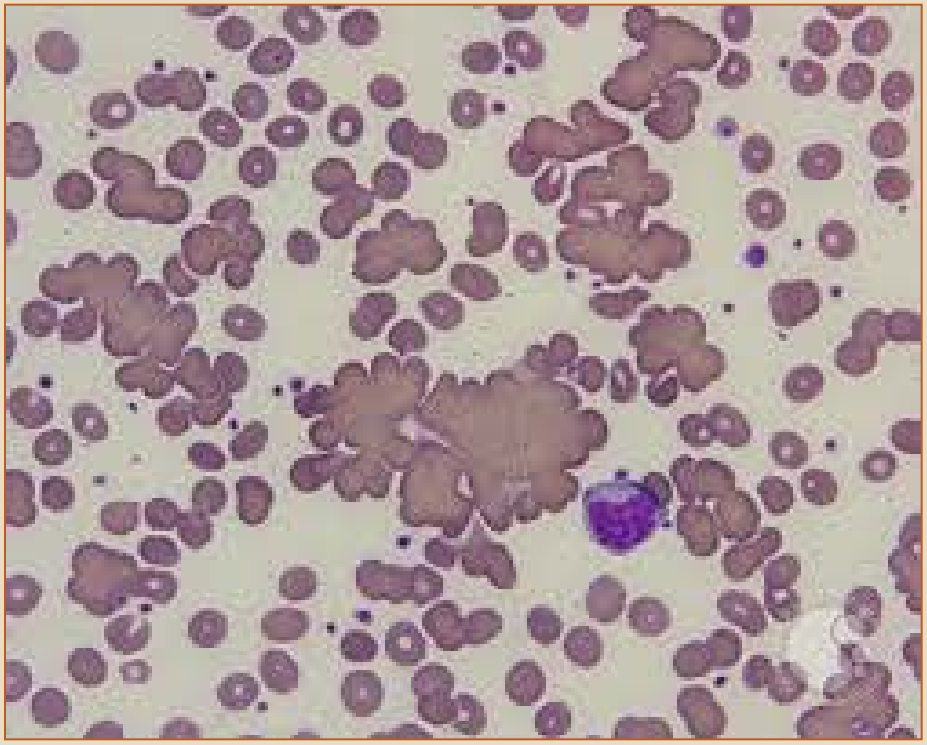
ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ-ΝΟΣΟΣ ΨΥΧΡΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΩΝ

- Η ύπαρξη ψυχρών αυτοαντισωμάτων, μπορεί να καλύπτει την ύπαρξη κλινικά σημαντικών αλλοαντισωμάτων
- Στις δοκιμασίες κατά τις οποίες χρησιμοποιείται πολυδύναμος AHG, η ύπαρξη ψυχρών αυτοαντισωμάτων δίνει θετικότητες, οι οποίες οφείλονται στην παρουσία συμπληρώματος πάνω στα ερυθρά
- Η χρήση μονοδύναμου αντι-IgG AHG μπορεί να επιλύσει τα προβλήματα
- Στην περίπτωση κατά την οποία δημιουργούνται προβλήματα στον καθορισμό της ομάδας αίματος ή στη διασταύρωση, τότε η **διενέργεια των διαδικασιών εν θερμώ**, συνήθως λύνει το πρόβλημα
- Τεχνικές αυτόλογης/αλλογενούς ψυχρής προσρόφησης

ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

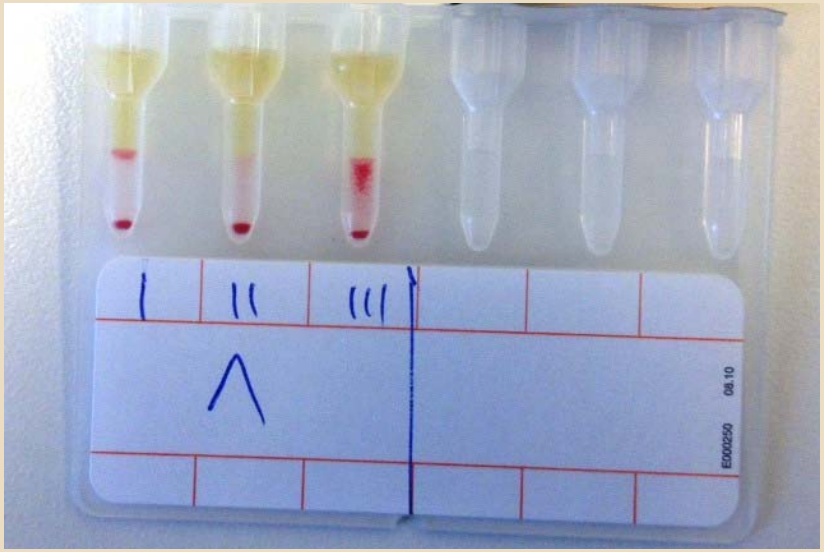
- Ασθενής 75 ετών με ιστορικό ΧΛΛ υπό θεραπεία προσέρχεται για προγραμματισμένο έλεγχο στο Εξωτερικό Αιματολογικό Ιατρείο
- Ο ασθενής έχει θετικό ιστορικό μεταγγίσεων στο παρελθόν
- Από το Αιματολογικό Εργαστήριο υπάρχει η πληροφορία, ότι εμφανίζεται πρόβλημα στη γενική αίματος με ασυμφωνία Hb/Hct (11g/dl, 25%)και παρουσία συγκολλήσεων ερυθρών τόσο μακροσκοπικά, όσο και μικροσκοπικά.
- Μετά από παραμονή του δείγματος στο υδατόλουτρο, τα αποτελέσματα εμφανίζουν συμφωνία με Hb=11.2 και Hct=34%
- **Συστήνεται έλεγχος για ψυχροσυγκολλητίνες**

ΨΥΧΡΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΕΣ

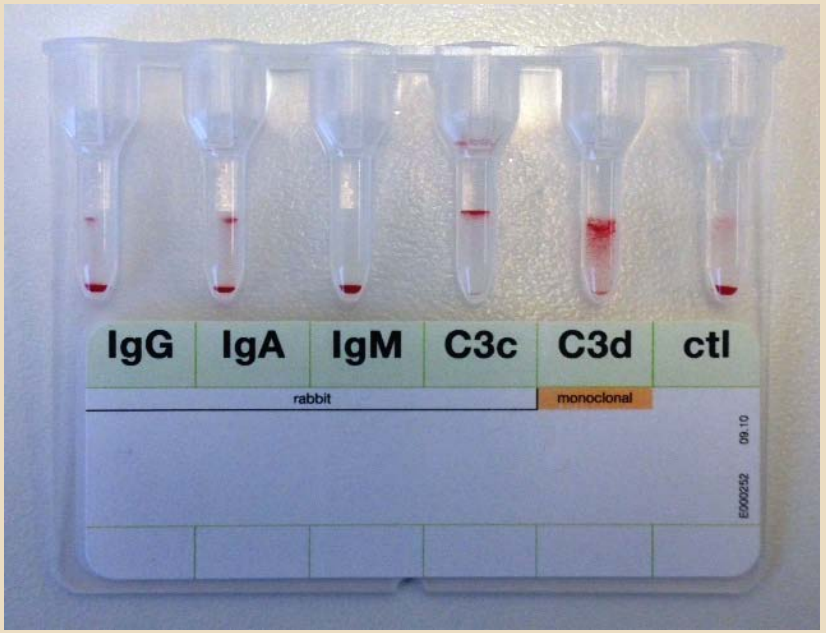


ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

ΨΥΧΡΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΕΣ(+)

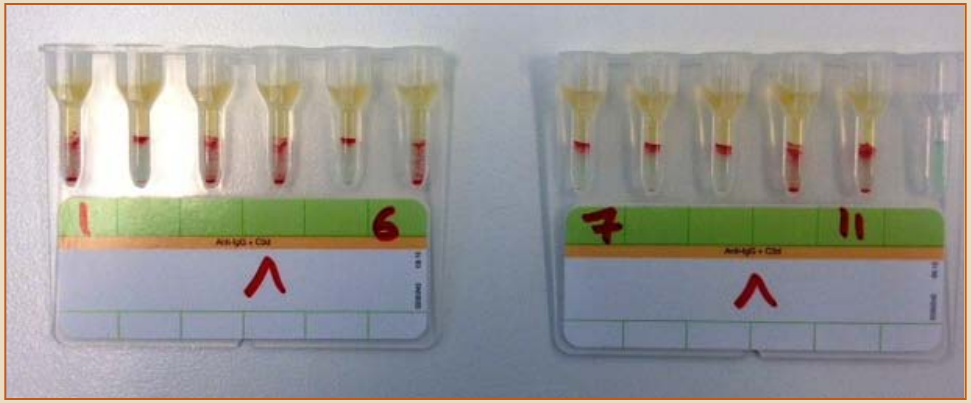


ΑΜΕΣΗ COOMBS ΜΕ ΠΛΥΜΜΕΝΑ ΜΕ ΠΡΟΘΕΡΜΑΣΜΕΝΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ ΟΡΟ ,ΕΡΥΘΡΑ



ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

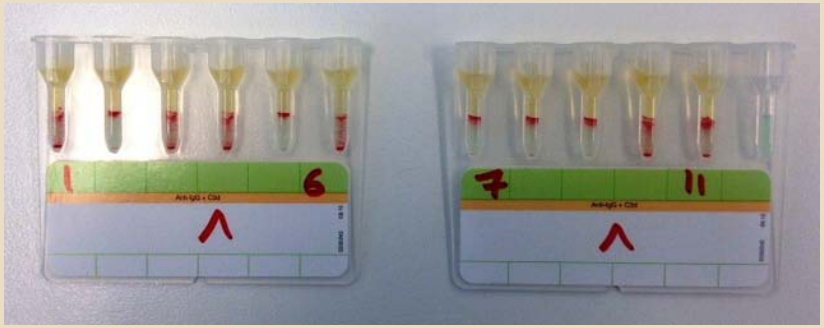
ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

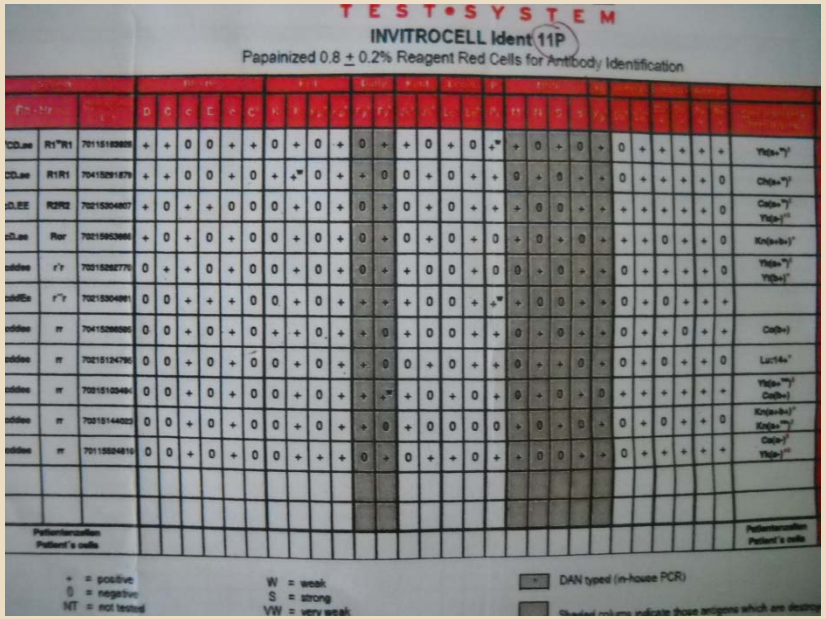


ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

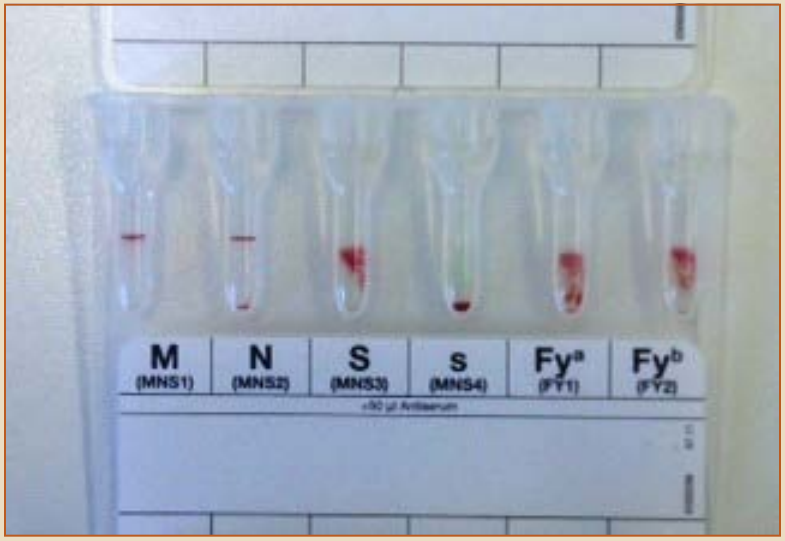
PANEL ΜΕ ΠΑΝΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΕΙΣ ΘΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

αντι-Ν και αντι-Μ ? !!!





ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ



ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟ

- Θετικές ψυχροσυγκολλητίνες σε κλινικό υπόβαθρο ΧΛΛ
- Παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό με ειδικότητα έναντι του ερυθροκυτταρικού συστήματος ΜΝ
- Ψυχρά αυτοαντισώματα με μεγάλο θερμικό εύρος?
- Θα μπορούσε να έχει γίνει panel σε θερμοκρασία 25^{o}C και 4^{o}C για καθορισμό του θερμικού εύρους
- Θα μπορούσε να έχει γίνει αυτόλογη/αλλογενής προσρόφηση σε ψυχρές συνθήκες για επιβεβαίωση απουσίας αλλοαντισωμάτων
- Ο ασθενής χρήζει στενής παρακολούθησης

ΠΑΡΟΞΥΣΜΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ ΕΚ ΨΥΧΟΥΣ (PCH)

- Σπάνια, αποτελεί το 2-5% των επίκτητων αιμολυτικών αναιμιών
- Παλαιότερα εμφανίζονταν σε περιπτώσεις σύφιλης χωρίς θεραπεία
- Σήμερα εμφανίζεται κυρίως σε παιδιά ως μία οξεία και παροδική επιπλοκή ιογενούς λοίμωξης
- Το υπεύθυνο αντίσωμα είναι IgG με αντι-P1 ειδικότητα και περιγράφεται ως διφασική αιμολυσίνη

ΠΑΡΟΞΥΣΜΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ ΕΚ ΨΥΧΟΥΣ (PCH)

- Το αντίσωμα συνδέεται με τα ερυθρά στις ψυχρές περιοχές του σώματος ενεργοποιώντας το συμπλήρωμα και προκαλεί σοβαρή ενδαγγειακή αιμόλυση όταν τα ερυθρά περνούν από θερμές περιοχές του σώματος στους 37◦C

- Η DAT είναι θετική λόγω της παρουσίας του συμπληρώματος

- Θετική δοκιμασία Donath-Landsteiner

- Γενικά, το αντίσωμα δεν εμποδίζει την ανίχνευση αλλοαντισωμάτων ή τη διαδικασία διασταύρωσης, διότι σπάνια δρα ως συγκολλητίνη σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από αυτή του περιβάλλοντος

ΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΑΠΟ ΦΑΡΜΑΚΑ

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ	ΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ DAT	ELUATE	ΑΙΜΟΛΥΣΗ
ΑΝΟΣΟΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΑ	Κινιδίνη, φαινακετίνη,κεφαλοσπορίνες	IgM/IgG	Θετική, συχνά C3d μόνο, περιστασιακά και IgG	Συνήθως αρνητικό	Οξεία ενδαγγειακή αιμόλυση
ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΥ	Πενικιλλίνη, στρεπτομυκίνη, κεφαλοσπορίνες	IgG	Έντονα θετική	Συνήθως αρνητικό	3-4% ασθενών με υψηλές δόσεις πενικιλλίνης εμφανίζουν συνήθως εξαγγειακή αιμόλυση
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ	Κεφαλοσπορίνες, αναστολείς β-λακταμασών, πλατίνα	Πρωτείνες πλάσματος	Θετική λόγω της παρουσίας πολλών πρωτεϊνών	Αρνητικό	Πιθανή αιμόλυση
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	Methyldopa, fludarabin	IgG	Έντονα θετική	Θετικό όπως στην ΑΑΑ θερμού τύπου	0.8% ΑΑΑ θερμού τύπου, 15% ασθενών που λαμβάνουν Methyldopa, εμφανίζει θετική DAT

ΜΕΤΑΓΓΙΣΗ ΣΤΗΝ ΑΑΑ

- Οι ασθενείς με ΑΑΑ είναι υψηλού κινδύνου για εμφάνιση αντιδράσεων μετά από μετάγγιση και δεν πρέπει να μεταγγίζονται εάν δεν υπάρχει απόλυτη ένδειξη
- Η παρουσία αλλοαντισωμάτων μπορεί να καλύπτεται από τη έκφραση του αυτοαντισώματος και η ανεύρεση συμβατού αίματος να είναι δύσκολη
- Η πρακτική μετάγγισης του ΄΄λιγότερου ασύμβατου΄΄ αίματος είναι συνηθισμένη
- Η μετάγγιση δεν πρέπει να καθυστερεί σε περιπτώσεις με χαμηλή αιμοσφαιρίνη οι οποίες συνοδεύονται από συμπτώματα υποξίας ή επί εμφάνισης καρδιαγγειακών επιπλοκών
- Στην προετοιμασία του αίματος πρέπει να σεβόμαστε το φαινότυπο Rh/Kell, ενώ εάν έχουμε καθορίσει τον πλήρη φαινότυπο ερυθρών, μπορούμε να σεβαστούμε και άλλα σημαντικά αντιγόνα
- Θεραπεία υποκείμενης διαταραχής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΑΣ