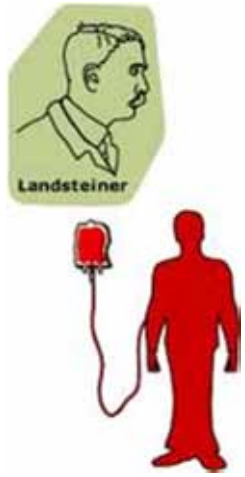
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΟΣΟΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΜΕ Ή ΧΩΡΙΣ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΥ ΟΡΟΥ

ΣΦΥΡΙΔΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΟΣ
ΚΕΝΤΡΟ ΑΙΜΑΤΟΣ ΒΓΝΗ

ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ ΑΝΟΣΟΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ
30 ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΥ 2011
ΑΘΗΝΑ

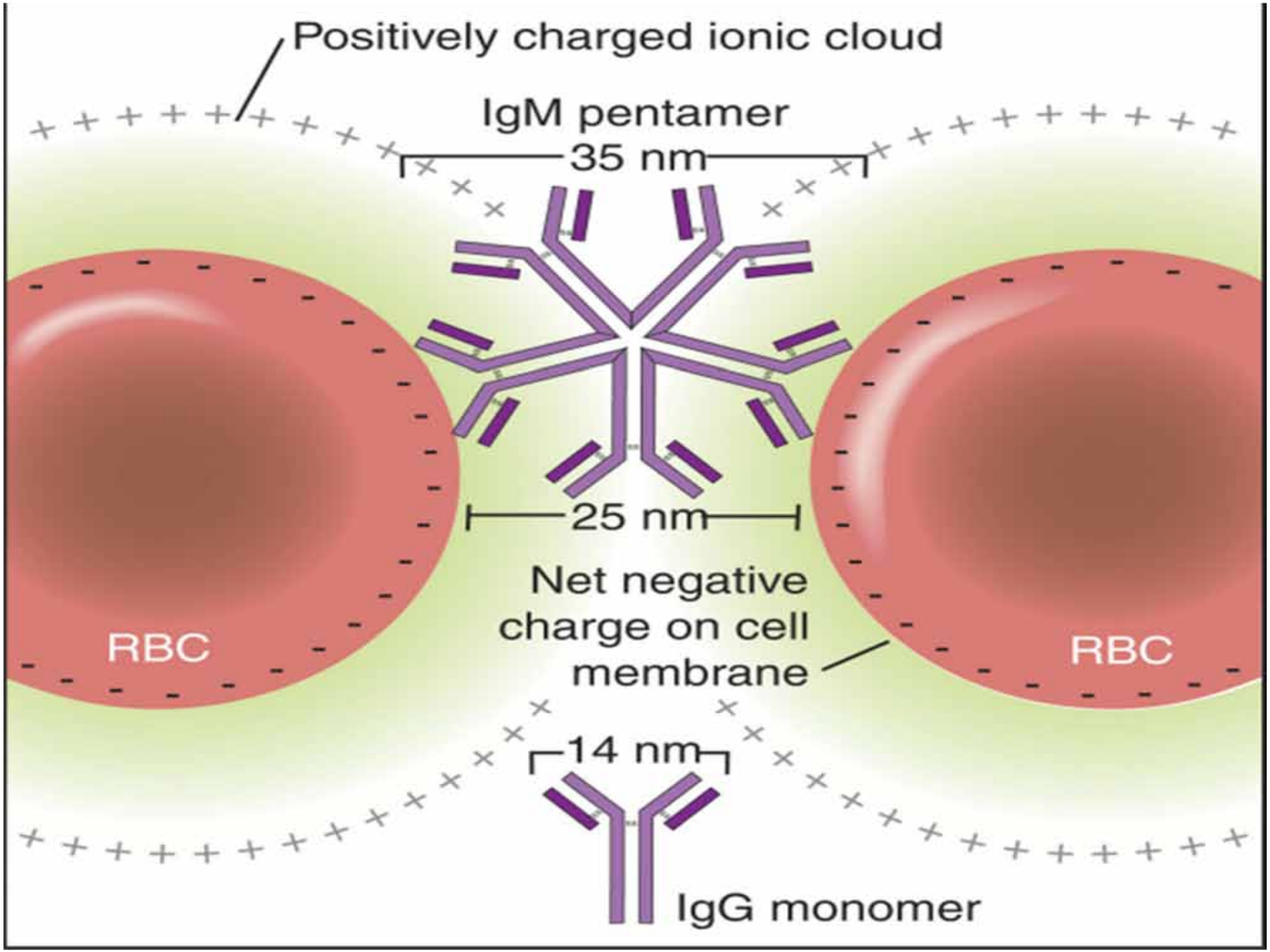
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1900-Ανακάλυψη ΑΒΟ ομάδων αίματος από τον ***Karl Landsteiner***
- Ανίχνευση πλέον των 300 αντιγονικών ομάδων
- Ορολογικές τεχνικές
- Κλασσική μέθοδος η αιμοσυγκόλληση

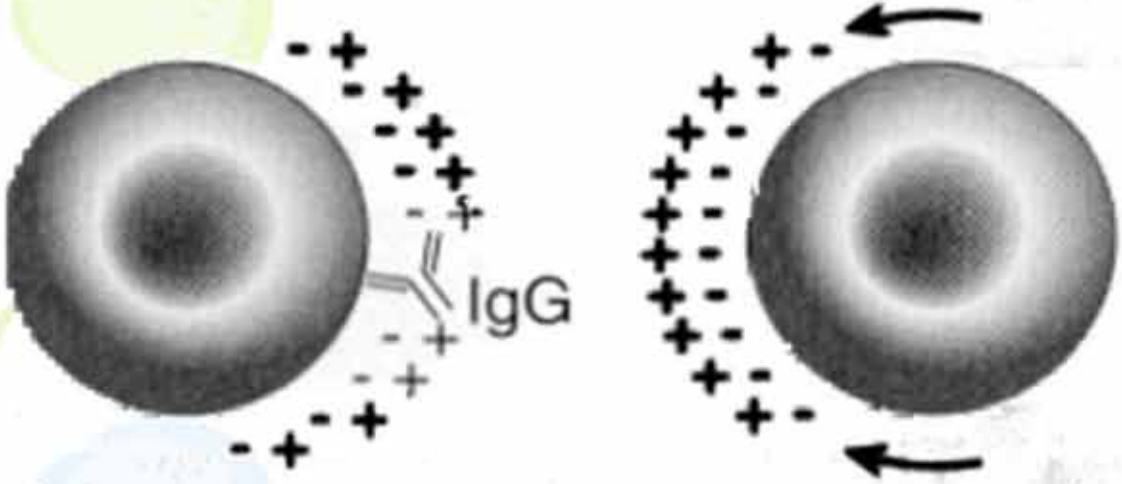


ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ

- Ολοκληρώνεται σε δυο στάδια
- Στάδιο ευαισθητοποίησης ερυθροκυττάρων
- Σχηματισμός συγκόλλησης

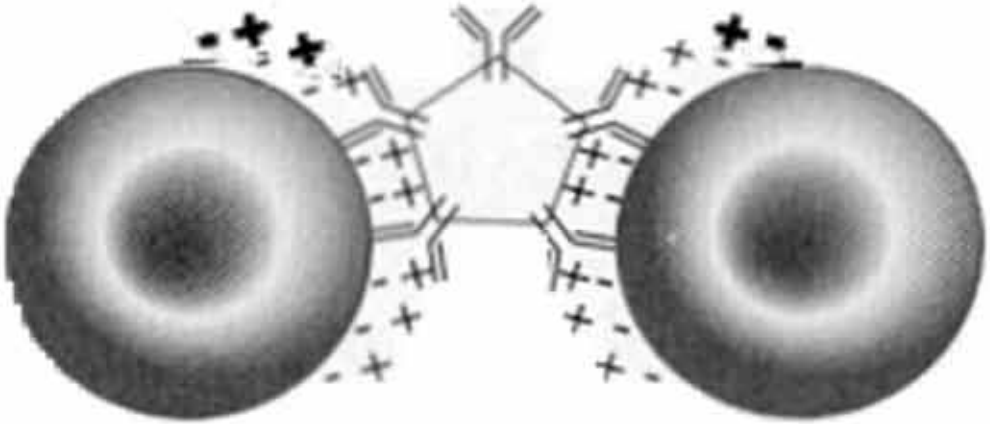

Positively charged ionic cloud
IgM pentamer
35 nm
25 nm
RBC
RBC
Net negative charge on cell membrane
14 nm
IgG monomer

Ionic charges on the surface of red cells keep them separated



Negative charges attract positive charges which in turn repel positive charges from other cells

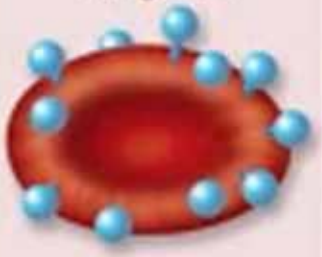
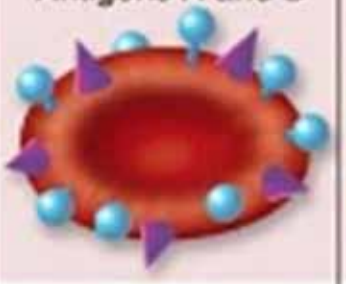
A IgG cannot bridge the space between red cells because it is too small a molecule



B IgM is large enough to bridge the space between red cells

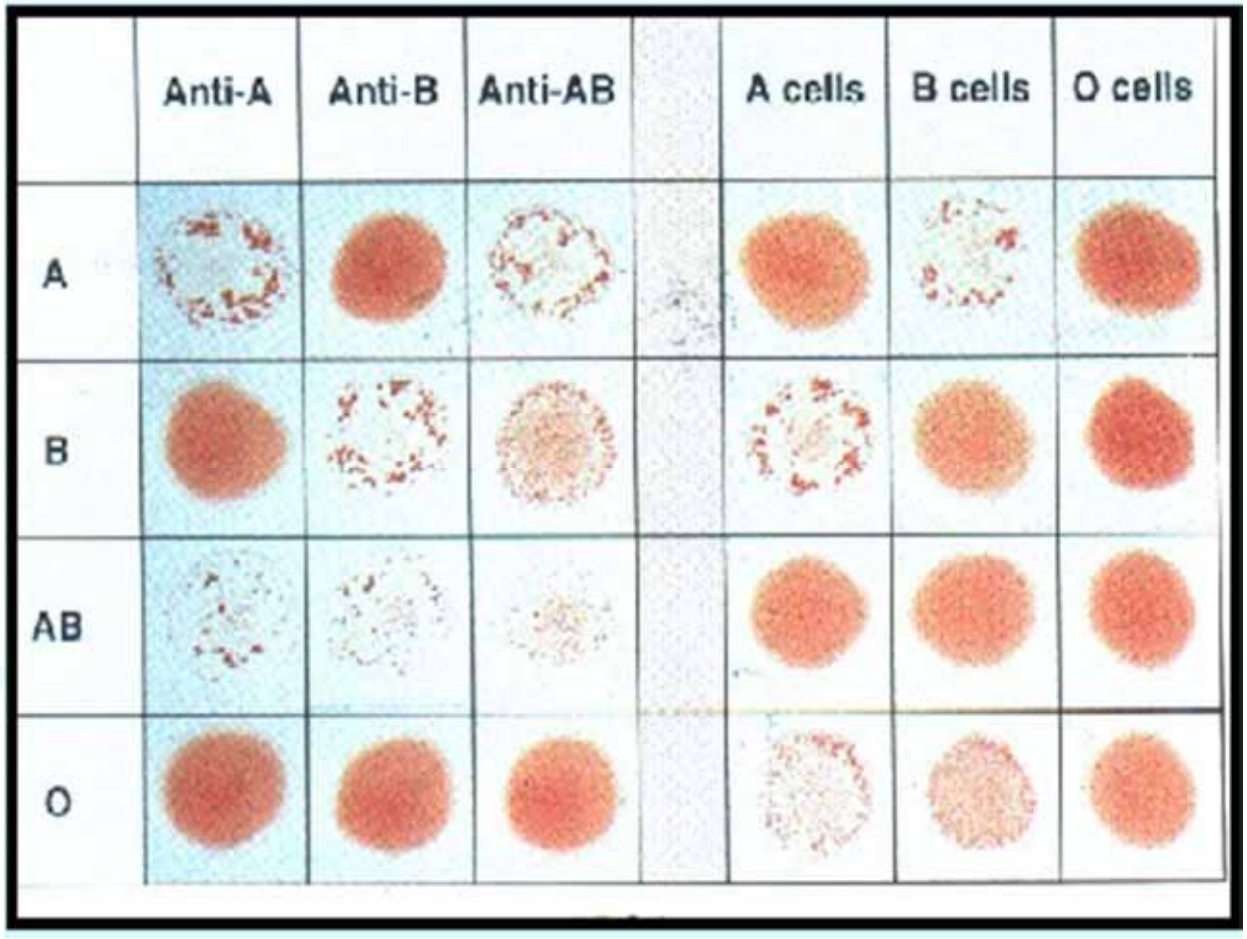
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

ABO Blood Types

	Antigen A	Antigen B	Antigens A and B	Neither antigen A nor B
Erythrocytes				
Plasma	Anti-B antibodies	Anti-A antibodies	Neither anti-A nor anti-B antibodies	Both anti-A and anti-B antibodies
Blood type	**Type A** Erythrocytes with type A surface antigens and plasma with anti-B antibodies	**Type B** Erythrocytes with type B surface antigens and plasma with anti-A antibodies	**Type AB** Erythrocytes with both type A and type B surface antigens, and plasma with neither anti-A nor anti-B antibodies	**Type O** Erythrocytes with neither type A nor type B surface antigens, but plasma with both anti-A and anti-B antibodies

(a)

SLIDE TEST



ΨΕΥΔΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΕΙΣ

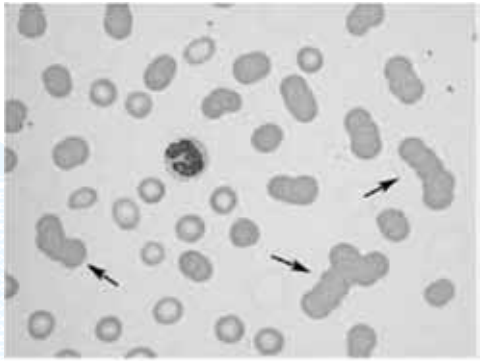
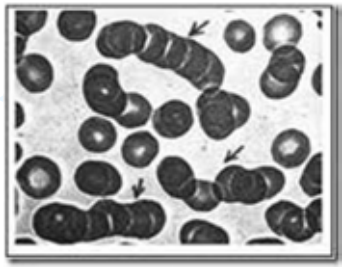
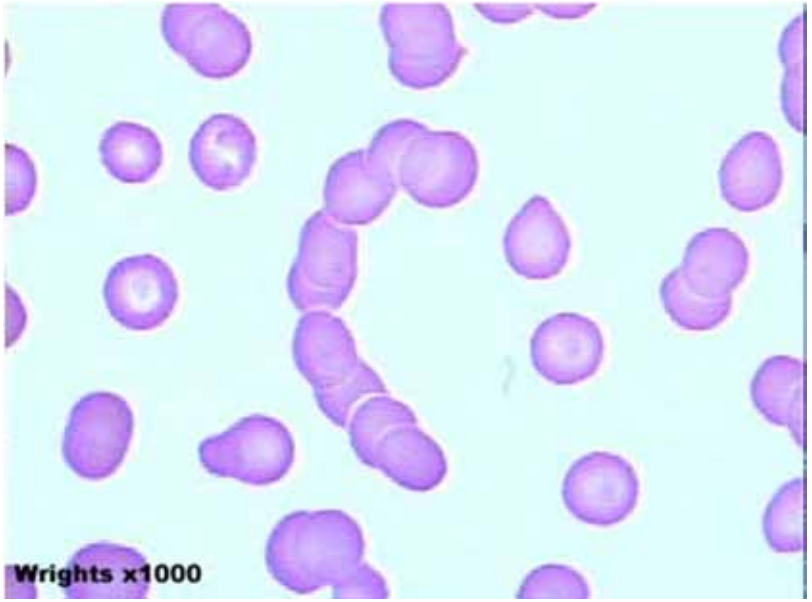


Figure 26.9 Peripheral blood smear shows red blood cells arranged as "stacks of coins" forming rouleaux (arrows). (See Color Fig. 26.9.)





ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ

- Φυγοκέντρηση
- Σχέση αντιγόνου αντισώματος
- Δράση PH
- Θερμοκρασία
- Τύπος ανοσοσφαιρίνης
- Μέσα ενίσχυσης της αντίδρασης

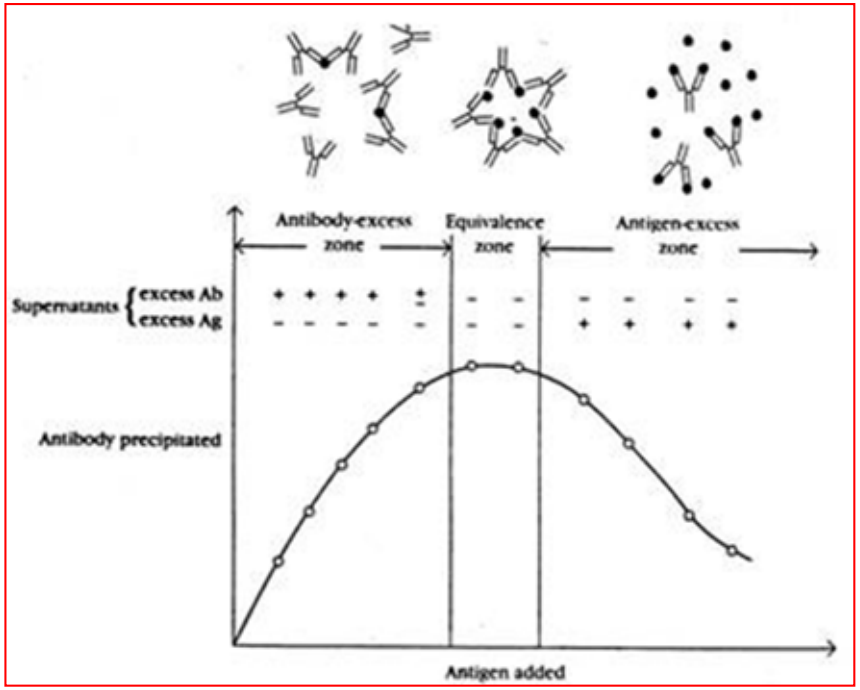
ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

- Αυξάνει την συγκόλληση ελαττώνοντας τον χρόνο και φέρνοντας τα ευαισθητοποιημένα ερυθροκύτταρα πιο κοντά ,μειώνοντας το zeta-potential
- Σημαντική μέθοδος για την αιμοδοσία

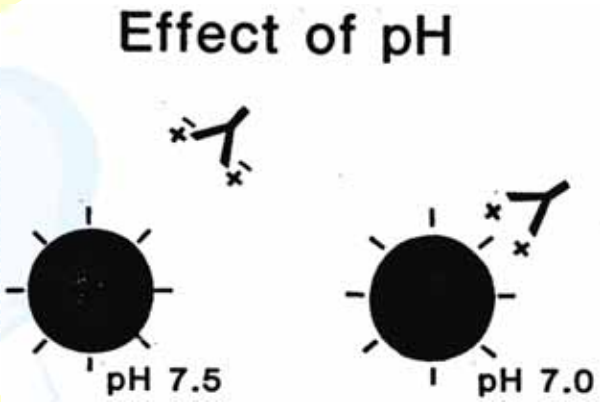
ΣΧΕΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ-ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

- Αν υπάρχει περίσσεια αντισώματος αραιώνεται το πλάσμα ή ο ορός με το κατάλληλο διάλυμα και κάθε αραίωση επανεξετάζεται
- Αν υπάρχει περίσσεια αντιγόνου αυξάνεται η σχέση ορός /κύτταρα και έτσι αυξάνεται η συγκέντρωση του αντισώματος που συνδέεται με τα ερυθρά.

- ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΠΡΟΖΩΝΗΣ



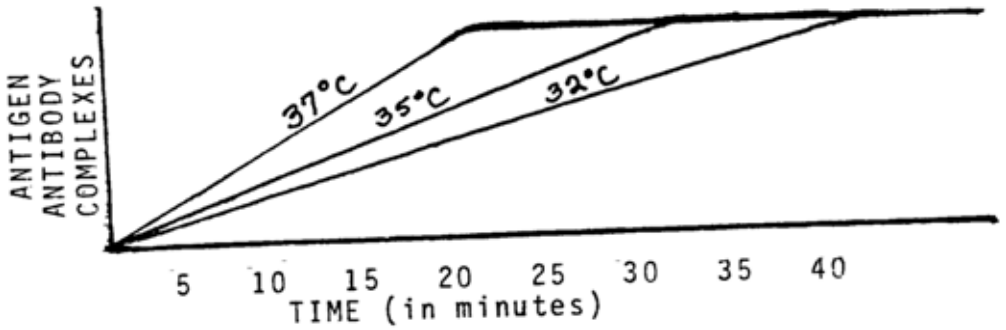
ΕΠΙΔΡΑΣΗ PH



- Το ιδανικό PH για την συγκόλληση των περισσοτέρων αντιγονικών ομάδων είναι 6,5-7,5
- Μεταβάλλοντας το PH σε πλέον όξινο επηρεάζεται η σταθερά ισορροπίας για ορισμένα αντισώματα και γίνεται ευκολότερη η ανίχνευση τους.Π.χ anti-M

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

- Ελαττώνοντας την θερμοκρασία στους 24 ή 4 αυξάνεται η δράση των IGM



ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΩΑΣΗΣ

- Αυξάνοντας τον χρόνο μπορείς να ανιχνεύσεις ασθενώς αντιδρώντα αντισώματα
- Εξαρτάται από το μέσο που πραγματοποιείται η αντίδραση

ΤΥΠΟΣ ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

- Σημαντικά IgM αντισώματα είναι έναντι των ABH, MN,Lewis,Lutheran a και P αντιγονικών συστημάτων
- Σημαντικά IgG αντισώματα είναι έναντι των Ss, Kell, Rh(DCEce), Lutheran b, Duffy και Kidd αντιγονικών συστημάτων

ΧΡΗΣΗ ΕΝΙΣΧΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

- Επηρεάζουν την δράση του ύδατος και των κατιόντων της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης
- Ελαττώνουν το zeta-potential
- Πρωτεολυτικά ένζυμα
- Πολυμερή όπως η αλβουμίνη
- Πολυκατιόντα όπως το polybrene

ΕΝΖΥΜΑ

- Τα πρωτεολυτικά ένζυμα τροποποιούν την ερυθροκυτταρική μεμβράνη αφαιρώντας σιαλικό οξύ ή γλυκοπρωτείνες
- Ελαττώνουν το αρνητικό φορτίο και την απόσταση μεταξύ των ερυθροκυττάρων
- Αυξάνουν την έκφραση των αντιγονικών συστημάτων *Rhesus,Kidd,Lewis,P1,I,ABO*
- Αδρανοποιούν την έκφραση των αντιγονικών συστημάτων *Duffy,MNS,Xga*

ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ

- Σχετικά μικρό διπολικό μόριο
- Ελαττώνει το zeta-potential
- 22% Bovine Serum Albumin
- Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την δοκιμασία αντισφαιρινικού ορού
- Τεχνική τριών φάσεων στην οποία ανιχνεύονται κυρίως αντισώματα έναντι του συστήματος Rhesus

POLYBRENE

- Θετικά φορτισμένο μόριο που επάγει την συγκόλληση των ερυθροκυττάρων αντιδρώντας με την αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη τους (πανσυγκόλληση)
- Τα ατελή αντισώματα αν υπάρχουν έρχονται σε μεγαλύτερη συγγένεια με τα ερυθροκύτταρα και τα συγκολλούν
- Λύση των πανσυγκολλητινών μετά προσθήκη διαλύματος κιτρικού νατρίου οδηγεί στην ανίχνευση πραγματικών συγκολλήσεων αν υπάρχουν.
- Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τον αντισφαιρινικό ορό
- Σημαντικό μειονέκτημα η μη ανίχνευση αντι-Kell αντισωμάτων στον ορό.

POLYETHYLENEGLYCOLE (PEG)

- Υδατοδιαλυτό πολυμερές
- Αφαιρεί νερό από το σύστημα αυξάνοντας την συγκέντρωση των υπαρχόντων αντισωμάτων,και την ευαισθητοποίηση των ερυθροκυττάρων
- Δρά σε συνδυασμό με μονοδύναμο anti-IgG αντισφαιρινικό ορό.
- Τεχνική ενός σταδίου.Δεν απαιτείται φυγοκέντρηση μετά την επώαση στους 37

LISS

- Αυξάνει την πρόσληψη αντισωμάτων και ελαττώνει τον χρόνο επώασης
- Χρησιμοποιείται σε τεχνικές στήλης, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε δοκιμασία σωληναρίου

ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΩΛΗΝΑΡΙΟΥ-TEST TUBE

- Παραμένει ακόμα δημοφιλής μέθοδος
- Χρησιμοποιεί απλό εργαστηριακό εξοπλισμό
- Σχετικά φθηνή μέθοδος
- Μη σταθερότητα αντιδράσεως
- Υποκειμενική διαβάθμιση της έντασης της αντίδρασης
- Απαιτείται επαρκές πλύσιμο
- Διαρκής ενασχόληση του προσωπικού

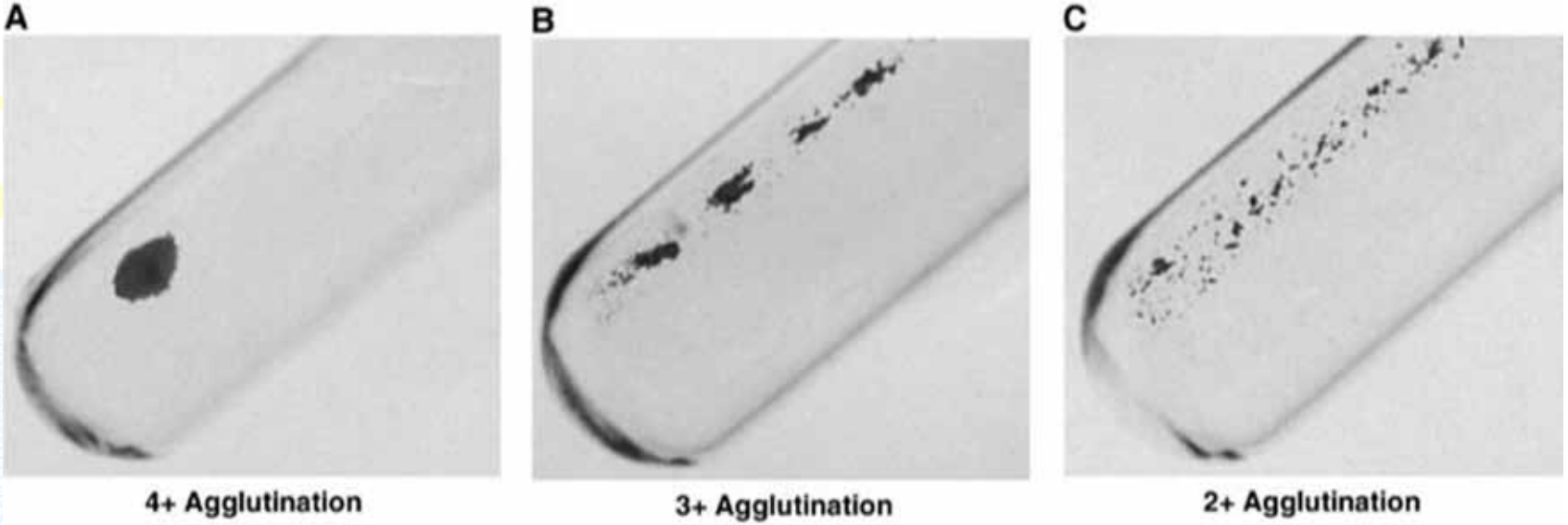
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ-1

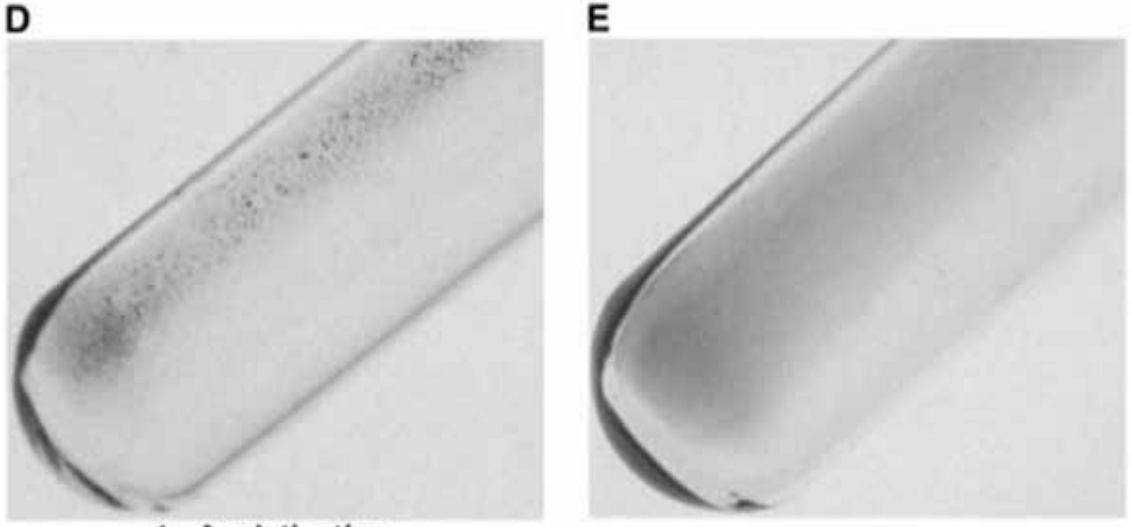
ΒΑΘΜΟΣ	ΕΜΦΑΝΙΣΗ	SCORE
Η	Παρουσία αιμόλυσης	10
4+	Μια μεγάλη συσσώρευση	10
3+	Αρκετές μεσαίου και μεγάλου μεγέθους συσσωρεύσεις	8
2+	Αρκετές μικρού και μεσαίου μεγέθους συσσωρεύσεις	5
1+	Αρκετές μικρές συσσωρρεύσεις με καθαρό υπόστρωμα	3

ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗΣ-2

+ ή w	Μερικές μικρές συσσωρεύσεις με αρκετά μη συγκολλημένα κύτταρα	2
+/- m ή m+	Συγκολλήσεις ορατές μόνον με το μικροσκόπιο	1
0	Απουσία συγκολλήσεων	0
Mf	Mixed-field	NA
R	rouleaux	NA

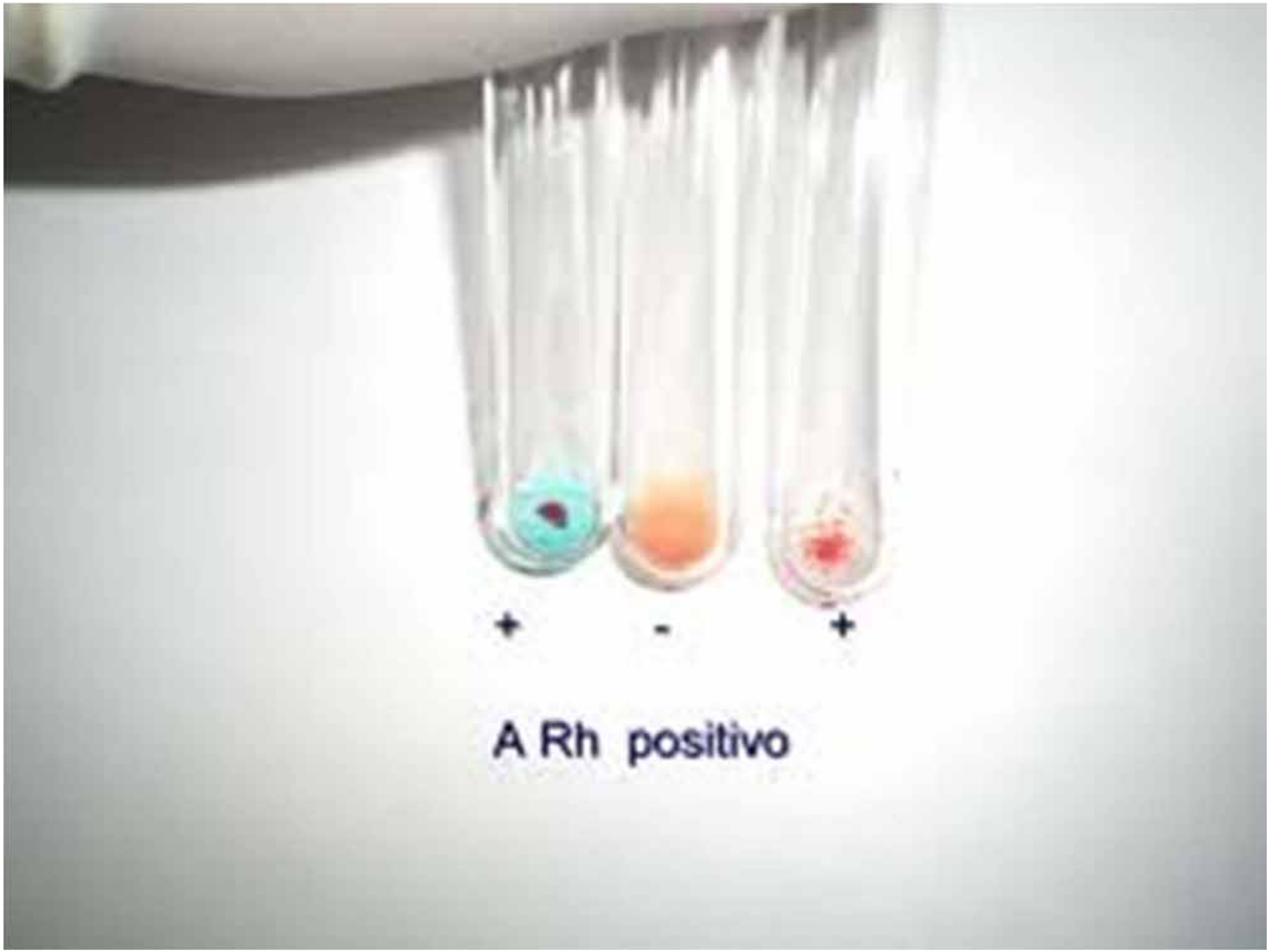
Grading System for Reactions

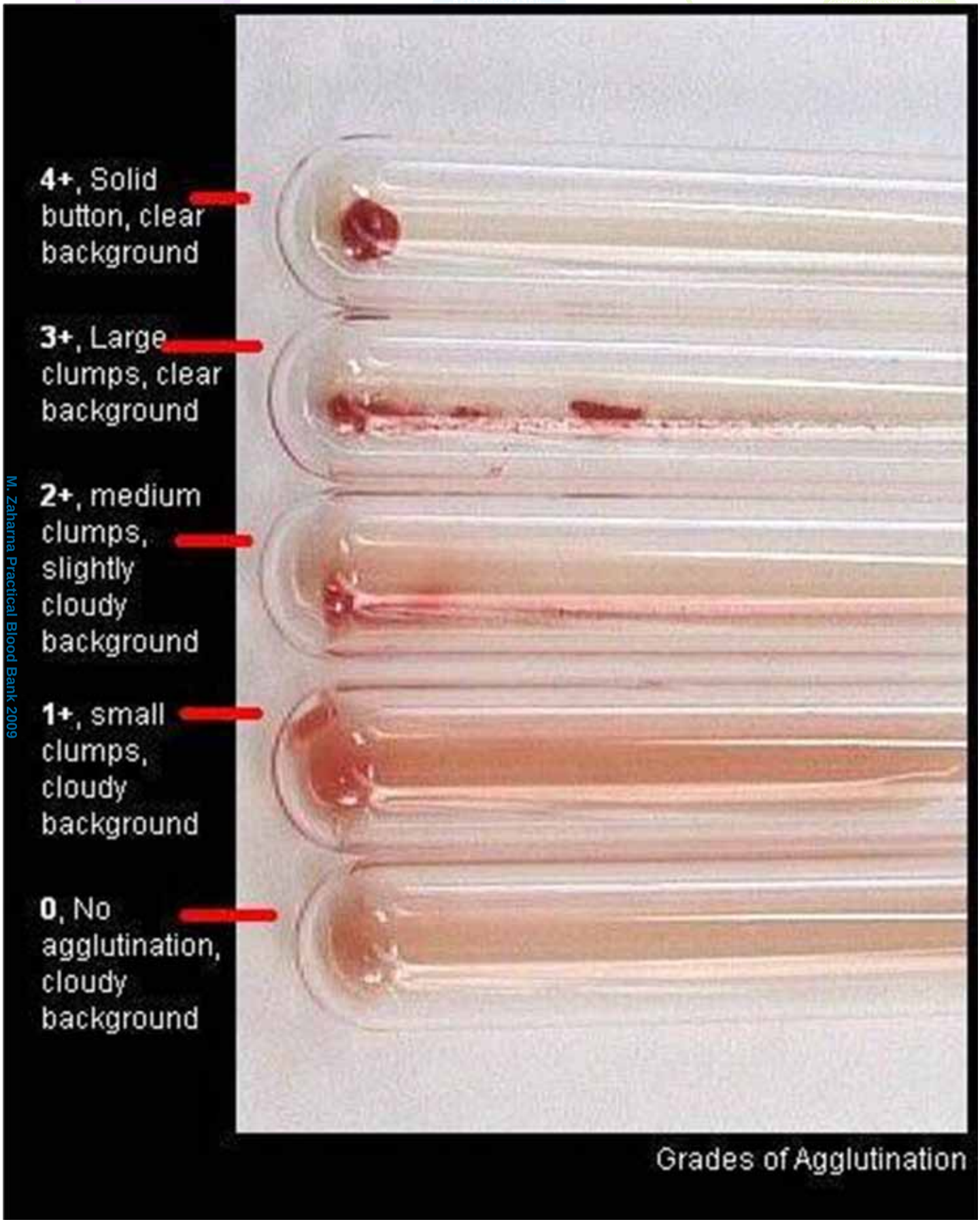




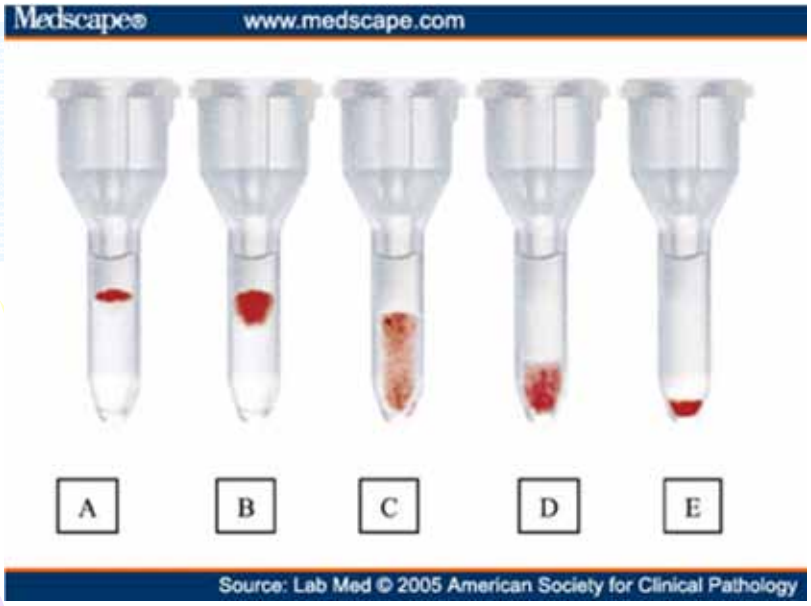
M. Zaharna Practical Blood Bank 2009

(Courtesy Organon Teknika, Inc.)


+
-
+
A Rh positivo


4+, Solid button, clear background
3+, Large clumps, clear background
2+, medium clumps, slightly cloudy background
1+, small clumps, cloudy background
0, No agglutination, cloudy background
M. Zaharna Practical Blood Bank 2009
Grades of Agglutination

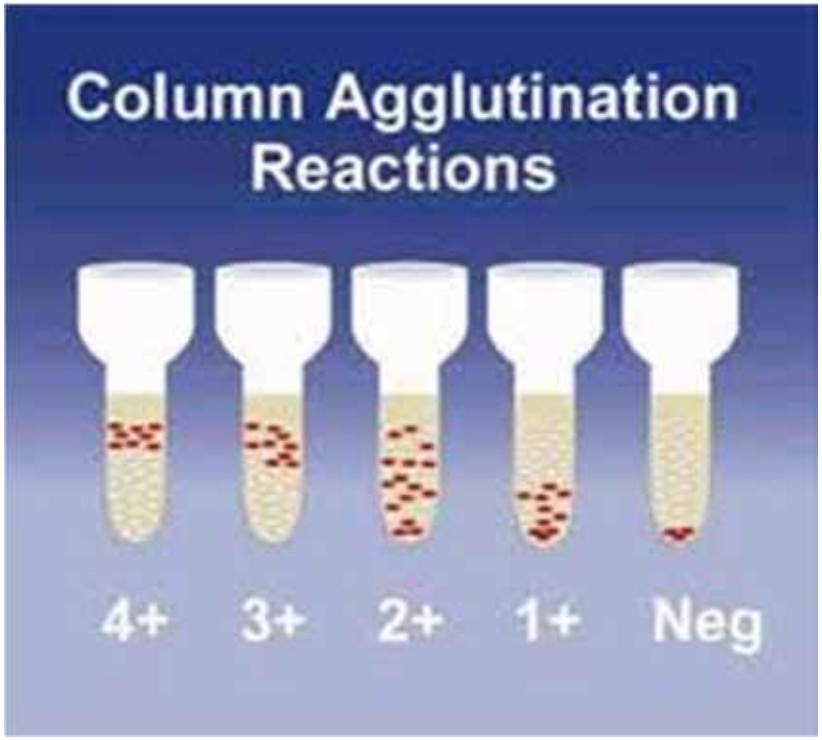
COLUMN TECHNIQUE



- Σε κάθε στήλη υπάρχει γέλη ή μικροσφαιρίδια
- Στην κορυφή της στήλης τοποθετούνται ο ορός και τα ερυθροκύτταρα
- Επώαση
- Φυγοκέντρηση

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΣΤΗΛΗΣ

- Δεν απαιτείται πλύσιμο
- Η συγκόλληση παραμένει σταθερή για αρκετό χρονικό διάστημα
- Αυτοματοποιείται



AFFINITY COLUMN TEST-AFCT

- Άμεση σύνδεση των ευαισθητοποιημένων ερυθροκυττάρων με την υπάρχουσα γέλη
- Τεχνική στερεάς φάσεως
- Πρωτείνη G,anti-IgM,C3d

ENZYME- LINKED ANTIGLOBULIN TEST

- Εναιώρημα ερυθροκυττάρων προστίθεται σε μικροπλάκα
- Πλύσιμο με ορό
- Προσθήκη αντισφαιρινικού ορού σημασμένου με ένζυμο
- Σύνδεση με ευαισθητοποιημένα ερυθροκύτταρα
- Αφαίρεση περίσσειας αντισώματος
- Προσθήκη ενζυμικού υποστρώματος
- Μέτρηση χρώματος φωτομετρικά στα 405 nm
- Προσδιορισμός των IgG μορίων ανα ερυθροκύτταρο

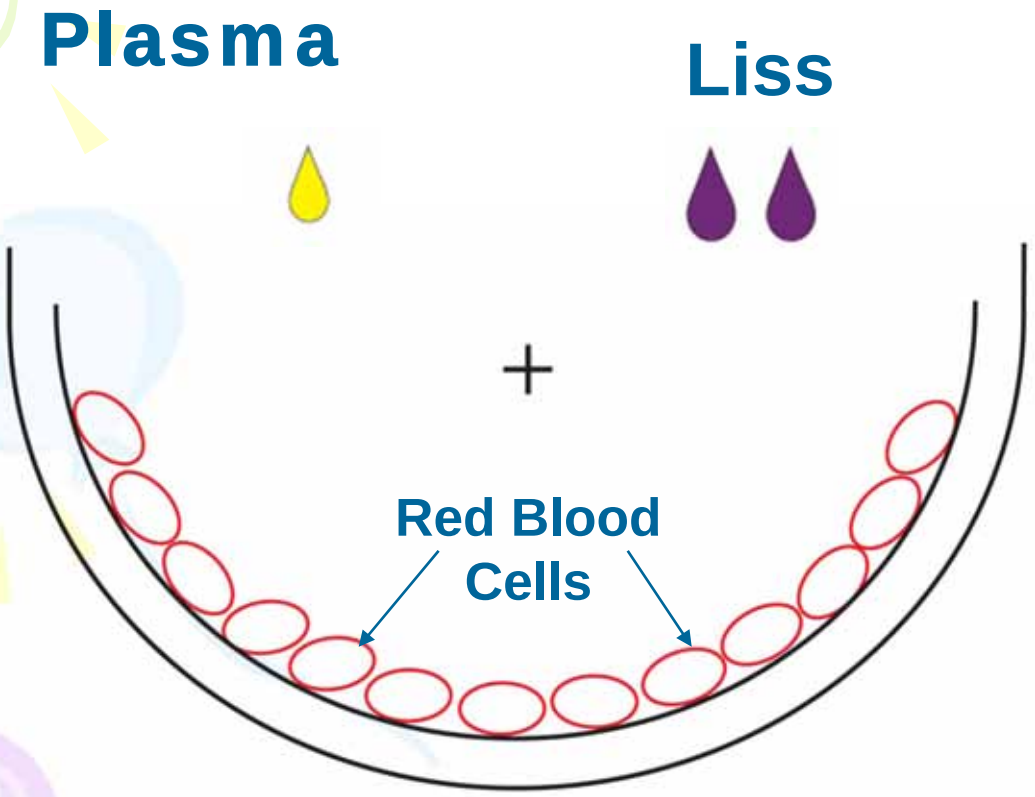
ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΕΩΣ-1

- Η επιφάνεια της μικροπλάκας καλύπτεται από ερυθροκύτταρα
- Προστίθενται ορός και ενισχυτική ουσία
- Επώαση στους 37
- Πλύσιμο για απομάκρυνση της περίσσειας των ανοσοσφαιρινών
- Προσθήκη ερυθροκυττάρων ανίχνευσης καλυμμένων με IgG
- Φυγοκέντρηση και ανάγνωση του αποτελέσματος

ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΕΩΣ-2

- Αυτοματοποιείται
- Πολλαπλή λήψη βαθμών αντίδρασης
- Μικρότερη ποσότητα δείγματος
- Απαιτείται προσεκτικό πιπεττάρισμα
- Καλή εκπαίδευση του προσωπικού για ανάγνωση των αποτελεσμάτων
- Χρήση πάντα θετικού και αρνητικού μάρτυρα

Addition of Plasma & LISS



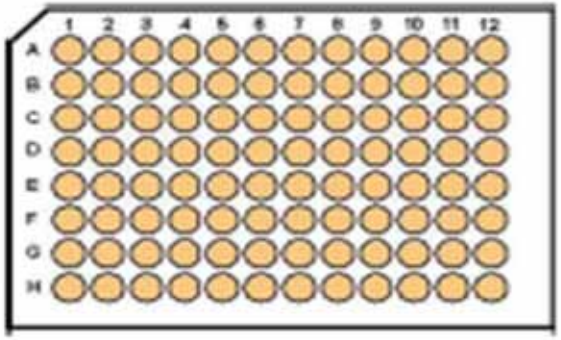
Add

- 100 µl of Capture LISS
- 50 µl of donor/patient plasma
  or
  Anti-Sera if weak D test or rare antigen typing is required

Incubation

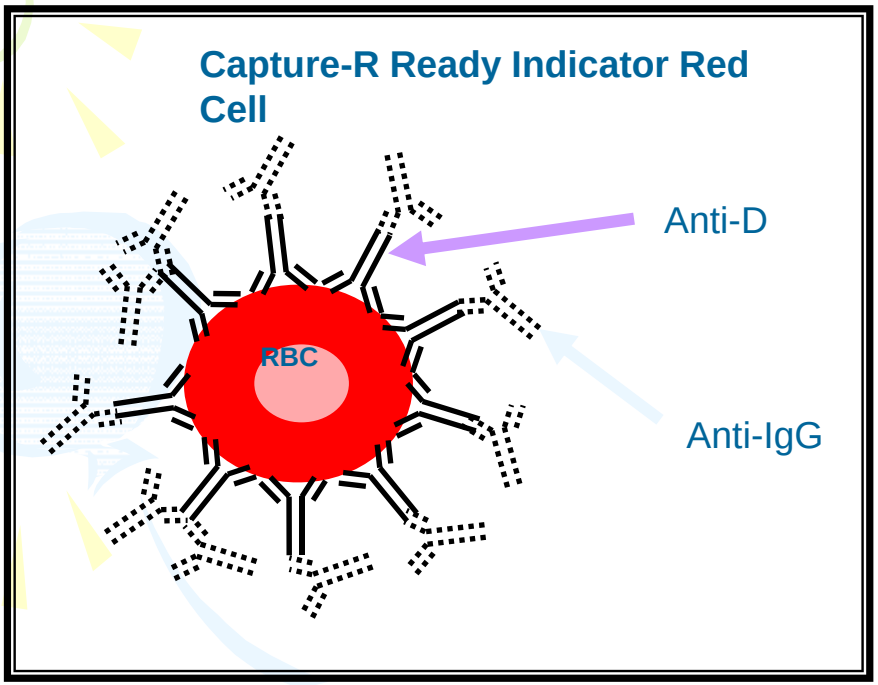
- Incubate test strips for 10 to 30 minutes. Depends on the test running
- (60 minutes max)

Second Wash Step - removing plasma/proteins



- Wells are washed to remove proteins
- Use phosphate buffered saline (PBS)
  - pH 6.5 – 7.5

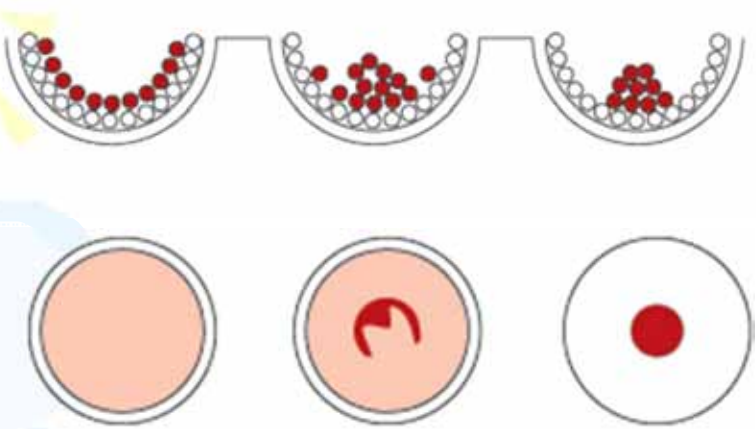
Indicator Cell



Group O Rh positive Human Red Blood Cell

ADD INDICATOR CELLS
50µl to each test wells

Second Centrifuge step



Indicator cells are centrifuged

to indicate IgG presence

Centrifuge parameter:

- 90 sec.
- 600g
- ramp up 135

Final Read

READER:
- Capture Algorithm

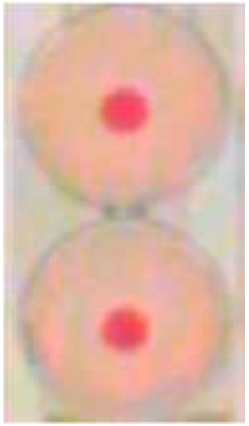
4+

3+

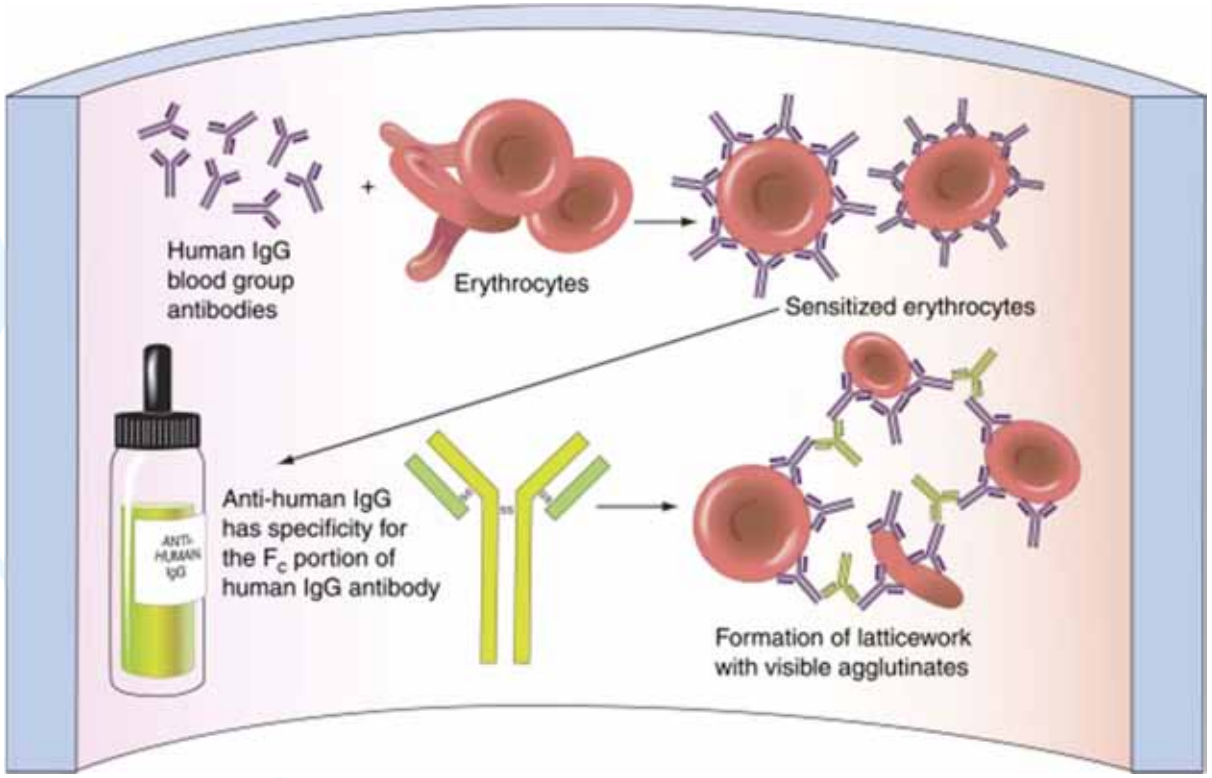
2+

1+

0



ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΣ ΟΡΟΣ



ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΟΣ ΑΝΤΙΣΦΑΙΡΙΝΙΚΟΣ ΟΡΟΣ

- ANTI-IgG και ANTI-C3d
- Πλεονέκτημα:Ανιχνεύει και αντισώματα που ενεργοποιούν το συμπλήρωμα (anti-Jka)
- Μειονέκτημα : Ανίχνευση αρκετών μη κλινικά σημαντικών αντισωμάτων
- Μονοκλονικός ή πολυκλονικός ορός

ΜΟΝΟΔΥΝΑΜΟΣ ΑΗG

- ANTI-IgG
- ANTI-Complement (C3b+C3d /C3d)
- Μονοκλονικός ή πολυκλονικός αντιορρός
- Λιγότερες ψευδώς θετικές αντιδράσεις
- Μπορεί να χάσει κλινικά σημαντικά αντισώματα

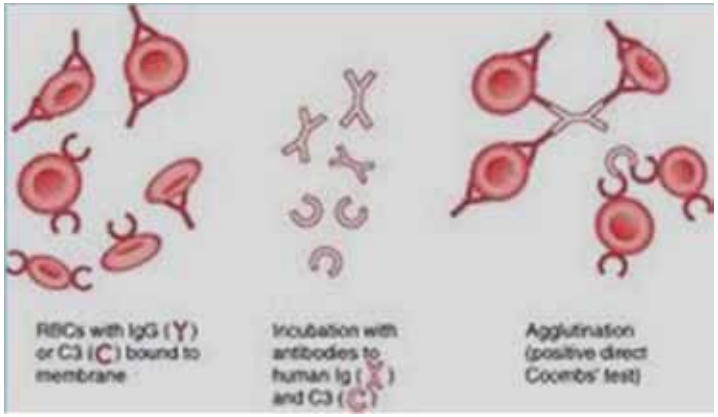
ANTIGLOBULIN TEST/COOMBS TEST

- Moreshi 1908
- Coombs 1945
- Ανιχνεύει ερυθροκύτταρα ευαισθητοποιημένα με IGG αλλοαντισώματα,IGG αυτοαντισώματα και συστατικά του συμπληρώματος

ΑΜΕΣΗ COOMBS-1

- Ανιχνεύει in vivo ευαισθητοποίηση ερυθροκυττάρων με IgG ή/και με συστατικά του συμπληρώματος.
- Κλινικές καταστάσεις
  1. Αιμολυτική νόσος του νεογνού
  2. Αιμολυτική αντίδραση μετά μετάγγιση
  3. Αυτοάνοσα νοσήματα
  4. Φάρμακα

ΑΜΕΣΗ COOMBS-2



- Δημιουργία εναιωρήματος ερυθροκυττάρων 3-5%
- Πλύσιμο μιας σταγόνας εναιωρήματος Χ 3
- Προσθήκη δυο σταγόνων πολυδύναμου AHG
- Φυγοκέντρηση και διάβασμα
- Προσθήκη κυττάρων ελέγχου σε αρνητικό αποτέλεσμα

DAT negative positive

ΑΙΤΙΑ ΨΕΥΔΩΣ ΘΕΤΙΚΩΝ DAT

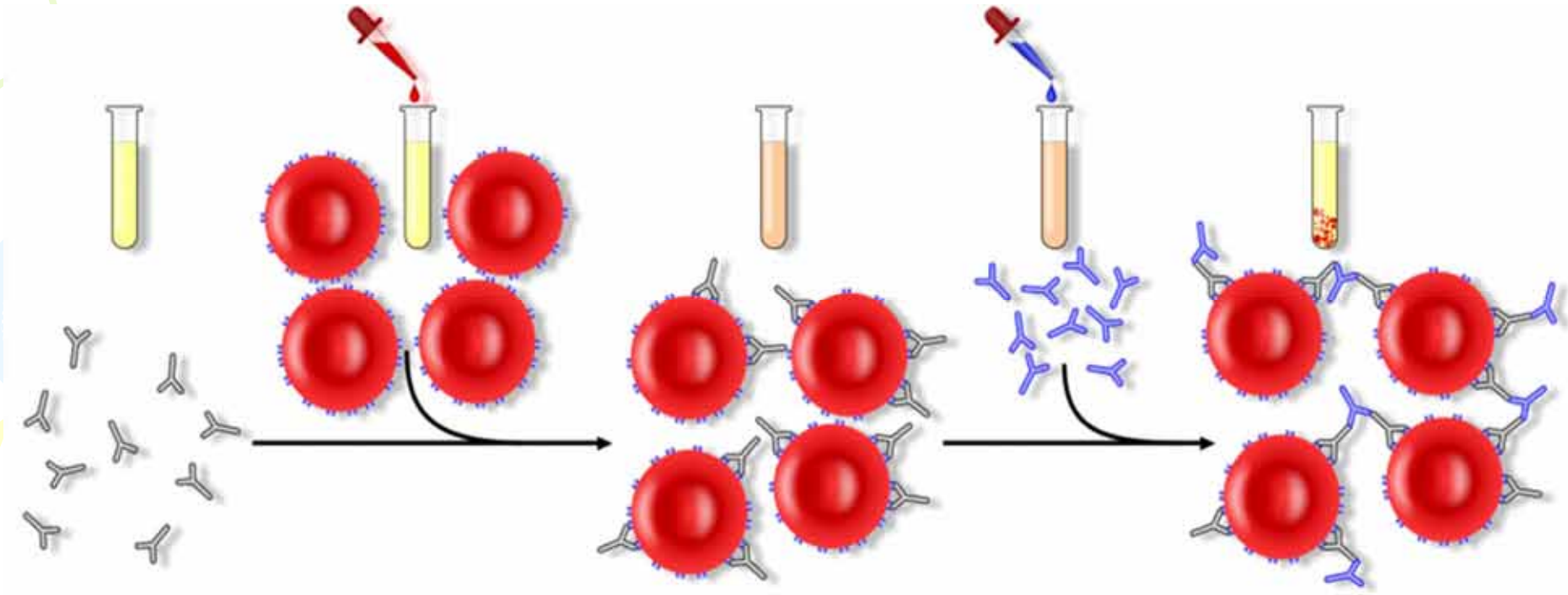
- Υπερφυγοκέντρηση
- Άμεση συγκόλληση από ισχυρές ψυχροσυγκολλητίνες
- Υπέρ-επώαση με επεξεργασμένα με ένζυμο ερυθρά
- Ακατάλληλη χρήση PEG
- Ανεπαρκής επαναδιάλυση της κηλίδας
- Σχηματισμός rouleaux

ΕΜΜΕΣΗ COOMBS (IAT)

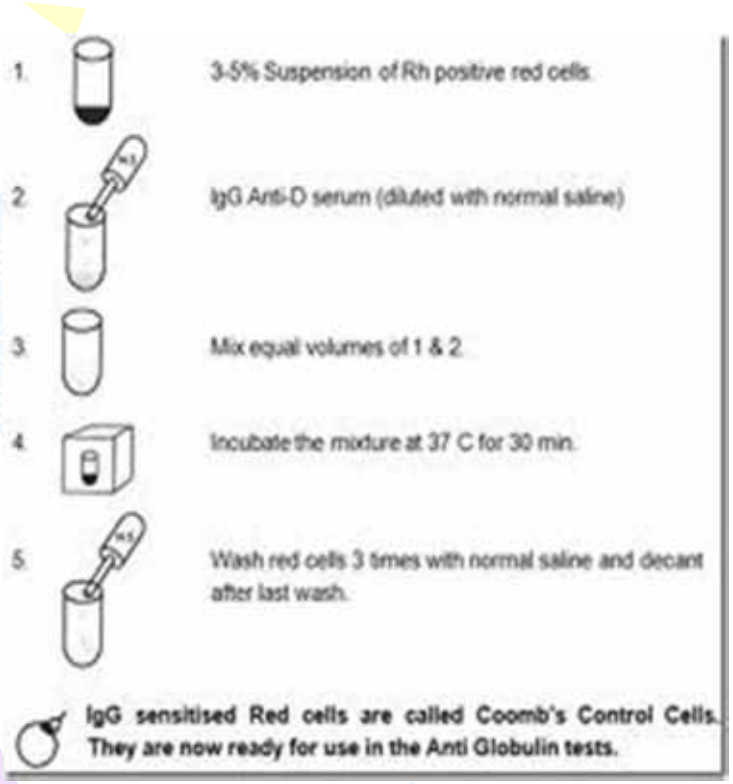
- Ανίχνευση αντισώματος
- Ταυτοποίηση αντισωμάτων
- Συμβατότης
- Καθορισμός ερυθροκυτταρικών αντιγόνων

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΙΑΤ

- Μια σταγόνα εναιωρήματος ερυθροκυτταρων 3-5% σε ένα σωληνάριο
- 2-3 σταγόνες ορός του ασθενούς
- Προσθήκη ανάλογων σταγόνων του ενισχυτικού μέσου
- Επώαση στους 37 για χρονική περίοδο ανάλογη της ενδεδειγμένης μεθόδου(15-60min)
- Φυγοκέντρηση και έλεγχος για αιμόλυση ή συγκόλληση
- Πλύσιμο Χ3 με ΦΟ
- Προσθήκη 2 σταγόνων αντισφαιρινικού ορού
- Φυγοκέντρηση και έλεγχος
- Προσθήκη κυττάρων ελέγχου σε όλα τα αρνητικά δείγματα



COOMBS CONTROL



- Έλεγχος αντισφαιρινικού ορού
- Έλεγχος πλυσίματος
- Έλεγχος φυγοκέντρησης

ΑΙΤΙΑ ΨΕΥΔΩΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Ακατάλληλο δείγμα(παγωμένο,πήγμα)
- Βακτηριακή επιμόλυνση
- Λερωμένα σωληνάρια
- Υπερφυγοκέντρηση
- Επιμολυσμένα αντισώματα στον αντισφαιρινικό ορό
- Φυγοκέντρηση πριν το πλύσιμο σε δοκιμασία με PEG
- Χρήση κυττάρων με θετική DAT ,σε δοκιμασία IAT

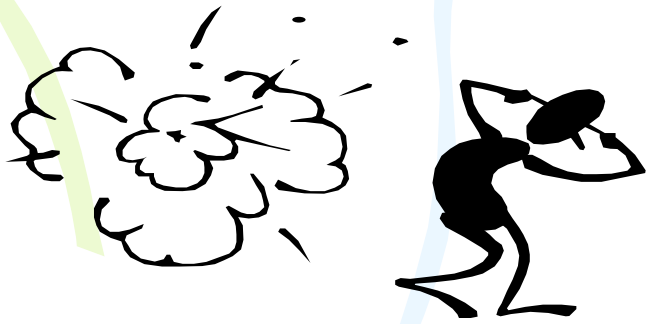
ΑΙΤΙΑ ΨΕΥΔΩΣ ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Ανεπαρκές ή ακατάλληλο πλύσιμο των κυττάρων
- Μη αντιδρών αντισφαιρινικός ορός
- Απουσία προσθήκης ορού
- Ανεπαρκής επώαση
- Λανθασμένο εναιώρημα ερυθροκυττάρων
- Υπο ή υπερφυγοκέντρηση
- Λάθος ανάγνωση των αποτελεσμάτων
- Χαμηλό PH

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΟΥ TEST

- Απαιτείται η σύνδεση 200-500 μορίων IgG ή C3 ανά κύτταρο για θετική DAT
- Η IAT ανιχνεύει 100-200 μόρια IgG ή C3 ανά κύτταρο
- Διαφορετική ευαισθησία μεταξύ των διαφόρων υποκλάσεων ανοσοσφαιρινών

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ



ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

- Ηλικία
- Φύλο
- Καταγωγή
- Διάγνωση νοσήματος
- Ιστορικό προηγούμενης μετάγγισης ή κύησης
- Ενδοφλέβια χορήγηση διαλυμάτων (ανοσοσφαιρίνης, αντιλεμφοκυτταρικός ορός)
- Ιστορικό πρόσφατης μετάγγισης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Το panel των ερυθροκυττάρων που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση του αντισώματος πρέπει να αποτελείται από 11-20 κύτταρα ομάδος Ο με διαφορετική αντιγονική έκφραση.
- Να περιλαμβάνει κύτταρα με ομόζυγη έκφραση των αντιγόνων Rh , Duffy, Kidd και MNS
- Το profile των ερυθροκυττάρων είναι ειδικό για κάθε συσκευασία
- Το εσώκλειστο ένθετο θα πρέπει να αναφέρει την ύπαρξη σπανίων κυττάρων

Antibody panel

Ένα panel αντισωμάτων πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 11 κύτταρα

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0			
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0			
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+			
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+			
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+			
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+			
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+			
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0			
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+			
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0			
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+			
Patient Typing																						
INTERPRETATION:																						

- Αποκλεισμός όλων των κυττάρων που έδωσαν αρνητική αντίδραση
- Η τεχνική “rule out” εφαρμόζεται μόνο σε κύτταρα με ομόζυγη αντιγονική έκφραση
- Εξαίρεση αποτελούν τα χαμηλής συχνότητας αντιγόνα που σπάνια απαντούν σε ομόζυγη μορφή (K,Kpa,Jsa,Lua)

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- STEP BY STEP

ΦΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

- ***Αντιδρούν όλα τα κύτταρα με την ίδια ένταση?***
- Η ένταση της αντίδρασης δείχνει την ποσότητα και όχι το είδος του αντισώματος
- Διαφορετική ένταση καταδεικνύει την ύπαρξη περισσοτέρων του ενός αντισωμάτων
- Ποικιλία έκφρασης αντιγόνων (I,P1,Lea,Leb,Vel,Ch/Rg,Sda)

ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΟΛΑ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗΝ ΙΔΙΑ ΦΑΣΗ?

- Πολλαπλά αντισώματα-διαφορετικές φάσεις
- Ομόζυγος ή ετερόζυγος έκφραση
- Κλινική σημασία του αντισώματος (IgM/IgG)

ΑΠΟΜΟΝΩΝΕΤΑΙ ΚΑΠΟΙΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ?

ΕΙΝΑΙ ΤΟ ΑΥΤΟΛΟΓΟ CONTROL ΘΕΤΙΚΟ Ή ΑΡΝΗΤΙΚΟ?

ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΕΠΑΡΚΕΙΣ ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ?

RULE OF THREE

- Για να ταυτοποιηθεί κάποιο αντίσωμα θα πρέπει να ισχύει ο κανόνας των «3»
- Ελέγχοντας τον ορό του ασθενούς με τουλάχιστον 3 θετικά και 3 αρνητικά κύτταρα η πιθανότητα ανίχνευσης είναι $p<0.05$
- Διάστημα εμπιστοσύνης 95%
- Επιλογή κυττάρων και από άλλα panels
- Παρουσία πολλών αντισωμάτων ο κανόνας των «3» ισχύει για κάθε ένα ξεχωριστά

ΚΑΝΟΝΑΣ ΤΟΥ LANDSTEINER

- Τα άτομα ΔΕΝ αναπτύσσουν αντισώματα έναντι αντιγόνων που δεν έχουν

Panel

- Ερυθροκύτταρα ομάδας Ο

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0			
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0			
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+			
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+			
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+			
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+			
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+			
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0			
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+			
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0			
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+			
Patient Typing																						
INTERPRETATION:																						

Panel

- Με ΟΛΑ τα panels θα πρέπει να τρέχει ένα autocontrol

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0			
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0			
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+			
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+			
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+			
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+			
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+			
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0			
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+			
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0			
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+			
Patient Typing																						
INTERPRETATION:																						

Autocontrol

Patient RBCs
+
Patient serum

Panel

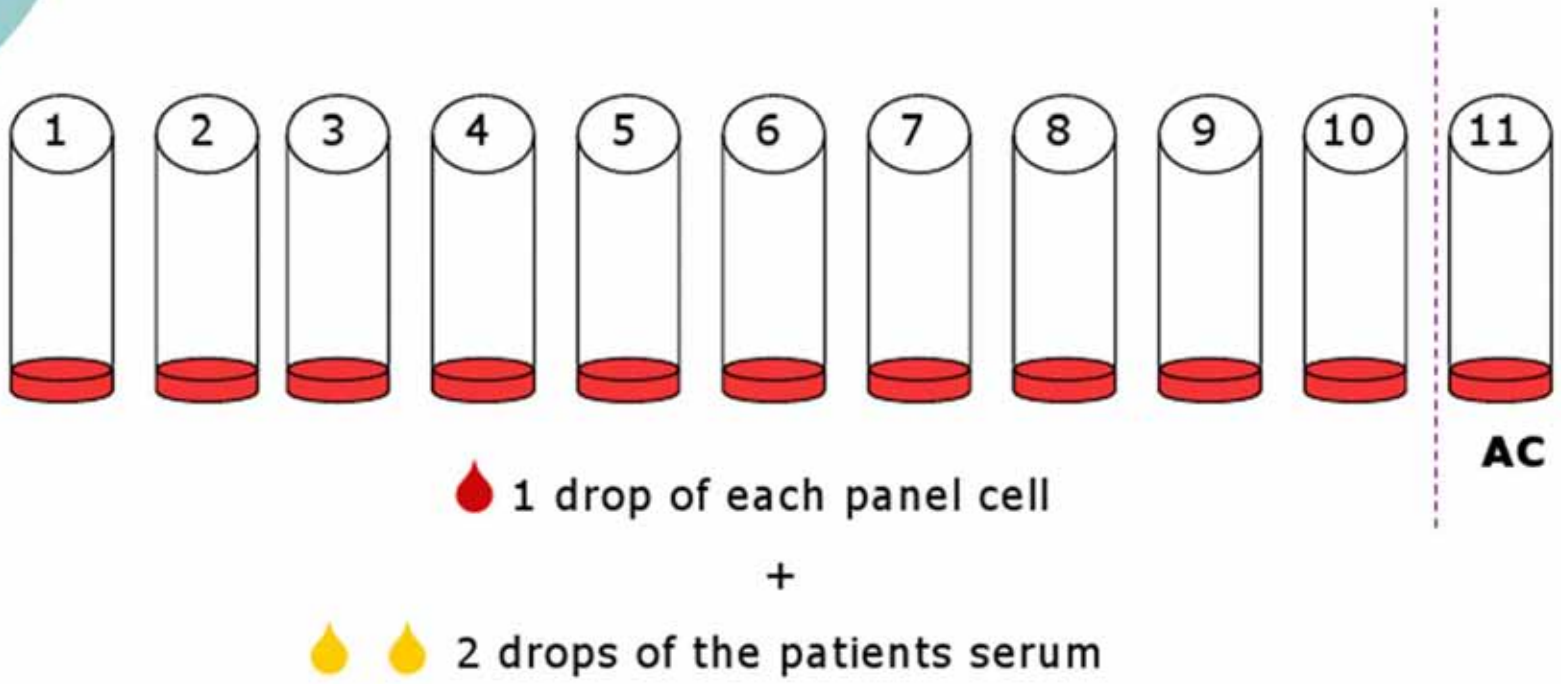
- Χρησιμοποιούνται οι ίδιες φάσεις όπως στο antibody screening

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0			
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0			
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+			
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+			
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+			
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+			
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+			
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0			
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+			
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0			
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+			
Patient Typing																						
INTERPRETATION:																						

- **IS**
- **37°**
- **AHG**

Antibody ID Testing

- A tube is labeled for each of the panel cells plus one tube for AC:

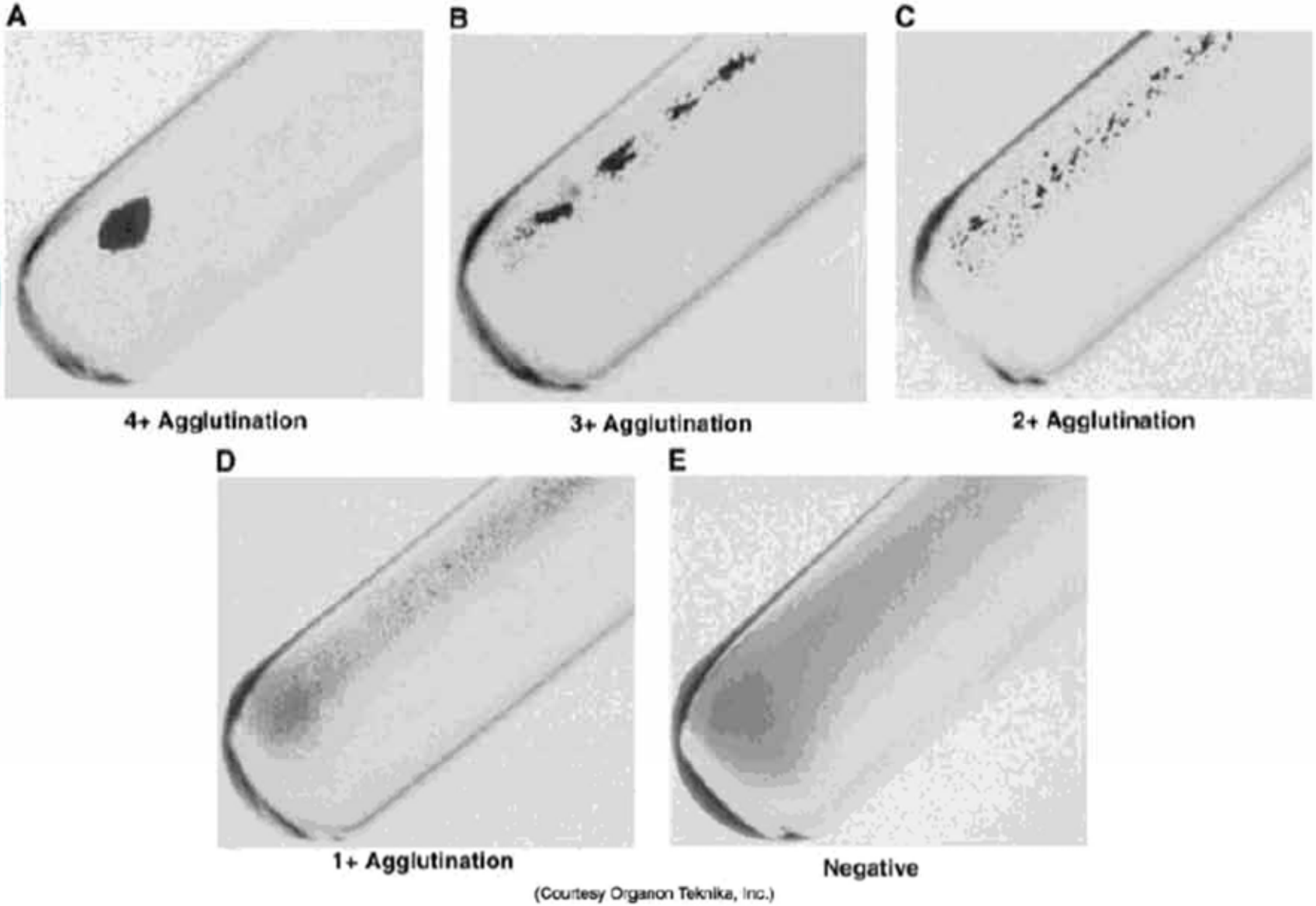


Φάση IS(IMMEDIATE SPIN)

- Φυγοκέντρηση και έλεγχος για τυχόν συγκόλληση και αιμόλυση
- Καταγραφή των αποτελεσμάτων στην αντίστοιχη στήλη

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	2		
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	±		
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0		

Last tube



(Courtesy Organon Teknika, Inc.)

(LISS) 37°C Phase

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	2	0	
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	2		
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0		
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0		
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	2		
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	0		
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	2		
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0		
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0		
Patient Typing																						
INTERPRETATION:																						

AHG Phase

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	2	0	0
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	2	0	0
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	2	0	0
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	0
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	2	0	0
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0
Patient Typing																				0	0	0
INTERPRETATION:																						

Μην ξεχνάτε….

- …Προσθέστε check cells σε κάθε αρνητικό AHG!!!

IS	LISS 37°	AHG	CC
2+	0	0	✓
0	0	0	✓
0	0	0	✓
2+	0	0	✓
0	0	0	✓
0	0	0	✓
2+	0	0	✓
0	0	0	✓
2+	0	0	✓
0	0	0	✓
0	0	0	✓

All cells are negative at AHG, so add "Check" Cells

Έχετε συγκόλληση…και τώρα;

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG	CC
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	2	0	0	✓
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	✓
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	✓
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	2	0	0	✓
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	✓
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	✓
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	2	0	0	✓
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	0	0	0	✓
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	2	0	0	✓
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0	0	✓
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	✓
Patient Typing																				0	0	0	✓
INTERPRETATION:																							

??

1.Αποκλεισμός

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	2	0	0
2	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	0	+	+	0	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~0	0	0
3	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	0	~~+~~	0	+	+	~~+~~	0	~~+~~	+	~~+~~	+	+	0	~~+~~	0	0	0
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	2	0	0
5	0	0	+	~~+~~	+	~~+~~	0	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	+	+	~~+~~0	0	0
6	0	0	0	~~+~~	~~+~~	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	~~+~~	0	+	+	0	0	0
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	2	0	0
8	0	0	0	~~+~~	~~+~~	~~+~~	+	+	0	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	0	~~+~~0	0	0
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	2	0	0
10	0	0	0	~~+~~	~~+~~	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	0	0	~~+~~	0	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~0	0	0
11	0	0	0	~~+~~	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	0	0	~~+~~	0	~~+~~	+	+	+	+	0	0	0
Patient Typing																				0	0	0

Διαγράψτε τα αντιγόνα που δεν ανιχνεύεται ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ-ΜΗ διαγράφεται αντιγόνα με ετερόζυγη έκφραση

2.Κυκλώστε τα αντιγόνα που δε διαγράφηκαν

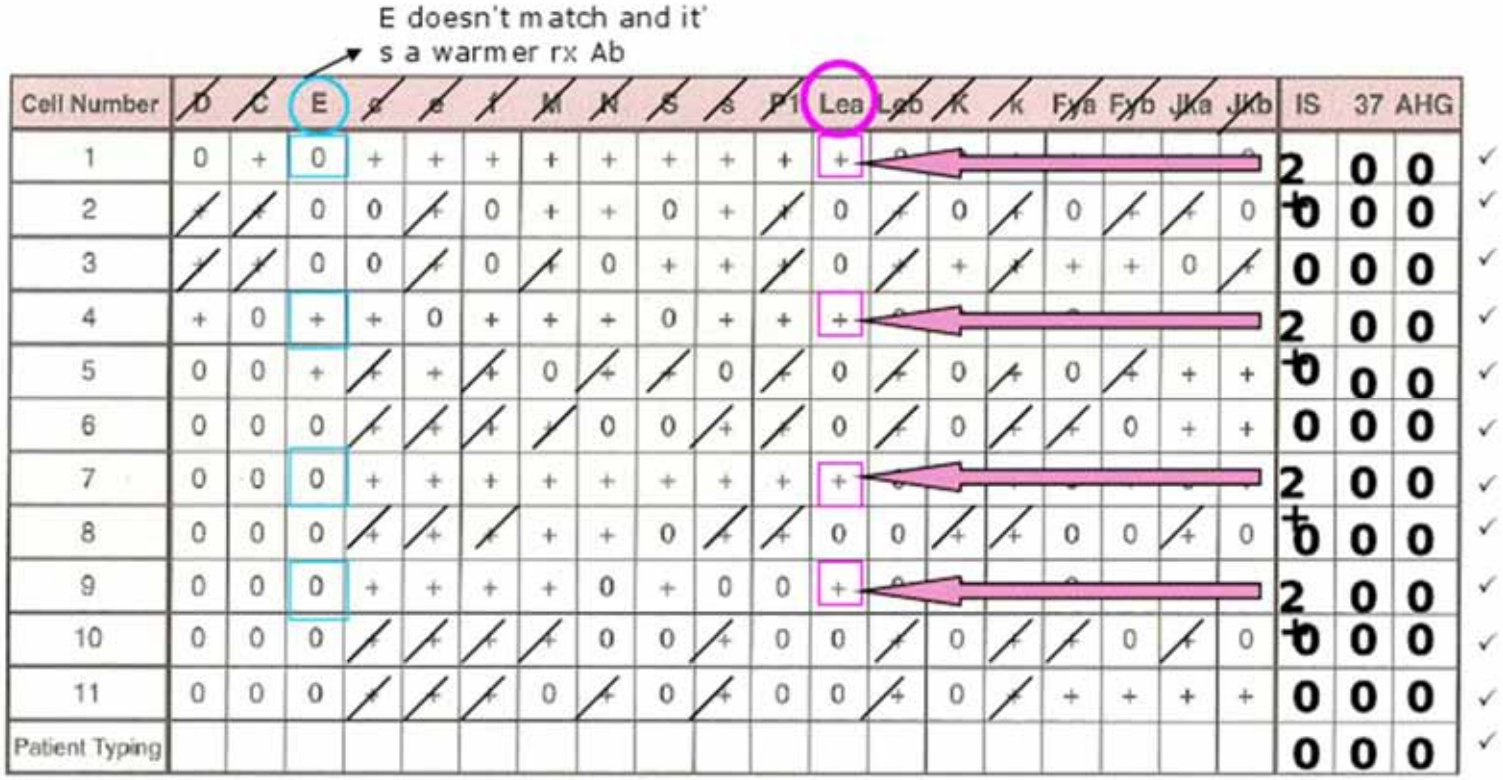
Cell Number	D	C	E	c	e	f	Ma	M	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG	
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	2	0	0	✓
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+ 0	0	0	✓
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	✓
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	2	0	0	✓
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+ 0	0	0	✓
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	✓
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	2	0	0	✓
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+ 0	0	0	✓
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	2	0	0	✓
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+ 0	0	0	✓
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	✓
Patient Typing																				0	0	0	✓

3.Σκεφθείτε τη συνήθη δράση του αντιγόνου

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG	
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	2+	0	0	✓
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	✓
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	✓
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	2+	0	0	✓
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	✓
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0	✓
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	2+	0	0	✓
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	0	0	0	✓
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	2+	0	0	✓
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0	0	✓
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	✓
Patient Typing																				0	0	0	✓

Le^a is normally a Cold-Reacting antibody (IgM), so it makes sense that we see the reaction in the IS phase of testing; The E antigen will usually react at warmer temperatures

4.Σας ταιριάζει κάτι;

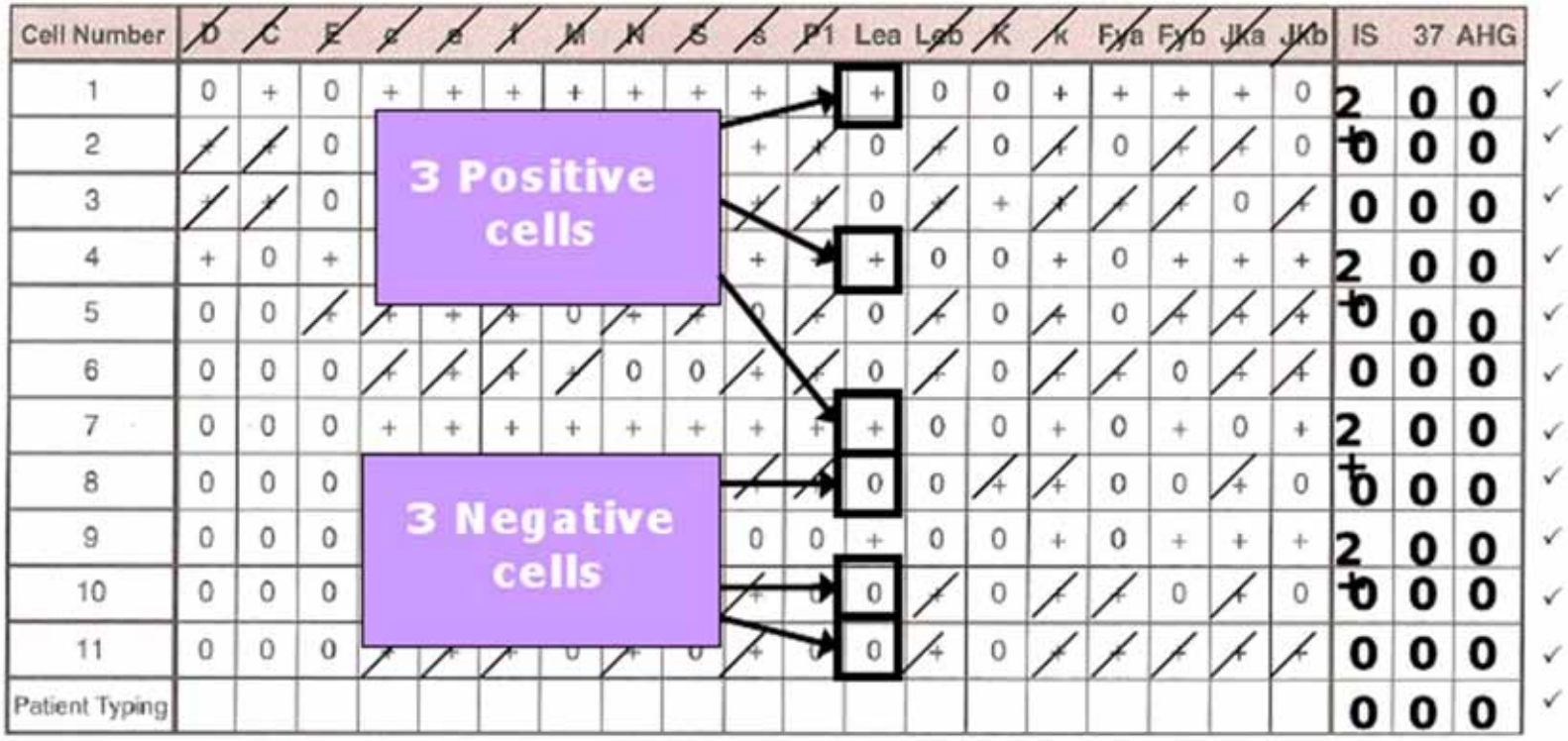


Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+								2	0	0
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+								2	0	0
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+								2	0	0
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	0
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+								2	0	0
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0
Patient Typing																				0	0	0

Ναι!Κάτι ταιριάζει!!!!!

Αποτέλεσμα

Το προηγούμενο παράδειγμα καλύπτει το “rule of three”



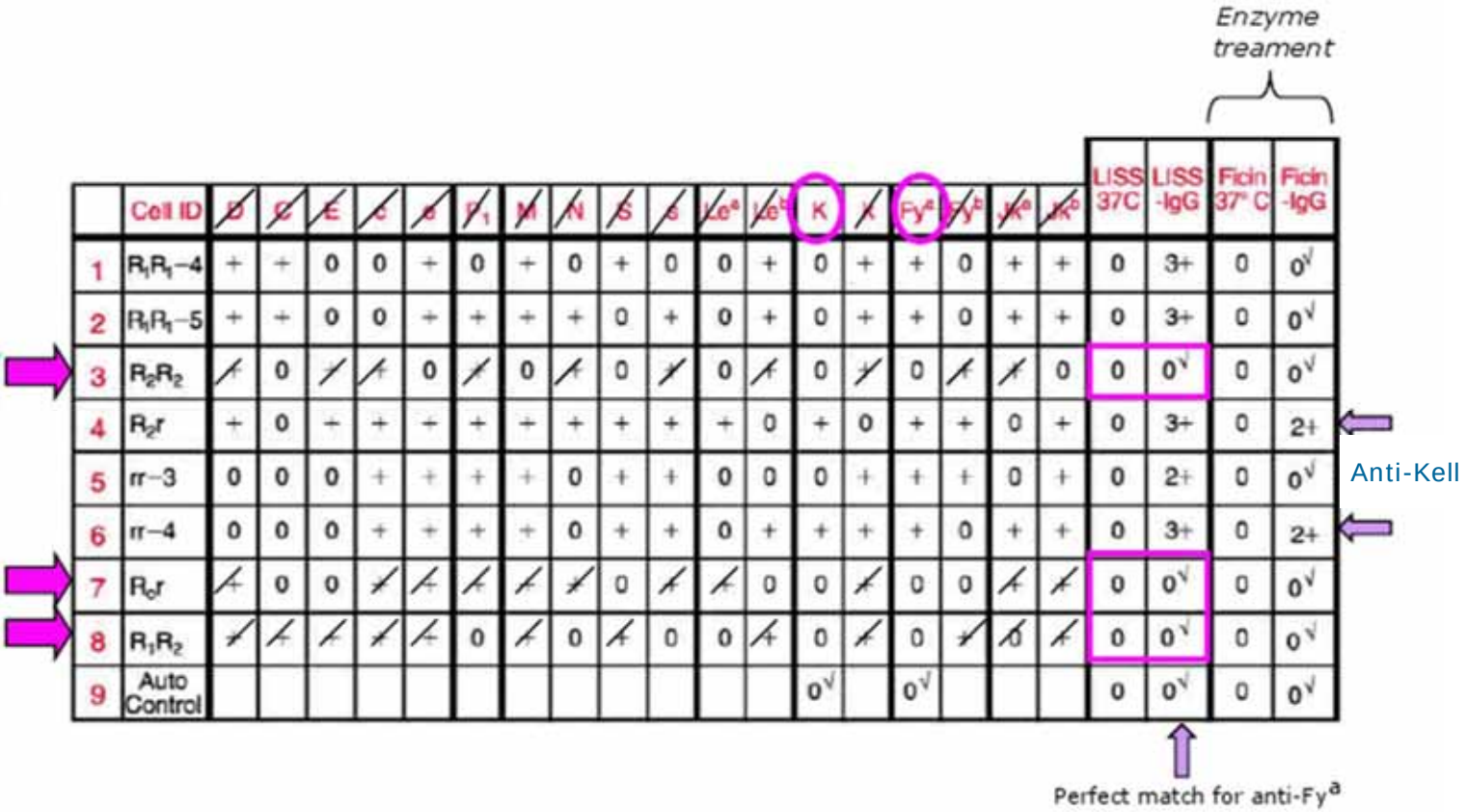
Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	2	0	0
2	+	+	0							+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0
3	+	+	0							+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0
4	+	0	+							+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	2	0	0
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	0
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	2	0	0
8	0	0	0							+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	0
9	0	0	0							0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	2	0	0
10	0	0	0							+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0
Patient Typing																				0	0	0

ΜΗΝ ΞΕΧΝΑΤΕ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ

Papain, bromelin, ficin, and trypsin

Αύξηση αντιγονικής έκφρασης	Κατάργηση της αντιγονικής έκφρασης
Kidd Rh Lewis I P	Fy^a and Fy^b M, N S, s

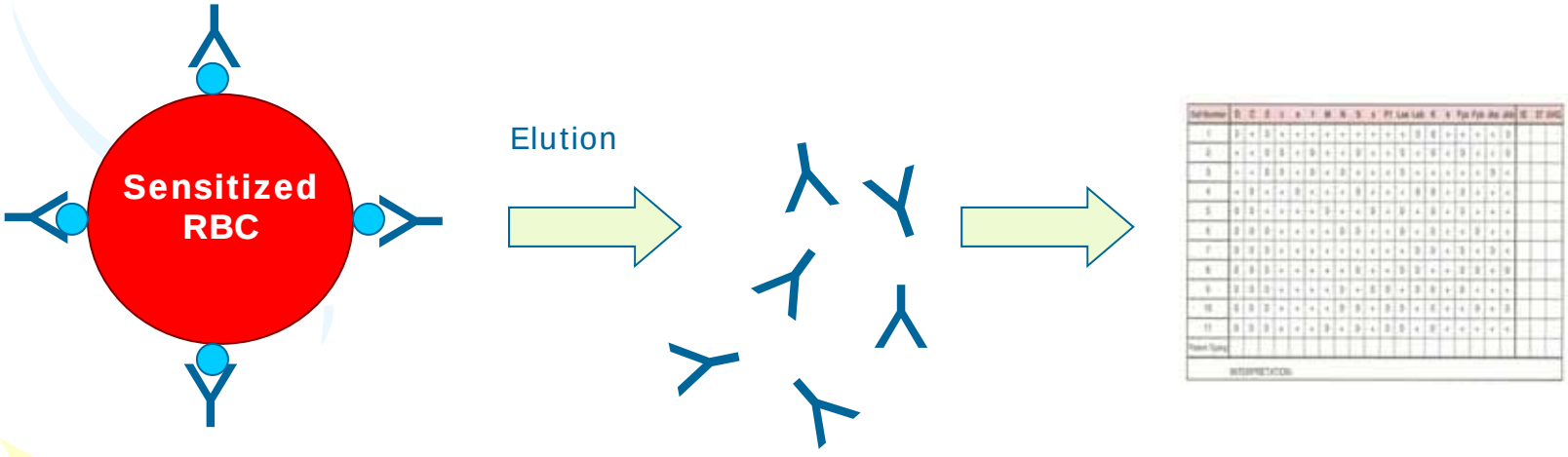
Επεξεργασία με ένζυμο



	Cell ID	D	C	E	c	e	f/r_1	M	N	S	s	Le^a	Le^b	K	k	Fy^a	Fy^b	Jk^a	Jk^b	LISS 37C	LISS -IgG	Ficin 37° C	Ficin -IgG
1	R_1R_1–4	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	3+	0	$0^{\surd}$
2	R_1R_1–5	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	3+	0	$0^{\surd}$
3	R_2R_2	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	$0^{\surd}$	0	$0^{\surd}$
4	R_2r	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	3+	0	2+
5	rr–3	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	2+	0	$0^{\surd}$
6	rr–4	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	3+	0	2+
7	R_or	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	$0^{\surd}$	0	$0^{\surd}$
8	R_1R_2	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	$0^{\surd}$	0	$0^{\surd}$
9	Auto Control													$0^{\surd}$		$0^{\surd}$				0	$0^{\surd}$	0	$0^{\surd}$

ΕΚΛΟΥΣΗ ΟΤΑΝ Η DAT ΕΙΝΑΙ ΘΕΤΙΚΗ

Η έκλουση « απελευθερώνει» αντισώματα από τα ευαισθητοποιημένα κύτταρα και έτσι είναι δυνατή η ανίχνευση τους



Positive DAT

Frees antibody

Antibody ID

ΕΚΛΟΥΣΗ

- Το έκλουσμα είναι όρος που χρησιμοποιείται για τα αντισώματα που έχουν αφαιρεθεί από τα ευαισθητοποιημένα ερυθροκύτταρα
- Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις θετικής DAT όπως σε HDN,μετά μετάγγιση αντιδράσεις, αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία
- Τα ερυθροκύτταρα μετά το έκλουσμα μπορεί να χρησιμοποιηθούν και για φαινοτύπηση αν χρειάζεται
- Όταν υπάρχει θερμό αυτοαντίσωμα συνήθως το έκλουσμα αντιδρά με όλα τα κύτταρα του panel.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ

- Διφωσφορική χλωροκίνη :πλυμένα ερυθρά επωάζονται με το αντιδραστήριο για 30min έως 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Πλύσιμο των ερυθρών για απομάκρυνση του αντιδραστηρίου. Φαινοτύπηση ερυθρών όταν η DAT γίνει αρνητική
- Όξινη έκλουση(acid glycine/EDTA)
- Οργανικά διαλύματα (αιθέρας,χλωροφόρμιο)
- Θέρμανση
- Ψύξη-απόψυξη

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ-ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

- Λάθος τεχνική
- Σύνδεση πρωτεινών με τις γυάλινες επιφάνειες του σωληναρίου
- Αστάθεια του εκλούσματος

- Ανεπαρκές πλύσιμο
- -αν τα κύτταρα δεν είναι καλά πλυμένα υπάρχει επιμόλυνση από το παραμένον αντίσωμα και ψευδώς θετικά αποτελέσματα
- -πραγματοποίηση εξέτασης στον ορό του τελευταίου πλυσίματος. Αν είναι θετική η εξέταση επαναλαμβάνεται.

ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ-1

- Χρησιμοποιείται στην ανίχνευση αλλοαντισωμάτων
- Αυτοπροσρόφηση
  -όχι πρόσφατη μετάγγιση
  -τα αυτοαντισώματα απομακρύνονται χρησιμοποιώντας τα ερυθροκύτταρα του ίδιου του ασθενούς με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ανίχνευση του αλλοαντισώματος
- Αλλογενής προσρόφηση
  -σε πρόσφατη μετάγγιση
  -χρησιμοποιούνται διαφορετικά ερυθροκύτταρα και ο ορός του ασθενούς

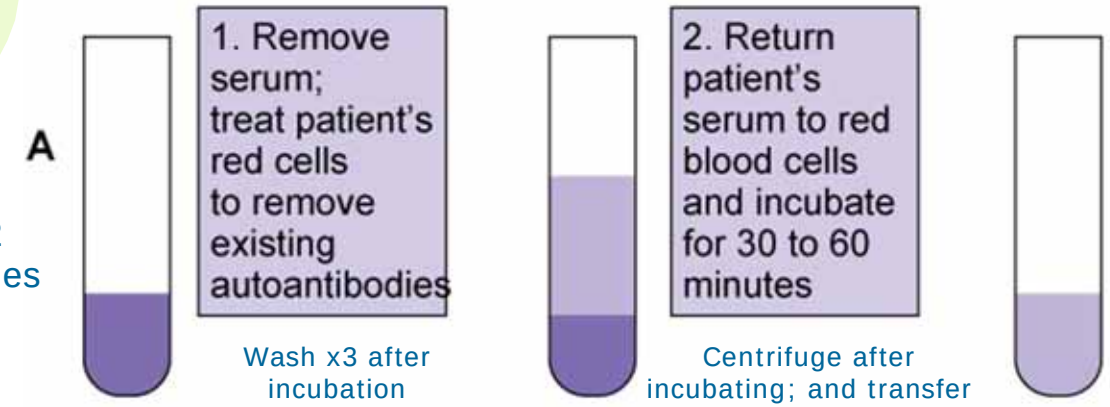
ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ-2

- Αφαίρεση αντισωμάτων από τον ορό προσθέτοντας τα κατάλληλα ερυθροκύτταρα
- Μετά την επώαση διαχωρίζεται ο ορός από τα κύτταρα και εξετάζεται περαιτέρω
- Ιδιαίτερα χρήσιμη όταν υπάρχει αυτοαντίσωμα το οποίο προσροφάται από τα ερυθροκύτταρα του ασθενούς και αλλοαντίσωμα το οποίο παραμένει ακέραιο

ΑΛΛΟΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ

- Ο ορός του ασθενούς διαχωρίζεται σε τρια σωληνάρια
- Χρησιμοποιούνται συνήθως R1R1 (DCee),R2R2(DcEE0,rr(ccee)
- Επίσης ένα θα πρέπει να είναι Kell-,ένα Jka- και ένα Jkb-
- Επεξεργασία των κυττάρων με ένζυμα
- Μετά την προσρόφηση γίνεται ταυτοποίηση αλλοαντισώματος σε κάθε σωληνάριο

Autoadsorption



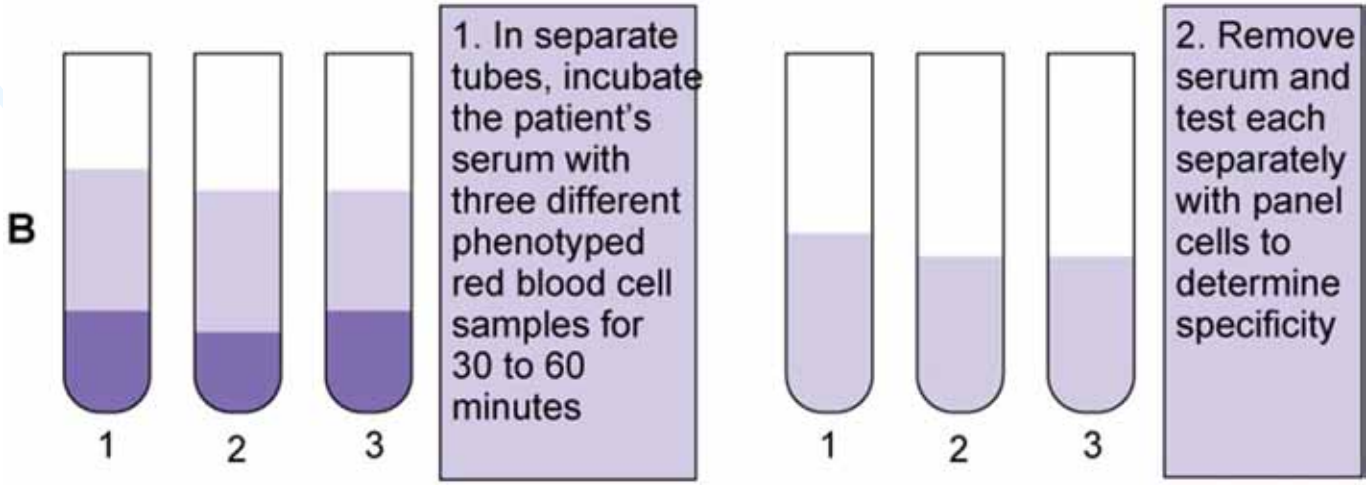
2 tubes

Wash x3 after incubation

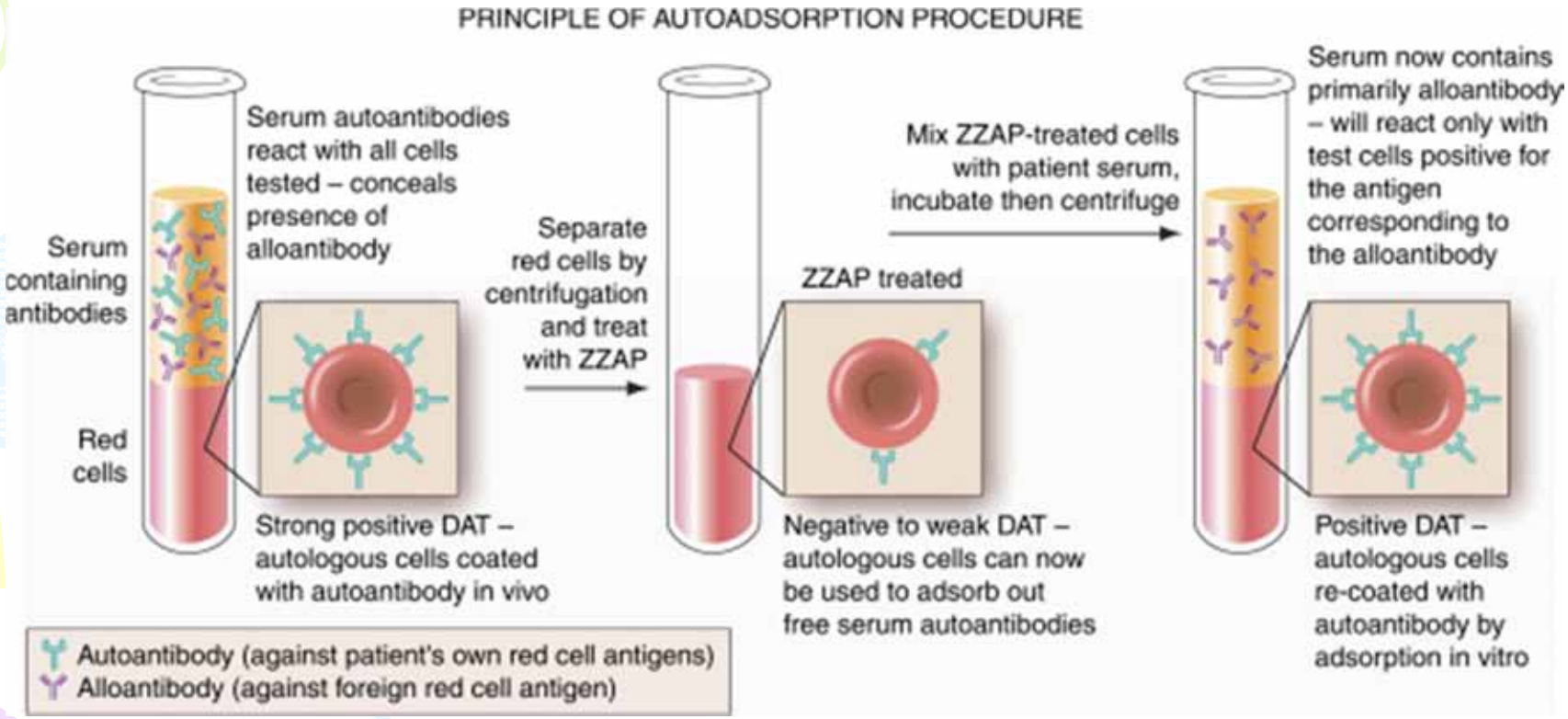
Centrifuge after incubating; and transfer serum to 2nd tube of treated cells; incubate and centrifuge again

Remove serum and test for alloantibody

Differential (allogeneic) adsorption



Mosby items and derived items © 2009 by Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.: Some material was previously published.


PRINCIPLE OF AUTOADSORPTION PROCEDURE
Serum containing antibodies
Red cells
Serum autoantibodies react with all cells tested – conceals presence of alloantibody
Strong positive DAT – autologous cells coated with autoantibody in vivo
Separate red cells by centrifugation and treat with ZZAP
ZZAP treated
Negative to weak DAT – autologous cells can now be used to adsorb out free serum autoantibodies
Mix ZZAP-treated cells with patient serum, incubate then centrifuge
Serum now contains primarily alloantibody – will react only with test cells positive for the antigen corresponding to the alloantibody
Positive DAT – autologous cells re-coated with autoantibody by adsorption in vitro
Autoantibody (against patient's own red cell antigens)
Alloantibody (against foreign red cell antigen)

ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ

- Χρησιμοποιεί διαλυτά αντιγόνα για να αναστείλει την δράση ορισμένων αντισωμάτων του ορού
- Προστίθεται το Ag στον ορό ,επωάζεται και έπειτα χρησιμοποιείται ο ορός για την δοκιμασία ανίχνευσης
- Ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος όταν συνυπάρχει στον ορό μη κλινικά σημαντικό ψυχρό αντίσωμα και κλινικά σημαντικό θερμό αντίσωμα

TEST ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ

- *Μερικά αντιγόνα ομάδων αίματος βρίσκονται στον οργανισμό υπό διαλυτή μορφή π.χ στον σίελο, στα ούρα , στο πλάσμα και στο μητρικό γάλα.*
- Αυτές οι ουσίες είναι πολύ χρήσιμες στην ταυτοποίηση αντισωμάτων είτε επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη αντισώματος με αναστολή του ,είτε εξουδετερώνοντας αντισώματα που μιμούνται την δράση αντισωμάτων που δεν εξουδετερώνονται
- Οι διαλυτές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι τα Lewis,P1,Sd

Lewis Inhibition Tests

- Τα αντιγόνα Lewis a και b βρίσκονται στον σίελο ατόμων με την αντίστοιχο φαινότυπο Lewis
- Απομονώνεται από τον σίελο αυτών των ατόμων είτε παρασκευάζεται εμπορικά για χρήση στις τράπεζες αίματος
- Η ουσία Lewis εξουδετερώνει τα Lewis αντισώματα στον ορό του ασθενούς και βοηθά στην ταυτοποίηση άλλων κλινικά σημαντικών αλλοαντισωμάτων

P1 INHIBITION TESTS

- Η ουσία P1 βρίσκεται στην υδάτινη κύστη εχινόκοκκου, αλλά και σε αυγά περιστεριών
- Εξουδετερώνει την δράση των αντι-P1 αντισωμάτων

Sda INHIPITION

- Η ουσία Sda βρίσκεται διαλυτή σε πολλά σωματικά υγρά κυρίως όμως σε ανθρώπινα ούρα

ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ-1

- Ποσοτικοποίηση αλλοαντισώματος
- Χρησιμοποιούνται υποδιπλάσιες αραιώσεις και χρησιμοποιούνται κύτταρα τα οποία έχουν το αντίστοιχο Ag
- Ο τελικός τίτλος είναι η τελευταία αραίωση στην οποία παρατηρείται συγκόλληση
- Καταμετρείται και ένα score ανάλογα με την ένταση της αντίδρασης
- Ο τελικός τίτλος βγαίνει από τον συσχετισμό των ανωτέρω παραμέτρων

ΤΙΤΛΟΣ ΚΑΙ SCORE ANTI-D

	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
ΤΙΤΛΟΣ 1ο ΔΕΙΓΜΑ	2+	2+	1+	W+	0	0	0	16
SCORE	8	8	5	2	0	0	0	23
ΤΙΤΛΟΣ 2ο ΔΕΙΓΜΑ	3+	3+	2+	2+	1+	W+	0	64
SCORE	10	10	8	8	5	2	0	43

SCORE VALUES :4+=12, 3+=10, 2+=8, 1+=5 ,W+=2

ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ-2

- Το αρχικό δείγμα θα πρέπει να φυλάσσεται
- Όταν ζητηθεί νέα τιτλοποίηση ελέγχεται συγχρόνως και το αρχικό δείγμα
- Αλλαγή στην θετικότητα άνω των δυο αραιώσεων ή αλλαγή του score άνω των 10 θεωρείται σημαντική
- Προσοχή στις αραιώσεις για τυχόν επιμόλυνση
- Προσεκτική επιλογή κυττάρων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο π.χ ομόζυγη ή ετερόζυγη έκφραση του αντιγόνου
- Διαφορετική η ευαισθησία της κάθε μεθόδου-προσοχή στην εκτίμηση του αποτελέσματος

ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΚΥΗΣΗ

- Αν ταυτοποιηθεί αλλοαντίσωμα γνωστό που προκαλεί αιμολυτική νόσο του νεογνού ή ταυτοποιείται αντίσωμα του οποίου η κλινική σημασία δεν είναι γνωστή απαιτείται η παρακολούθηση του τίτλου, το ιστορικό έκβασης των προηγούμενων κυήσεων για τυχόν ανάγκη αμνιοκέντησης
- Αύξηση τίτλου είναι ενδεικτική ευαισθητοποίησης της μητέρας

ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ HTLA

- Η τιτλοποίηση είναι ένας τρόπος επιβεβαίωσης της κατηγορίας HTLA αντισωμάτων(high titer,low avidity)
- Ανιχνεύονται στην φάση του αντισφαιρινικού ορού σε πολύ ασθενείς αντιδράσεις, των οποίων όμως ο τίτλος παραμένει σε πολύ μεγάλες αραιώσεις π.χ 1/2048
- Παράδειγμα τέτοιων αντισωμάτων αποτελούν ταanti-Ch, -Rg, -Cs, -Yk, -Kna, -McCa and -JMH.
- Δεν είναι κλινικά σημαντικά αλλά μπορεί να καλύψουν την εικόνα άλλων κλινικά σημαντικών αντισωμάτων

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΕ ΕΙΔΙΚΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

- Χρήση Null phenotypes όπως π.χ Rh null, Ko, Co (a-b-), Lu (a-b-), Fy (a-b-), Jk(a-b-).Χρησιμοποιούνται για ταυτοποίηση αντισωμάτων έναντι υψηλής συχνότητος αντιγόνων,που αντιδρούν με όλα τα κύτταρα του panel.
- Western blotting ή/και ανοσοκαθήλωση

ΧΡΗΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΓΙΑ ΚΑΘΟΡΙΣΜΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ

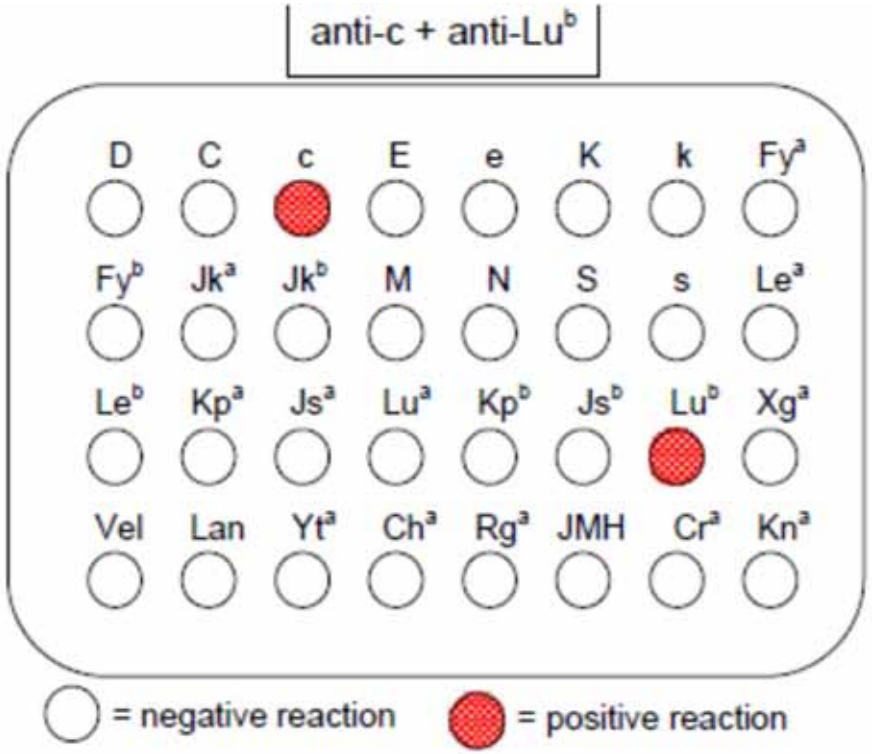
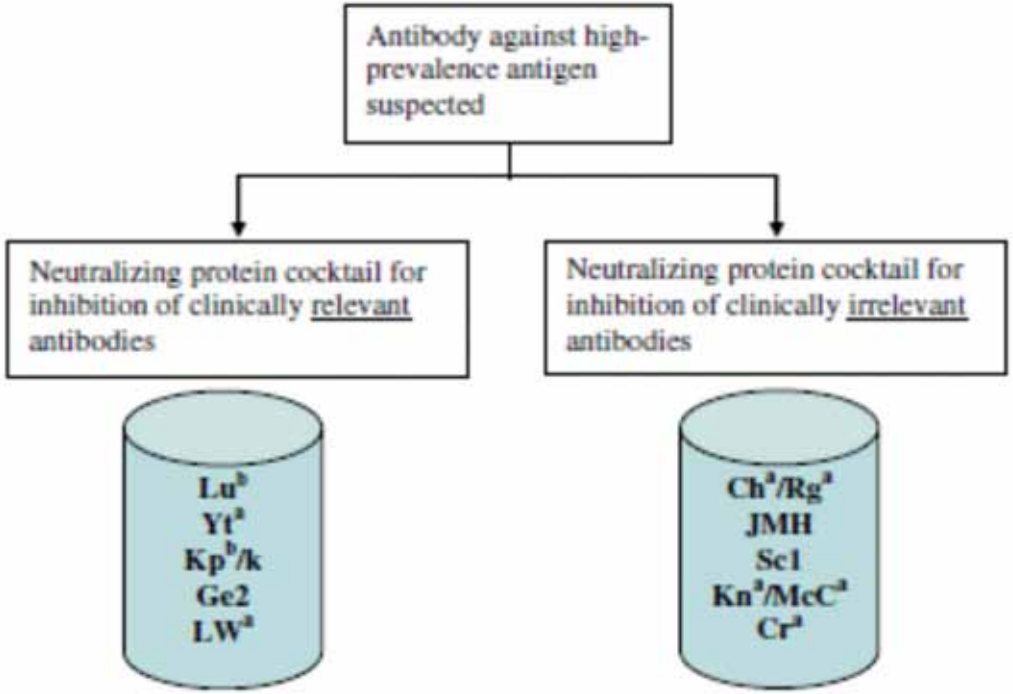


Fig. 1 Use of recombinant blood group antigens for antibody detection and identification. The score sheet shows reactions for a set of different recombinant blood group proteins carrying the most relevant blood group antigens. The test results for a serum containing anti-c plus anti-Lu^b are shown.

ΜΕΧΡΙ ΣΗΜΕΡΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙ-HTLA ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ



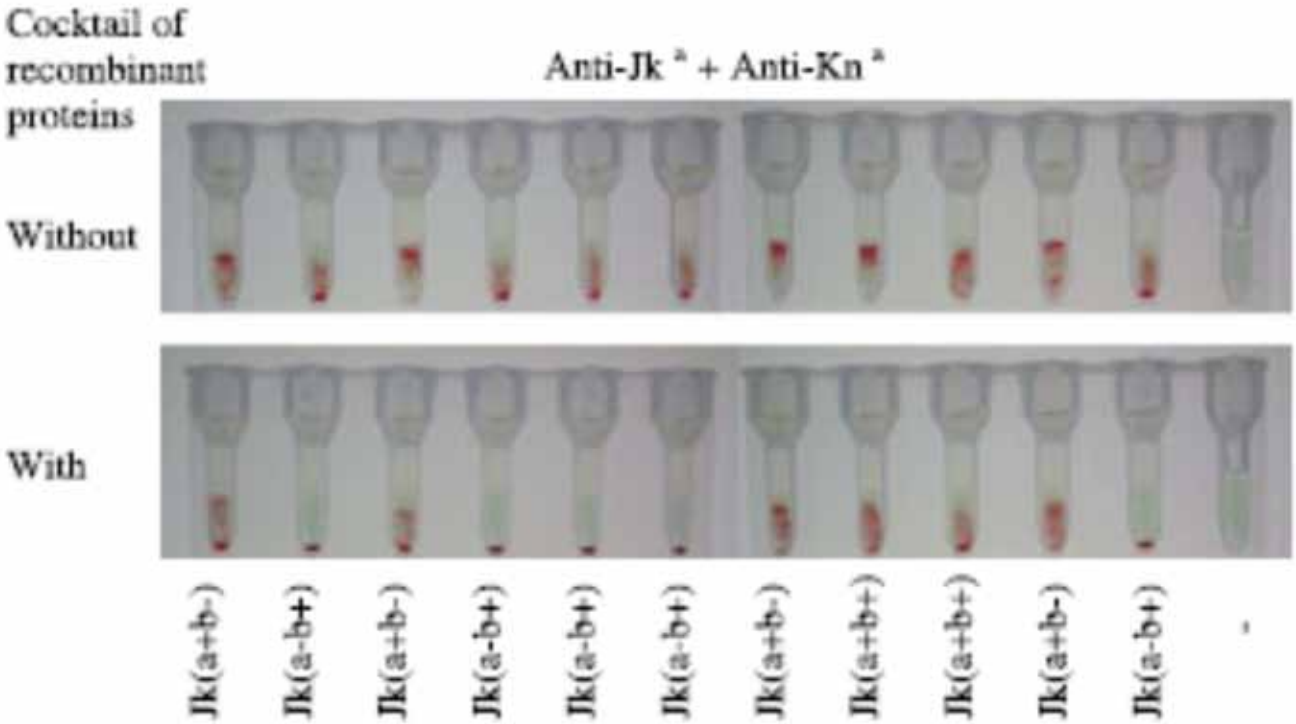


Fig. 3 Detection of admixed antibodies using a cocktail of recombinant blood group proteins. RBC samples for antibody identification are agglutinated by anti-Kn^a antibodies (upper panels), which can mask an anti-Jk^a antibody. Adding a mixture of soluble recombinant proteins carrying Ch^a, Rg^a, JMH, Sc1, Kn^a/McC^a, Cr^a antigens reveals the clinically relevant anti-Jk^a antibody (lower panels). It is detected in a single step with the use of one 'high yield cocktail' without prior knowledge of the antibodies to high-prevalence antigens in the Knops blood group system.

ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- PCR-RFLP
- PCR-SSP
- Multiplex PCR
- RT-PCR
- Sanger DNA Sequencing
- Pyrosequensing
- Microarray technology
- Fluidic microarray system
- TaqMan Open Array
- MALDI-TOF MS
- Mini-sequencing

TABLE 1. Applications of PCR-SSP for the determination of blood groups

- Genotype multiply transfused recipients
- Genotype patients after ABO-incompatible BMT
- Determine *RHD* zygosity of partners from alloimmunized D-negative women before pregnancies
- Genotype D-negative donors with C or E to exclude the presence of the *RHD* gene and thus prevent anti-D alloimmunization of recipients caused by very weak Rh D variants in blood donors
- Identify genotype in case of weakly expressed Rh D (e.g., DEL) in donors
- Confirm weak D genotypes in recipients to avoid unnecessary use of D-negative blood units
- Quality control of serologic methods
- External quality assurance

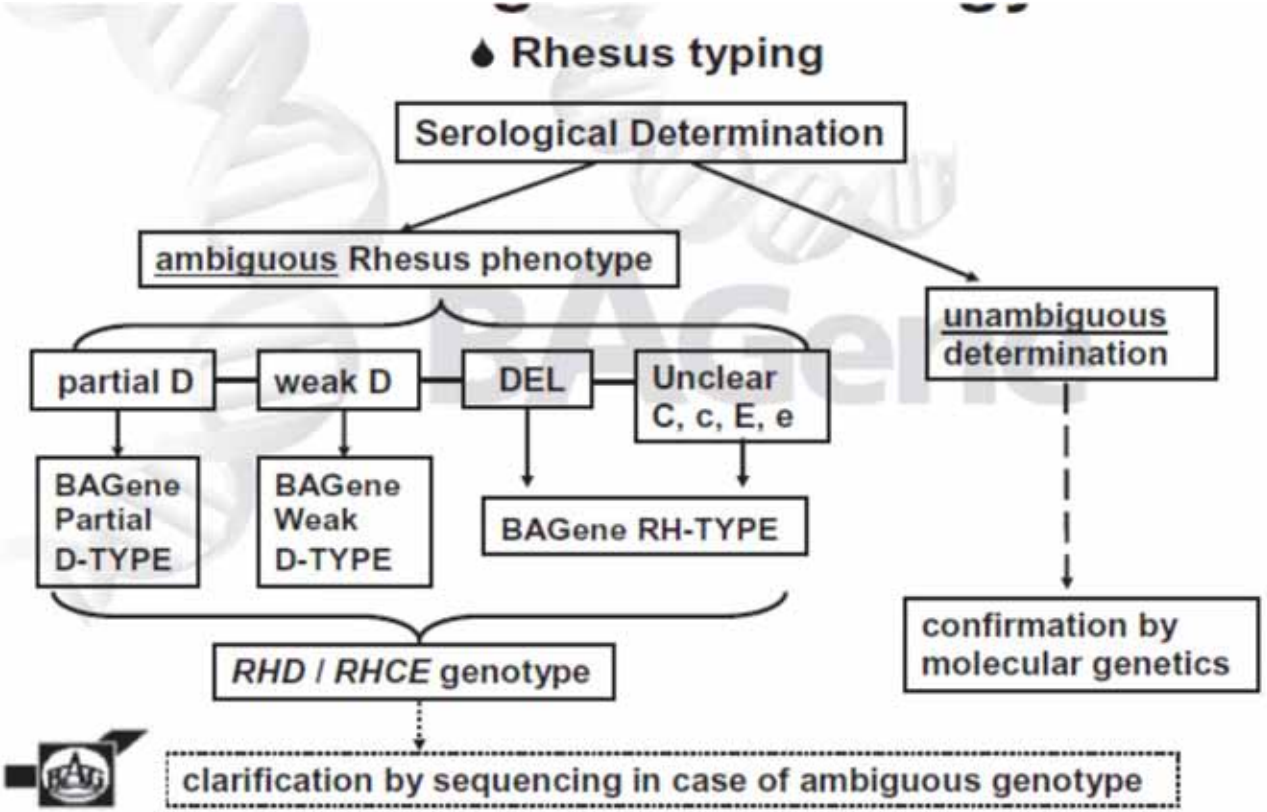


Fig. 3. Unclear Rh phenotypes can be investigated by selecting suitable SSP kits depending on specific purposes. This figure shows an approach, i.e., how to proceed in case of a questionable partial D pretyped by serology: Quite often, a weak D instead of a partial D is hidden behind. Testing for weak D first is recommended. In case that the most common weak D types can be excluded, typing with the Partial D-TYPE kit should follow. An additional kit is available to examine D-negative samples, for instance, with a big C or a big E. The RH-TYPE kit enables detection of D-negative *RHD* alleles, such as *DEL* types, *RHDψ*, or *Cde*^{s}. RhCE antigens can also be crosschecked with this SSP kit.

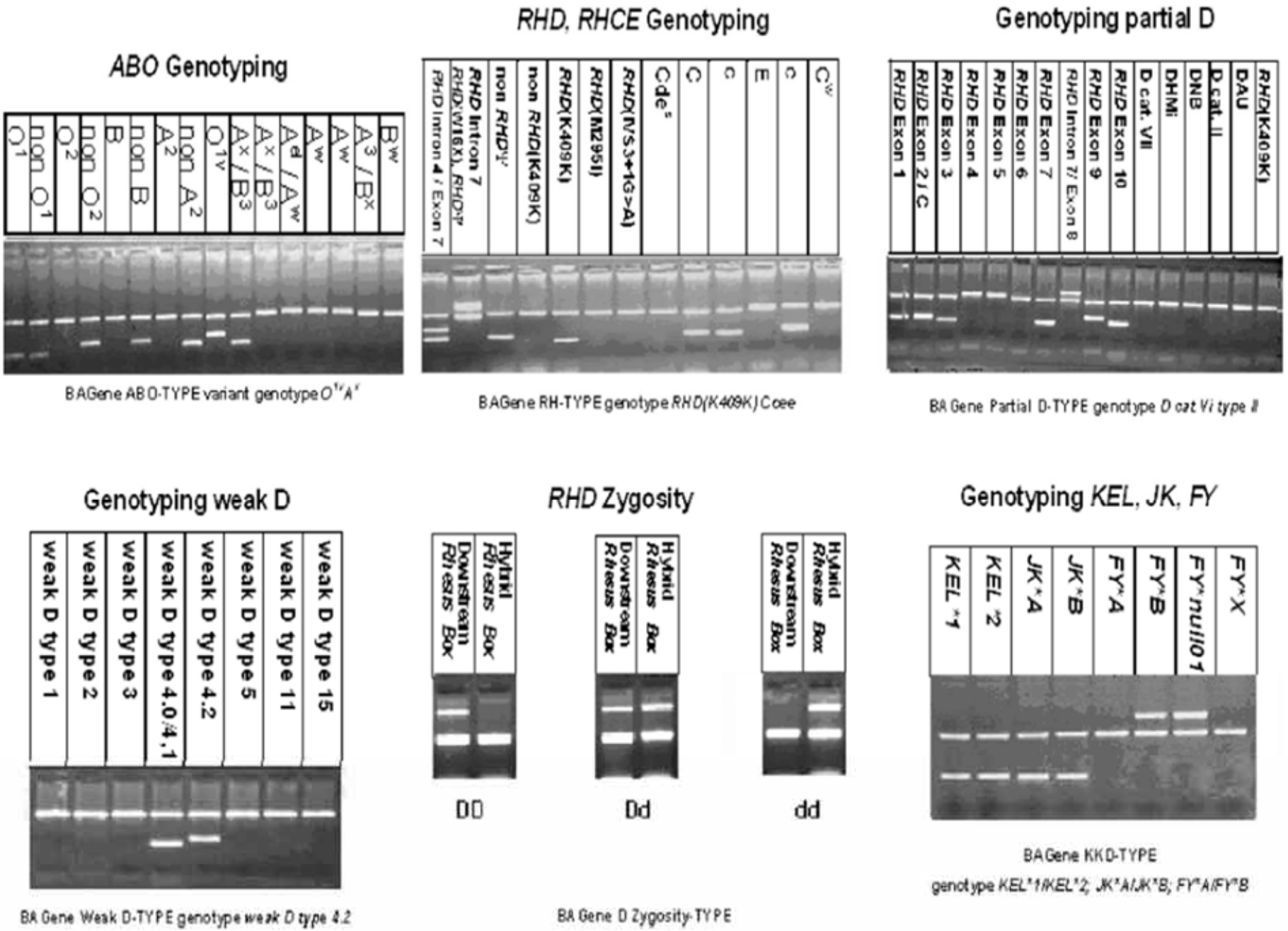
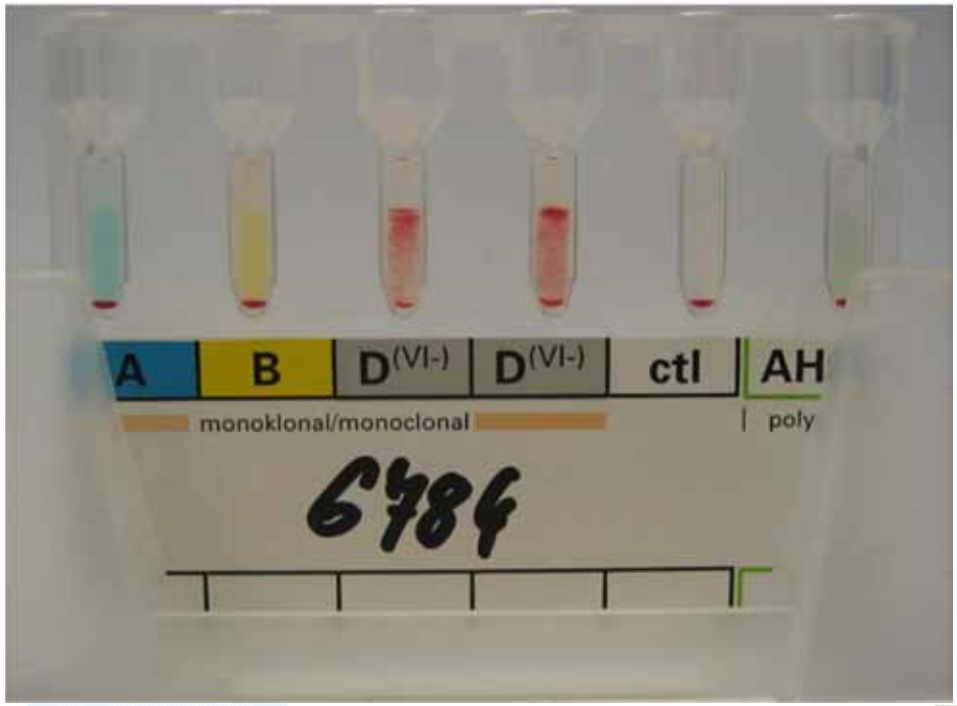
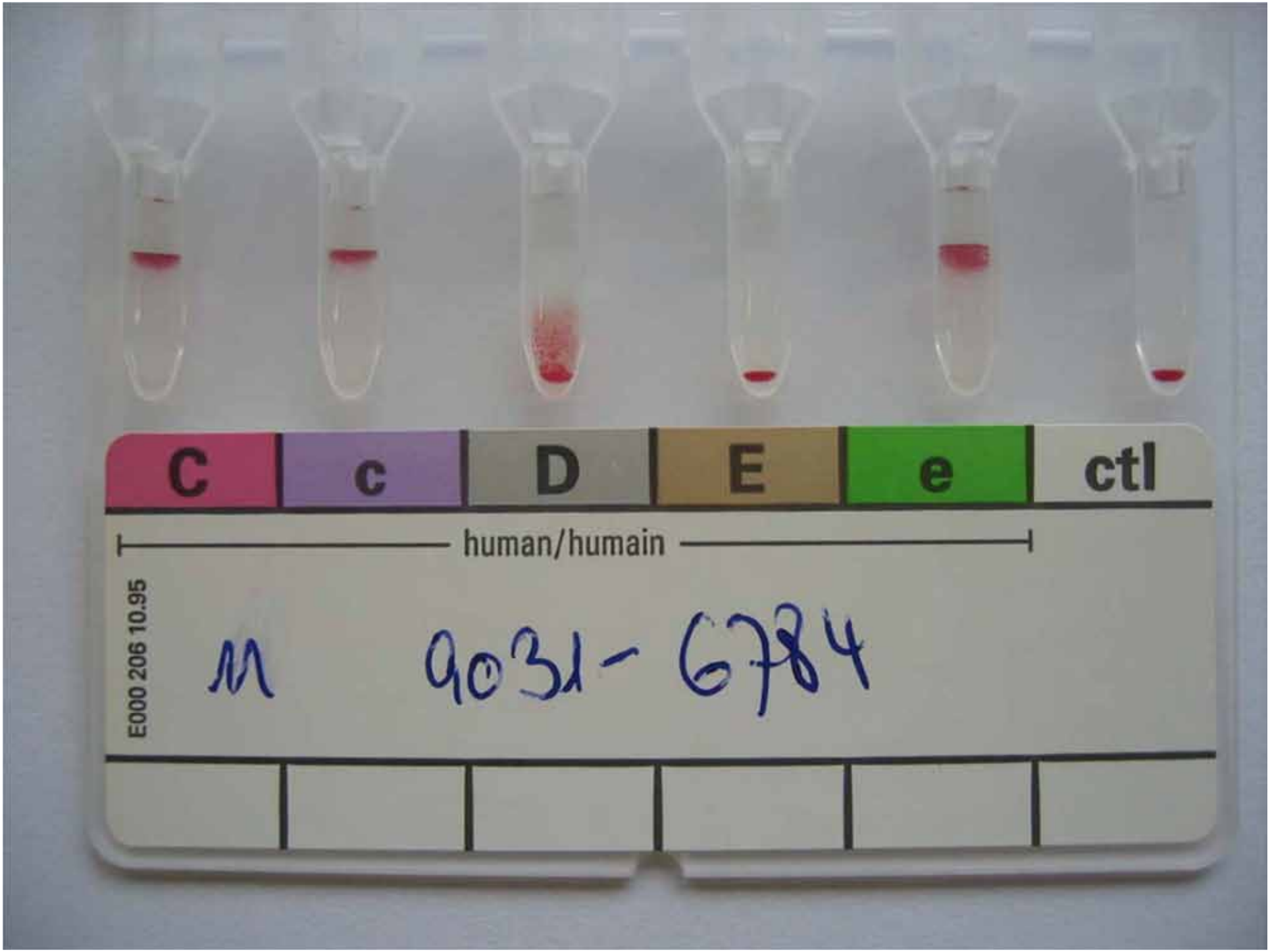
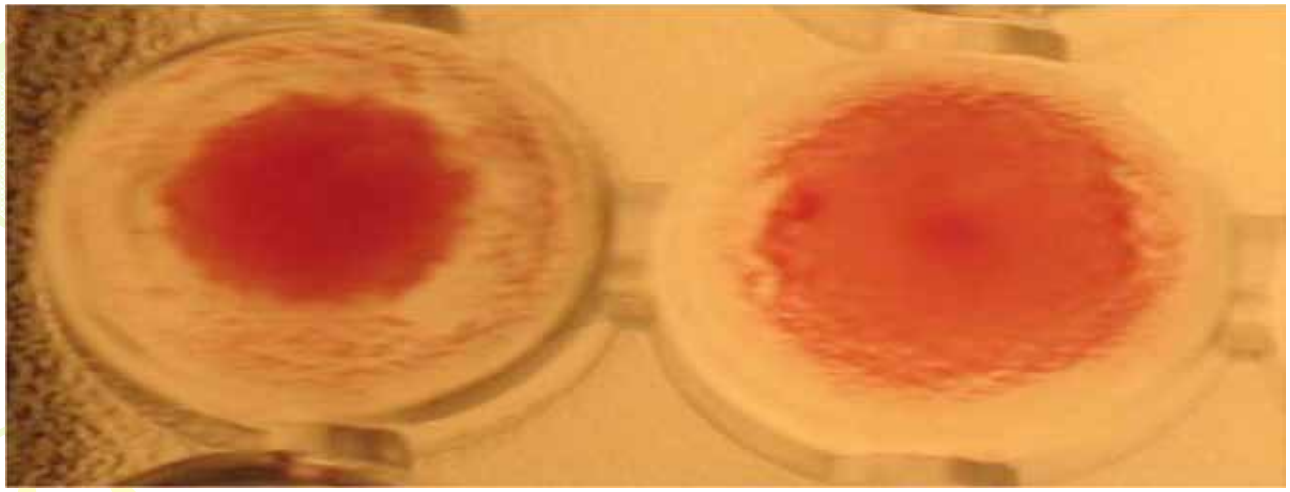


Fig. 1. Examples of gel pictures using BAGene PCR-SSP test kits for different applications.

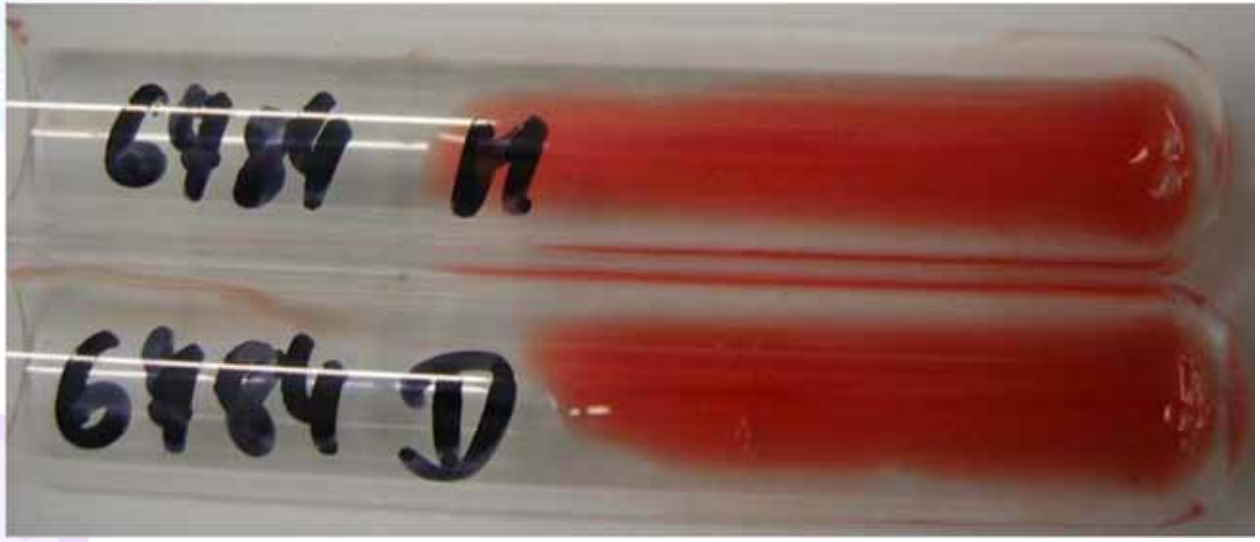


Rhesus D positive
CcD.ee Kell positive


C
c
D
E
e
ctl
human/humain
E000 206 10.95
M 9031-6784



Microwell-agglutination strength 1



Immediate spin-questionable agglutination with monoclonal anti-D

٩٥٣٨-٤٣٩

BAG HEALTH CARE

BAGene

CE LOT 0902 WD

IVD 2010-08

Weak D-TYPE

REF 6647

Worksheet und Auswertetabelle / *Worksheet and Evaluation diagram*

Reaktions-Nr. / *Reaction No.*	1	2	3	4	5	6	7	8
PCR-Produkt (Größe in bp) *PCR product (size in bp)*	150	126	165	101	130 83	112	198 83	153
weak D Allele / *weak D alleles*								
weak D type 1	+	–	–	–	–	–	–	–
weak D type 2	–	+	–	–	–	–	–	–
⇨ weak D type 3	–	–	+	–	–	–	–	–
weak D type 4.0, 4.1	–	–	–	+	–	–	–	–
weak D type 4.2, DAR	–	–	–	+	130	–	–	–
weak D type 5	–	–	–	–	–	+	–	–
weak D type 11 (haplotype cDe)	–	–	–	–	–	–	198	–
RHD(M295I) (haplotype $CD^{u}e$)	–	–	–	–	–	–	198	–
⇨ weak D type 15	–	–	–	–	–	–	–	+
weak D type 17	–	–	–	–	83	–	83	–
weak D type 4.2, 17	–	–	–	+	130 | 83	–	83	–
Weak D type 11 / *RHD*(M295I), 17	–	–	–	–	83	–	198 | 83	–
RHD pos. oder / or *RHD* neg.	–	–	–	–	–	–	–	–

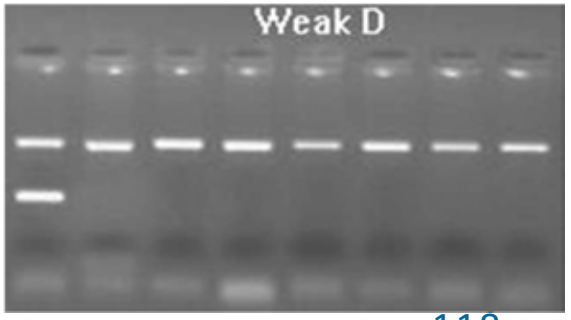
Ergebnis *Result*	1	2	3	4	5	6	7	8	Genotyp *Genotype*

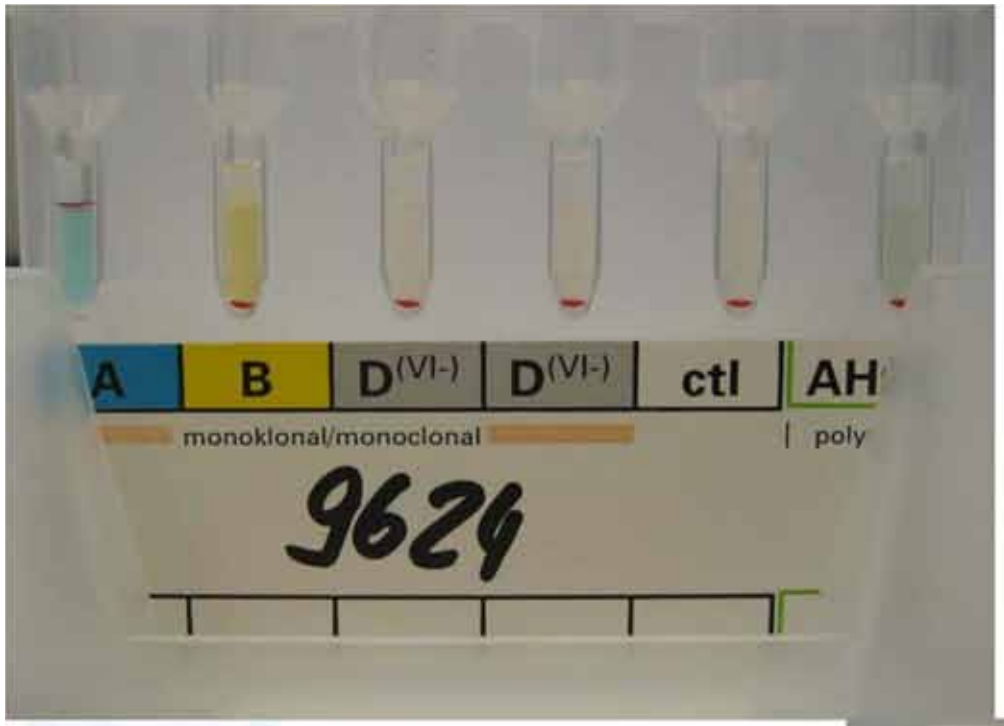
Ergebnis / Result: DW typ 1

Datum / Date: 22.10.04

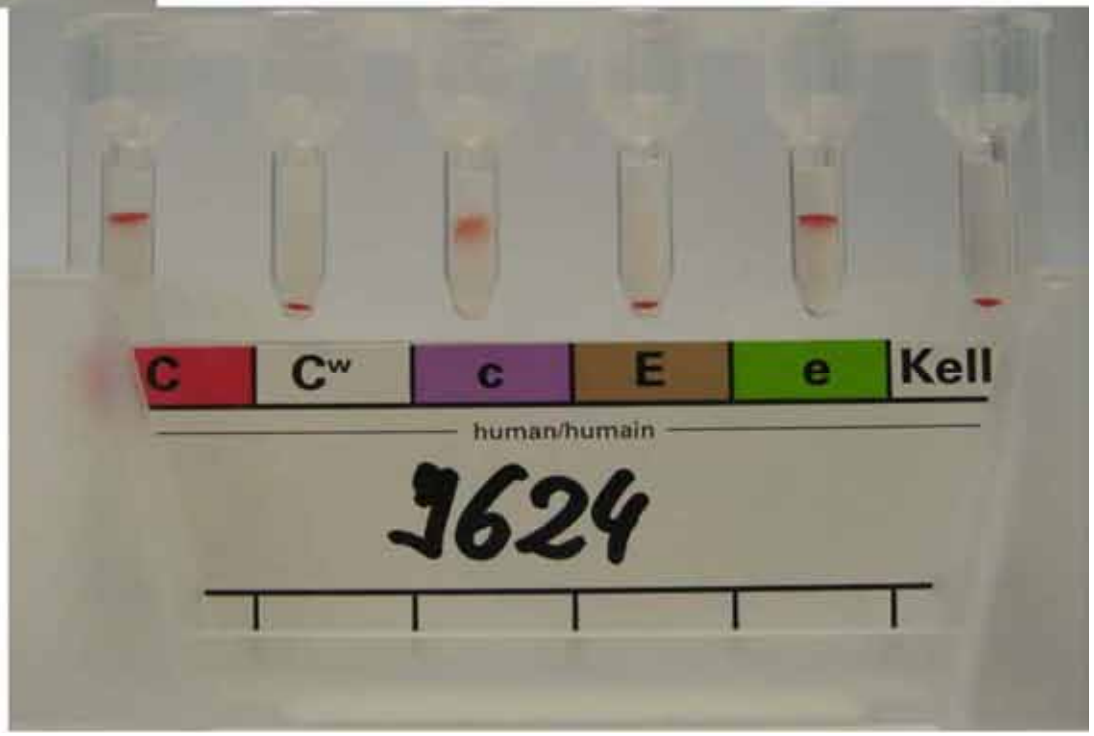
Unterschrift / Signature: Krämer P.

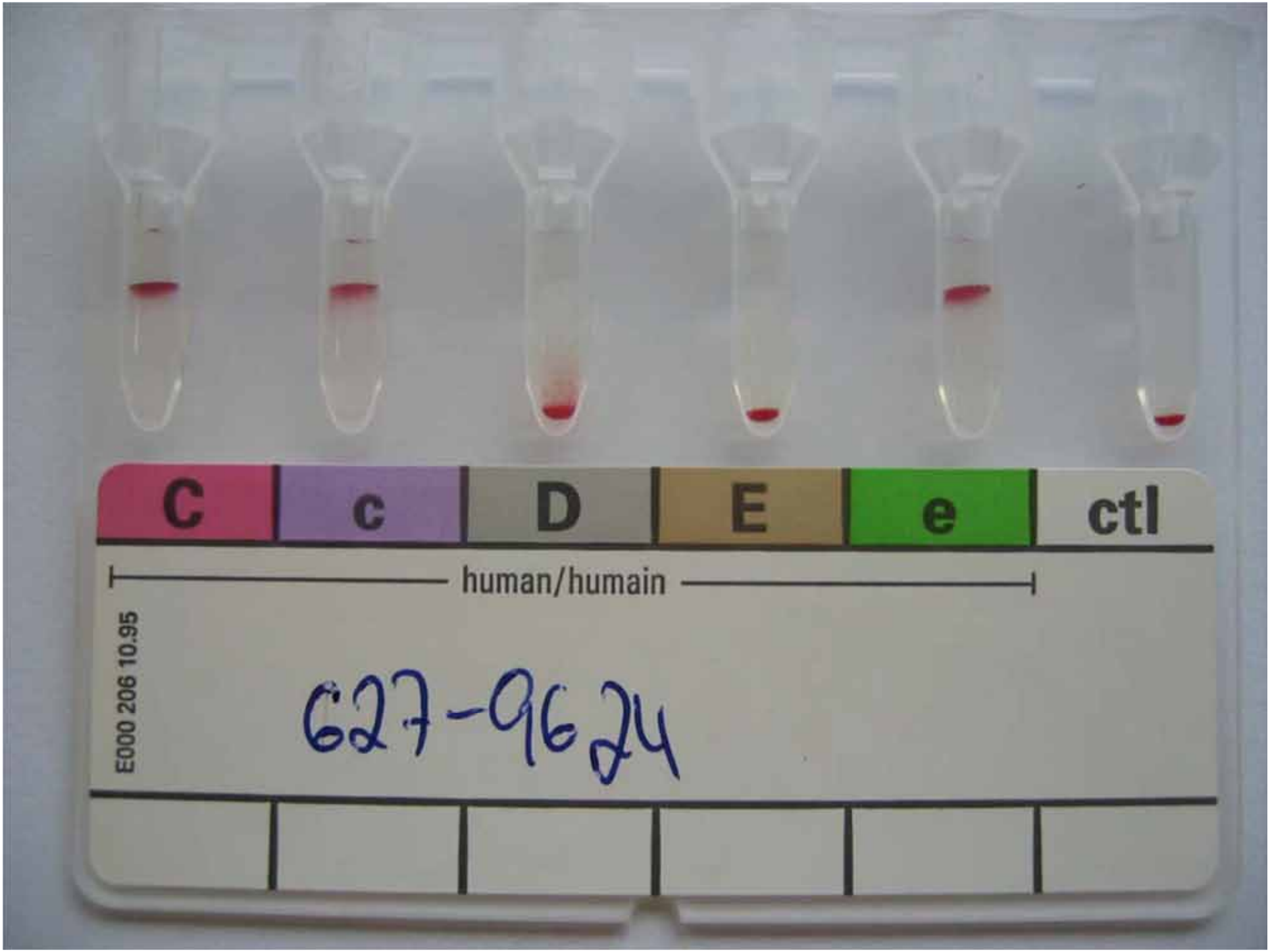
Weak D

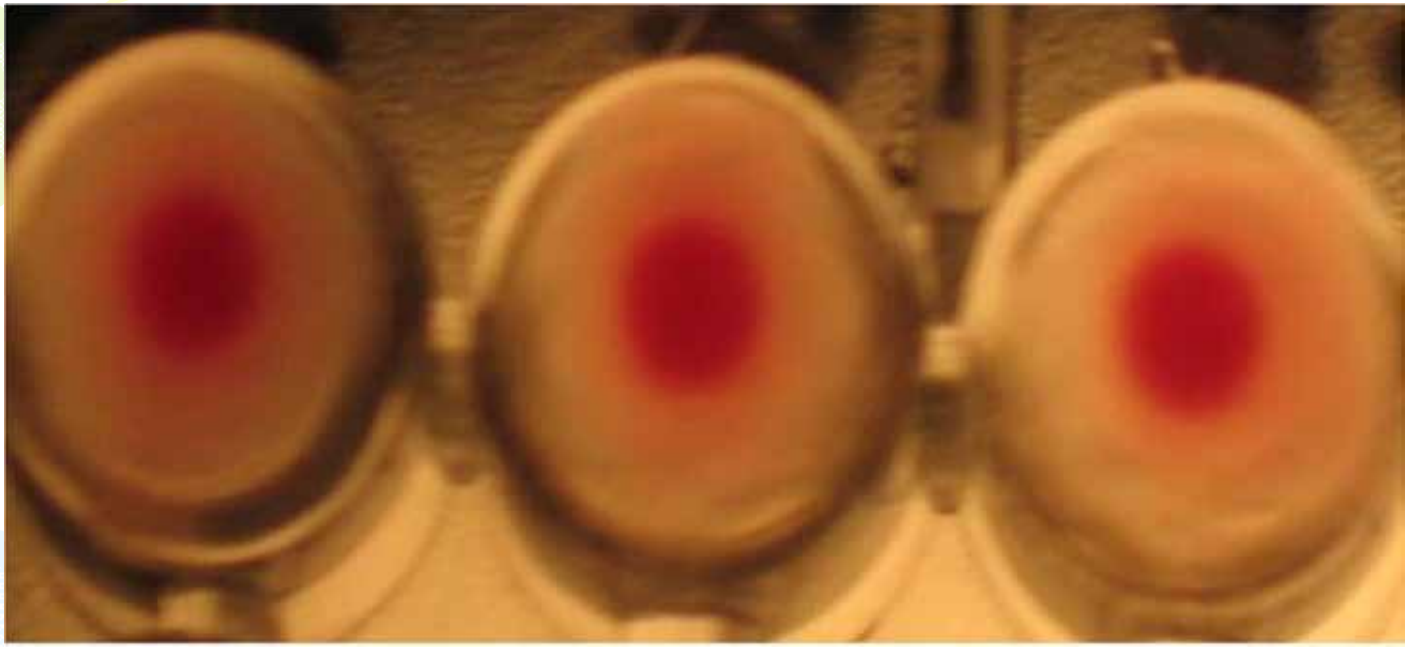




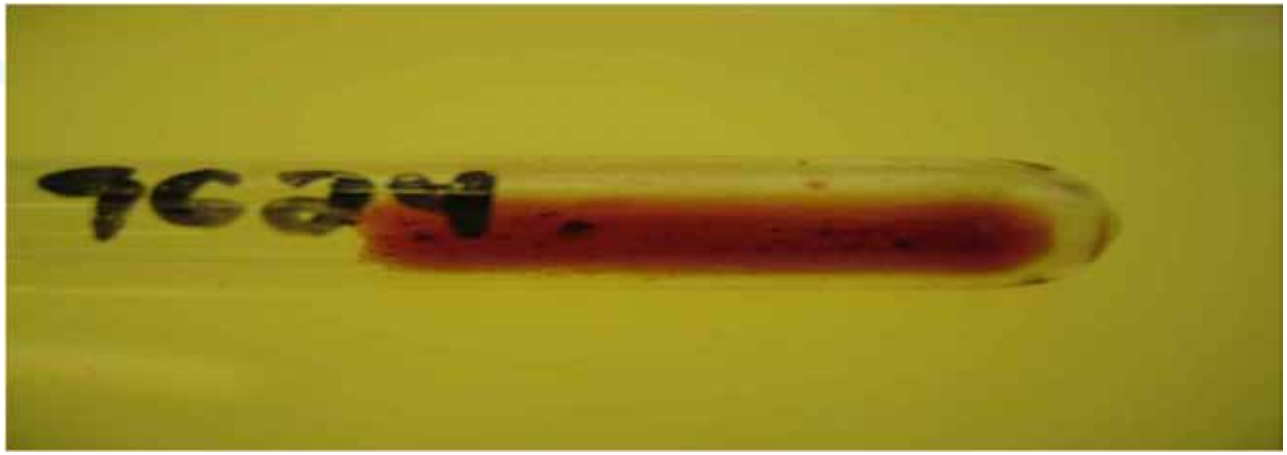
Rhesus D negative
Ccee Kell negative




C
c
D
E
e
ctl
human/humain
E000 206 10.95
627-9624



Microwell plate-negative



REF 6647

Weak D-TYPE

Worksheet und Auswertetabelle / *Worksheet and Evaluation diagram*

Reaktions-Nr. / *Reaction No.*	1	2	3	4	5	6	7	8
PCR-Produkt (Größe in bp) *PCR product (size in bp)*	150	126	165	101	130	112	198	153
weak D Allele / *weak D alleles*								
weak D type 1	+	–	–	–	–	–	–	–
weak D type 2	–	+	–	–	–	–	–	–
weak D type 3	–	–	+	–	–	–	–	–
weak D type 4.0, 4.1	–	–	–	+	–	–	–	–
weak D type 4.2, DAR	–	–	–	+	+	–	–	–
weak D type 5	–	–	–	–	–	+	–	–
weak D type 11 (haplotype cDe)	–	–	–	–	–	–	+	–
RHD(M295I) (haplotype CD_ele)	–	–	–	–	–	–	+	–
weak D type 15	–	–	–	–	–	–	–	+
RHD pos. oder / or *RHD* neg.	–	–	–	–	–	–	–	–

Ergebnis *Result*	1	2	3	4	5	6	7	8	Genotyp *Genotype*

Proben-ID / *Sample-ID:* 0627 9624

Name: Würster, Petra

Geb.-Datum / *Birthdate:*

Ergebnis / *Result:* => D. partial

Datum / *Date:* 25.10.04

Unterschrift / *Signature:* Würster

Gelbild / *Gel Picture*

BAGene

BAG HEALTH CARE

Partial D-TYPE

♦ Eine fehlende Bande in Reaktion Nr. 4 weist auf DFR (serologisch schwach D-positiv) oder RHD psi (hemi- bzw. homozygot, serologisch D-negativ) hin. Bei fehlender Information zur Serologie kann RHD psi mit BAGene RH-TYPE bestätigt oder ausgeschlossen werden.

♦ *A missing band in reaction no. 4 may indicate DFR (weak positive with anti-D) or RHD psi (hemi- or homozygous, D-negative in serology). If serological information is lacking, confirmation or exclusion of RHD psi can be obtained using BAGene RH-TYPE.*

CE LOT 0812 PD

IVD 2010-06

REF 6646

Worksheet und Auswertetabelle / *Worksheet and Evaluation diagram*

Reaktions-Nr. / *Reaction No.*		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
PCR-Produkt (Größe in bp) *PCR product (size in bp)*		134	146	118	135	132	132	120	673	184	132	166	107	117	129	140
RHD Exons * Mix & Intron 7/Exon 8	Haplotyp *Haplotype*	D_1	D_2 / C^x	D_3	D_4	D_5	D_6	D_7	D_{1-6}*	D_9	D_{10}	D_{11}	D_{12}	D_{13}	D_{14}	D_{15}
Spezifität / *Specificity*		Standard *RHD*														
D-positive		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
		RHD negative														
D-negative, cc		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D-negative, Cc oder / or CC		−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		RHD Varianten / *RHD Variants*														
D cat. II **	cDe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	−
D cat.IIIa, IIIc, III type 4 **	cDe, cDe, cDe	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
D cat. IIIb **	cDe	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
D cat. IVa **	cDe	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	−
D cat. IVb, IVb(ß **	cDe	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−
D cat. IV type 3	cDe	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
D cat. IV type 4	cDe	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	−	−	−	+	−
D cat. Va, Va-like, Va-associated, DBS	cDe	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
D cat. VI type 1	cDE	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
D cat. VI type 2	cDe	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−
D cat. VI type 3	cDe	+	+	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	−
D cat. VI type 4 [DHMi] **	cDe, cDE	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
D cat. VII	cDe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
DAR (weak D-Type 4.2)	cDe	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−
DAU	cDe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+
DBT type 1		+	+	+	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−
DBT type 2 **	cDe	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
DFR ♦ oder / or *RHD psi*		+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
DHMI	cDE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−
DNB	cDe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−
RHCE-D(5)-CE (DHAR (Rh33))	cDe	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
RHCE(1-9)-D(10)	cdE	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
RHD-CE(2-9)-D	Cde	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
RHD-CE(3-7)-D dil'Ice'	Cde	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−
RHD-CE(4-7)-D	cdE	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−
RHD-CE(8-9)-D	Cde	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−
RHD(del Ex9)	CDe	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−
RHD(Q41X) **	Cde	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
DCS, (DAV, DHR, DIM, DNU) **	d'emi / variant	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−

n.t. = not tested currently

Ergebnis *Result*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Phänotyp *Phenotype*	Genotyp *Genotype*

Proben-ID / *Sample-ID:* 0627 9624

Name: Würster, Petra

Geb.-Datum / *Birthdate:*

Ergebnis / *Result:* D. VI

Datum / *Date:* 26.10.04

Unterschrift / *Signature:* Wäster

Gelbild / *Gel Picture*

Τελικό αποτέλεσμα

- D κατηγορία VI τύπος II
- Χρειάζεται προφύλαξη Rhesus
- Απαιτείται μετάγγιση με Rhesus αρνητικά

Arigato
Gracias
Thank You
T.U.
T.U.
Merci
Danke
Grazie