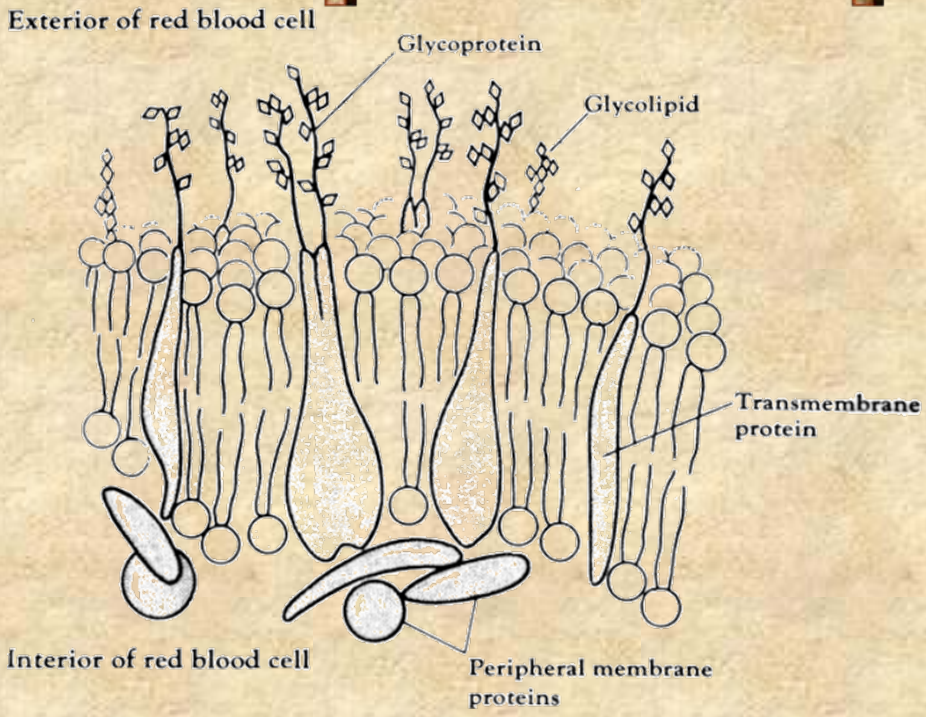
Ανοσοαιματολογία ΙΙ

Τυποποίηση ομάδας αίματος-παρουσίαση περιστατικών



Ζ. Μπεζιργιαννίδου
Αιματολόγος

Τυποποίηση ομάδας αίματος

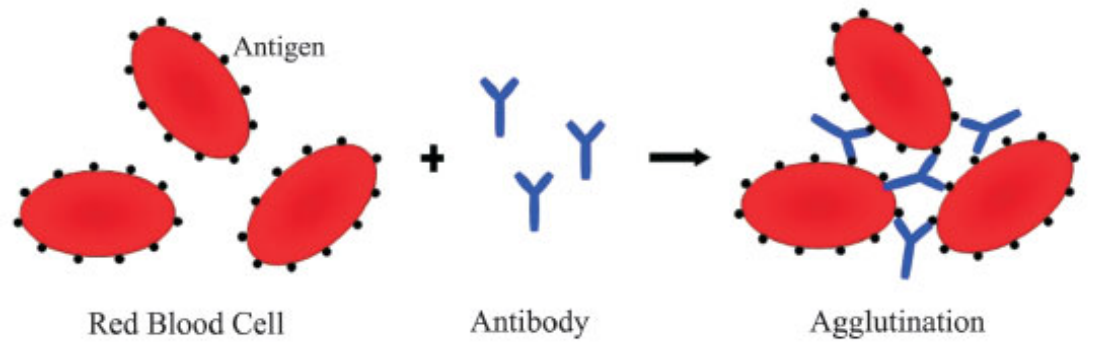
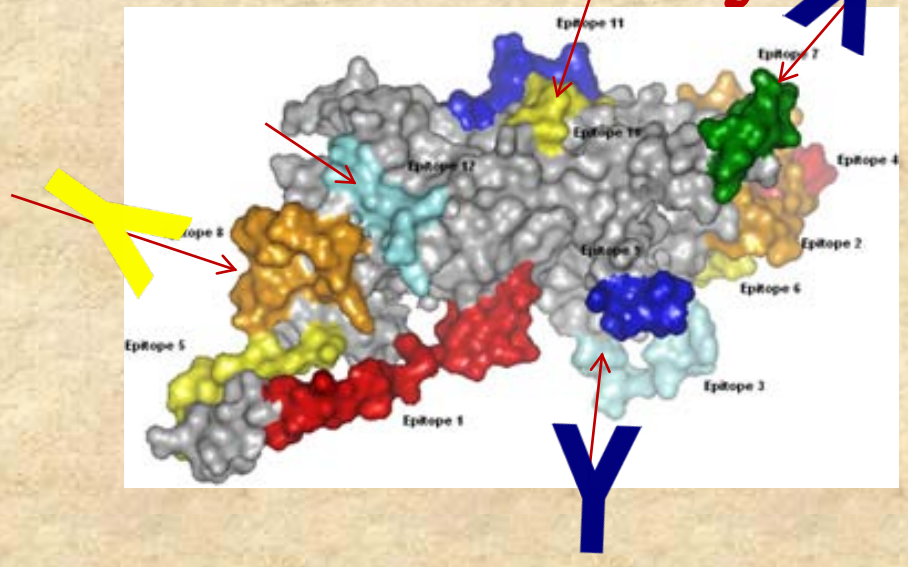


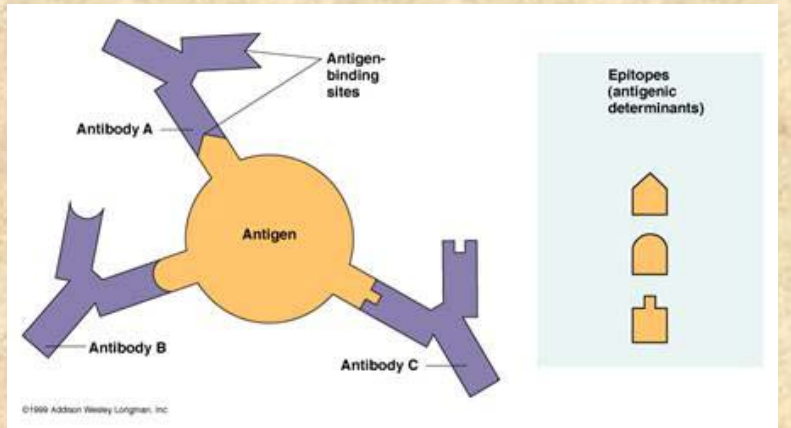
Figure 1 – Representation of the hemagglutination reaction. Blood group antigens and antibodies form a clumping of erythrocytes (modified from Parslow et al., 2004)[5]

- Η κυριότερη μέθοδος τυποποίησης είναι η Αιμοσυγκόλληση.
- **Αιμοσυγκόλληση είναι ο σχηματισμός συγκολλήσεων –αθροισμάτων ερυθρών ύστερα από την ειδική αντίδραση ενός Ab με ένα Ag.**
- Στον καθορισμό της ομάδας, αντιδρούν τα αντιγόνα των ερυθρών με αντιορό εμπορίου.

Σύνδεση Ag-Ab Επίτοπος

- Κάθε αντίσωμα αναγνωρίζει και συνδέεται με μια μικρή περιοχή ενός μεγαλύτερου μορίου του αντιγόνου που μπορεί να έχει και άλλες διαφορετικές περιοχές που συνδέονται με άλλα διαφορετικά αντισώματα.
- Κάθε επιφανειακό τμήμα του αντιγόνου που συνδέεται με ένα αντίσωμα λέγεται επίτοπος ή ανυτιγονικός καθοριστής
- Κάθε αντίσωμα αντιδρά μόνο με ένα συγκεκριμένο επίτοπο





Κάθε αντιγόνο μπορεί να έχει πολλούς επιτόπους

Αντιοροί

Μονοκλωνικοί

Αποτελούνται από ένα αντίσωμα
Παράγονται από ένα κλώνο
Στρέφονται έναντι ενός επιτόπου.

Πλεονεκτήματα:

- **μεγάλη ειδικότητα**
- **διακρίνουν ποικιλίες**

Μειονεκτήματα:

- **ψευδώς αρνητικό**

Πολυκλωνικοί

μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων άρα αντιδρούν με πολλούς επιτόπους
παράγονται από πολλούς κλώνους

Πλεονεκτήματα:

- **ανιχνεύσουν πολλούς επιτόπους**

Μειονεκτήματα:

- **Ψευδώς θετικές αντιδράσεις**
- **Δεν διακρίνουν ποικιλίες**

Μονοκλωνικοί και πολυκλωνικοί που προέρχονται από μείγμα μονοκλωνικών αντιδρούν πολύ καλύτερα με ασθενή αντιγόνα σε σύγκριση με αντιορούς που παράγονται από ανοσοποίηση πχ Ανθρώπειοι(Human) ή rabbit, mouse κλπ.

Τεχνικές προσδιορισμού Ομάδων αίματος

Αιμοσυγκόλληση

- Επί πλακός
- Σε σωληνάριο
- Σε μικροστήλες
- Συστήματα μικροπλακών

Μοριακή τυποποίηση

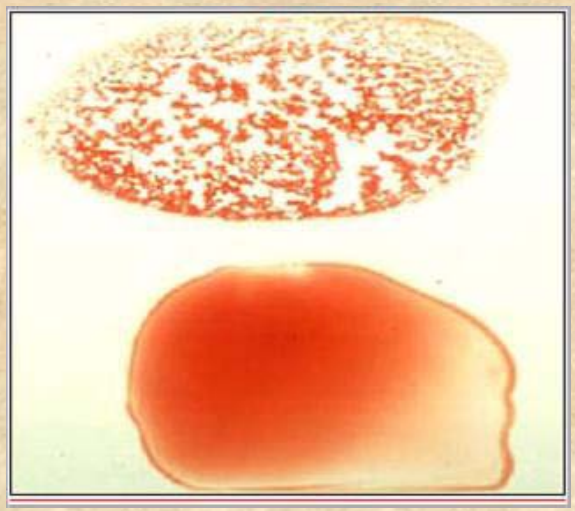
- PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism)
- SSP(Site Specific Primer) ALLELE SPECIFIC PCR
- REAL-TIME PCR
- DNA SEQUENCING
- Microarray Genotyping

Εφαρμογές διάφορων τεχνικών

Τεχνική επί πλακός (Αιμοσυγκόλληση)

Εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση:

- ABO
- Rh
- Kell



Τεχνική Σωληναρίων

Εφαρμόζεται για την ταυτοποίηση:

- **ABO**
- **Rh**
- **Kell**
- **Duffy**
- **Kidd**
- **MNS**
- **P**
- **Lewis**
- **Lutheran**

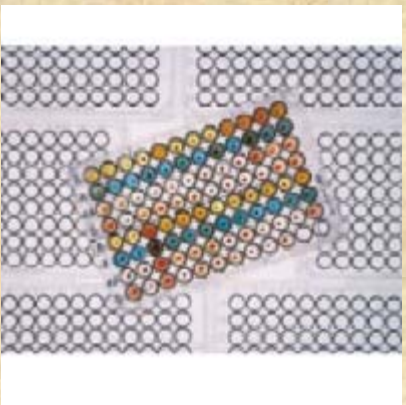
Αυτόματα και ημιαυτόματα συστήματα μικροπλακών (Αιμοσυγκόλληση)

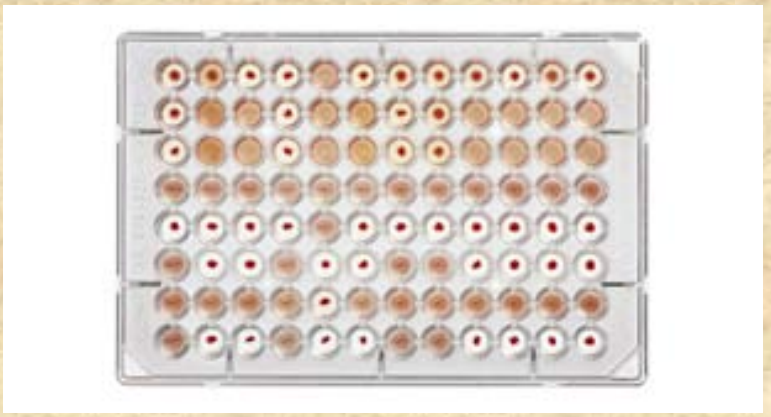
- **Χρησιμοποιούνται πλάκες με 96 θέσεις χαμηλών σωληναρίων, όπου αντιδρούν τα ερυθρά με τους αντιορούς ή ο ορός με τα γνωστά ερυθρά.**
- **Εάν υπάρχει αρκετό αντίσωμα και σχηματιστούν συμπλέγματα Ag-Ab, τότε τα ερυθρά παραμένουν στα τοιχώματα, σχηματίζοντας ένα στρώμα στο τοίχωμα του βοθρίου της μικροπλάκας.**
- **Εάν δεν υπάρξει αντίδραση τα ερυθρά κυλούνε προς τον πυθμένα σχηματίζοντας μια κουκίδα στο κέντρο.**

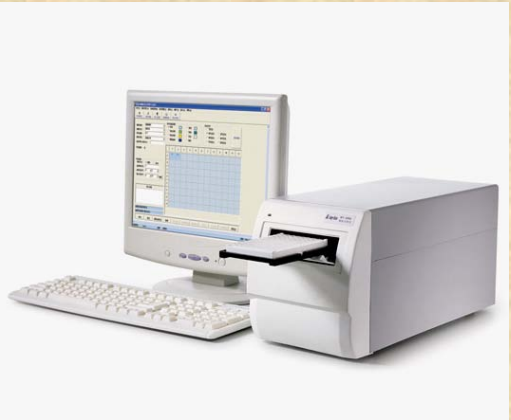
Συστήματα μικροπλακών

- Ένα **φωτόμετρο μετρά την απορρόφηση** των ακτίνων φωτός σε κάθε μικροπλάκα

- Τα δεδομένα μεταφέρονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και ερμηνεύονται.

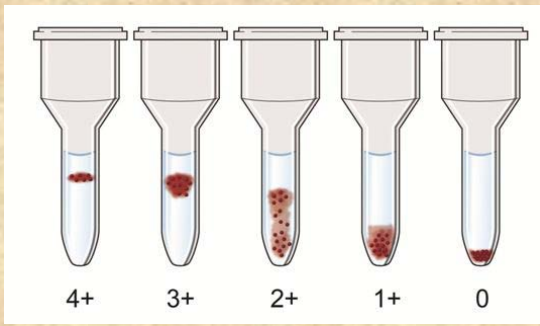






Τεχνικές μικροσωληναρίων με gel ή μικροσφαιρίδια

- **Γρήγορες και αξιόπιστες.**
- **Στο υλικό υπάρχουν οπές που κατά τη φυγοκέντρηση επιτρέπουν το πέρασμα των μεμονωμένων ερυθρών προς τον πυθμένα ενώ όταν σχηματισθούν συμπλέγματα ερυθρών, αυτά λόγω μεγέθους, παραμένουν στην επιφάνεια ή στο ενδιάμεσο του gel ή των μικροσφαιριδίων.**



Δυνατότητα εύκολης βαθμονόμησης της αντίδρασης

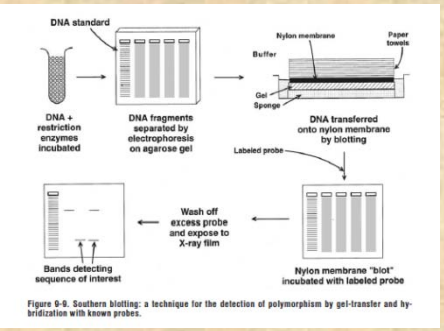


Figure 9-9. Southern blotting: a technique for the detection of polymorphism by gel-transfer and hybridization with known probes.

Μοριακή τυποποίηση

Πλεονεκτήματα

- Είναι κατάλληλη σε **μεταγγισμένους** ασθενείς
- **Δεν επηρεάζεται από DAT** Θετική(+)
- Κατάλληλη για εκτεταμένο φαινότυπο
- Μπορεί να γίνει αυτοματοποιημένα
- Μπορεί να εφαρμοστεί για **προγεννητικό έλεγχο RhD**

Μειονεκτήματα

- Χρειάζεται ειδικό εξοπλισμό
- Εξειδικευμένο προσωπικό
- Εφαρμόζεται για ερευνητικούς σκοπούς, σε τράπεζες σπανίων δοτών.
- Είναι χρονοβόρα διαδικασία
- Δεν χρησιμοποιείται στην καθημερινή πρακτική ακόμη
- Ο γονότυπος δε συμβαδίζει πάντα με το φαινότυπο

Προβλήματα τυποποίησης(γενικά)

Ψευδώς θετικά

- ΑΑΑ
- Υπερσφαιριναιμία
- Ενδοφλέβια Ανοσοσφαιρίνη
- Φάρμακα
- Μεταγγισμένοι προσφάτως ασθενείς
- Μεταμοσχευμένοι ασθενείς
- Τεχνικά λάθη

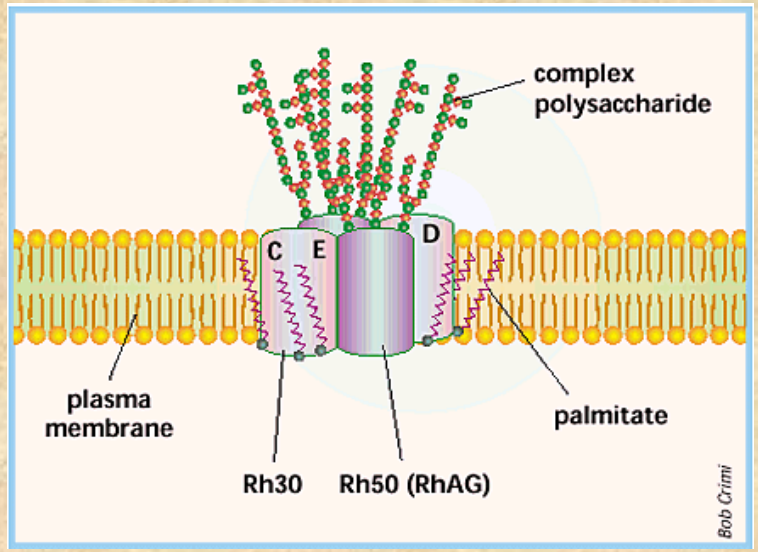
Ψευδώς αρνητικά

- Ασθενής έκφραση αντιγόνων (νεογνά ή κάποιες ασθένειες πχ. Λευχαιμίες)
- Τεχνικά λάθη

Σύστημα Rh

Τυποποίηση Rh

Απαραίτητος ο καθορισμός Rh D μαζί με το ABO σύστημα



D(+) ορίζονται τα ερυθρά που αντιδρούν

- **με άμεση συγκόλληση με ειδικούς αντι-D αντιορούς στην πλάκα και στα σωληνάρια**

ή

- **είναι θετικά 3-4 + στις μικροστήλες**

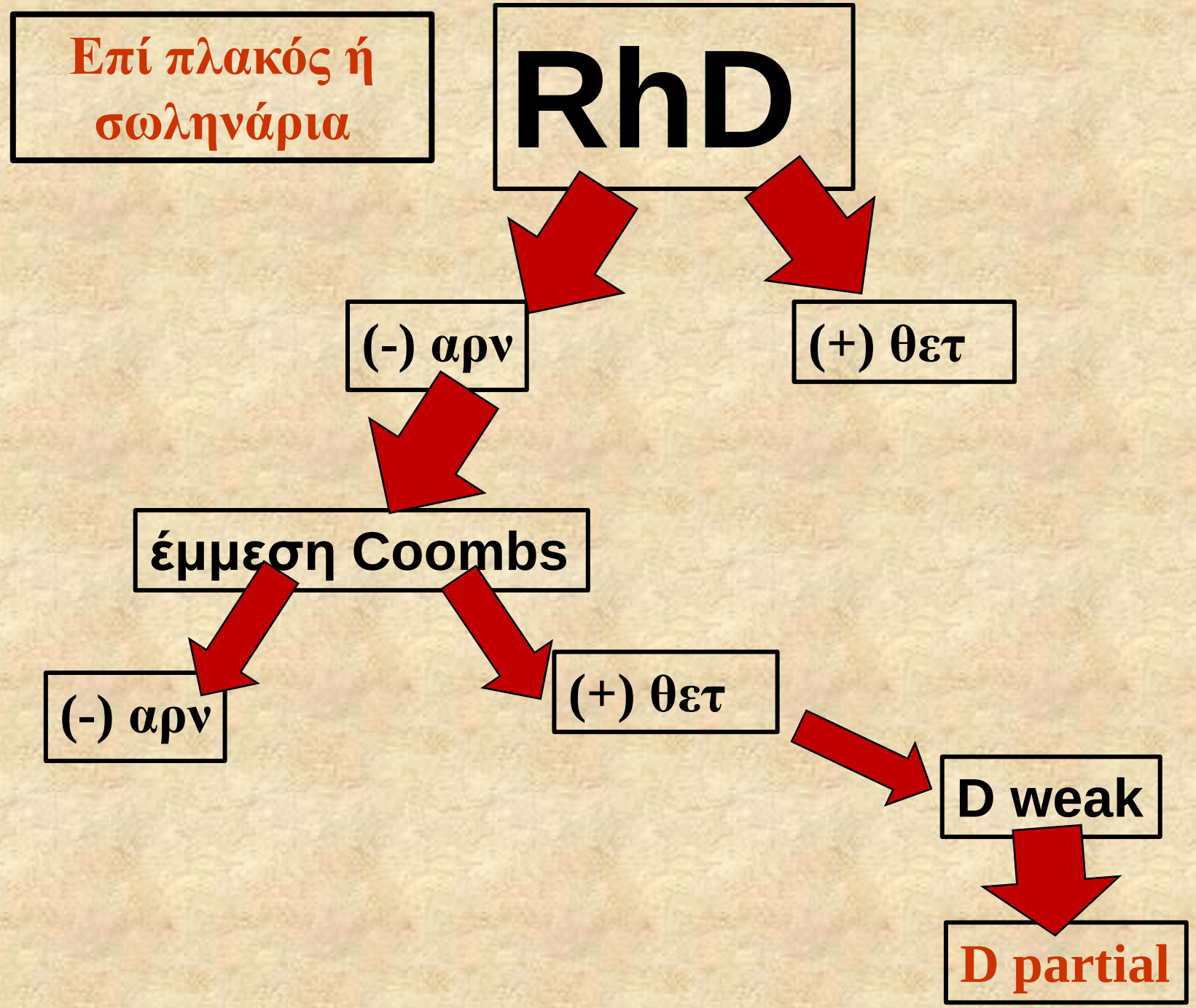
Έλεγχος ρουτίνας για RhD

- **Μονοκλωνικός αντιορός (πχMonoclonal IgM antibody, DVI- ή DVI+)**
- **Πολυκλωνικός(μείγμα διάφορων μονοκλωνικών) (πχ IgG και IgM ab, DVI-)**
- **Μονοκλωνικός + πολυκλωνικός Ανθρώπειος**

Έλεγχος ρουτίνας για RhD (II)

Είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε σύνθεση, ευαισθησία και ειδικότητα του αντιορού

Το ιδανικό για το slide test είναι τα ερυθρά και ο αντιορός να βρίσκονται σε θερμοκρασία 37ο C πάνω από το διαφανοσκόπιο και το αποτέλεσμα να διαβάζεται σε 2 λεπτά.


Επί πλακός ή σωληνάρια
RhD
(-) αρν
(+) θετ
έμμεση Coombs
(-) αρν
(+) θετ
D weak
D partial

RhD

(1+-2+) ασθ.θετικό

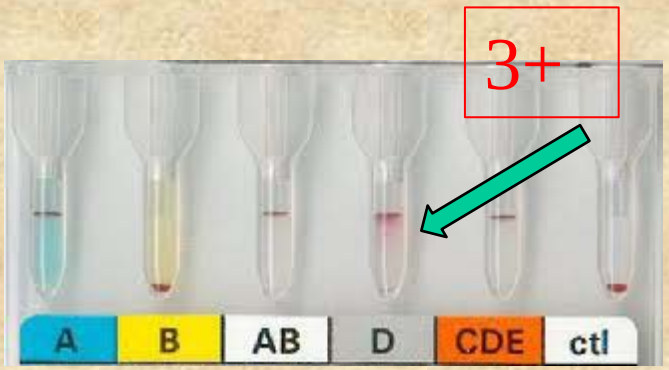
(-) αρν

(3+-4+) θετ

D weak

D partial

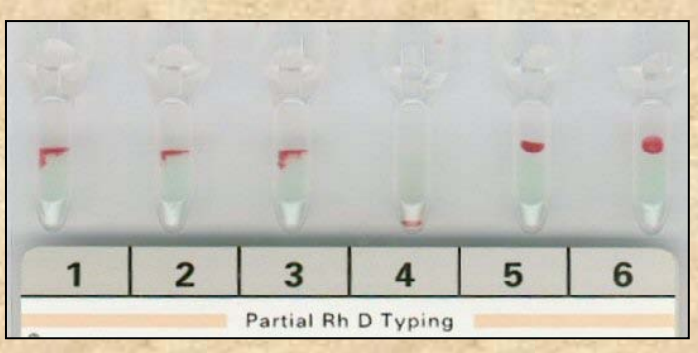
Μικροστήλες



D Mosaic/Partial D

- **Το αντιγόνο D θεωρείται σαν ένα μωσαϊκό με πολλούς αντιγονικούς επιτόπους**
- **Όταν λείπει ένα μέρος του, αποκτά διαφορετική αντιγονικότητα → παραγωγή αντισωμάτων μετά από έκθεση σε άλλη ποικιλία D**
- **30 ποικιλίες D αντιγόνου Partial D(II,IIIa,IIIb, IIIc,VI κ.α.)**
- **Η ποιοτική διαφορά συνοδεύεται συνήθως και από ποσοτική**
- **Η πιο σημαντική ποικιλία είναι η DVI η οποία μπορεί να προκαλέσει ανοσοποίηση σε D(-) ασθενείς**

Έλεγχος για D partial επιτυγχάνεται με μονοκλωνικούς αντιορούς



Έλεγχος DVI

Εάν δεν ταυτοποηθεί ορολογικά κάποια ποικιλία D, τότε θεωρείται D weak

	Μεταλλάξεις	Ποσοτική μεταβολή	Αντισώματα	Ανίχνευση
D weak	ενδοκυττάριο ή διαμεμβρανικό	↓	ΟΧΙ	Μοριακά
Partial D	εξωκυττάριο	↓	ΝΑΙ	Ορολογικά

Σημασία των ποικιλιών στη μετάγγιση

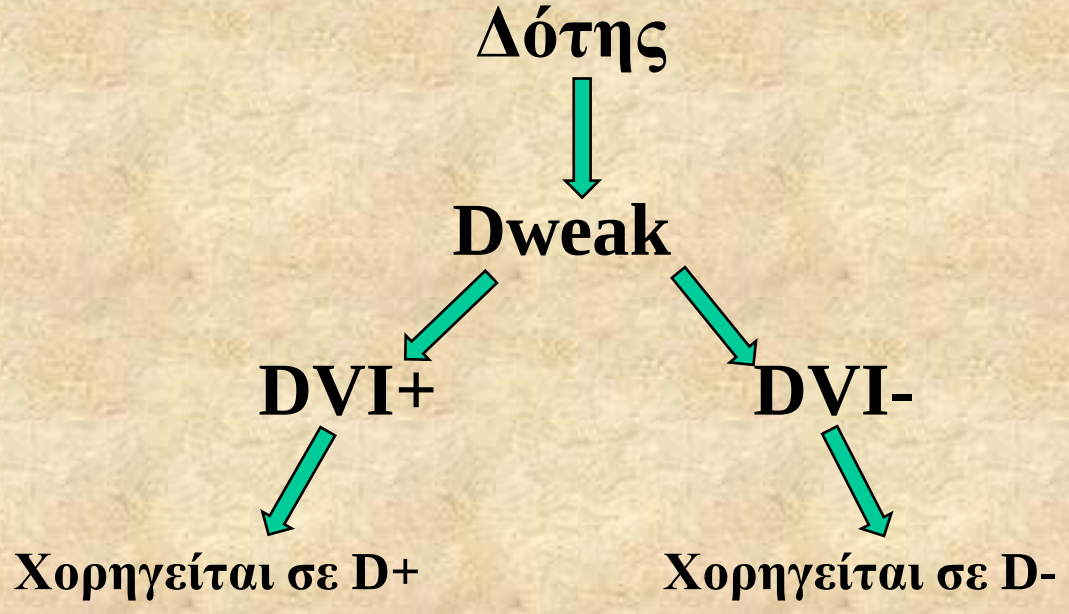
Οι D weak και οι D variant θεωρούνται

(+)θετικοί ως δότες και

(-)αρνητικοί ως λήπτες

Οικονομία στα D(-) αρνητικά μπορεί να γίνει αν τα Dweak ελέγχονται ως προς την ποικιλία DVI

- Οι ασθενείς πρέπει να ελέγχονται με αντιορούς που δεν αντιδρούν με DVI ώστε να χαρακτηρίζονται αρνητικοί
- Οι δότες πρέπει να ελέγχονται με αντιορούς που ανιχνεύουν το DVI ώστε να χαρακτηρίζονται ως θετικοί

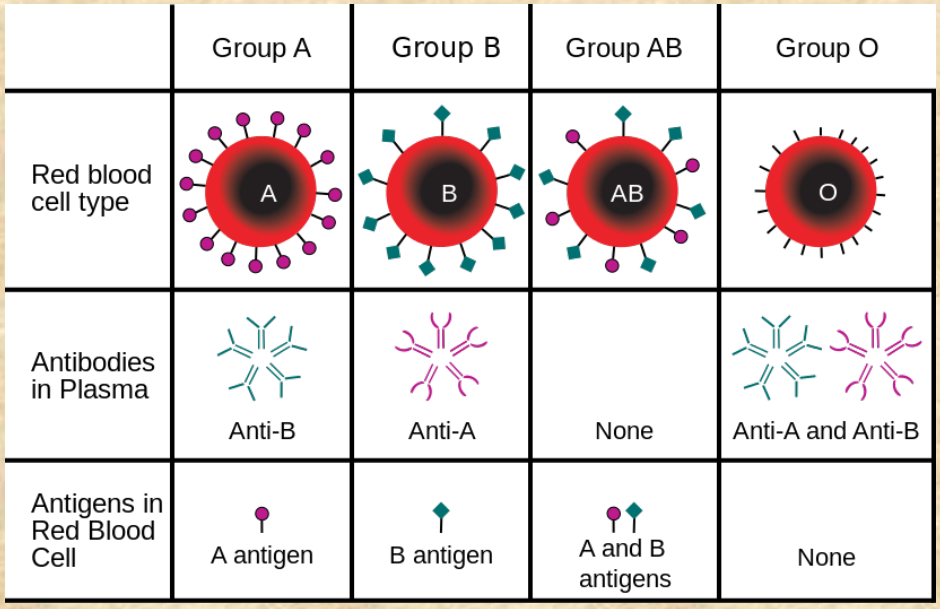


Δηλαδή ένα μέρος των D weak μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε D(-) ασθενείς

Σύστημα ABO

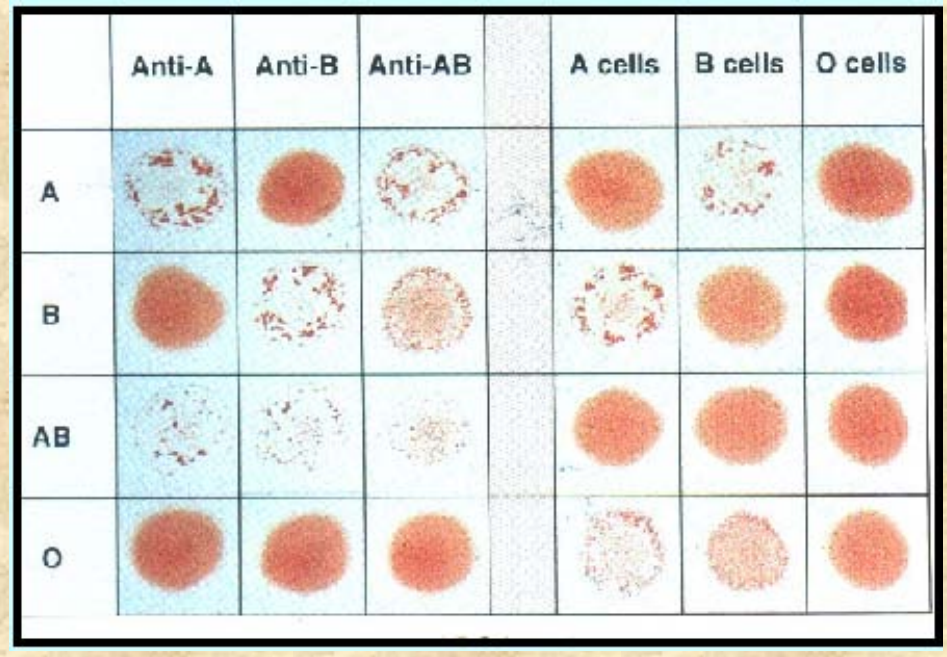
Αντιγόνα και αντισώματα ABO

- **Αντιγόνα Η, Α, Β**
- **Φυσικά αντισώματα ισοσυγκολλητίνες για τα αντιγόνα που λείπουν από τον ασθενή**
- Αναπτύσσονται μετά τον 5ο-6ο μήνα της ζωής πιθανότατα λόγω φυσικής έκθεσης σε παρόμοια αντιγόνα που υπάρχουν στη φύση.
- Αυτός είναι και ο λόγος που υπάρχει σοβαρός κίνδυνος σε λάθος μετάγγιση ομάδος ως προς ABO
- **Στην Α και Β ομάδα τα αντισώματα είναι IgM ενώ στην ομάδα Ο είναι κυρίως IgG**



Καθορισμός ομάδος ABO
Υποχρεωτικός έλεγχος ευθείας και ανάστροφης ομάδας

Ευθεία ομάδα **Ανάστροφη**



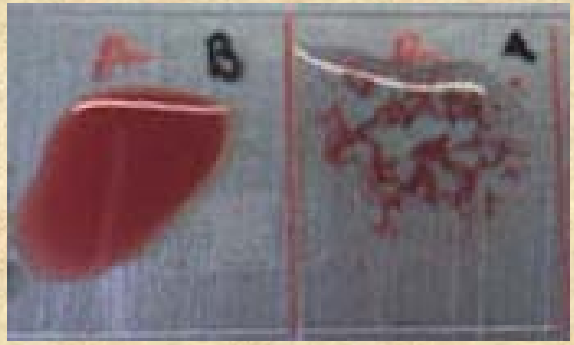
- **Ευθεία ομάδα:**

Ανίχνευση αντιγόνων ABO επί των ερυθρών

- **Ανάστροφη:**

ανίχνευση φυσικών ισοσυγκολλητινών αντι-Α και αντι-Β στον ορό του ασθενούς.

Τα ευρήματα από την ευθεία και την ανάστροφη πρέπει να ταυτίζονται



Ευθεία Ομάδα
Τεχνική επί πλακός

- **Η πιο σύντομη τεχνική**
- **Εφαρμόζεται σε ασθενείς ειδικά σε επείγοντα περιστατικά**
- **Μονοκλωνικός ή πολυκλωνικός αντιορός Anti-A, Anti-B και Anti-AB**
- **Τις αντιδράσεις με αντι-Α, αντι-Β, αντι-ΑΒ δεν τις βλέπουμε σε διαφανοσκόπιο διότι εκπέμπει θερμότητα και μπορεί να διαλυθούν οι συγκολλήσεις**
- **Τα αμφίβολα πρέπει να ελέγχονται και με άλλη μέθοδο πχ μέθοδο σωληναρίων ή κάρτα.**

Ευθεία Ομάδα (σε σωληνάριο)

Βοηθά στην επίλυση αμφιβολιών από την τεχνική επί πλακός

- **Δείγματα από σωληνάριο με ή χωρίς αντιπηκτικό**

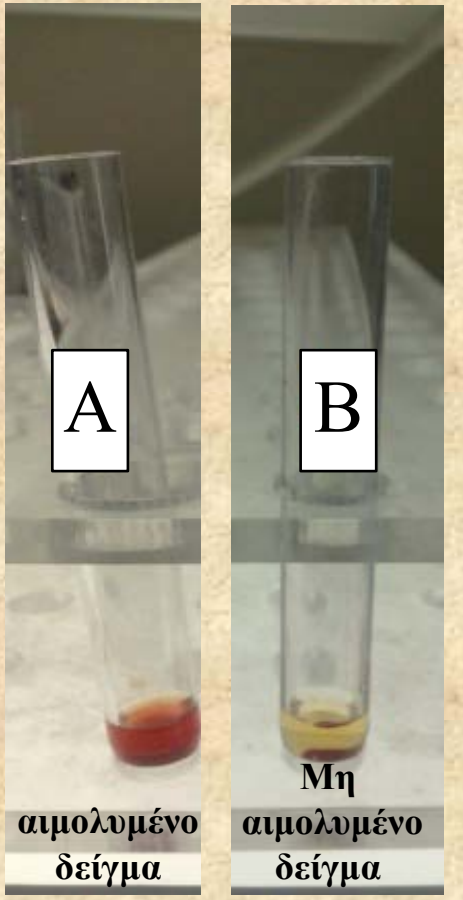
- **Το εναιώρημα 3-5% μπορεί να γίνει με**
  - **πλάσμα ή ορό του ασθενούς**

Αλλά το καλύτερο είναι με

- **Φυσιολογικό ορό και πλυμένα ερυθρά**

Ανάστροφη Ομάδα

- Είναι επιβεβαιωτική εξέταση για την ομάδα ΑΒΟ λόγω της παρουσίας των φυσικών αντι-Α και αντι-Β.
- Είναι χρήσιμο να ελέγχουμε τον ορό και με Ο ερυθρά και όχι μόνο με Α και Β
- Η παρουσία συγκόλλησης είναι ενδεικτική της ύπαρξης του αντίστοιχου αντισώματος
- Η παρουσία Αιμόλυσης επίσης είναι θετική αντίδραση που είναι δύσκολο να φανεί στην πλάκα.
- Παρόλο που γίνεται ευρεία χρήση της πλάκας για τον έλεγχο της ανάστροφης, σε περιπτώσεις μη ξεκάθαρου αποτελέσματος, πρέπει να γίνεται έλεγχος σε σωληνάριο ή κάρτα



Discrepancy: Ασυμφωνία ευθείας ανάστροφης

Τι κάνουμε

όταν η ευθεία και η ανάστροφη δείχνουν διαφορετική ομάδα?

- **Όταν δεν συμφωνεί η ευθεία με την ανάστροφη, δεν δίνουμε αποτέλεσμα μέχρι να λυθεί το πρόβλημα**
- **Αν είναι μονάδα κρατείται μέχρι να διευκρινισθεί**
- **Αν είναι ασθενής δεν δίνουμε την ομάδα αλλά αν χρειάζεται μετάγγιση δεν την καθυστερούμε αλλά δίνουμε Ο με Rh ανάλογα D- ή +.**

Ασυμφωνία ευθείας ανάστροφης

Πρέπει να εντοπίσουμε αν το πρόβλημα είναι στην ευθεία ή στην ανάστροφη

Παρατηρούμε

- **Ποια αντίδραση είναι ασθενέστερη**
- **Ποια αντίδραση είναι αρνητική, ενώ αναμενόταν θετική**
- **Αν εμφανίζεται επιπλέον αντίδραση που δεν αναμενόταν**

Αιτίες ασυμφωνίας

- Τεχνικής φύσεως λάθη
- Ενδογενή προβλήματα ορού ή ερυθρών

Τεχνικά λάθη

Ψευδώς αρνητικά

- Μη προσθήκη αντιδραστηρίου
- Αιμόλυση του δείγματος που παραβλέπεται
- Λάθος αναλογία αντιορού-ερυθρών
- Λιγότερη φυγοκέντρηση (στροφές ή χρόνο)
- Επώαση σε ψηλές θερμοκρασίες 20-24^{o} C
- Λάθος ανάγνωση αποτελέσματος
- Λάθος καταγραφή

Ψευδώς θετικά

- Υπερφυγοκέντρηση δείγματος
- Επιμολυσμένα ερυθρά ή αντιδραστήρια ή φυσιολογικός ορός
- Λερωμένα σωληνάρια ή πλάκες
- Λάθος ανάγνωση
- Λάθος καταγραφή

Πρώτα αποκλείουμε τα τεχνικά λάθη (Ι)

- **Ελέγχουμε τα στοιχεία στα σωληνάρια**
- **Επανάληψη του τεστ** με τον ίδιο τρόπο
- Επανάληψη με άλλη τεχνική
- Ζητάμε **νέο δείγμα** του ασθενή ή παίρνουμε δείγμα από τη φιάλη (αν είναι αιμοδότης). Αυτό θα βοηθήσει σε λάθος δείγμα ή επιμολυσμένο)
- **Ιστορικό** ασθενή (Διάγνωση, μεταγγίσεις, μεταμόσχευση, φάρμακα)

Πρώτα αποκλείουμε τα τεχνικά λάθη (ΙΙ)

- Ελέγχουμε ημερομηνία λήξης των αντιδραστηρίων
- Έλεγχος φυγοκέντρου
- Ακολουθούμε τις οδηγίες του κατασκευαστή
- Σωστό εναιώρημα
- Σωστή ανάγνωση μετά επαναιώρηση

Εφόσον αποκλειστούν τα τεχνικά λάθη,

Κατηγοριοποιούμε το πρόβλημα της Ασυμφωνίας ABO

Προβλήματα Ερυθρών

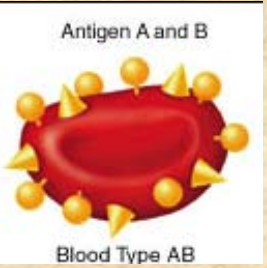
- Απόντα αντιγόνα ή ασθενώς αντιδρώντα
- Επιπλέον αντιγόνα
- Διπλός πληθυσμός

Προβλήματα ορού

- Απουσία αντισωμάτων ή ασθενώς αντιδρώντα
- Επιπλέον αντισώματα

Προβλήματα Ορού και ερυθρών

- Υπερσφαιριναιμία-Rouleaux
- AAA
- Wharton Jelly



Ασυμφωνίες ABO

Ευθεία

I
Έλλειψη ή ασθενές Ag

- Α, Β υποομάδα
- Κακοήθεια

II
Επιπλέον αντίδραση

- Επίκτητο Α
- Επίκτητο Β
- Β(Α)Φαινότυπος

III
Mixed field (Διπλός πληθυσμός)

- Μετάγγιση με Ο
- Μεταμόσχευση
- Πρόσμιξη ερυθρών μητέρας
- Α3 Υποομάδα

Ανάστροφη

IV
Έλλειψη ή ασθενής

- Νεογνά
- Ηλικιωμένοι
- Ανοσοκατα-σταλμένοι

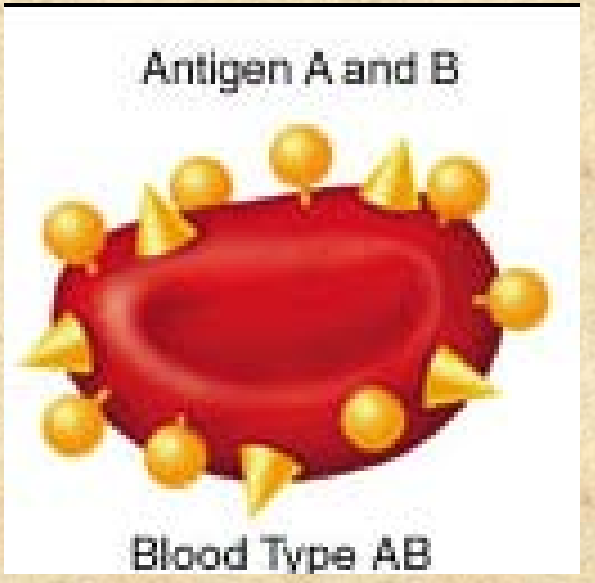
V
Επιπλέον αντίδραση

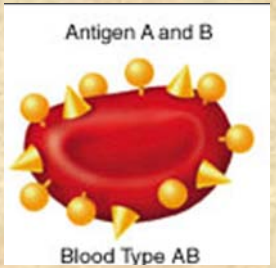
- Ψυχρό ΑλλοAb
- Anti-A1

Ευθεία και Ανάστροφη

- Υπερσφαιριναιμία-Rouleaux Π.Μυέλωμα, Waldestrom
- Θερμό AυτοAb
- Ψυχρό AυτοAb
- IV IgG

Προβλήματα Ευθείας Ομάδας

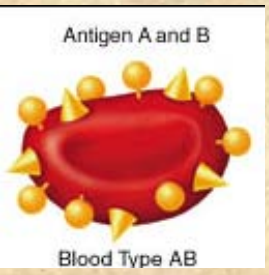




Πιθανές αιτίες ασυμφωνίας (Ι)

(Ευθεία: μειωμένη έκφραση αντιγόνων Α και Β)

(πιο σπάνιες αιτίες)



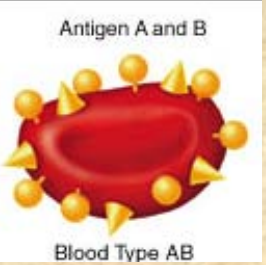
Ευθεία: μειωμένη έκφραση αντιγόνων Α και Β

Κληρονομούμενα

- **Α ή Β υποομάδα(λίγα σε αριθμό αντιγόνα Α ή/και Β)**
- **Ομάδα Bombay (Έλλεψη και Η αντιγόνου, συγκολλά και τα Ο ερυθρά)**
- **Υψηλές συγκεντρώσεις διαλυτών αντιγόνων στον ορό, μπορούν να εξουδετερώσουν τον αντιορό και να έχουμε ψευδώς (-) αποτέλεσμα αν κάνουμε το εναιώρημα των ερυθρών με ορό ή πλάσμα του ασθενή**

Επίκτητα

- **Λευχαιμίες, Λεμφώματα, άλλες κακοήθειες**

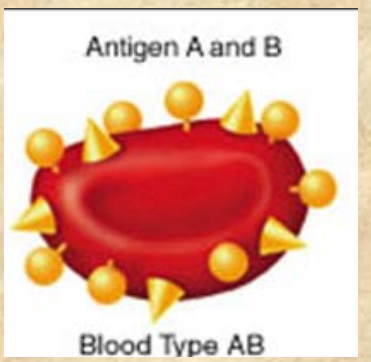


Υποομάδα Α2

- Στην υποομάδα Α2 παρατηρούνται IgM αντι-Α1 φυσικά αντισώματα σε ποσοστό 1-8%, ενώ στην Α2Β σε ποσοστό 22-35%.
- **Η παρουσία αντι-Α1 δημιουργεί προβλήματα στην ταυτοποίηση ομάδος**
- Η θερμοκρασία δράσης τους είναι αρκετά κάτω των 37ºC και δεν θεωρούνται κλινικά σημαντικά εκτός αν δρουν στους 37ºC.

Ευρήματα

- **Ευθεία ομάδα: Α2**
- **Ανάστροφη ομάδα: Συγκολλά τα Β και πιθανόν και τα Α1 ενώ δεν συγκολλά τα Α2**



Υποομάδες ασθενέστερες

Aint(intermediate), A3, Ax, Am, Aend, Ael, Abandu

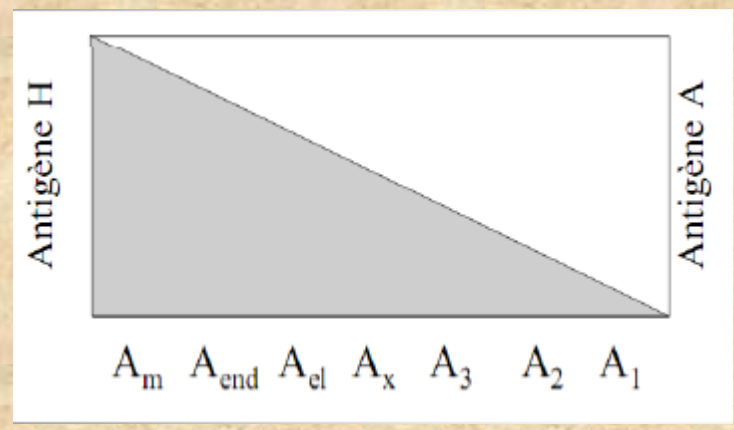
- **Ευθεία ομάδα: Αντιδρούν πολύ ασθενώς ή καθόλου με αντι-Α ή αντι-Α,Β πολυκλωνικούς αντιορούς ενώ με μονοκλωνικούς αντιδρούν καλύτερα.**
- **Ανάστροφη ομάδα: συγκολλούν ασθενώς ή καθόλου τα Α1 ερυθρά**

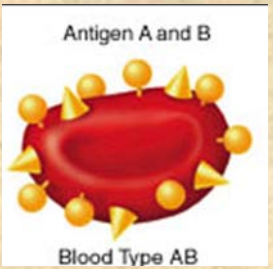
Εκτίμηση υποομάδων Α και Β

Η ποσότητα του Η αντιγόνου είναι μεγαλύτερη στην ομάδα Ο

O>A2>B>A1>A1B

Sub-group of A	Reactions* with				Sub-stances in saliva†	Anti-A1 in serum
	Anti-A	Anti-A,B	Anti-A1	Anti-H		
A_1	++++	++++	++++	0	A, H	No
A_2	++++	++++	0	++++	A, H	Some-times
A_{int}	++++	++++	++(+)	+++	A, H	No
A_3	++(+) mf	++(+)mf	0	++++	A, H	Some-times
A_x	0/+	++(+)	0	++++	H	Often
A_{end}	+	+	0	++++	H	Some-times
A_m	0/+	0/+	0	++++	A, H	No
A_{finn}	+	+	0	++++	H	Yes
A_{bantu}	+(+)	+(+)	0	++++	H	Yes
A_{1ae}	0‡	0	+++**	++++	H	Yes***
A_y	0‡	0	0	++++	A, H	No
A_{el}	0‡	0	0	++++	H	Some-times



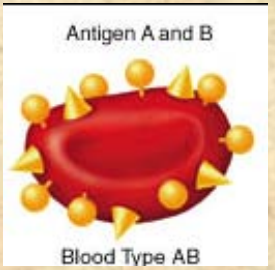


Ομάδα Bombay

- **Η έλλειψη του Η αντιγόνου χαρακτηρίζει την ομάδα Bombay και έχει φυσικά anti-H αντισώματα**
- **Ευθεία ομάδα: Ο**
- **Διαφορική Διάγνωση από Ο: Τα ερυθρά δεν αντιδρούν ούτε με τον αντι-Η αντιορό (ενώ τα Ο αντιδρούν έντονα)**
- **Ανάστροφη ομάδα: Συγκολλά Α,Β, και Ο ερυθρά**

Anti-A	Anti-B	A1 Cell	B Cell	O Cell
0	0	4+	4+	4+

Ευθεία: μειωμένη έκφραση αντιγόνων Α και Β

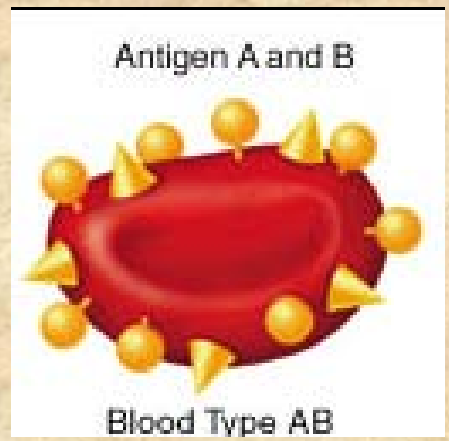


Επίλυση

- **Ιστορικό: Μεταγγίσεις, νοσήματα, μεταμόσχευση**
- **Επανάληψη με άλλη τεχνική**
- **Επανάληψη με άλλο αντιδραστήριο (μονοκλωνικό αντιορό)**
- **Πλένουμε τα ερυθρά για να αποφύγουμε διαλυτά αντιγόνα.**
- **Χρησιμοποιούμε εκτός των αντι-Α, αντι-Β, αντι-ΑΒ, και αντι-Α1 και αντι-Η**
- **Επώαση των ερυθρών με τους αντιορούς επί 15-30min για να ανιχνεύσουμε ασθενή αντιγόνα**
- **Επανάληψη του τεστ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (IgM αντισώματα)**
- **Προσρόφηση έκλουση για την αποκάλυψη πολύ ασθενών αντιγόνων**

Πιθανές αιτίες ασυμφωνίας (II)

Ευθεία: αυξημένη αντίδραση των ερυθρών με Autocontrol(-)

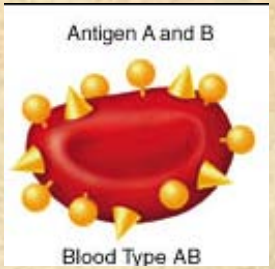


Anti-A	Anti-B	A_1 cells	B cells
4+	1+	0	4+

Group AB? Group A

Ευθεία: αυξημένη αντίδραση των ερυθρών με Autocontrol(-)

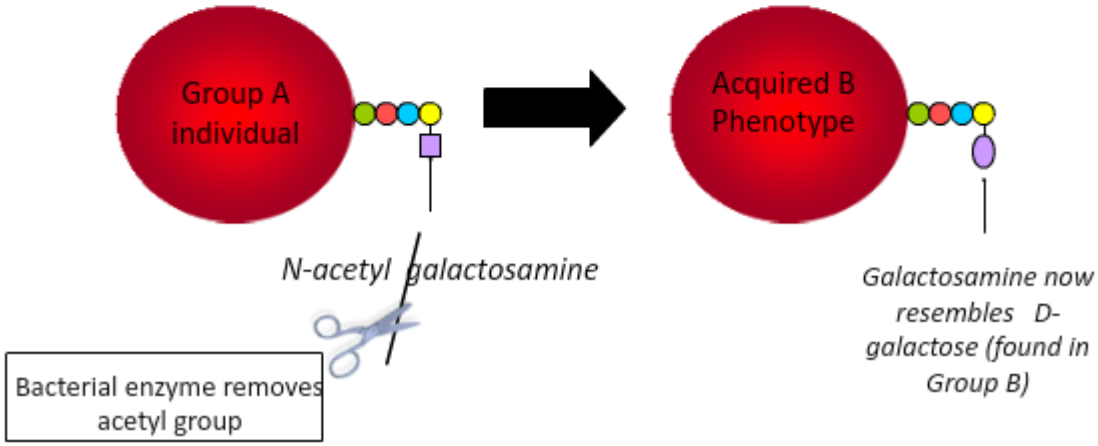
- Επίκτητο Β αντιγόνο
- Επίκτητο Α αντιγόνο
- Β(Α) Φαινότυπος



Επίκτητο Β

- Ασθενείς με καρκίνο παχέος
- Υποτροπιάζουσες λοιμώξεις ΓΣΣ και κυρίως παχέος εντέρου από gram(-) βακτήρια

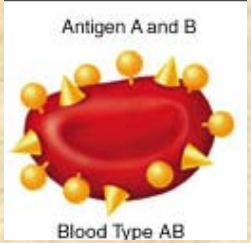
Βακτήρια (E.coli) έχουν ένα ένζυμο που αφαιρεί μια ακετυλική ομάδα από το Α αντιγόνο, μετατρέποντάς τη N-ακέτυλογαλακτοζαμίνη σε α-γαλακτοζαμίνη που μοιάζει με το Β Αντιγόνο.

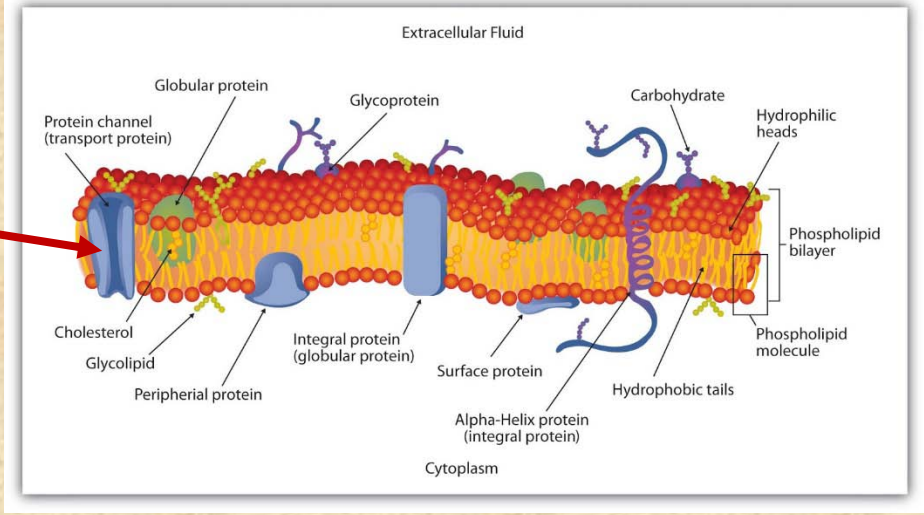


Επίκτητο Β

Επίλυση

- Ιστορικό για προβλήματα παχέος εντέρου
- Πλένουμε τα ερυθρά
- Ελέγχουμε autocontrol (Το anti-B του ασθενή δεν αντιδρά με τα δικά του ‘’ΑΒ’’ ερυθρά)
- Οξίνιση του αντιορού αντι-Β με p.H. 6 και επανεξέταση των ερυθρών. Το επίκτητο Β αντιγόνο δεν αντιδρά με τον οξινισμένο ορό





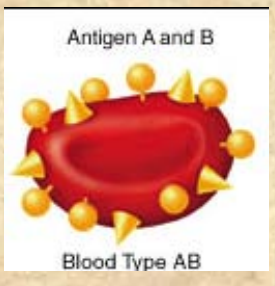
Επίκτητο Α

- **Υπάρχουν κάποια αντιγόνα, εντός της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης που λέγονται κρυπτοαντιγόνα Tn και δεν έχουν αντιγονική δράση.**
- **Κληρονομικές ή επίκτητες διαταραχές της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, σε ασθενείς με κακοήθειες, βακτηριακή ή ιογενή λοίμωξη, μπορούν να οδηγήσουν σε αποκάλυψη των κρυπτοαντιγόνων.**
- **Το σάκχαρο που αποκαλύπτεται είναι η N-ακετυλογαλακτοζαμίνη που χαρακτηρίζει το Α αντιγόνο.**
- **Αποτέλεσμα κάποια άτομα Ο ή Β να εμφανίζουν θετικότητα με αντι-Α αν χρησιμοποιηθούν ανθρώπειοι αντιοροί διότι οι οροί των ανθρώπων> των 6 μηνών περιέχουν IgM φυσικά anti-Tn αντισώματα**
- **Δεν αντιδρούν όμως με αυτόλογο ορό**

Επίκτητο Α

Επίλυση

- Χρήση μονοκλωνικών αντιορών
- Χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων, που αποδομούν το κρυπτοαντιγόνο οπότε δεν αντιδρά με το αντι-Α
- Χρήση διάφορων λεκτινών για την ταυτοποίηση των κρυπτοαντιγόνων



B(A) Φαινότυπος

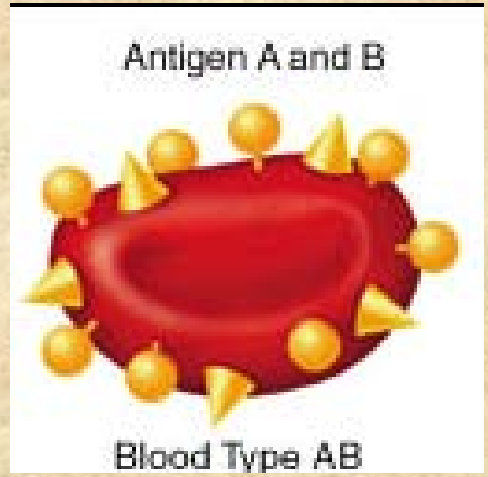
- **Παρόμοια με επίκτητο Β**
- **Ασθενείς ομάδας Β, εμφανίζουν ασθενές Α αντιγόνο**
- **Οι ασθενείς αυτοί έχουν υψηλά επίπεδα γαλακτοσυλτρανσφεράσης παράγοντας μεγάλες ποσότητες Β αντιγόνου.**
- **Ανιχνεύεται με ένα μονοκλωνικό αντιορό από ποντικό, τον κλώνο MHO4.**

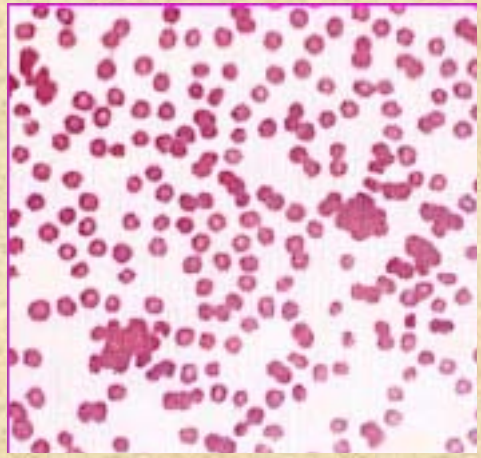
Επίλυση

Αν χρησιμοποιηθεί άλλος μονοκλωνικός, το τροποποιημένο Α δεν ανιχνεύεται

Πιθανές αιτίες ασυμφωνίας (ΙΙΙ)

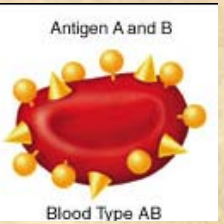
Διπλός πληθυσμός ερυθρών

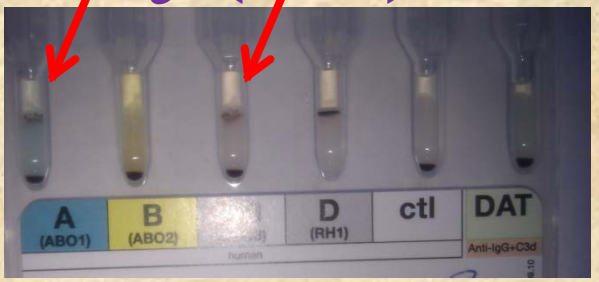


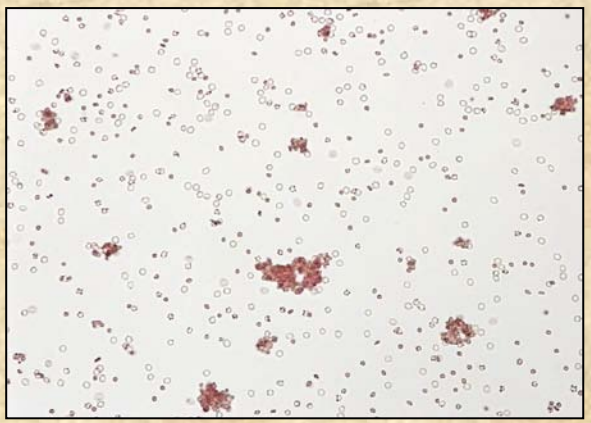


Πιθανές αιτίες ασυμφωνίας (ΙΙΙ)

Διπλός πληθυσμός ερυθρών

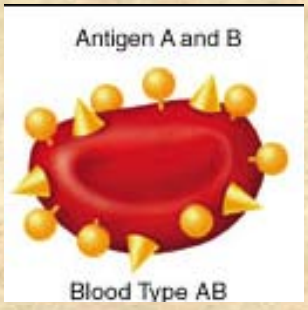






- **Μετάγγιση με άλλη ομάδα πχ Ο**
- **Ενδομήτρια μετάγγιση με Ο Rh (-)**
- **Χίμαιρα λόγω μεταμόσχευσης Μυελού**
- **Νεογνά με πρόσμειξη αίματος της μητέρας**
- **Υποομάδες αίματος (κυρίως Α3)**

Διπλός πληθυσμός ερυθρών



Επίλυση

- **Ιστορικό: Διευκρίνιση της αιτίας**
- **Επί υποψίας υποομάδας, ειδικές εξετάσεις (όπως στην ασθενή έκφραση αντιγόνων, αναφέρθηκε ήδη)**
- **Μοριακός έλεγχος**

Πιθανές αιτίες ασυμφωνίας (IV)

Ελαττωμένα anti-A και anti-B στον ορό

(Συχνότερη αιτία ασυμφωνίας)

Anti-A	Anti-B	A_1 cells	B cells
4+	0	0	0
Group A		Group AB	

Ελαττωμένα anti-A και anti-B στον ορό

- Νεογνά(δεν παράγουν)
- Ηλικιωμένοι (χαμηλή παραγωγή αντισωμάτων)
- Υπογαμμασφαιριναιμία
- Ανοσοκατασταλή (Συγγενής ή επίκτητη λόγω νοσήματος ή φαρμάκων)
- Μεταμοσχευμένοι
- Υποομάδα Α ή Β

Ελαττωμένα anti-A και anti-B στον ορό

Επίλυση

- Ιστορικό ηλικίας, νοσημάτων κλπ
- Επώαση για 15-30 λεπτά
- Επώαση σε χαμηλές Θερμοκρασίες 4ο C

Πιθανές αιτίες ασυμφωνίας(V)

Αυξημένη αντίδραση Ορού

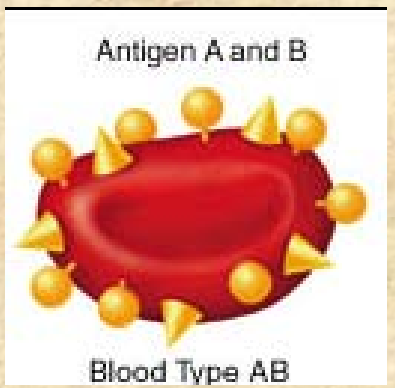
Αυξημένη αντίδραση Ορού

- **Αντι-Α1(σε υποομάδα Α2 και Α2Β)**
- **Αντι-Η (Σε ομάδα Bombay, αντιδρά και με τα Ο ερυθρά)**
- **Ψυχρό αλλοαντίσωμα πχ αντι-Μ, αντι-Ρ, κλπ**
- **Μετάγγιση με προϊόντα πλάσματος ή PLT άλλης ομάδας**

Αυξημένη αντίδραση
Ορού
Επίλυση

- Ελέγχουμε τα ερυθρά με αντι-Α1 λεκτίνη και αντι-Η για υποομάδα Α2 και bombay,
- Ελέγχουμε τον ορό του ασθενούς με Α1, Α2 και Ο ερυθρά
- Έμμεση Coombs για έλεγχο αλλοαντισωμάτων

Πιθανές αιτίες ασυμφωνίας(VI)
Αυξημένη Συγκολλητικότητα



ερυθρών και ορού

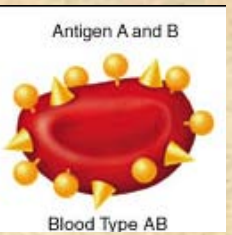
με Autocontrol(+)

Anti-A	Anti-B	A_1 cells	B cells	O cells	Auto
4+	4+	2+	2+	2+	2+

Group AB

?

- *Cold autoantibody in group AB individual*
- *Rouleaux*



Αυξημένη Συγκολλητικότητα ερυθρών και ορού με Autocontrol(+)

Ευρήματα: DAT(+), Έμμεση (+), Αυτοκοντρόλ(+)
Ευθεία ομάδα: AB, Rh(+), **Ανάστροφη: O**

- **ΑΑΑ (Ψυχρό ή θερμό αυτοαντίσωμα)**
- **Υπερσφαιριναιμία-Rouleaux(Μυέλωμα ή Waldestrom)**
- **Αυξημένες πρωτεΐνες ορού, (ενδοφλέβια χορήγηση στον ασθενή μακρομορίων πχ HES, Dextrane κλπ)**
- **Δείγματα από ομφάλιο λώρο που περιέχουν την ουσία Wharton's gelly)**

Εντοπίζουμε την αιτία

- **Άμεση Coombs**
- **Έμμεση Cooombs**
- **Autocontrol**
- **Πλένουμε τα ερυθρά (στο ομφάλειο δείγμα τουλάχιστον 6 φορές)**
- **Μονοκλωνικοί αντιοροί αντί των πολυκλωνικών**
- **Άλλη τεχνική(σωληνάριο)**
- **Νέο δείγμα (Ομφάλειο δείγμα, ζητάμε από φλέβα)**

ΑΑΑ με Θερμό ΑυτοAb

Επίλυση

- Πλύσιμο ερυθρών μπορεί να βοηθήσει
- Χρήση τεχνικής σωληναρίων
- Μονοκλωνικοί αντιοροί
- Εάν οι συγκολλήσεις επιμένουν, χρησιμοποιούμε ένζυμα για να αφαιρέσουμε αυτοαντισώματα [Προσθήκη σουλφυδρυλικών παραγόντων όπως 2-mercaptoethanol(2-ME) ή dithiothreitol(DTT), Glycine-HCL/EDTA]
- Επανεξετάζουμε το δείγμα μετά την επεξεργασία

ΑΑΑ από Ψυχρό αυτοAb

Επίλυση (Ι)

Ψυχρά αυτοαντισώματα προκαλούν αυτόματη συγκόληση και επομένως ψευδώς θετικά αποτελέσματα

- **Θερμαίνουμε το δείγμα στους 37^{o} C** αμέσως μετά τη λήψη του
- **Πλένουμε** τα ερυθρά με φυσιολογικό ορό θερμασμένο στους 37-45^{o}C.
- **Παράλληλα control test**:

Ερυθρά

+

Φυσιολογικός Ορός με 6% αλβουμίνη

- Εάν δεν υπάρχει αυτοσυγκόλληση στο control, το αποτέλεσμα για Α και Β είναι αξιόπιστο ενώ αν η αυτοσυγκόλληση παραμένει, χρειάζεται επιπλέον επεξεργασία.
- Πάντως μπορεί να γίνει εκτίμηση του αποτελέσματος συγκρίνοντας και την ένταση της συγκόλλησης μεταξύ των αντιορών και του control.

ΑΑΑ από Ψυχρό αυτοAb

Επίλυση (ΙΙ)

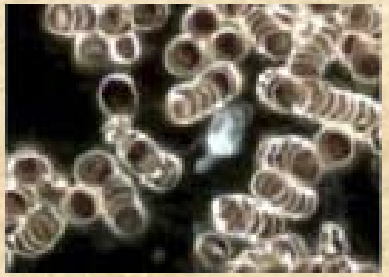
Θέρμανση

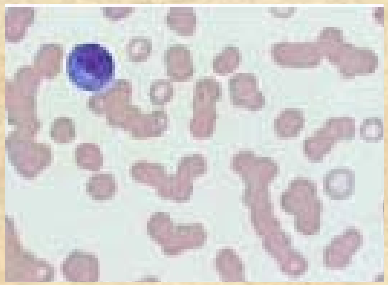
- **Θερμαίνουμε και τον ορό και τα γνωστά ερυθρά στους 37ο για να αποφύγουμε τη δράση των ψυχρών αυτοαντισωμάτων**
- Υπάρχει όμως σε κάποιους ασθενείς η πιθανότητα τα αντι-Α και Αντι-Β να μη δρούν στους 37, οπότε τότε θα έχουμε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα

Προσρόφηση

- **Επώαση φυσιολογικών πλυμμένων ερυθρών με ίση ποσότητα ορού ασθενούς Χ30-60min στους 4ο C και έλεγχος της ανάστροφης με τον προσροφημένο ορό)**
- Προσρόφηση σε στρώμα κονίκλειων ερυθροκυττάρων δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για ανάστροφη διότι τα ερυθρά του κονίκλου περιέχουν ένα αντιγόνο B-like που προσροφά τα anti-B οπότε πάλι θα έχουμε ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα για το αντι-Β

Υπερσφαιριναιμία, Rouleaux, Ομφάλειο δείγμα, IV χορήγηση μακρομορίων





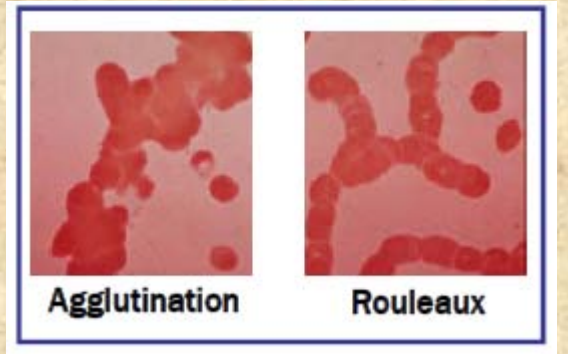
Επίλυση

Απομάκρυνση πρωτεϊνών

- Πλύσιμο ερυθρών και επανάληψη του τεστ

Αντικατάσταση του ορού με φυσιολογικό ορό στην ανάστροφη

- Ορός ασθενή+ ερυθρά γνωστά
- Επωάζουμε, φυγοκεντρούμε, εκτιμούμε
- Απομακρύνουμε τον υπερκείμενο ορό
- Προσθέτουμε φυσιολογικό ορό
- Ανάδευση, φυγοκέντρηση, επανεξέταση
- **Οι πραγματικές συγκολλήσεις θα παραμείνουν ενώ αν οφείλονται σε υπερσφαιριναιμία θα διαλυθούν.**



Επίλυση ασυμφωνίας ομάδας ABO (Συνοπτικά Ι)

- Επανάληψη της εξέτασης με την ίδια τεχνική
- Επανάληψη με άλλη τεχνική, πχ σωληνάρια ή κάρτα
- Χρήση άλλου αντιορού(πχ μονοκλωνικού σε περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικός ή ανθρώπειος)
- Χρήση control σε όλες τις διαδικασίες για να διαπιστώσουμε το ψευδώς θετικό ή αρνητικό
- Λήψη ιστορικού
- Επανάληψη με νέο δείγμα
- Πλύσιμο ερυθρών

Επίλυση ασυμφωνίας ομάδας ABO (Συνοπτικά ΙΙ)

- Επώαση της ασθενούς αντίδρασης για περισσότερο χρόνο σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (των ερυθρών με τον αντιορό ή του ορού με τα γνωστά ερυθρά)
- Έλεγχος της ανάστροφης και με Ο ερυθρά
- Έλεγχος των ερυθρών με αντι-Α1 και αντι-Η
- Έμμεση Coombs με πάνελ ερυθρών για ανίχνευση αλλοαντισωμάτων
- Άμεση Coombs ερυθρών

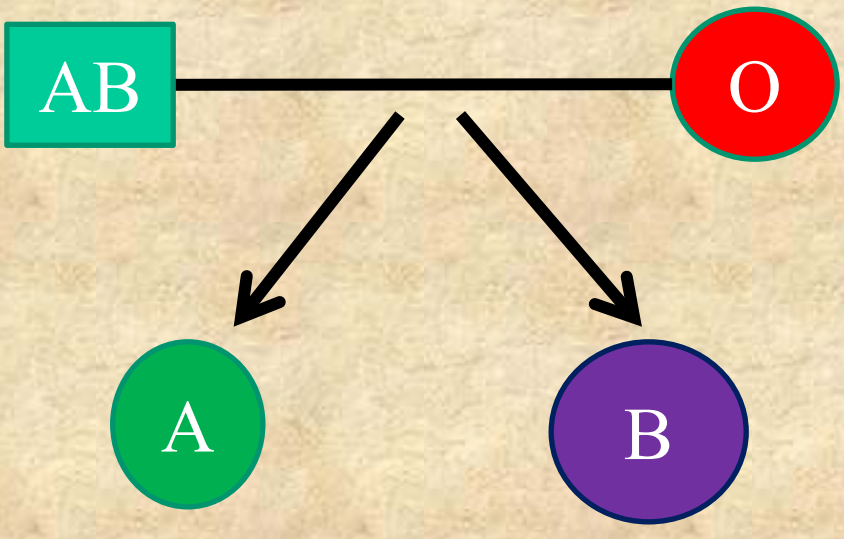
Παραδείγματα
με δυσκολίες τυποποίησης

Περιστατικό 1

Νεογνό ομάδας ΑΒ(+) με ασθενή έκφραση στο Β

- **Μητέρα: Ο(-)**

- **Πατέρας: ΑΒ(+)**

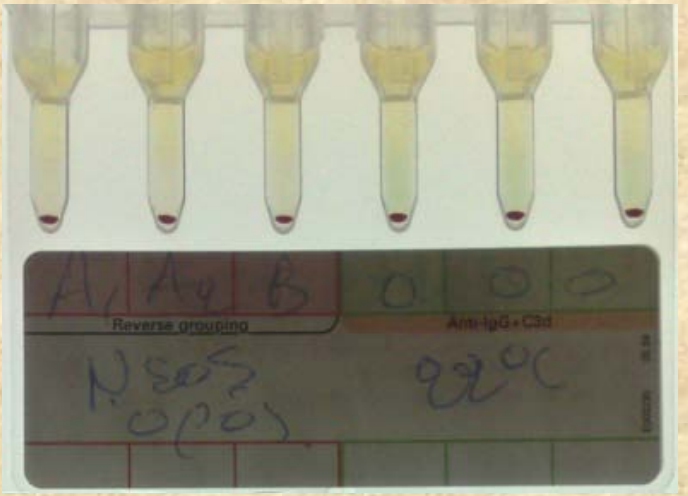


Μετά τη διαπίστωση ομάδας ΑΒ(+) με ασθενή έκφραση στο Β, το ερώτημα ήταν από πού προέρχεται το Β αντιγόνο?
πρώτη σκέψη ήταν ότι το παιδί αυτό δεν μπορεί να είναι της συγκεκριμένης μητέρας,
εκτός και αν

- **επρόκειτο για ασθενή υποομάδα Β στη μητέρα ή για**
- **μεταβίβαση του γονιδίου ΑΒ σε cis μορφή από τον πατέρα.**

Εξετάσθηκαν και οι δύο περιπτώσεις.

Ανάστροφη ομάδα Γονέων



Μητέρα, συγκολλά και Α και Β(-). Ο έλεγχος έγινε και με Rh (-) ερυθρά λόγω ύπαρξης anti-D στον ορό της μητέρας

Πατέρας δεν συγκολλά τα Β, άρα δεν είναι cis μορφή για να μπορεί να κληρονομηθεί ως ΑΒ

Συμπέρασμα το γονίδιο του Α κληρονομήθηκε από τον πατέρα ενώ του ασθενούς Β κληρονομήθηκε από τη μητέρα που όμως από την ευθεία και την ανάστροφη δείχνει Ο

Υποψία υποομάδας (Τεχνική)

- Πλύσιμο ερυθρών Χ 3
- Επώαση ερυθρών με αντιορό (πχ αντι-Β, όταν υποψιαζόμαστε υποομάδα Β)
- Πλύσιμο ερυθρών Χ 8
- Έλεγχος υπερκείμενου για περίσσεια αντιορού
- Έκλουση του αντι-Β πχ που προσροφήθηκε εάν υπήρχαν ασθενή Β αντιγόνα

Έλεγχος ασθενούς υποομάδας Β

Στη μητέρα λόγω της υποψίας του ασθενούς Β αντιγόνου, έγινε διαδικασία προσρόφησης αντι-Β και στη συνέχεια έκλουση.

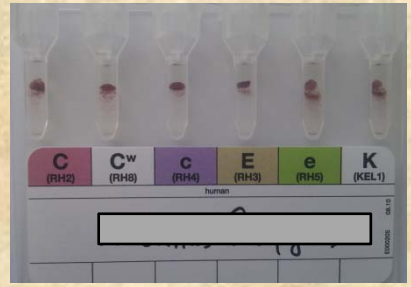
Αποδείχθηκε η παρουσία Β αντιγόνου λόγω της έκλουσης anti-Β μετά την προσρόφηση.

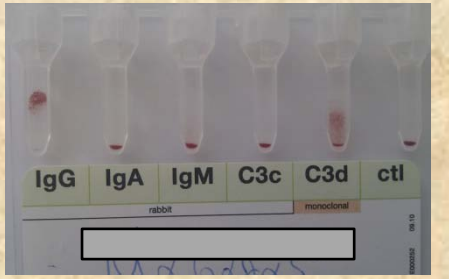
Υποομάδα Bel σε μητέρα ανακαλύφθηκε μετά τη γέννηση παιδιού

Περιστατικό2

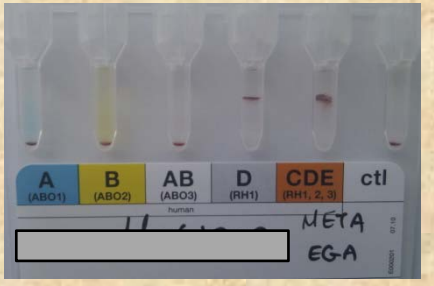
Ταυτοποίηση ομάδας σε ΑΑΑ

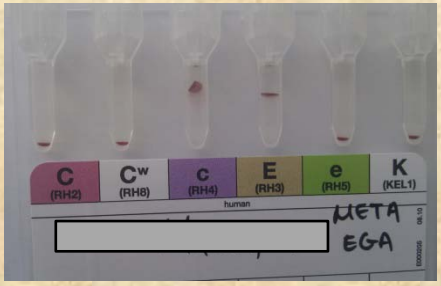
Όταν όλα είναι θετικά…….

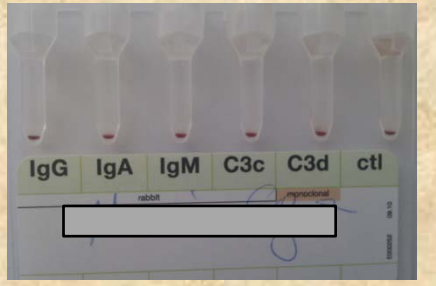




…η χρήση ενζύμων μας δίνει τη λύση







Περιστατικό 3

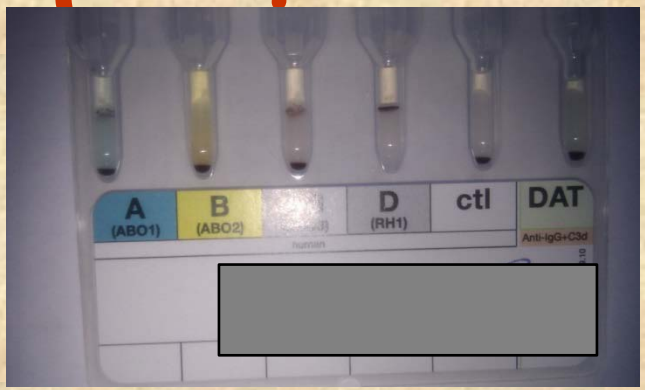
Νεογνό με διπλό πληθυσμό

Δείγμα ομφαλίου λώρου

Διπλός Πληθυσμός

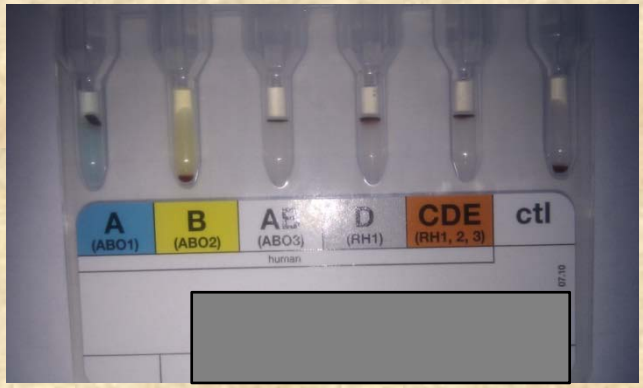
Κυριαρχεί η ομάδα Ο

Έλεγχος ομάδας μητέρας: Α



Συμπέρασμα:

Τα λίγα Α ερυθρά προέρχονται από τη μητέρα.



Περιστατικό 4

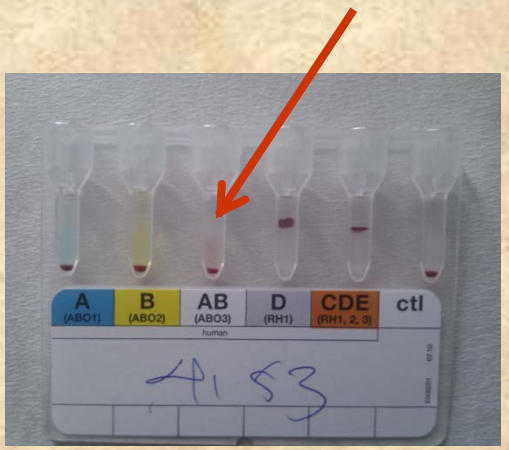
Υποομάδα Α σε αιμοδότη Ι

- Η ευθεία ομάδα ενός αιμοδότη έγινε σε αυτόματο αναλυτή και χαρακτηρίστηκε ως O(+)
- Η ανάστροφη έγινε σε πλάκα, σωληνάριο και κάρτα και έδειχνε Β
- Έλλειπε δηλαδή το αντι-Α

Ευθεία:Ο

Ανάστροφη:Β

- Έγινε έλεγχος ξανά σε κάρτα στο χέρι και παρατηρήσαμε κάποιες συγκολλήσεις στον αντι-ΑΒ, που διέφυγαν από τον αναλυτή
- Ένδειξη ότι υπάρχει ασθενές Α ή Β αντιγόνο



Υποομάδα Α σε αιμοδότη(ΙΙ)

- Εφόσον υπάρχει μόνο αντι-Β, και δεν υπάρχει αντι-Α, προφανώς το ασθενές που δεν φαίνεται είναι το Α
- Έγινε επώαση των ερυθρών με αντι-Α σε σωληνάριο για 30 λεπτά στο ψυγείο
- Μετά τη φυγοκέντρηση και την επαναιώρηση, διαπιστώθηκαν συγκολλήσεις
- Παράλληλα ελέγχθηκε η παρουσία του Η αντιγόνου, η οποία ήταν ασθενέστερη από μια Ο ομάδα

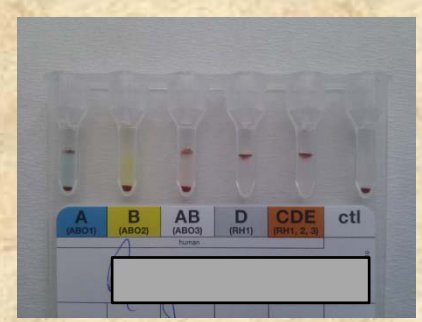
Μετά επώαση 30min στους 4° C

Περιστατικό 5

Ασθενής με Διπλό πληθυσμό Α και Ο

Ιστορικό:

- **Μεταμόσχευση Μυελού από Δότη Α(+)**
- **Η ομάδα της ασθενούς πριν τη μεταμόσχευση: Ο(+)**



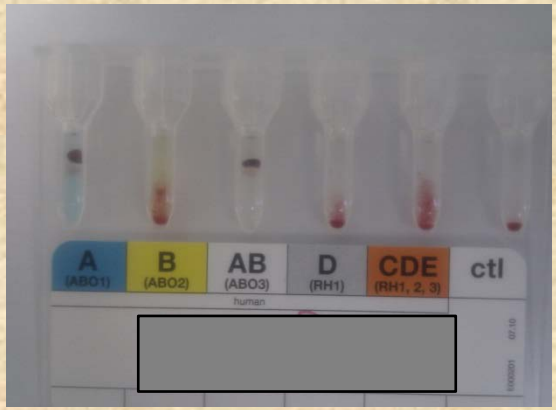
Επεξήγηση

- **Το αντι-Β της ανάστροφης παράγεται από τα λεμφοκύτταρα του Δότη**
- **Τα Α ερυθρά είναι του Δότη**
- **Επικρατούν όμως τα Ο, λόγω μεταγγίσεων με Ο ερυθρά λόγω της χίμαιρας**

Περιστατικό 6

Γνωστός αιμοδότης ομάδας Α σε νέα αιμοληψία, χαρακτηριζόταν ως ΑΒ με ασθενή έκφραση στο Β

Ευθεία: **ΑΒ**



Ανάστροφη: **Α**

Ασυμφωνία: Επιπλέον αντιγόνο Β

Ιστορικό: Προηγηθείσα γαστρεντερίτιδα

Συμπέρασμα: Επίκτητο Β

Πρακτική εξάσκηση

Προβλήματα

Περίπτωση 1

Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
3+	0	0	1+

Πρόβλημα: Ασθενής αντίδραση στην ανάστροφη

Αιτία: Σχετίζεται με ηλικία

Επίλυση: Επωάζουμε για 15-30λεπτά και ξαναφυγοκεντρούμε

Περίπτωση 2

Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
3+	1+	0	4+

Πρόβλημα: 1+ συγκόλληση με anti-B. Μάλλον έξτρα αντιγόνο B

Αιτία: Επίκτητο B antigen

Επίλυση: Ιστορικό για νοσήματα παχέος εντέρου

Περίπτωση 3

Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
2+	0	1+	4+

Πρόβλημα: Ασθενές Α 2+ και αντίδραση με Α1 ερυθρά

Αιτία: Πιθανόν υποομάδα Α2

Επίλυση: Ελέγχος με

- ερυθρών με Α1 λεκτίνη και
- ορού με Α2 ερυθρά

Περίπτωση 4

Anti-A	Anti-B	Anti-AB	A1 Cells	B Cells
0	0	1+	0	3+

Πρόβλημα: Μάλλον Α Υποομάδα (όπως φαίνεται από την ανάστροφη)

Αιτία: Α υποομάδα Προφανώς Α (Ax) επειδή αντιδρά με αντι-ΑΒ

Επίλυση: Έλεγχος για υποομάδα(αυξημένη επώαση, μονοκλωνικοί αντιοροί.

Εάν δεν αντιδρούσε με αντι-ΑΒ, τότε μόνο η προσρόφηση/έκλουση μπορεί να αποδείξει την υποομάδα Α

Περίπτωση 5

Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
0	2+mf	3+	0

Πρόβλημα: Ασθενές Β ή Β μεταγγισμένος με Ο ή μεταμόσχευση

Αιτία: Ιστορικό απαραίτητο

Επίλυση: Ανεύρεση ομάδας προ μετάγγισης

Περίπτωση 6

Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
4+	4+	0	1+

Πρόβλημα: Ευθεία:ΑΒ Ανάστροφη: μη αναμενόμενη αντίδραση στα Β.

Αιτία: Πιθανόν ψυχρό αυτό (I or IH)ή αλλοαντίσωμα(P, M, N, Lewis)

Επίλυση: Πάνελ ερυθρών και χρήση αυτοκοντρολ

	Screening Cells	Autocontrol (AC)	Συμπέρασμα
Περίπτωση 1	Pos	Neg	Cold alloantibody
Περίπτωση 2	Pos	Pos	Cold autoantibody

Περίπτωση 7

Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
0	0	0	0

Πρόβλημα: Προφανώς Ο χωρίς ισοσυγκολλητίνες

Αιτία: Νεογνό ή ηλικιωμένος ή ανοσοκατασταλμένος

Επίλυση: Ιστορικό, αυξημένη επώαση ανάστροφης

Ευχαριστώ για την
προσοχή σας

Καλό Καλοκαίρι
Σε ελεύθερες παραλίες