



FIGURE 1-1 A comparison of anticoagulated blood and clotted blood. Test tube A contains anticoagulated whole blood. Plasma is separated from the formed elements. Test tube B contains clotted blood. The clot is cellular components enmeshed in fibrin. The liquid portion is serum.

Source: Delmar, Cengage Learning




Gli anticorpi anti-eritrociti, clinicamente significativi, causano la morte prematura di tali cellule, inducendo iperemolisi.



Gli anticorpi anti-eritrociti, clinicamente significativi, causano la morte prematura di tali cellule, inducendo iperemolisi.

Tali anticorpi diretti contro antigeni di superficie eritrocitaria, sospesi in vitro in soluzione fisiologica, possono produrre agglutinazione delle emazie: in questo caso sono detti “agglutinanti”.



Al contrario, anticorpi anti-eritrociti incapaci di determinare tale fenomeno, sono chiamati “non-agglutinanti”, o “sensibilizzanti”.



Al contrario, anticorpi anti-eritrociti incapaci di determinare tale fenomeno, sono chiamati “non-agglutinanti”, o “sensibilizzanti”.

L’attività agglutinante di un sistema non è unicamente legata al tipo molecolare degli anticorpi.

Assumono, difatti, un ruolo significativo il numero e la quantità delle strutture reattive dell’antigene verso cui l’anticorpo è diretto.



Al contrario, anticorpi anti-eritrociti incapaci di determinare tale fenomeno, sono chiamati “non-agglutinanti”, o “sensibilizzanti”.

L'attività agglutinante di un sistema non è unicamente legata al tipo molecolare degli anticorpi.

Assumono, difatti, un ruolo significativo il numero e la quantità delle strutture reattive dell'antigene verso cui l'anticorpo è diretto.

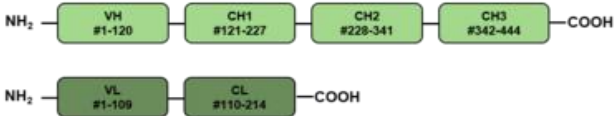
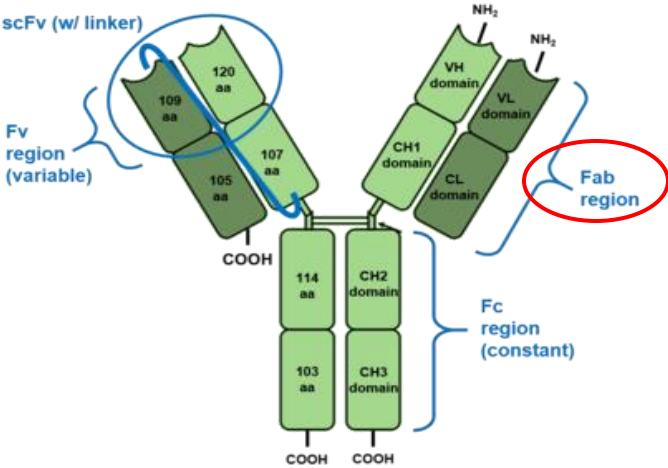
Tuttavia, molto schematicamente, si può affermare che gli anticorpi di classe IgM sono generalmente agglutinanti, mentre gli anticorpi di classe IgG non lo sono.

Questi anticorpi sono delle molecole IgG che attaccano un solo frammento Fab al sito antigenico delle emazie;

l'altro frammento Fab resta libero e a causa della distanza delle cellule non può attaccarsi all'antigene di un'altra cellula.

Anatomy of an IgG

(residue numberings are approximate)



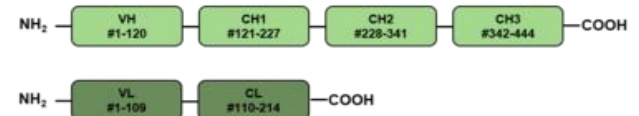
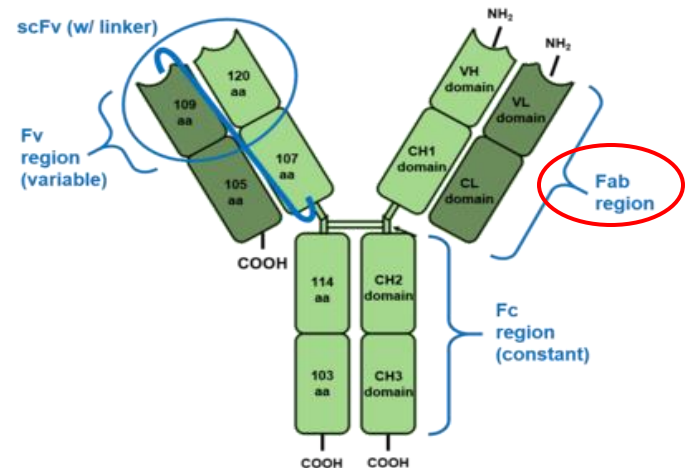
Questi anticorpi sono delle molecole IgG che attaccano un solo frammento Fab al sito antigenico delle emazie;

l'altro frammento Fab resta libero e a causa della distanza delle cellule non può attaccarsi all'antigene di un'altra cellula.

→ l'agglutinazione non avviene

Anatomy of an IgG

(residue numberings are approximate)



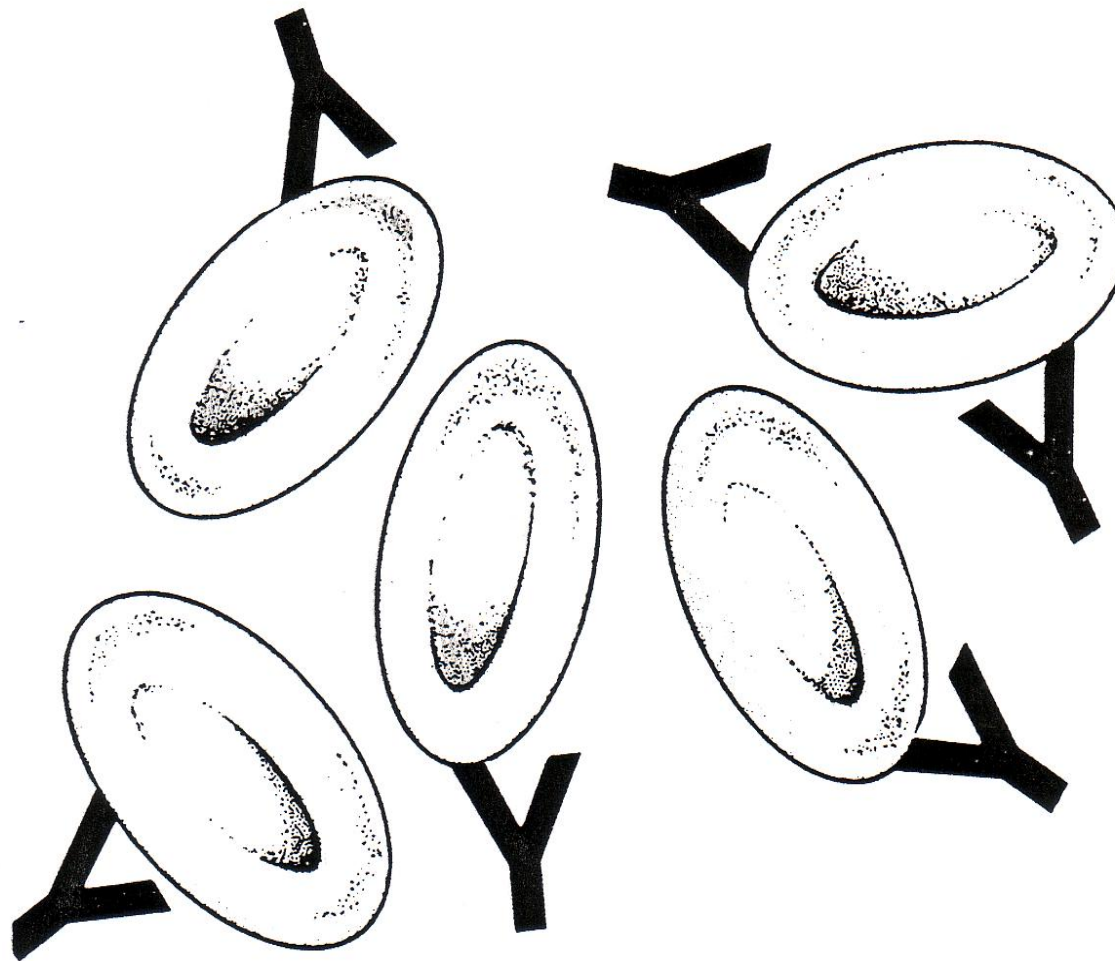


Figura 1.6A Illustrazione della sensibilizzazione di globuli rossi da parte di anticorpi IgG. Come mostrato le cellule sensibilizzate portano alla loro superficie anticorpi attaccati per un solo sito combinatorio.

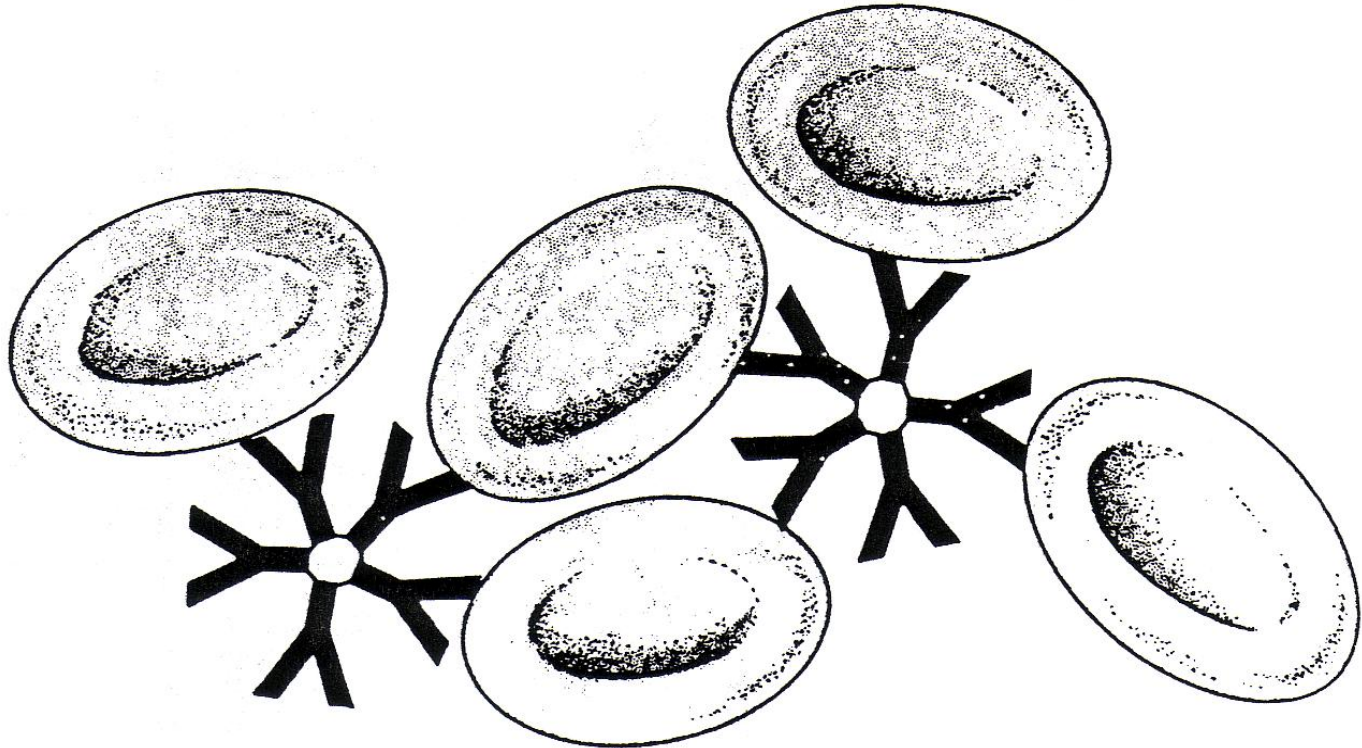


Figura 1.6J Nel caso di anticorpi IgM la reazione di agglutinazione non richiede che venga modificata la distanza tra i globuli essendo le molecole degli anticorpi sufficienti a coprire la distanza tra le cellule sospese in soluzione fisiologica.



Gli anticorpi anti-eritrociti che non agglutinano direttamente le cellule sono detti *anticorpi incompleti o anticorpi sensibilizzanti*

Le cellule che portano questi anticorpi sulla loro superficie sono dette:

cellule sensibilizzate.

Gli anticorpi anti-eritrociti che non agglutinano direttamente le cellule sono detti *anticorpi incompleti o anticorpi sensibilizzanti*

Le cellule che portano questi anticorpi sulla loro superficie sono dette:

cellule sensibilizzate.

Per evidenziare la reazione antigene anticorpo è necessario usare la tecnica dell'antiglobulina o impiegare soluzioni che cambino il mezzo di reazione.

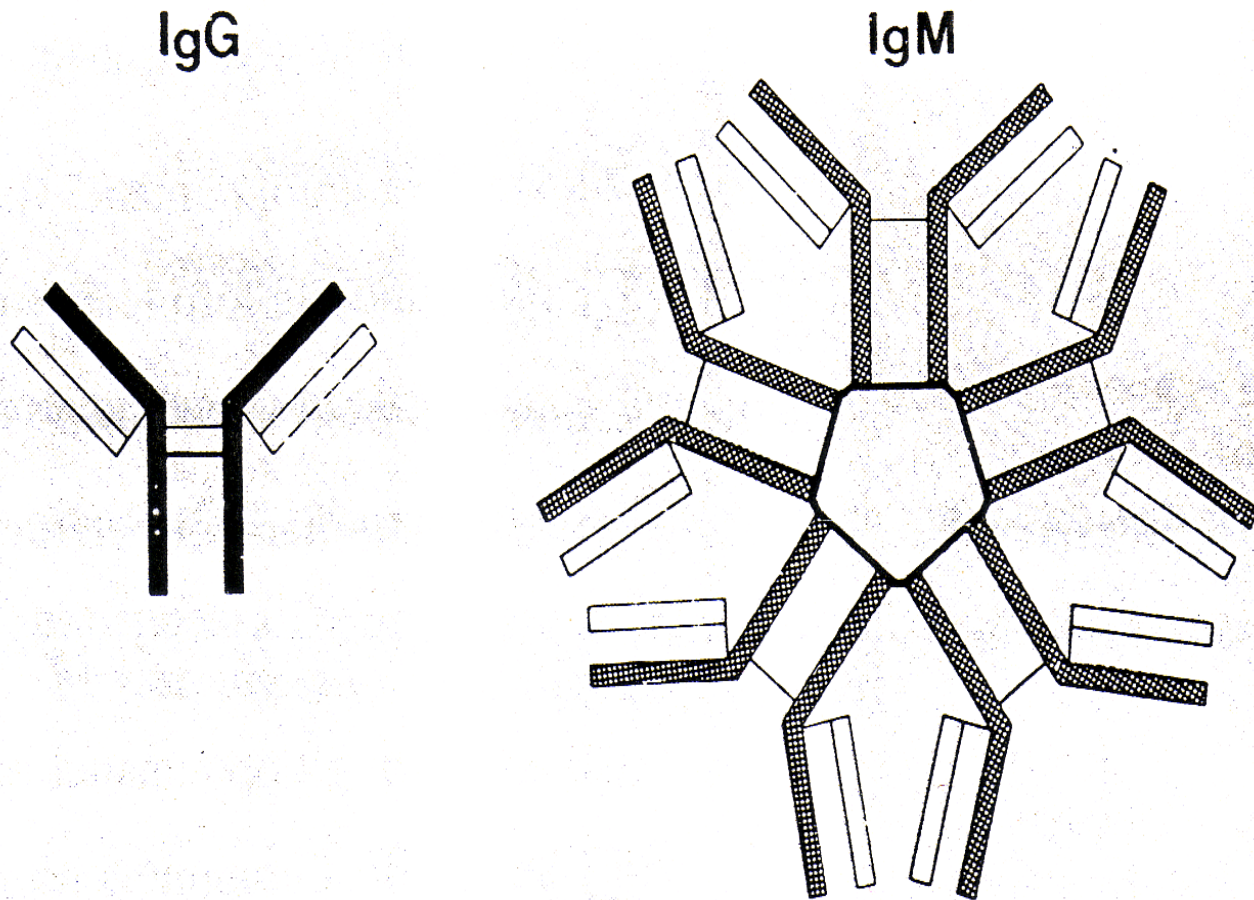


Figura 1.3C Struttura semplificata delle molecole IgG e IgM.

Il test dell'antiglobulina si basa sui seguenti principi:

Gli anticorpi e i componenti del complemento sono delle globuline.

Il test dell'antiglobulina si basa sui seguenti principi:

Gli anticorpi e i componenti del complemento sono delle globuline.

L'iniezione ad un animale da esperimento (solitamente il coniglio) di immunoglobuline umane induce una risposta anticorpale specifica,

così che il siero animale conterrà anticorpi anti-globuline umane.

Il test dell'antiglobulina si basa sui seguenti principi:

Gli anticorpi e i componenti del complemento sono delle globuline.

L'iniezione ad un animale da esperimento (solitamente il coniglio) di immunoglobuline umane induce una risposta anticorpale specifica, così che il siero animale conterrà anticorpi anti-globuline umane

(AHG= Anti Human Globulin)

Questi anticorpi sono in grado di reagire in modo specifico con le globuline umane.

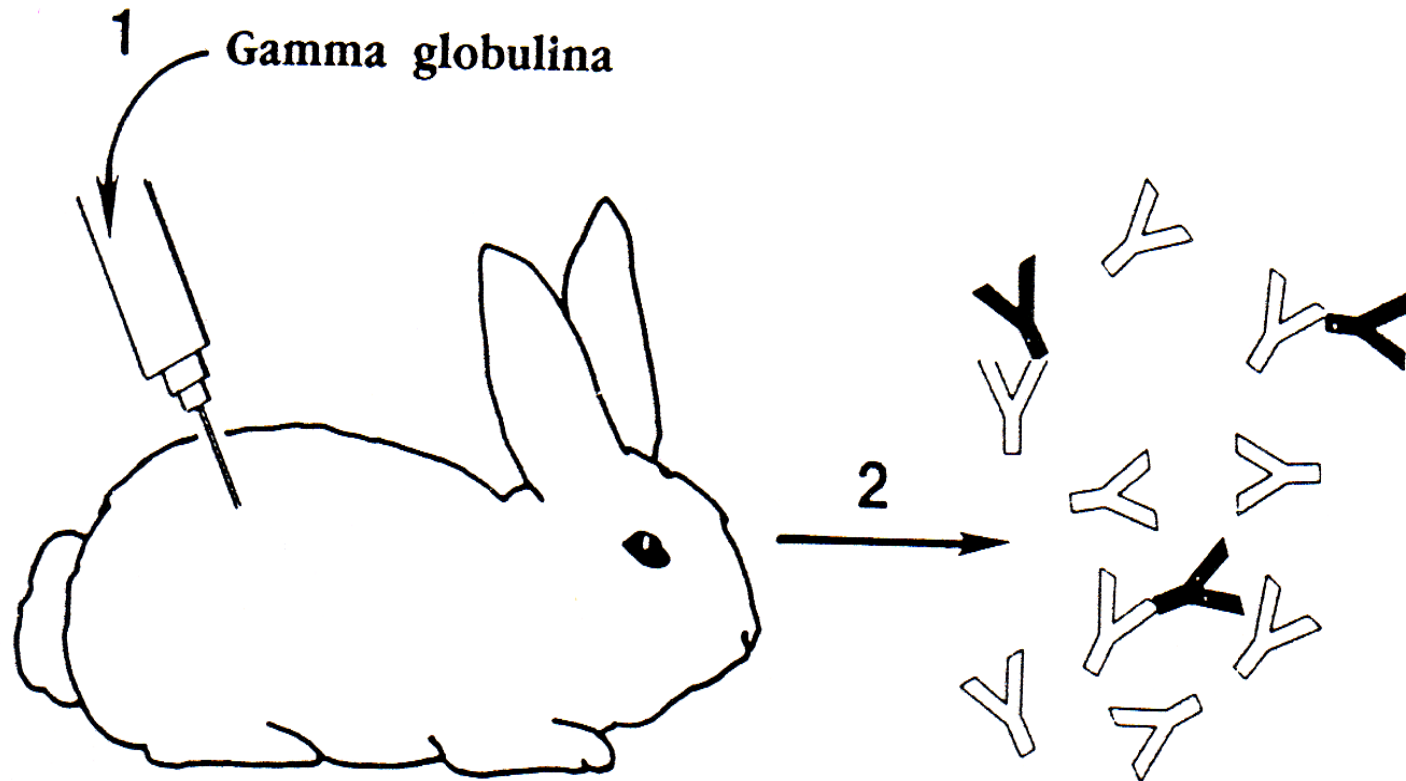




Figura 1.6D La produzione del siero anti-globuline umane. (1) Gamma globuline umane purificate vengono iniettate nel coniglio. (2) Il sistema immune del coniglio riconosce le IgG umane come estranee e produce anticorpi anti-IgG umane (schematizzati col simbolo vuoto).




Ovviamente, variando l'antigene, possono essere prodotti sieri con diverse specificità anticorpali,



Ovviamente, variando l'antigene, possono essere prodotti sieri con diverse specificità anticorpali,

tuttavia quelle contenute nel “siero anti-immunoglobuline umane”, di comune impiego, sono contro le IgG e contro alcune componenti del complemento,



Ovviamente, variando l'antigene, possono essere prodotti sieri con diverse specificità anticorpali,

tuttavia quelle contenute nel “siero anti-immunoglobuline umane”, di comune impiego, sono contro le IgG e contro alcune componenti del complemento,

dato che sulla superficie del globulo rosso, come proteina sensibilizzante, può esserci una componente del complemento in associazione o in alternativa all'immunoglobulina.

Attualmente per la produzione di tali sieri vengono impiegate le tecniche con ibridomi

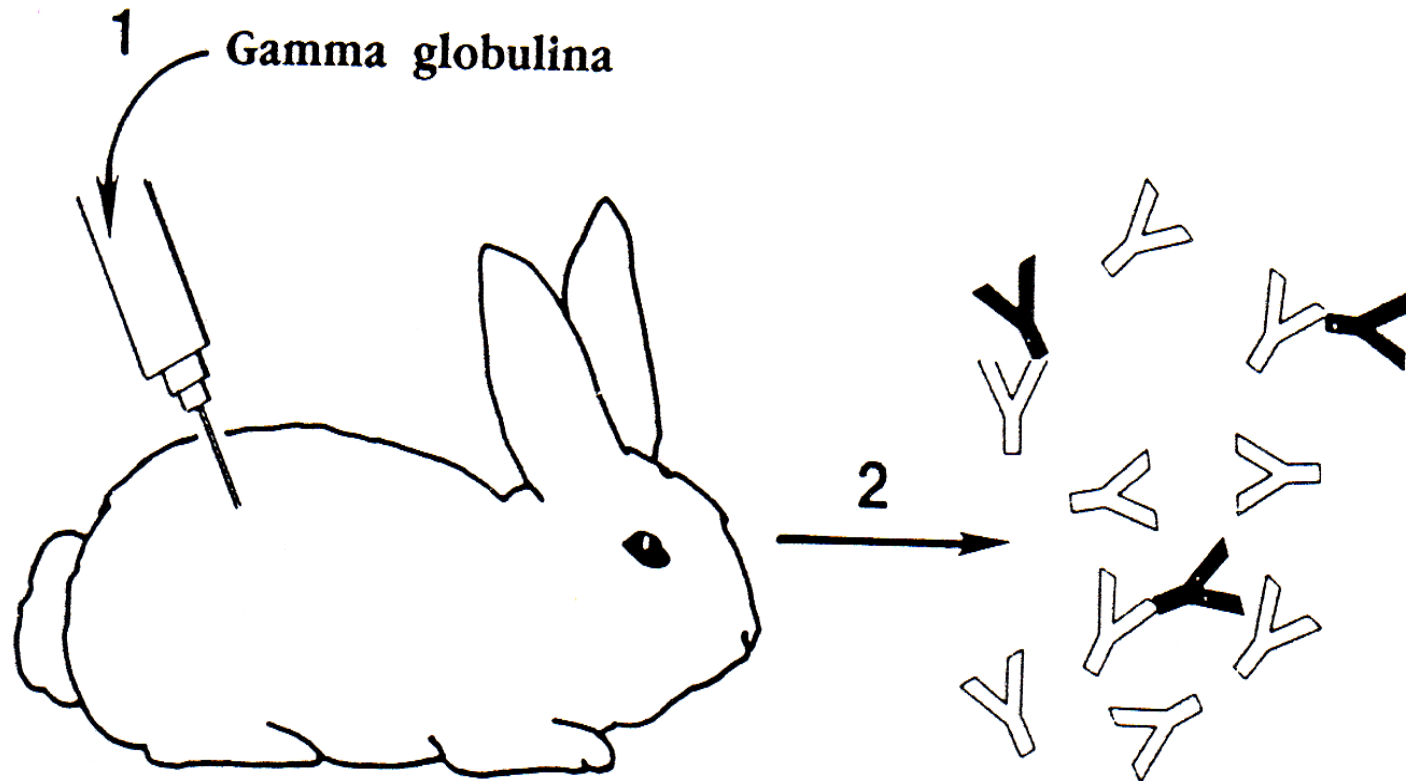


Figura 1.6D La produzione del siero anti-globuline umane. (1) Gamma globuline umane purificate vengono iniettate nel coniglio. (2) Il sistema immune del coniglio riconosce le IgG umane come estranee e produce anticorpi anti-IgG umane (schematizzati col simbolo vuoto).

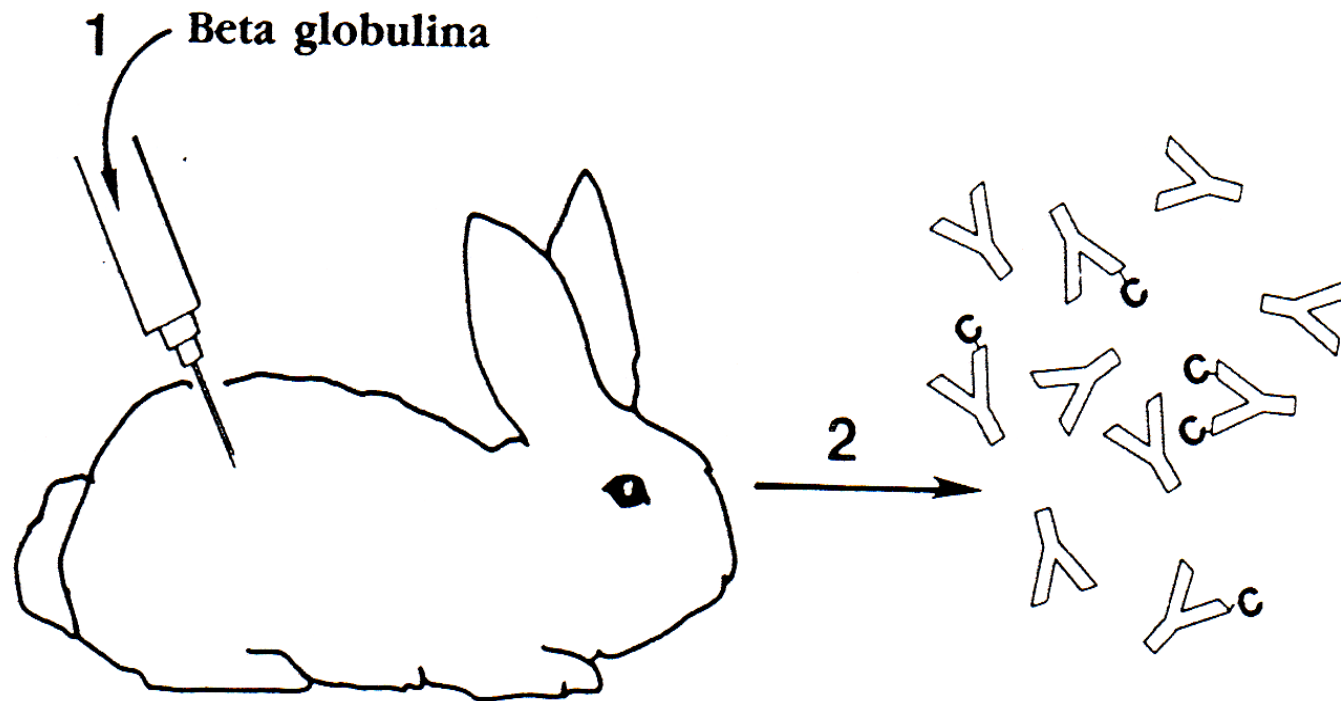


Figura 1.6E La produzione del siero antiglobulina umana specifico per il complemento. (1) Beta globuline umane purificate vengono iniettate nel coniglio. (2) Il sistema immunitario del coniglio riconosce le beta globuline umane come estranee e produce anticorpi che reagiscono specificatamente col complemento, l'unica betaglobulina verosimilmente presente sulla superficie cellulare.




Test di Coombs Diretto(TCD)

Serve a svelare la presenza di anticorpi incompleti e/o frazioni del complemento adesi alle emazie.




L'evidenziazione di una sensibilizzazione “in vivo” richiede che vengano rimosse le globuline libere e che venga aggiunto il siero antiglobulina.



L'evidenziazione di una sensibilizzazione “in vivo” richiede che vengano rimosse le globuline libere e che venga aggiunto il siero antiglobulina.

Tale procedura è detta:

- Test dell'antiglobulina diretto
- o Test di Coombs diretto



L'introduzione del siero antiglobuline umano nel 1945 (Coombs RRA, Mourant AE, Race RR, *A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. Br J Exp Path* 1945, 26 255-66) ha rappresentato una pietra miliare nell'evoluzione della diagnostica immunoematologica.

Il **siero di Coombs** è un siero antiglobuline umano che, fissandosi in maniera specifica sulla porzione Fc degli anticorpi IgG umani adesi alle emazie sensibilizzate, rende possibile evidenziare, con la creazione di questi "ponti" immunologici, l'avvenuta reazione antigene-anticorpo mediante il rilievo dell'emoagglutinazione.

Il **siero di Coombs** è un siero antiglobuline umano che, fissandosi in maniera specifica sulla porzione Fc degli anticorpi IgG umani adesi alle emazie sensibilizzate, rende possibile evidenziare, con la creazione di questi "ponti" immunologici, l'avvenuta reazione antigene-anticorpo mediante il rilievo dell'emoagglutinazione.



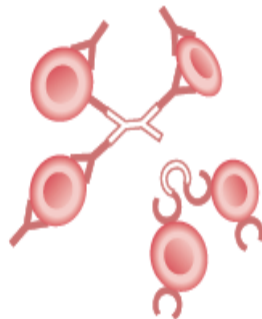
Il **siero di Coombs** è un siero antiglobuline umano che, fissandosi in maniera specifica sulla porzione Fc degli anticorpi IgG umani adesi alle emazie sensibilizzate, rende possibile evidenziare, con la creazione di questi "ponti" immunologici, l'avvenuta reazione antigene-anticorpo mediante il rilievo dell'emoagglutinazione.



GR con IgG (Y) o C3 (C) legato alla membrana



Incubazione con anticorpi a Ig (X) e C3 (C) umani



Agglutinazione (test di Coombs diretto positivo)



Siero del paziente con IgG (Y)



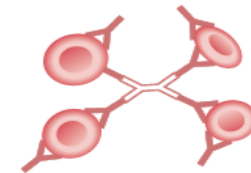
Incubazione con GR reagenti



Legame di qualsiasi IgG ai GR reagenti



Incubazione con anticorpi a Ig (X) umani



Agglutinazione (test di Coombs indiretto positivo)

La storia di Carlo Moreschi

30

- ❖ **Carlo Moreschi nacque il 28 febbraio 1876** a Cermenate, in provincia di Como. Frequentò la scuola a Bergamo e in seguito a Milano, conseguendo brillantemente tutte le promozioni. Si iscrisse nel 1894 alla facoltà di medicina di Pavia.
- ❖ Cominciò a frequentare come allievo interno il laboratorio di patologia generale diretto da Camillo Golgi, assimilandone il metodo rigoroso e cominciando a pubblicare alcuni lavori scientifici.
- ❖ Dopo la laurea, conseguita nel 1900, divenne assistente alla cattedra di patologia medica dimostrativa nell'istituto diretto da Luigi Devoto e cominciò ad occuparsi di ricerche immunologiche.



La storia di Carlo Moreschi

31

- ❖ Nel 1904, grazie a un sussidio messo a disposizione dalla Cassa di risparmio delle province lombarde, si presentò al giovane scienziato l'opportunità di partire per la Germania per perfezionarsi nell'istituto di Igiene di Königsberg.
- ❖ Moreschi affrontò anni di intenso lavoro, difficili dal punto di vista economico, trascorsi con la costante preoccupazione di dover interrompere ricerche ormai avviate, portate poi a termine grazie a un nuovo sussidio messo a disposizione nel 1906.
- ❖ Una stabilità lavorativa sembrava tuttavia ancora lontana, mentre il desiderio di una sistemazione si era fatto più pressante a causa del fidanzamento con una giovane berlinese, Carlotta Mühsam, che sposò nel 1909 e dalla quale ebbe due figlie.



La storia di Carlo Moreschi

32

- ❖ Durante gli anni trascorsi in Germania, l'attenzione di Moreschi si rivolse soprattutto all'immunologia, studiando **la natura del complemento** e dei meccanismi di azione delle sostanze che sembravano in grado di inibirne o neutralizzarne l'azione.
- ❖ **Nel 1907** pubblicò «Nuovi contributi allo studio dei sieri emolitici: di una sostanza di produzione immunizzatoria che accelera l'emolisi».
- ❖ **Nel 1908** pubblicò in tedesco un lavoro fondamentale «Neue Tatsachen über die Blutkörperchenagglutination» che precedette le ricerche di Robin Coombs sull'agglutinazione dei globuli rossi. Lo stesso Coombs, **nel 1945**, avrebbe ricordato le ricerche di Moreschi e **il test dell'antiglobulina** assunse il nome di **test di Moreschi Coombs**.



La reazione, nel test dell'antiglobulina, avviene nel modo seguente:

l'anti-IgG si lega alla porzione Fc dell'anticorpo sensibilizzante il globulo rosso;

La reazione, nel test dell'antiglobulina, avviene nel modo seguente:

l'anti-IgG si lega alla porzione Fc dell'anticorpo sensibilizzante il globulo rosso;

i due Fab dell'anticorpo anti-immunoglobulina umana, legandosi a siti presenti su globuli rossi diversi, ma adiacenti e ricoperti di IgG, formano un ponte;

La reazione, nel test dell'antiglobulina, avviene nel modo seguente:

l'anti-IgG si lega alla porzione Fc dell'anticorpo sensibilizzante il globulo rosso;

i due Fab dell'anticorpo anti-immunoglobulina umana, legandosi a siti presenti su globuli rossi diversi, ma adiacenti e ricoperti di IgG, formano un ponte;

il risultato di tali legami e la produzione di agglutinazione delle emazie.

La reazione, nel test dell'antiglobulina, avviene nel modo seguente:

l'anti-IgG si lega alla porzione Fc dell'anticorpo sensibilizzante il globulo rosso;

i due Fab dell'anticorpo anti-immunoglobulina umana, legandosi a siti presenti su globuli rossi diversi, ma adiacenti e ricoperti di IgG, formano un ponte;

il risultato di tali legami è la produzione di agglutinazione delle emazie.

L'intensità di tale reazione è proporzionale alla quantità di Ig legate.

La reazione, nel test dell'antiglobulina, avviene nel modo seguente:

l'anti-IgG si lega alla porzione Fc dell'anticorpo sensibilizzante il globulo rosso;

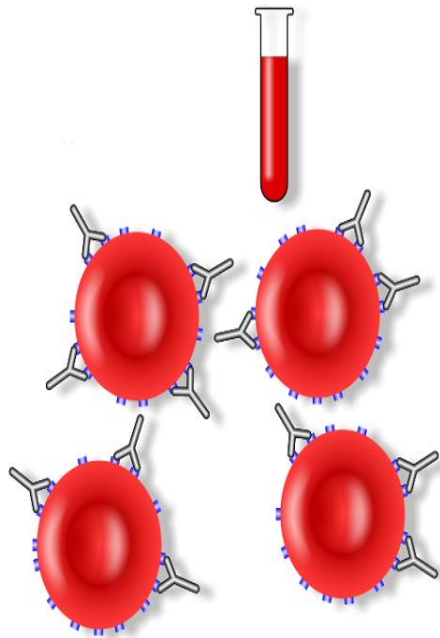
i due Fab dell'anticorpo anti-immunoglobulina umana, legandosi a siti presenti su globuli rossi diversi, ma adiacenti e ricoperti di IgG, formano un ponte;

il risultato di tali legami è la produzione di agglutinazione delle emazie.




L'intensità di tale reazione è proporzionale alla quantità di Ig legate.

Ovviamente, globuli rossi, che non presentano IgG sulla superficie, non possono essere agglutinati.

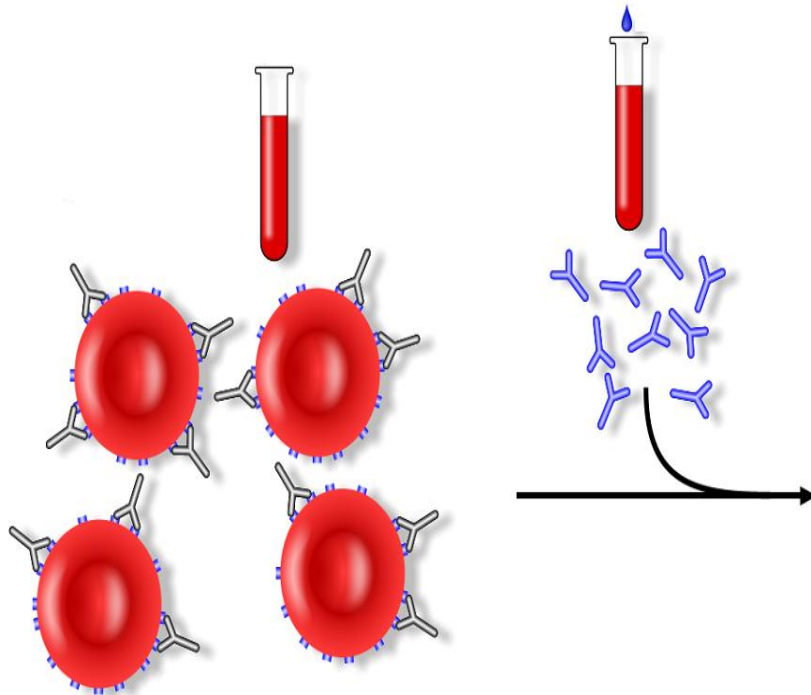
Test di Coombs Diretto



Blood sample from a patient with immune mediated haemolytic anaemia: antibodies are shown attached to antigens on the RBC surface.




Legend	
	Antigens on the red blood cell's surface
	Human anti-RBC antibody
	Antihuman antibody (Coombs reagent)

Test di Coombs Diretto

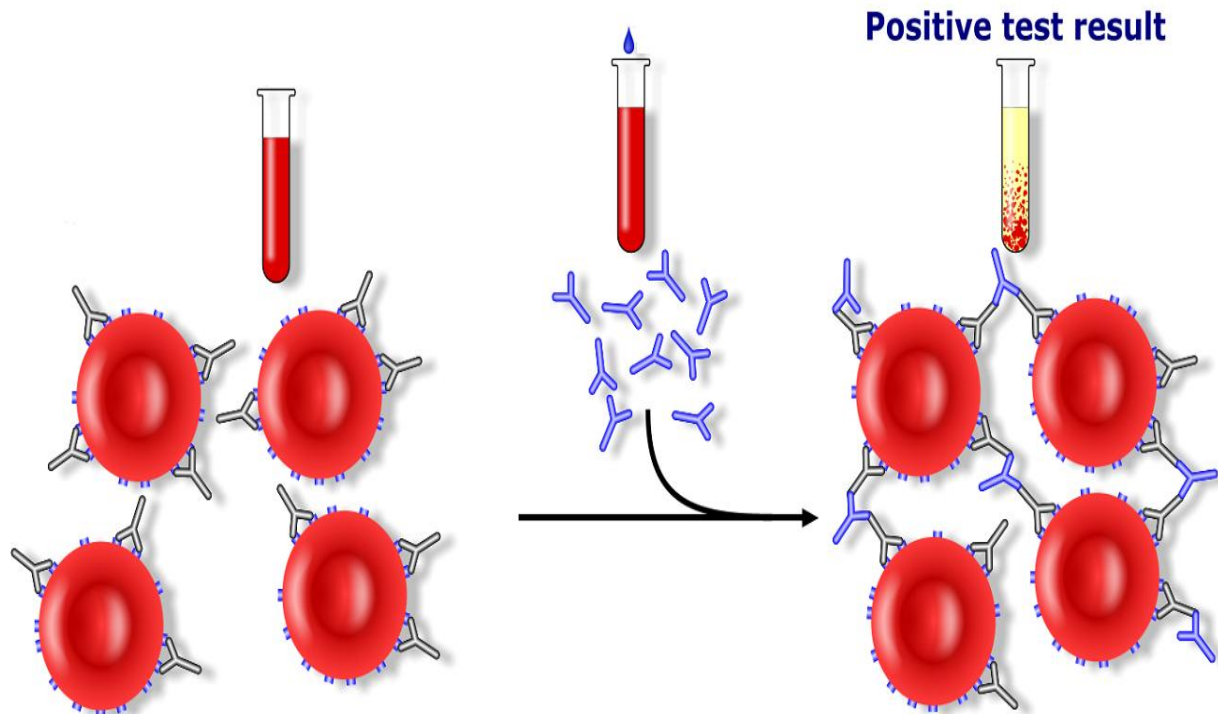


Blood sample from a patient with immune mediated haemolytic anaemia: antibodies are shown attached to antigens on the RBC surface.

The patient's washed RBCs are incubated with antihuman antibodies (*Coombs reagent*).

Legend	
	Antigens on the red blood cell's surface
	Human anti-RBC antibody
	Antihuman antibody (<i>Coombs reagent</i>)

Test di Coombs Diretto



Blood sample from a patient with immune mediated haemolytic anaemia: antibodies are shown attached to antigens on the RBC surface.

The patient's washed RBCs are incubated with antihuman antibodies (*Coombs reagent*).

RBCs agglutinate: antihuman antibodies form links between RBCs by binding to the human antibodies on the RBCs.

Legend	
	Antigens on the red blood cell's surface
	Human anti-RBC antibody
	Antihuman antibody (<i>Coombs reagent</i>)

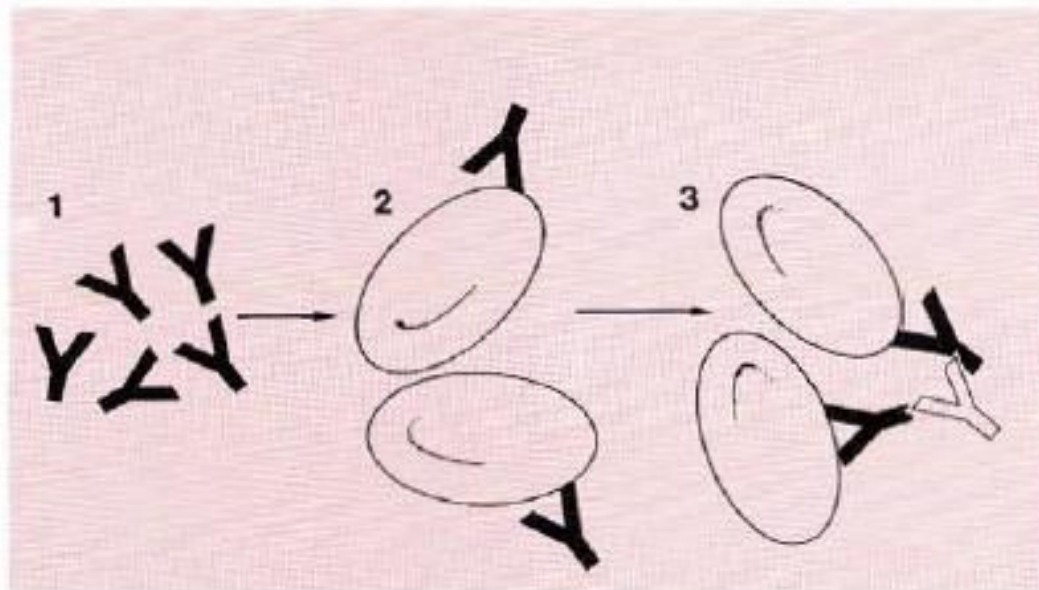




Figura 1.6H Il test dell'antiglobulina indiretto. (1) Siero contenente anticorpi eritrocitari. Gli anticorpi eritrocitari possono trovarsi nei sieri dei pazienti candidati alle trasfusioni, nelle donne gravide, nei donatori o nei sieri usati come reagenti. (2) Le emazie aggiunte al siero vengono sensibilizzate dopo un certo tempo. Le emazie possono essere le emazie testo, quelle di un paziente o di un donatore. (3) Le cellule sensibilizzate sono agglutinate dal siero antiglobuline umane (rappresentato dal segno vuoto).




Per l'esecuzione del test è necessario disporre di globuli rossi del paziente, ottenuti da un campione di sangue con anticoagulante.



Per l'esecuzione del test è necessario disporre di globuli rossi del paziente, ottenuti da un campione di sangue con anticoagulante.

Le emazie devono essere accuratamente lavate con soluzione fisiologica al fine di allontanare completamente le Ig plasmatiche, non adese ai globuli rossi, che andrebbero altrimenti ad interagire con il siero anti immunoglobuline, impedendo a quest'ultimo di reagire con quelle Ig adese alla superficie eritrocitaria;



Per l'esecuzione del test è necessario disporre di globuli rossi del paziente, ottenuti da un campione di sangue con anticoagulante.

Le emazie devono essere accuratamente lavate con soluzione fisiologica al fine di allontanare completamente le Ig plasmatiche, non adese ai globuli rossi, che andrebbero altrimenti ad interagire con il siero anti immunoglobuline, impedendo a quest'ultimo di reagire con quelle Ig adese alla superficie eritrocitaria;

l'effetto di questa interferenza sarebbe un risultato del test falsamente negativo.

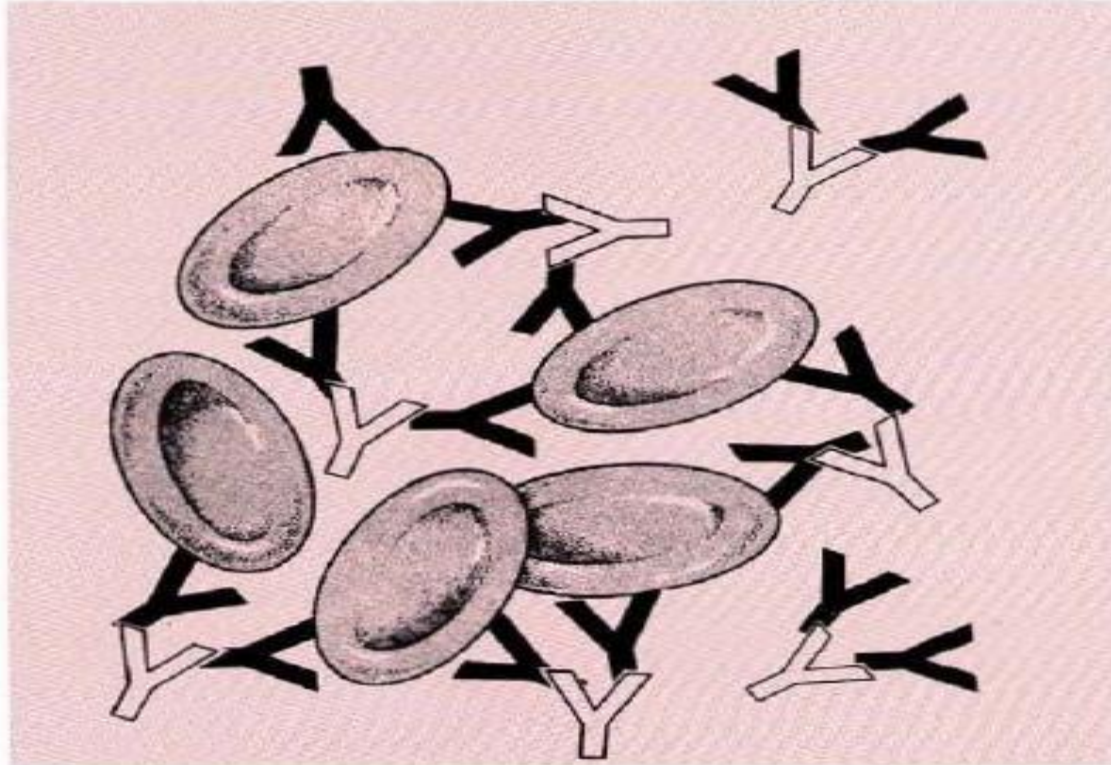


Figura 1.6F Illustrazione di emazie sensibilizzate da IgG agglutinate dal siero antiglobuline umane. Le molecole in neretto sono gli anticorpi gruppoematici, mentre le molecole in vuoto sono gli anticorpi antiglobuline umane. Se le globuline libere non venissero rimosse esse reagirebbero con il siero antiglobuline neutralizzandolo e determinando un risultato falsamente negativo.

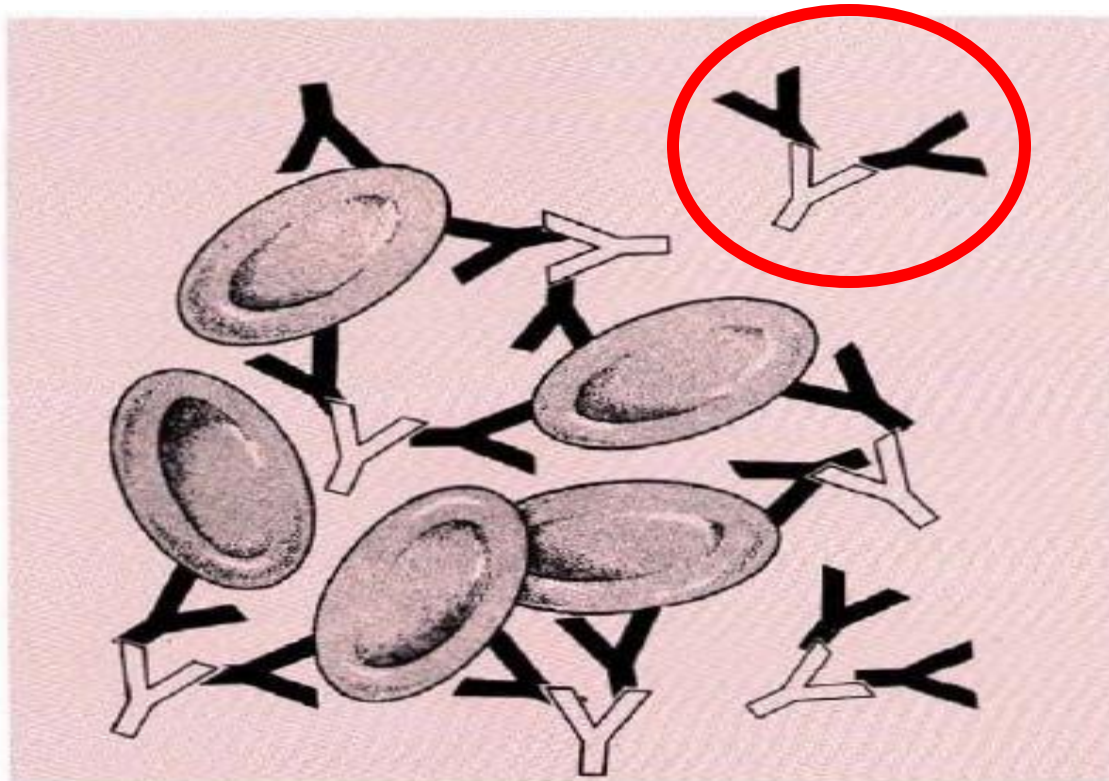



Figura 1.6F Illustrazione di emazie sensibilizzate da IgG agglutinate dal siero antiglobuline umane. Le molecole in neretto sono gli anticorpi gruppoematici, mentre le molecole in vuoto sono gli anticorpi antiglobuline umane. Se le globuline libere non venissero rimosse esse reagirebbero con il siero antiglobuline neutralizzandolo e determinando un risultato falsamente negativo.



In immunoematologia vengono utilizzati vari sieri antiglobuline capaci di riconoscere specificamente diversi tipi di globulina umane.

Si dispone così di reagenti contenenti anticorpi


anti-IgG

anti-C3d del complemento umano

e sieri ad ampio spettro dotati di attività sia anti-IgG che anti-C3d.

Test di Coombs diretto: metodica classica

Le emazie, dopo accurato lavaggio, vengono poste direttamente a contatto con il siero anti-globuline umane in provetta o sul vetrino.



Gli anticorpi anti-globuline reagiscono sia con le globulina umane adese alla superficie eritrocitaria che con quelle libere nel siero.


Le globulina libere nel siero possono pertanto neutralizzare il siero antiglobuline quando questo venga aggiunto ai globuli rossi sensibilizzati.



Nel caso di risultato positivo, il TAD viene ripetuto impiegando i sieri monospecifici anti-IgG ed anti-C3d per determinare la/le componente/i in causa.


Antisieri disponibili

- siero antiglobuline umane polispecifico *anti IgG+C3d*
- siero antiglobuline umane monospecifico *anti-IgA*
- siero antiglobuline umane monospecifico *anti-IgG*
- siero antiglobuline umane monospecifico *anti-IgM*
- siero *anti-C3d+C3d+C4*



La presenza della sola frazione anti-complemento a livello eritrocitario, non accompagnata dal rilievo di IgG, può rappresentare la spia della presenza di anticorpi non dimostrabili, in quanto numericamente insufficienti a raggiungere il valore soglia di Ig (almeno 200 molecole/globulo rosso) per la positività del test;

in questo caso sono necessari esami supplementari per supportare l'ipotesi proposta.



Tuttavia, va ricordato che un TAD di tipo anti-complemento si può riscontrare nel caso in cui immunocomplessi, presenti nel plasma del paziente, aderiscano in modo aspecifico ai globuli rossi, causando la fissazione del complemento.

Mentre gli immunocomplessi possono andare incontro a dissociazione, la frazione C3 rimane adesa e pertanto rilevabile.

Il sistema del Complemento



I componenti del complemento sono delle normali proteine dell'organismo, specialmente delle betaglobuline.

La **fissazione del complemento** è una serie di reazioni di tipo enzimatico attivate a cascata, ognuna dal prodotto della reazione precedente.

Il sistema del Complemento



Lo stadio iniziale dell'attivazione è innescato dall'anticorpo che si attacca all'antigene

Il sistema del Complemento



Lo stadio iniziale dell'attivazione è innescato dall'anticorpo che si attacca all'antigene

ma solo alcuni anticorpi sono in grado di attivare il sistema del complemento.

Il sistema del Complemento

Lo stadio iniziale dell'attivazione è innescato dall'anticorpo che si attacca all'antigene

ma solo alcuni anticorpi sono in grado di attivare il sistema del complemento.

Alcuni anticorpi, attaccandosi ai globuli rossi, modificano la loro forma permettendo l'attacco del primo componente del complemento; inizia così una serie di reazioni enzimatiche tra i componenti del sistema complemento per cui alcuni componenti (specialmente C3) si attaccano direttamente alla membrana cellulare.


Il sistema del Complemento

Lo stadio iniziale dell'attivazione è innescato dall'anticorpo che si attacca all'antigene

ma solo alcuni anticorpi sono in grado di attivare il sistema del complemento.

Alcuni anticorpi, attaccandosi ai globuli rossi, modificano la loro forma permettendo l'attacco del primo componente del complemento; inizia così una serie di reazioni enzimatiche tra i componenti del sistema complemento per cui alcuni componenti (specialmente C3) si attaccano direttamente alla membrana cellulare.

Gli ultimi componenti della sequenza di reazione (C5, C6, C7, C8) concorrono a ledere la membrana e la cellula viene così distrutta.



Il colore rosso dell'emoglobina libera rilasciata durante la reazione immune sugli eritrociti (in aggiunta o in luogo della agglutinazione) indica l'avvenuta reazione antigene-anticorpo.

Il riscontro di emolisi durante la ricerca di anticorpi è importante quanto il documentare l'agglutinazione.

Gli anticorpi che fissano il complemento sono solitamente IgM, talvolta IgG.

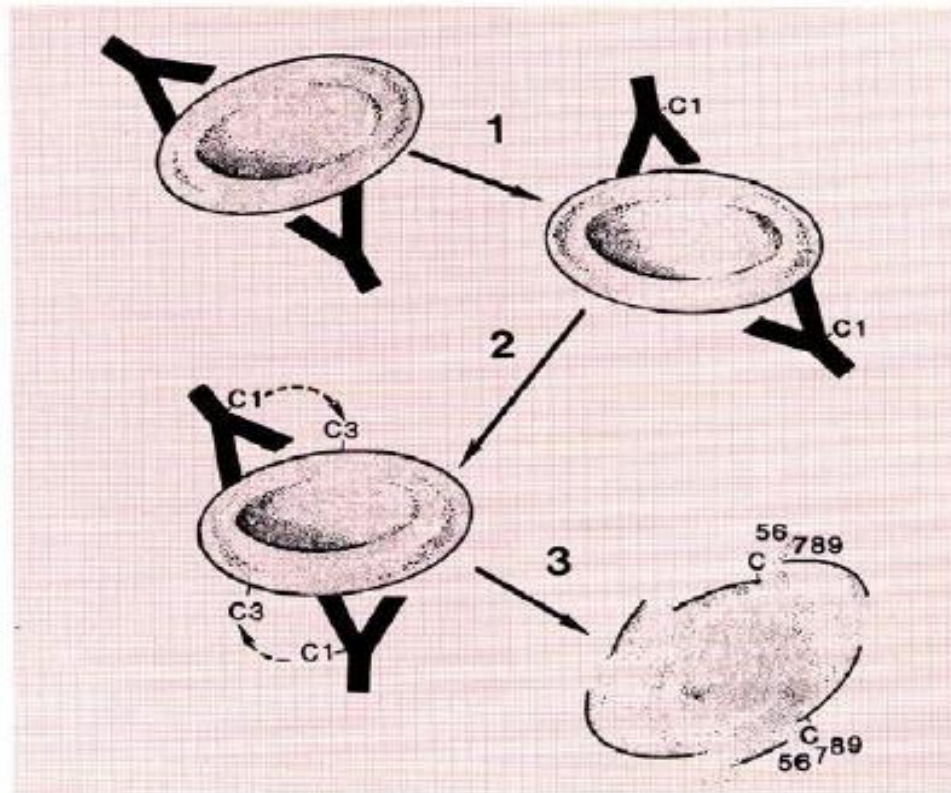


Figura 1.6B Illustrazione della lisi eritrocitaria mediata dal complemento. (1) Gli anticorpi attaccati alla cellula attivano il complemento. Per attivare il complemento è necessario che due anticorpi siano legati alla cellula molto vicini tra loro (nella figura ne viene rappresentato uno solo). Il primo componente, C1, si lega ad un recettore nella regione Fc che viene esposto solo quando l'anticorpo modifica la sua forma dopo il legame con l'antigene (2) attraverso una serie di reazioni enzimatiche (illustrate dalla linea tratteggiata), il C3 si lega alla superficie della cellula (3). Se la attivazione prosegue fino al completamento C5,6,7,8 e 9 penetrano nella membrana e determinano la lisi.

Per ragioni non del tutto chiarite il processo spesso si ferma dopo i primi stadi lasciando adesi alla superficie cellulare alcuni componenti che non sono però in grado di determinare la lisi.

**Tabella 1.6C - Fasi del test dell'antiglobulina
complemento/anti-complemento**

1. Gli anticorpi fissanti il complemento reagiscono con gli antigeni eritrocitari.
2. Il primo componente del complemento (C1) è formato da tre parti: C1q, C1r e C1s. C1q è legato al frammento Fc di due diverse molecole di IgG (nel caso delle IgM basta una sola molecola).
3. Il legame di C1q converte il C1s nell'enzima attivo $\overline{C1s}$ (la linea sopra il simbolo denota l'enzima attivo).
4. $\overline{C1s}$ scinde il C4. C4b, il frammento maggiore di C4, si lega direttamente alla superficie dell'eritrocita. $\overline{C1s}$ scompone anche C2.
5. Il C4b fissato sulla cellula si combina con C2a, uno dei frammenti di C2, formando $\overline{C4b2a}$.
6. Il complesso $\overline{C4b2a}$, detto C3 convertasi, scinde C3 in C3a e C3b; il C3b si lega direttamente in grande quantità al globulo rosso.
7. C3b viene evidenziato dai reagenti anti-immunoglobuline umane opportunamente preparate

-In vivo- il C3b è ulteriormente modificato a produrre il C3d, che è il componente reperibile sulle cellule dei pazienti quando avviene -in vivo- l'attivazione del complemento. Sono disponibili gli antisieri specifici per il C3d umano.

Test di Coombs diretto: metodica classica

Possibilità di falsi negativi per:

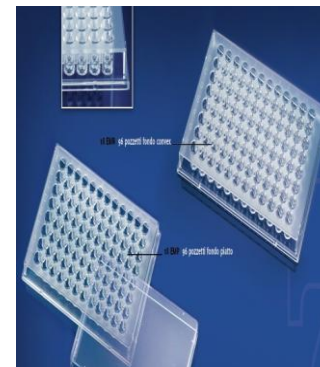
- ✓ presenza di meno di 500 molecole anticorpali sulla membrana eritrocitaria
- ✓ non corretto lavaggio delle emazie
- ✓ mancato rispetto dei tempi di esecuzione del test

Test di Coombs diretto

Risultati falsamente positivi

- ✓ Eritrociti spontaneamente agglutinati prima del lavaggi
- ✓ Soluzioni fisiologiche conservate in bottiglie di vetro (contengono particelle di silice colloidale, liberate dal contenitore; può verificarsi anche con la conservazione in contenitori metallici in quanto possono passare in soluzione ioni metallici che inducono una adesione aspecifica delle proteine delle cellule)
- ✓ Vetreria non correttamente pulita che presenta residui di polvere, detersivi o altro in grado di determinare l'aggregazione degli eritrociti
- ✓ Eccessiva centrifugazione che determina una eccessiva sedimentazione e una difficoltosa risospensione

L'introduzione di più recenti tecnologie, come la **metodica di agglutinazione su colonna** e la **metodica di agglutinazione in fase solida** (SPRCA - Solid Phase Red Cell Adherence -), entrambe ormai utilizzate routinariamente nei Servizi Immunotrasfusionali, ha assicurato un miglioramento della qualità e riproducibilità dei test.



Test di Coombs diretto: metodiche alternative

- ✓ microcolonna gel
microsfere di vetro
- ✓ citofluorimetria
- ✓ microcolonna per affinità

Test di Coombs diretto

metodiche alternative su microcolonna

Vantaggi

- ✓ facilità di esecuzione
- ✓ rapidità di esecuzione
- ✓ interpretazione obiettiva dei risultati
- ✓ possibilità di rilettura dei risultati anche a distanza di tempo

Positività del test di Coombs Diretto

1. anemie emolitiche autoimmuni

nell'ambito delle quali i globuli rossi del paziente sono sensibilizzati da autoanticorpi, con o senza complemento, o dal solo C3d;

Positività del test di Coombs Diretto

1. anemie emolitiche autoimmuni

nell'ambito delle quali i globuli rossi del paziente sono sensibilizzati da autoanticorpi, con o senza complemento, o dal solo C3d;

Positività del test di Coombs Diretto

1. anemie emolitiche autoimmuni

nell'ambito delle quali i globuli rossi del paziente sono sensibilizzati da autoanticorpi, con o senza complemento, o dal solo C3d;

Positività del test di Coombs Diretto

1. anemie emolitiche autoimmuni

nell'ambito delle quali i globuli rossi del paziente sono sensibilizzati da autoanticorpi, con o senza complemento, o dal solo C3d;

2. malattia emolitica del neonato (MEN)

per dimostrare che le emazie di questi sono sensibilizzate da alloanticorpi di classe IgG di origine materna;

Positività del test di Coombs Diretto

1. anemie emolitiche autoimmuni

nell'ambito delle quali i globuli rossi del paziente sono sensibilizzati da autoanticorpi, con o senza complemento, o dal solo C3d;

2. malattia emolitica del neonato (MEN)

per dimostrare che le emazie di questi sono sensibilizzate da alloanticorpi di classe IgG di origine materna;

3. anemie emolitiche immuno-mediate

legate all'assunzione di alcuni farmaci (penicillina, cefalosporine, rifampicina,...);

Positività del test di Coombs Diretto

1. anemie emolitiche autoimmuni

nell'ambito delle quali i globuli rossi del paziente sono sensibilizzati da autoanticorpi, con o senza complemento, o dal solo C3d;

2. malattia emolitica del neonato (MEN)

per dimostrare che le emazie di questi sono sensibilizzate da alloanticorpi di classe IgG di origine materna;

3. anemie emolitiche immuno-mediate

legate all'assunzione di alcuni farmaci (penicillina, cefalosporine, rifampicina,...);

4. reazioni emolitiche trasfusionali

a causa del legame dei globuli rossi del donatore con anticorpi presenti nel circolo del ricevente.

Positive DAT

Why is DAT positive?

Transfusion reactions



Positive DAT

Why is DAT positive?

Transfusion reactions



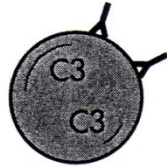
Donor red blood cells

Recipient antibody

Positive DAT

Why is DAT positive?

Transfusion reactions



Recipient antibody

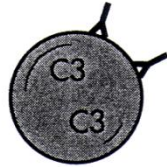
Donor red blood cells

Hemolytic disease of the newborn

Positive DAT

Why is DAT positive?

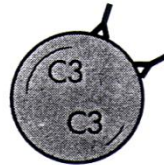
Transfusion reactions



Recipient antibody

Donor red blood cells

Hemolytic disease of the newborn



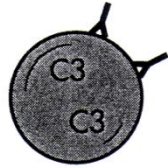
Maternal antibody

Fetal red blood cells

Positive DAT

Why is DAT positive?

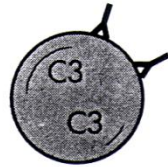
Transfusion reactions



Recipient antibody

Donor red blood cells

Hemolytic disease of the newborn



Maternal antibody

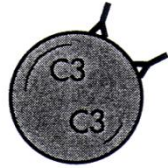
Fetal red blood cells

Autoimmune hemolytic anemia

Positive DAT

Why is DAT positive?

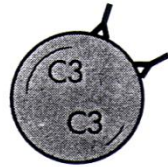
Transfusion reactions



Recipient antibody

Donor red blood cells

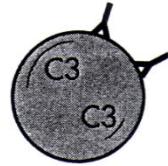
Hemolytic disease of the newborn



Maternal antibody

Fetal red blood cells

Autoimmune hemolytic anemia



Patient autoantibody

Patient red blood cells

Positive DAT

Why is DAT positive?

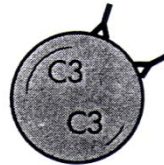
Transfusion reactions



Recipient antibody

Donor red blood cells

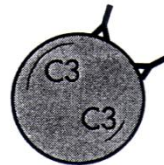
Hemolytic disease of the newborn



Maternal antibody

Fetal red blood cells

Autoimmune hemolytic anemia



Patient autoantibody

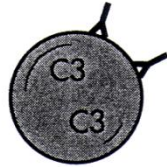
Patient red blood cells

Drug-related mechanism

Positive DAT

Why is DAT positive?

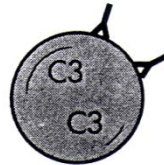
Transfusion reactions



Recipient antibody

Donor red blood cells

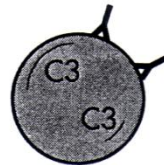
Hemolytic disease of the newborn



Maternal antibody

Fetal red blood cells

Autoimmune hemolytic anemia



Patient autoantibody


Patient red blood cells

Drug-related mechanism



Drug/anti-drug (▼)
complex

Patient red blood cells



Un test di Coombs diretto positivo non implica necessariamente che le emazie del soggetto abbiano una ridotta sopravvivenza “in vivo”

Proteine e anticorpi possono fissarsi sulla superficie eritrocitaria in molti modi, anche con meccanismi non immunologici

Sono riferiti test dell'antiglobulina positivi in 1/1000-14000 donatori di sangue e in 1-15% dei pazienti ospedalizzati

senza che siano presenti segni clinici di emolisi immune

Per **emolisi immune** si intende la riduzione della sopravvivenza degli eritrociti causata da reazione immunologica

Elementi indicativi di emolisi “in vivo” sono:

- ridotti livelli Hb
- reticolocitosi
- iperbilirubinemia non coniugata
- aumento LDH
- emoglobinemia, emoglobinuria
- ridotti livelli aptoglobina sierica
- morfologia degli eritrociti

Gli autoanticorpi possono essere caratterizzati solo esaminando l'eluato

Tecniche di eluizione:

- ✓ eluizione con etere
- ✓ eluizione al calore
- ✓ eluizione mediante congelamento-scongelamento
- ✓ eluizione con ultrasuoni
- ✓ eluizione alla digitonina acida
- ✓ eluizione acida a freddo
- ✓ eluizione al cloroformio
- ✓ eluizione allo xylolo
- ✓ eluizione al cloruro di metilene