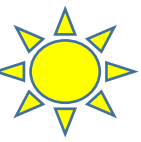


A transzfúzió immunológiai, szerológiai alapjai

Vércsoport antigének, antitestek – természetes, irreguláris

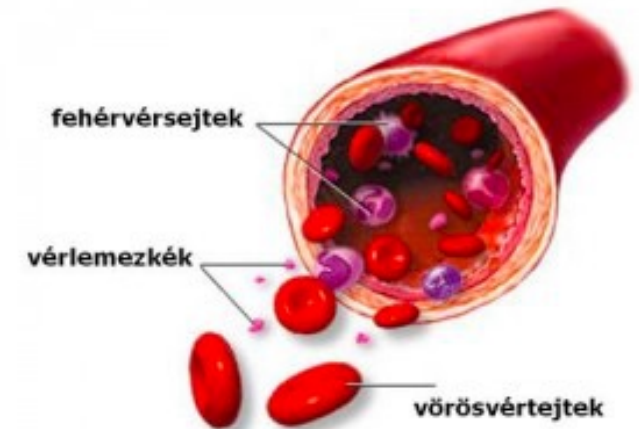
Antigén-antitest reakciók in vivo, in vitro – agglutináció

Dr. Földi Éva
OVSz Szegedi RVK



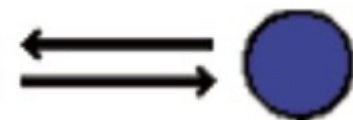
A vér

- A vér folyékony kötőszövet, mely:
 - Biztosítja a sejtek számára a tápanyagot, oxigént, energiát
 - Elszállítja a salakanyagot
 - Tartalmazza az immunrendszer és a hemosztázis elemeit
- Sejtes alkotói a vérplazmában helyezkednek el (+szerves és szervetlen anyagok)
- A vérképzés a vörös csontvelőben történik a pluripotens őssejtekből



**pluripotens
őssejt**

nem proliferáló



proliferáló



**multipotens
őssejt**



myeloid

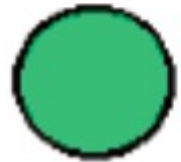
lymphoid



**oligopotens
progenitor
sejt**



CFU-Eos/Baso

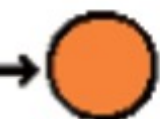


CFU-GEMM

**elkötelezett
progenitor
sejtek**



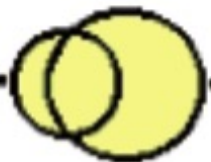
CFU-Baso



CFU-Eos



CFU-E



CFU-GM



CFU-meg

**érett
sejtek**



basophil



eosinophil



erythrocyta



neutrophil



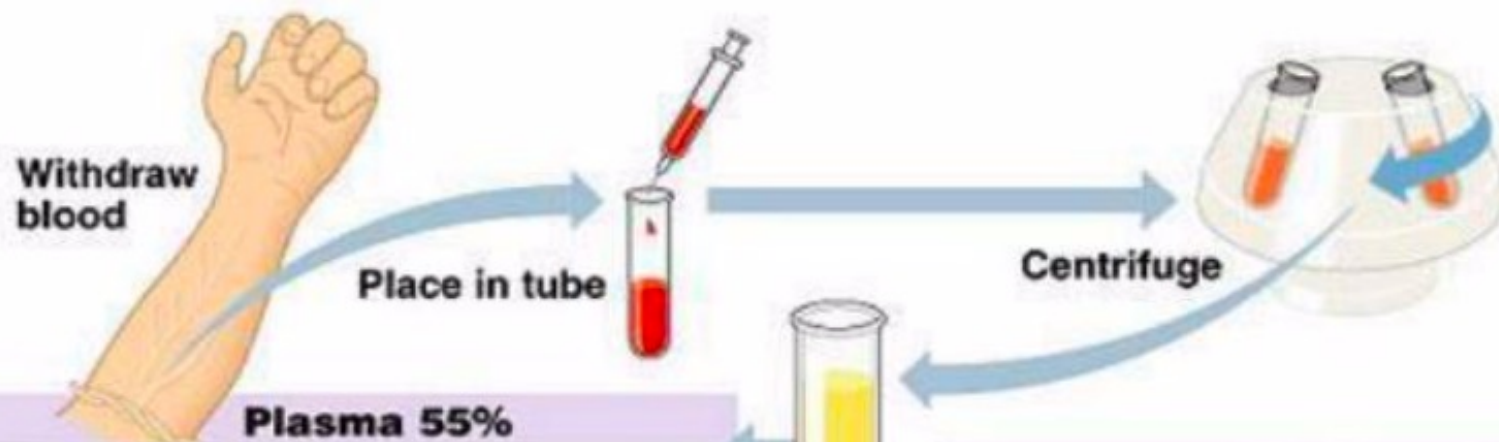
monocyta



thrombocyta



lymphocyta



Plasma 55%

Constituent	Major functions
Water	Solvent for carrying other substances
Ions Sodium Potassium Calcium Magnesium Chloride Bicarbonate	Osmotic balance, pH buffering, and regulation of membrane permeability
Plasma proteins Albumin Fibrinogen Immunoglobulins (antibodies)	Osmotic balance pH buffering Clotting Defense
Substances transported by blood Nutrients (e.g., glucose, fatty acids, vitamins) Waste products of metabolism Respiratory gases (O_2 and CO_2) Hormones	

Cellular elements 45%

Cell type	Number (per mm^3 of blood)	Functions
Erythrocytes (red blood cells) 	5–6 million	Transport oxygen and help transport carbon dioxide
Leukocytes (white blood cells)	5000–10,000	Defense and immunity
 Basophil  Eosinophil  Neutrophil  Lymphocyte  Monocyte		
Platelets 	250,000–400,000	Blood clotting



A véralkotók

Sejtes elemek (45%)			Vérplazma (55%)
Vörösvértestek (vvt)	Fehérvérsejtek (fvs)	Vérlemezkék (thrombocyta - thr)	
4-5 millió/ μ l	4-10 ezer/ μ l	150-400 ezer/ μ l	90% víz 10% ionok és szerves anyagok
Bikonkáv korongok	Eltérő működés és alak	Lencse alakúak	Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^-
Vörös csontvelőben 2,4 millió/sec képződik Érés 7 nap	Granuociták, monociták, limfociták	Véralvadásban vesznek részt	Glükóz, aminosavak, karbamid, húgysav
Élettartam: 120 nap (lebomlás: lép, máj)	Élettartamuk változó	Élettartam: 9-11 nap	Plazmafehérjék: albuminok, globulinok, fibrinogén

A transzfúzió

- A transzfúzió szövetátültetés
- Véralkotó elemeket juttatunk a recipiens keringésébe
- Komponens terápia – csak a hiányzó részt adjuk
- Cél az oxigénszállító kapacitás helyreállítása anaemia esetén, vagy a keringő vértérfogat és elvesztett sejttes elemek pótlása vérzéskor
- A donor vvt antigéneket (fvs, thr) az immunrendszer sejtjei felismerik

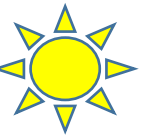




Az immunrendszer válasza

- Minden olyan molekula, amelyet az immunrendszer idegenként azonosít, antigénként viselkedik, és immunválaszt vált ki
- **Cél a nem saját anyagok eltávolítása**
 - A sajáttal szemben immunológiai tolerancia jön létre
- Megkülönböztetünk celluláris és humorális, ill. veleszületett és szerzett immunitást

Veleszületett/természetes immunitás	Szerzett immunitás
Születéskor már „működik”	Életünk során teszünk rá szert
Monociták/makrofágok, granulociták, dendritikus sejtek, NK sejtek, komplement rendszer	B és T limfociták
Gyors válasz - órák	Lassú válasz – órák, hetek
Nem szükséges az előzetes találkozás a kórokozóval „We don't need no education” <i>Pink Floyd</i>	Természetes (fertőzés, antigéninger) vagy mesterséges úton (védőoltás) szerzett védettség
A patogén által kiváltott válasz nem specifikus, mindig ugyanúgy zajlik le	Az immunválasz specifikus a termelődő antitestek révén, idővel az immunválasz javul, hatékonyabbá válik
Közös mechanizmusok a kórokozók, antigének eltávolítására	



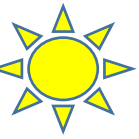
Az immunválasz

- Befolyásolja:
 - Bejutó antigének mennyisége, minősége
 - Az antigén inger gyakorisága
 - A recipiens immunrendszere
- A transfuziológiában a humorális immunválasz a főszerep

Alloimmunizáció

- **Alloimmunizáció:**
- az azonos fajon belüli (=allo-), idegen antigénekkal szemben kialakuló immunválasz
- Az alloimmunizáció során kialakuló antitesteket összefoglaló néven alloantitesteknek nevezzük (autoantitest a saját antigén ellen termelődik)
- Transzfúzió vagy terhesség kapcsán jön létre





Donor vvt

Feldolgozott antigén

CD4-T-sejt

TCR

MHCII

Adhéziós molekula

Idegen antigén

APC

B-sejt

Plazmasejt

Nem feldolgozott antigén

MEMÓRIASEJTEK

Antigén prezentáló sejt (APC) – T-sejt dependens (protein antigén) vagy T-sejt independens (szénhidrát antigén) bemutatás = B-sejt aktiválódás – plazmasejtek - ellenanyagok (IgG, IgM) és memóriasejtek képződnek

Ellenanyag közvetített effektor mechanizmusok (in vivo antigén-antitest reakciók)

- Neutralizáció: a képződő antitestek semlegesítik az antigéneket
- Komplement rendszer aktiválása (intravasalis hemolízis)
- Fagocitózis (extravasalis hemolízis)
- ADCC = antitest dependens celluláris citotoxicitás

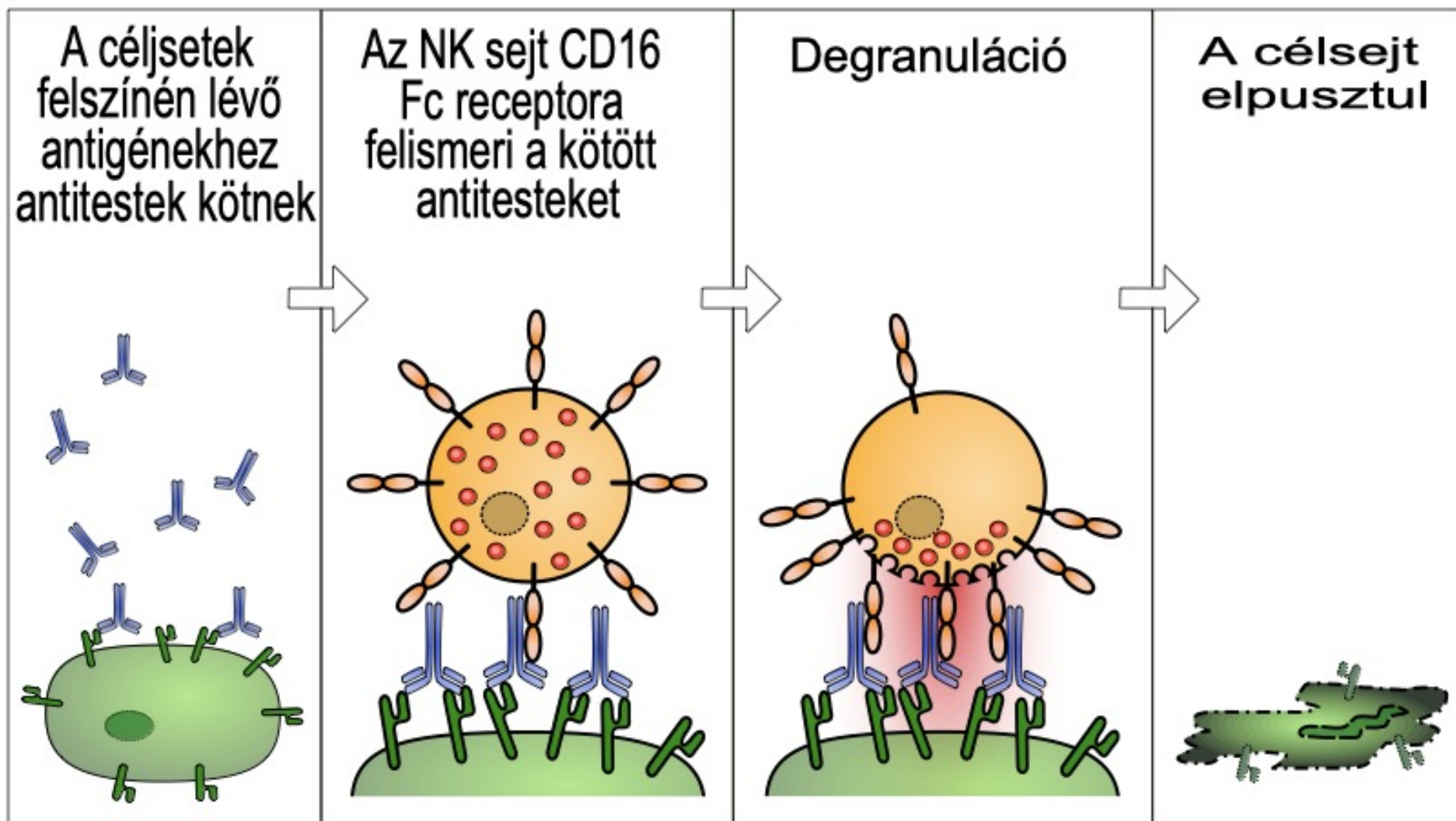
Komplement rendszer

- Veleszületett immunitás része
- C1-C9 enzim kaszkád
- Az inaktív enzimek 3 úton aktiválódhatnak: klasszikus, alternatív és lektin út
- Az antigén-antitest reakciója a klasszikus utat aktiválja
- **IgM, IgG1 és IgG3** aktiválhatják a rendszert
- $C1q \longrightarrow C6-C9 = \text{MAC}$ (membran attack complex)
- A MAC kilyukasztja a vvt membránt, intravasalis hemolízis jön létre

Fagocitózis

- IgG antitestek hozzák létre, melyek komplementet nem aktiválnak, vagy csak C3b-ig
- Az immunkomplexek a monocita/makrofág rendszert aktiválják
- A fagocitózisra képes sejtek eltávolítják az immunkomplexet a membránból, vagy az egész sejt a bekebelezés áldozata lesz a lépben vagy a májban

ADCC





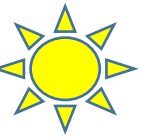
Primer immunizáció

- Az antigénnel történő első találkozás
- Az antigéningert követően néhány nap múlva IgM típusú antitestek jelennek meg
- Fehérje természetű antigének esetén:
 - Izotípus (nehézlánc) váltás: az IgM-et felváltja az IgG
 - Affinitásérés: egyre hatékonyabb antitestek keletkeznek, ezáltal az immunválasz gyorsabb és effektívebb lesz



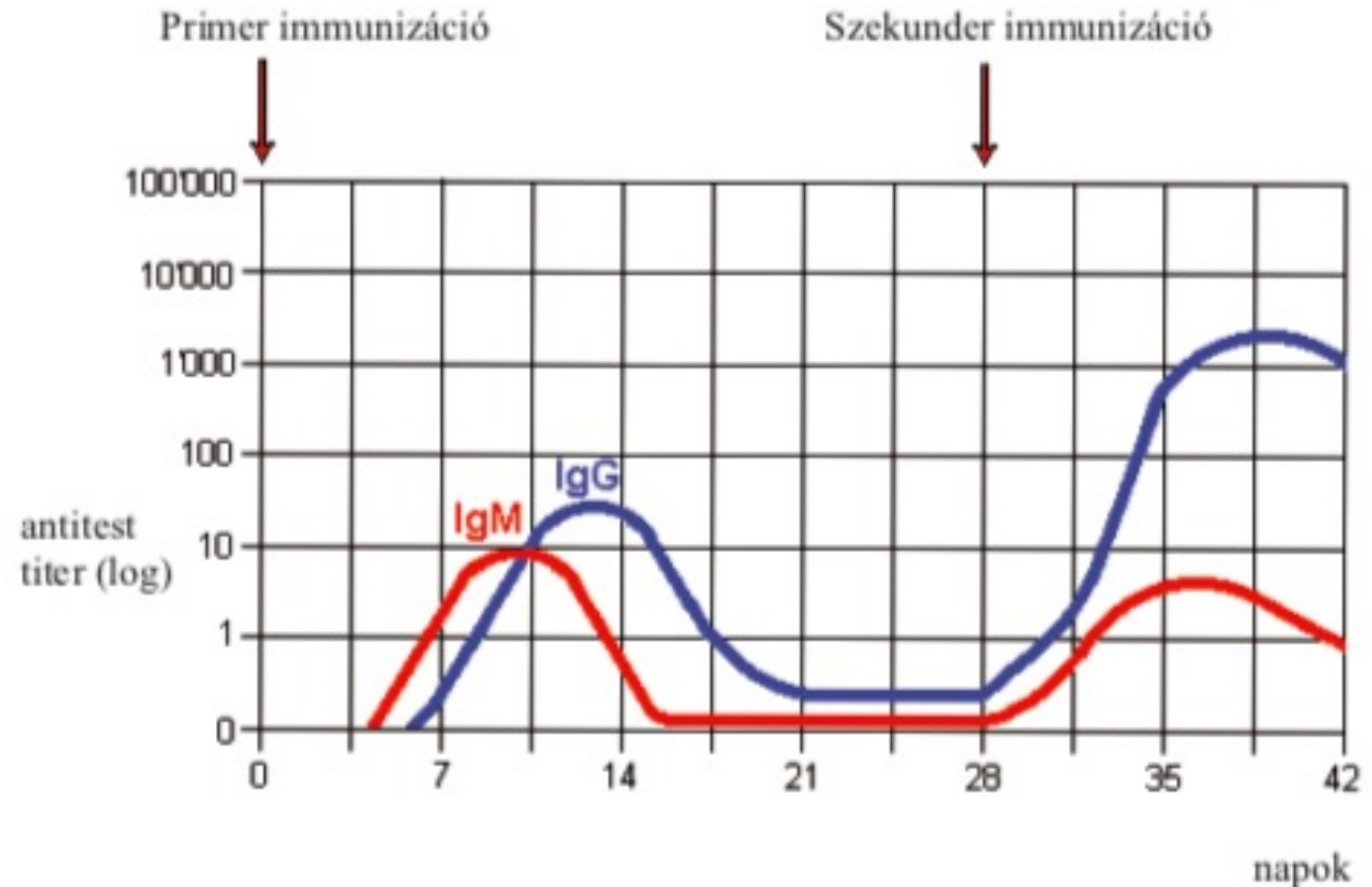
Primer immunizáció

- Szénhidrát antigének esetében:
 - Nincs izotípus váltás és affinitásérés
 - Kis affinitású IgM antitestek képződnek
- Immunológiai memória minden esetben kialakul: a memóriasejtek hosszú életűek !!!

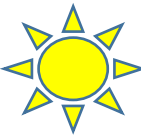


Szekunder immunizáció

- Az antigénnel történő második találkozás
- Rendkívül gyorsan, nagy mennyiségű (többségében IgG) antitest képződik



Vércsoport-szerológiai alapfogalmak



Vércsoport-szerológiai kompatibilitás

- *Kompatibilitás:*
a donor vörösvérsejtjei a recipiens keringésében normális túlélést mutatnak
- *Szerológiai kompatibilitás:*
a recipiens savójában nem mutatható ki ellenanyag a donor vörösvérsejt antigénjei ellen
- Cél: a hemolitikus transzfúziós szövődmény és – amennyire lehetséges – az alloimmunizáció megelőzése

Vércsoport-szerológiai kompatibilitás

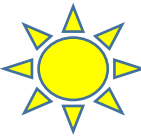
A kompatibilitási vizsgálat elemei:

- Laboratóriumi vércsoport-meghatározás,
ennek része:
 - *AB0 meghatározás kétoldalas technikával*
 - *RhD meghatározás*
 - *Ellenanyagszűrés* – pozitív ellenanyagszűrés esetén az ellenanyag azonosítása, sz.e. további vizsgálatok
 - *DAT vizsgálat*
- Laboratóriumi keresztpróba



Vércsoport antigének

- A vörösvérsejt felszínének örökletes tulajdonságai
 - felfedezésüket specifikus alloantitestek megjelenése „segítette”
- Ezen tulajdonságok nem csak a vvt felszínén jelenhetnek meg (fvs, thr, testi sejtek, szekrétumok)
- Vércsoportrendszerek:
 - 36 rendszer, a rendszerezés genetikai alapú (ISBT: International Society of Blood Transfusion)
 - <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>



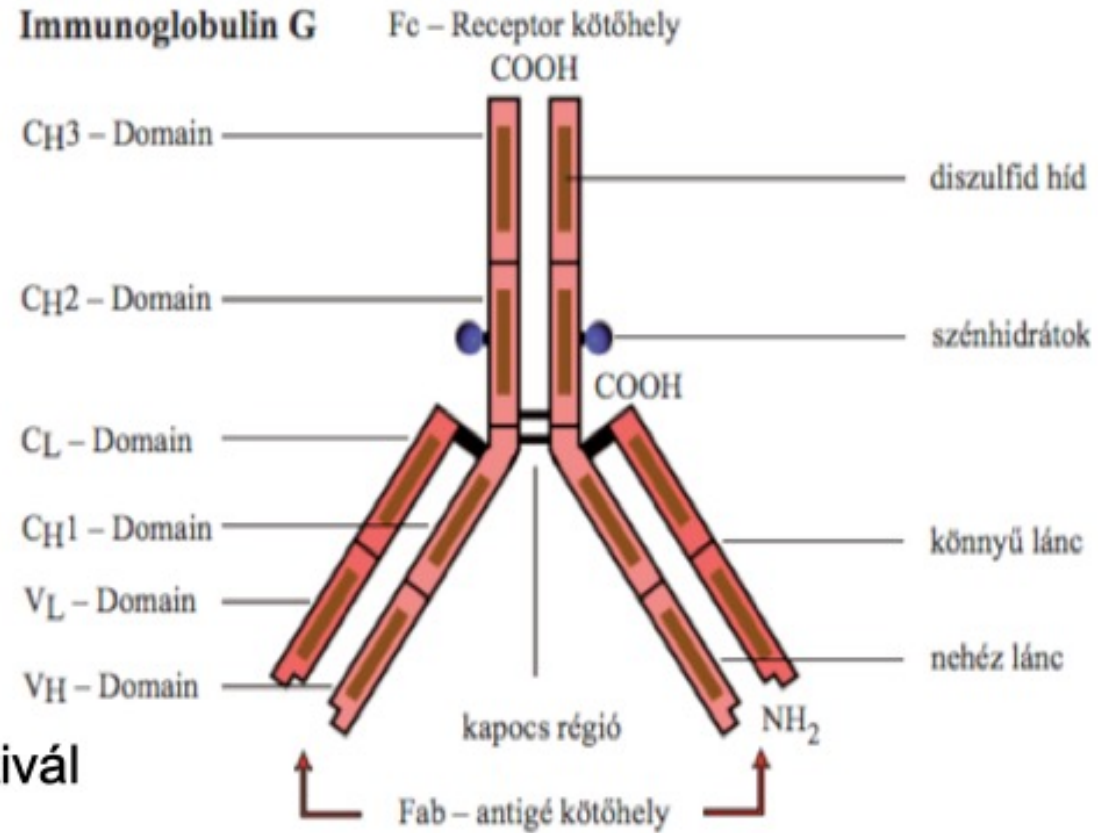
Ellenanyagok

- Az antitestek immunglobulinok
- 5 osztály: IgA, IgD, IgE, **IgG**, **IgM**
- Fiziológiás sós közegben a komplett antitestek agglutinálnak – **IgM**
- Az **IgG** típusúak kötődnek az antigénhez, de nem agglutinálnak, inkomplett antitestek
- A transfuziológiában reguláris és irreguláris antitesteket különböztetünk meg



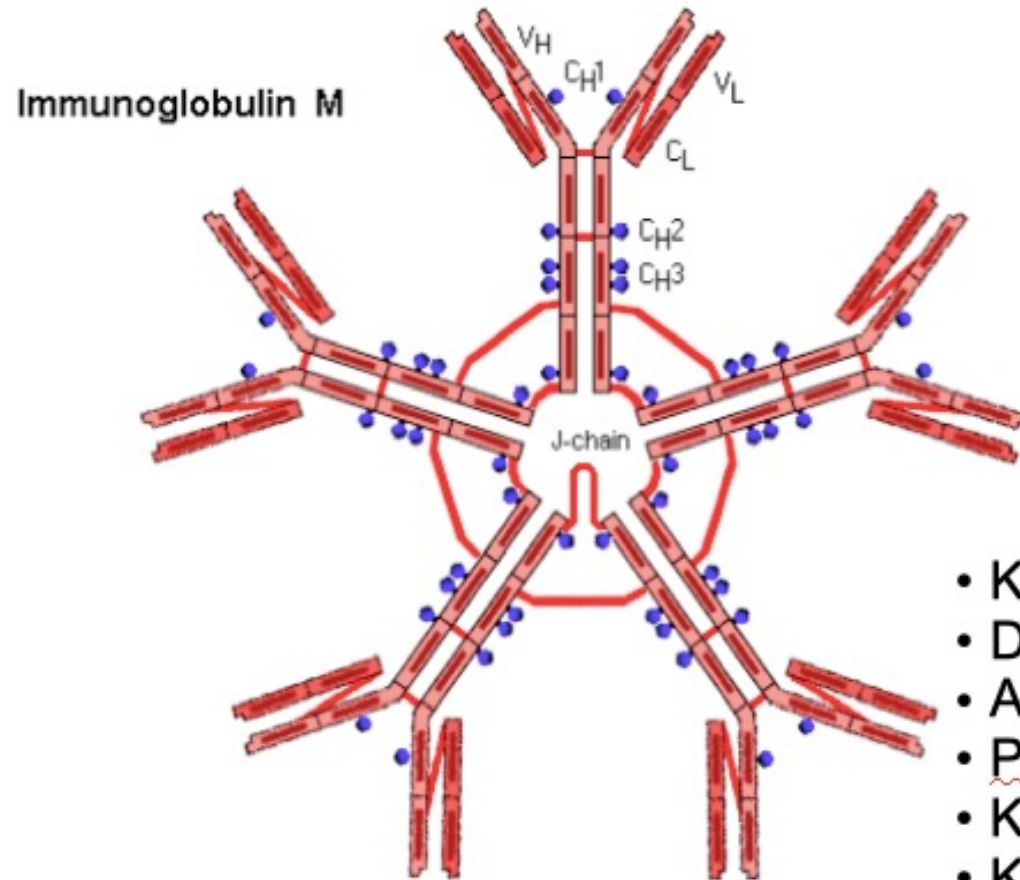
IgG típusú (ún. irreguláris) antitest

- Az ellenanyag készlet 75 %-a
- 4 osztály
- IgG1 és IgG3 komplementet aktivál
- 2 nehéz, 2 könnyű lánc
- Szekunder immunválasz
- Inkomplett agglutinin
- Indirekt agglutináció jellemzi
- Meleg típusú antitest, reakcióhője 37 °C
- **Átjut a placentán**





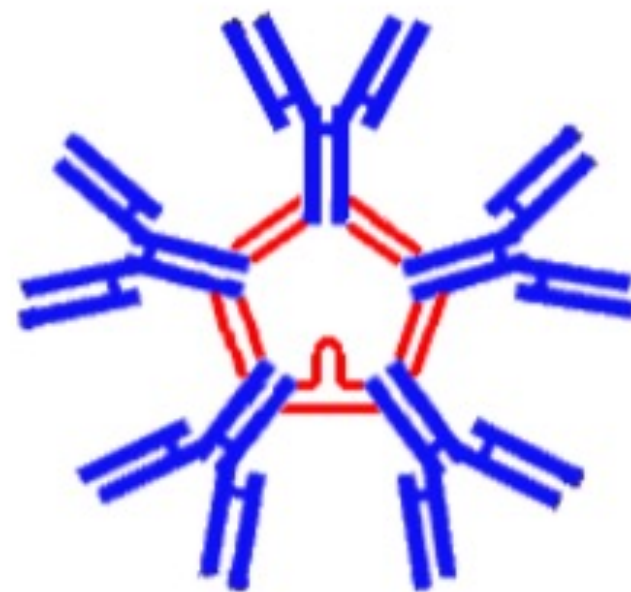
IgM típusú antitest



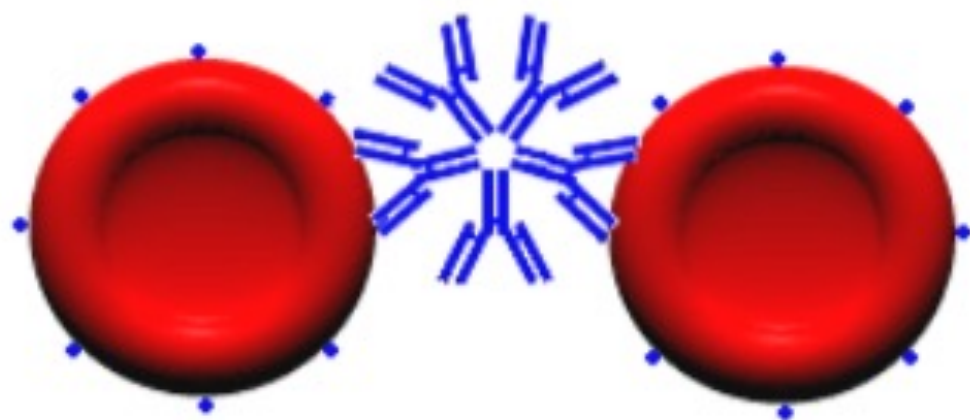
- Komplet antitest
- Direkt agglutinin
- Az immunglobulinok 10 %-a
- Pentamer szerkezetű
- Korai immunválaszban termelődik
- Komplementet aktivál
- Hideg típusú antitest, reakcióhő 4 °C
- **de az anti-A, anti-B antitest**
37 °C-on is aktív!



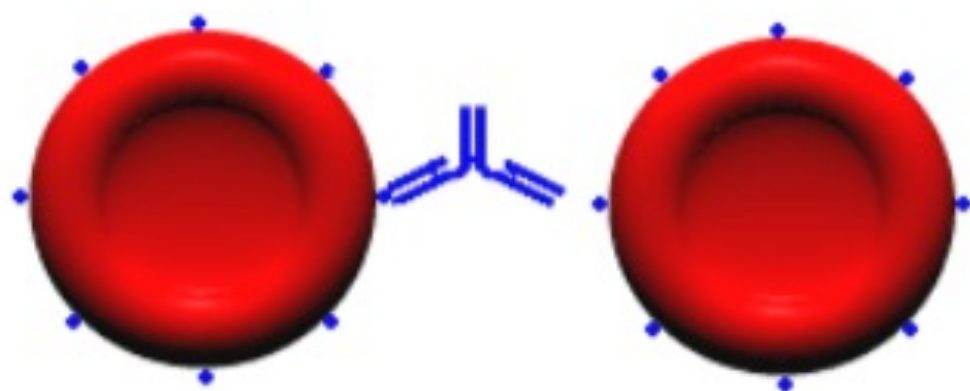
IgG



IgM



Complete Antibody (IgM)



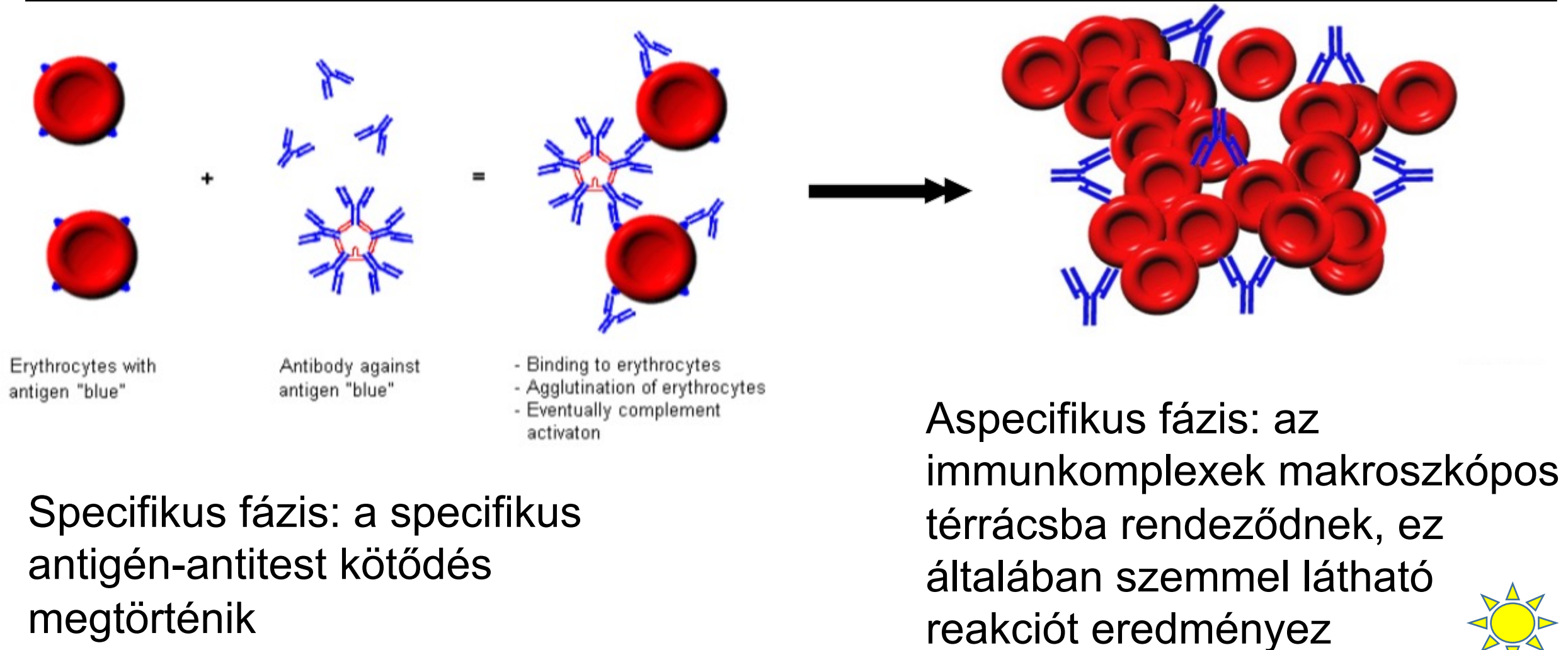
Incomplete Antibody (IgG)



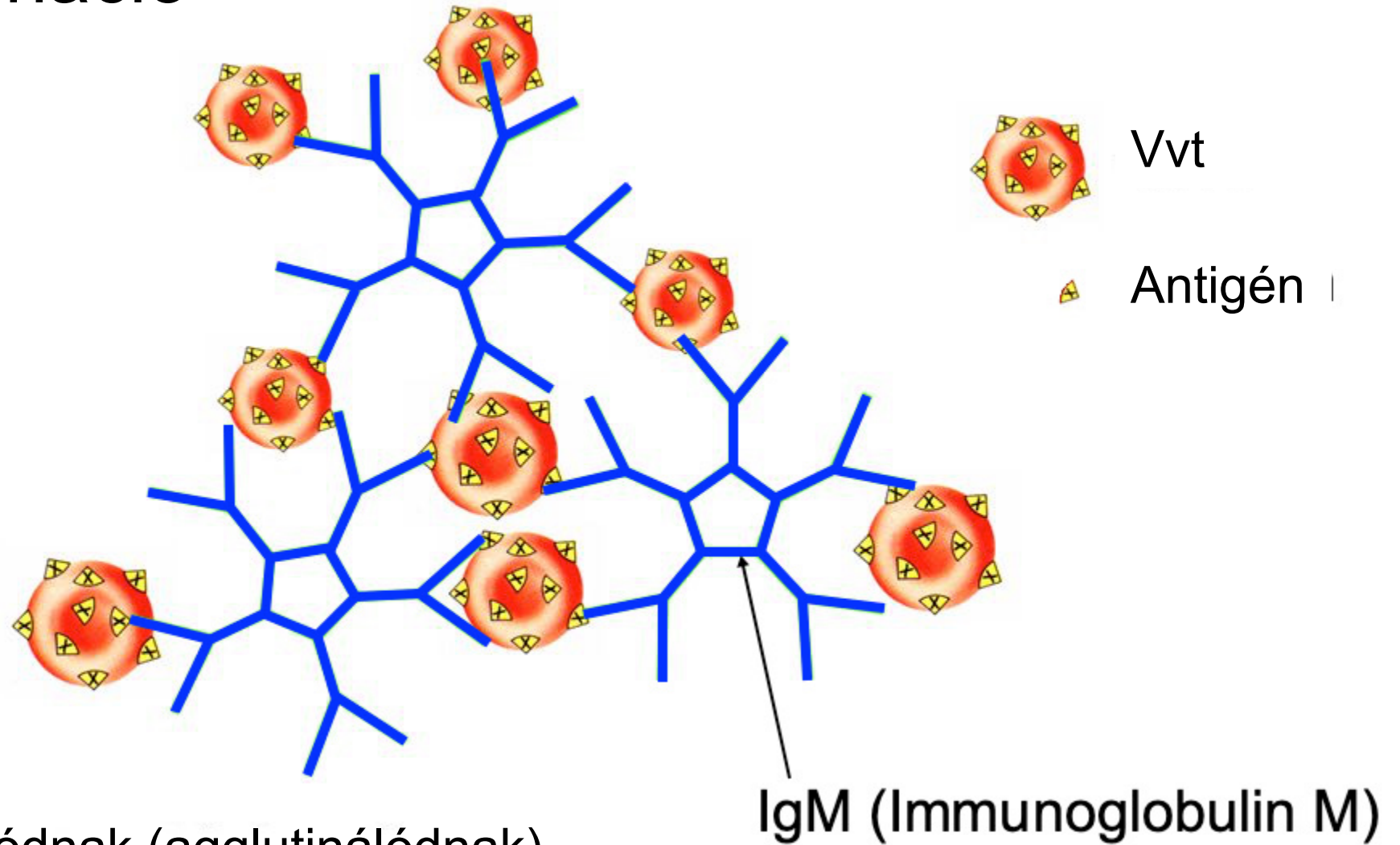
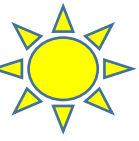
Vércsoport-szerológiai vizsgálatok

- Antigén (sejt felszínén) és antitest (savóban) reakcióján alapulnak
- In vitro antigén és antitest reakció eredményezhet:
 - **Agglutinációt**
 - Hemolízist
 - Abszorpciót
 - Elúciót

Agglutináció



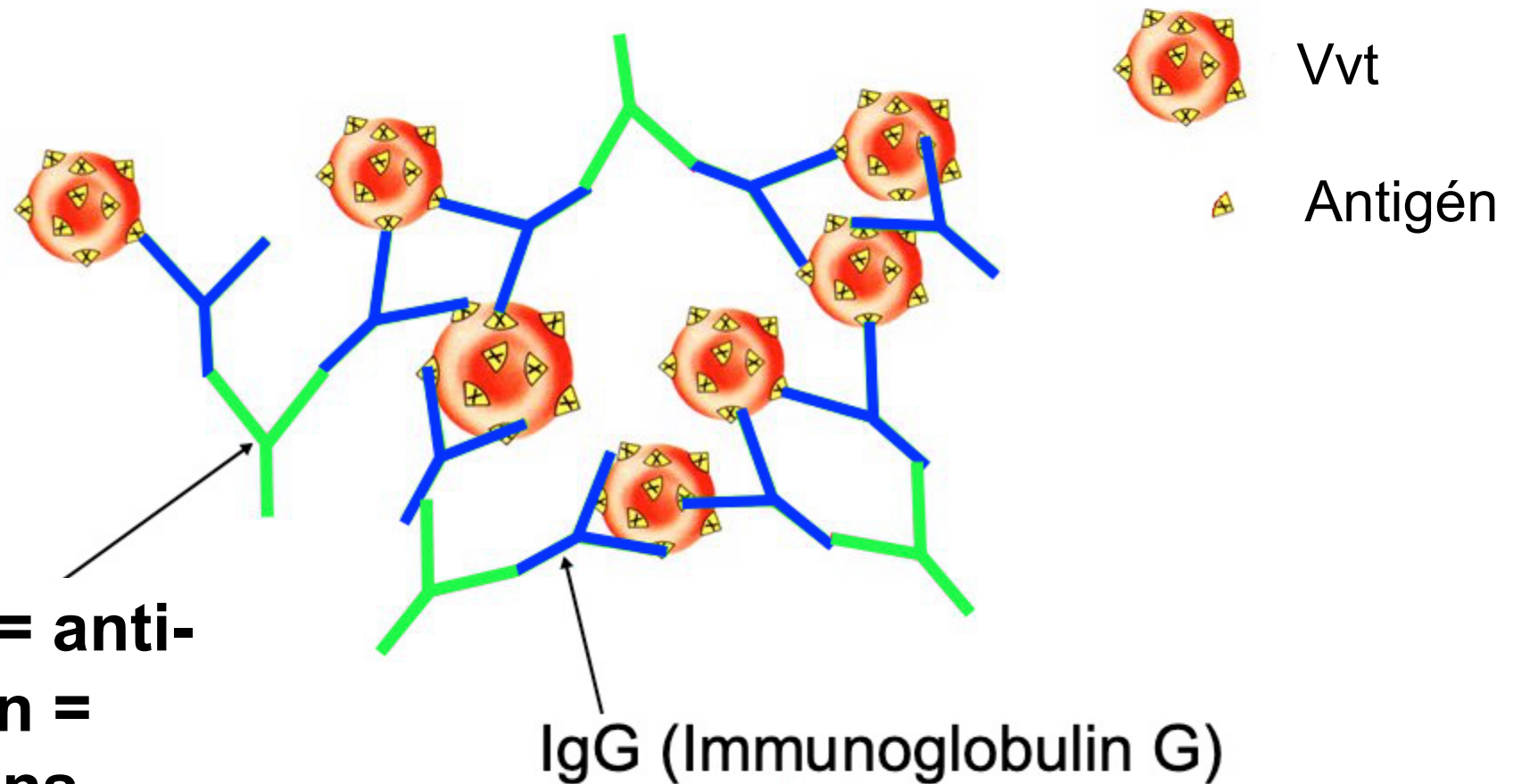
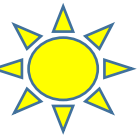
Direkt agglutináció



Térrács jön létre

A vvt-k összezsapzódnak (agglutinálódnak),
ez szemmel látható reakciót eredményez =
agglutináció

Indirekt agglutináció



**Segédantitest = anti-
humán globulin =
Coombs reagens**

Antigén-antitest kötődés megtörténik, de ahhoz, hogy kialakuljon a rácsszerkezet, és szemmel látható reakciót kapjunk, egy segédantitestre/speciális közegre van szükség.

Inkomplett antitestek (IgG) kimutatására alkalmas közegek/technikák

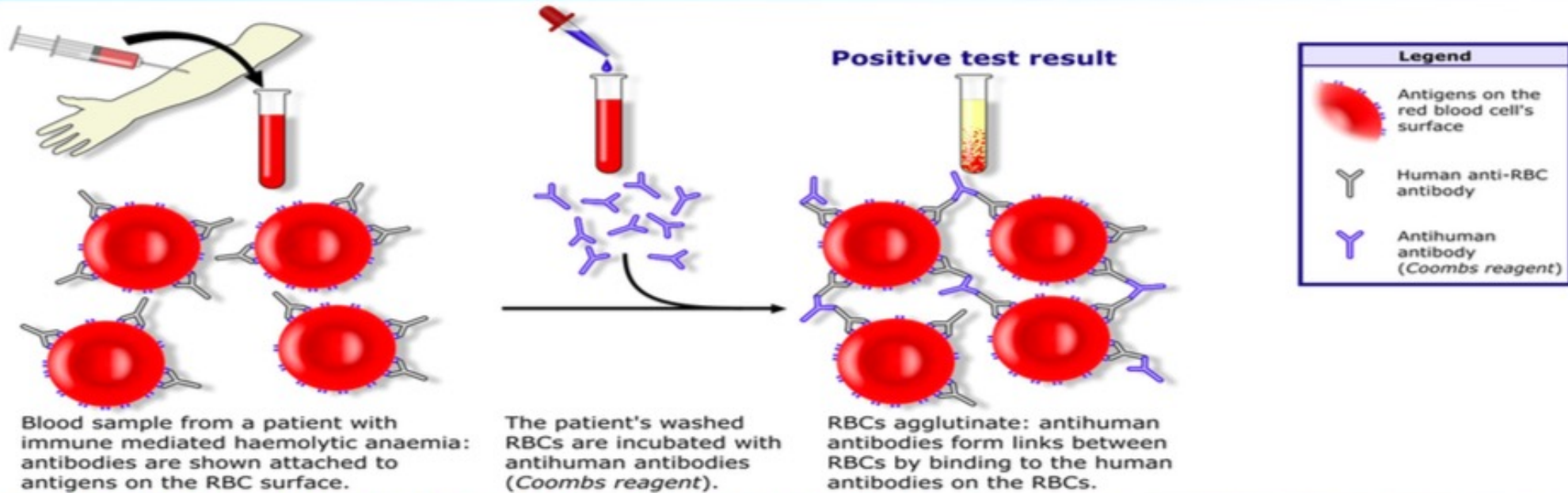
- **LISS** (alacsony ionerősségű közeg): növeli a sejtfelszínt, csökkenti az elektromos kettős réteget a vvt-k között, közelebb hozza a sejteket, gyorsítja az antitestek kötődését
- **Proteolitikus enzimek** (papain, bromelin): csökkentik a sejtfelszín negatív töltését, egyes antigéneket szabaddá tesznek (Rh, Kidd), másokat elroncsolnak (MNS, Duffy)
- **AHG/Coombs technikák** (direkt, indirekt): anti-humán-globulint alkalmazunk az antigén-antitest kötődés kimutatására



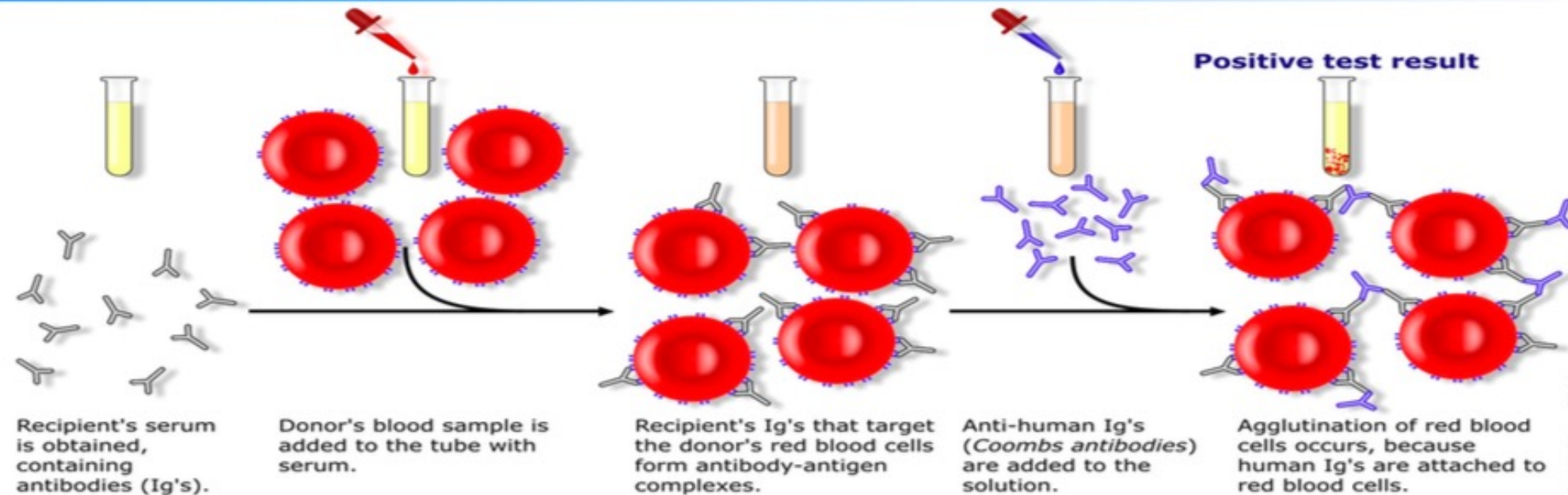
Direkt és indirekt Coombs technika

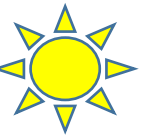
- DAT= direkt antiglobulint teszt vagy direkt Coombs teszt: a vvt-k antitest és/vagy komplement fedettségének kimutatása
- IAT= indirekt antiglobulin teszt vagy indirekt Coombs teszt: a savó inkomplett antitestjeinek (IgG) kimutatása (ellenanyagszűrés, ellenanyag azonosítás, laboratóriumi keresztpróba)

Direct Coombs test / Direct antiglobulin test



Indirect Coombs test / Indirect antiglobulin test





Coombs reagens

- Anti-humán-globulint (AHG) tartalmaz:
 - anti-IgG+C3d
 - ún. segédantitest, amely az irreguláris antitestek, ill. komplementek ellen irányul
- Különféle gyártók, használati utasítás, tárolási előírás, lejárati idő, LOT szám



A teszt elméleti alapja Moreschi nevéhez (1908) fűződik, de Coombs és munkatársai alkalmazták először a gyakorlatban 1945-ben (nyulakba oltott humán eredetű immunglobulint, mely heteroantitest (AHG) termelését váltotta ki)

Direkt Antiglobulin teszt (DAT) vagy Direct Coombs (DC) vizsgálat



- A vvt-k fedettek-e antitesttel és/vagy komplementtel
 - Ha igen: a fedett vvt-k kevesebb ideig élnek túl a keringésben (extravasalis hemolízis)
 - Pozitív reakció értékelése: 1+ -től a 4+ erősségig



Vércsoport-szerológiai kompatibilitás

A kompatibilitási vizsgálat elemei:

- Laboratóriumi vércsoport-meghatározás,
ennek része:
 - *AB0 meghatározás kétoldalas technikával*
 - *RhD meghatározás*
 - *Ellenanyagszűrés* – pozitív ellenanyagszűrés esetén az ellenanyag azonosítása, sz.e. további vizsgálatok

✓ ***DAT vizsgálat***

Ellenanyagszűrés

- Célja a plazmában lévő irreguláris antitestek kimutatása – a legtöbb IgG típusú
 - Mivel IgG típusúak, nem képesek direkt agglutinációra, csak indirektre
 - Speciális közegek segítik a kimutatást LISS és enzimek
- Indirekt Coombs technika alkalmazása



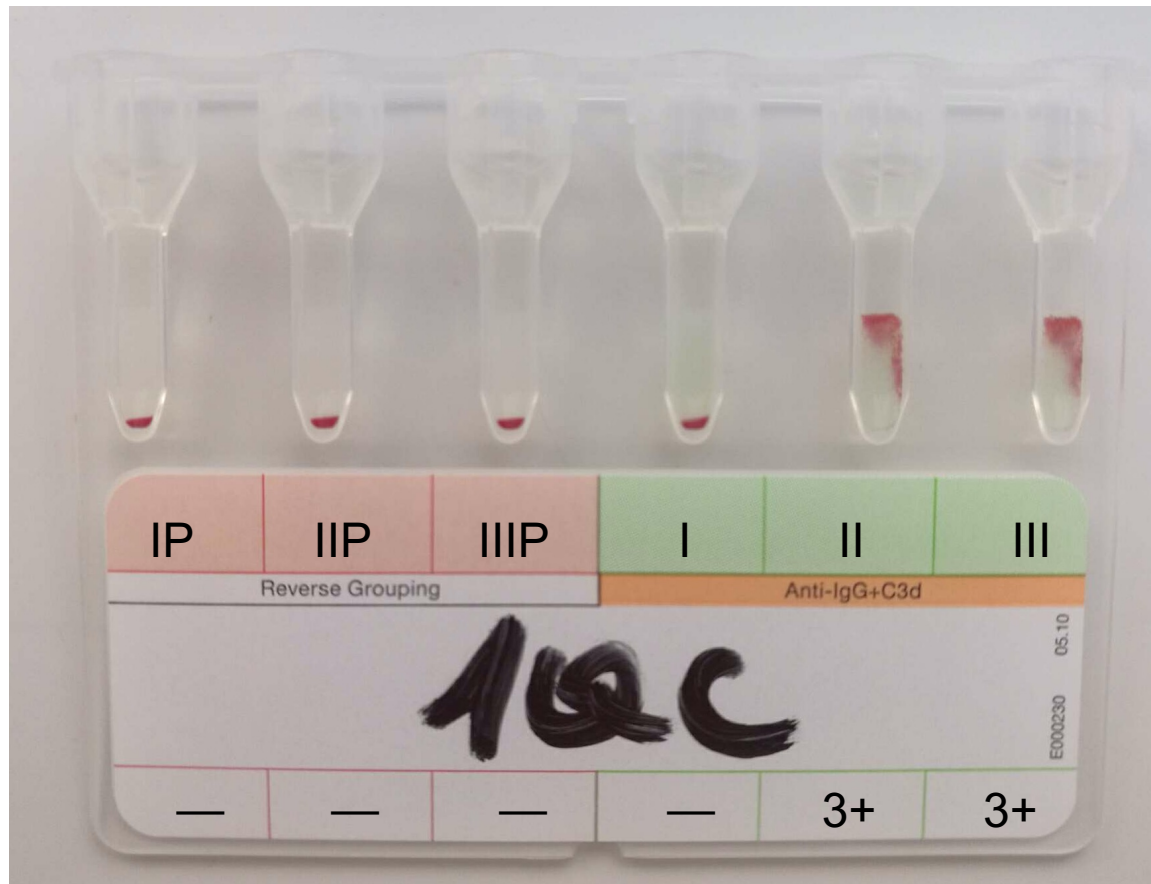
Ellenanyagszűrés

- Gélkártyán, oszlopagglutinációs technikával végezzük
- 2 közegben: LISS/Coombs és enzim közeg
- Mindkét közegben 3 – 3, ismert antigén tulajdonságú, 0-ás teszt vörösvérsejtekkel dolgozunk



Ellenanyagszűrés gélkártyán

1. 50 μ l teszt vvt + 25 μ l beteg plazma
2. Antigén túlsúly
3. 15 min inkubáció 37 °C-on
4. Centrifugálás
5. Értékelés



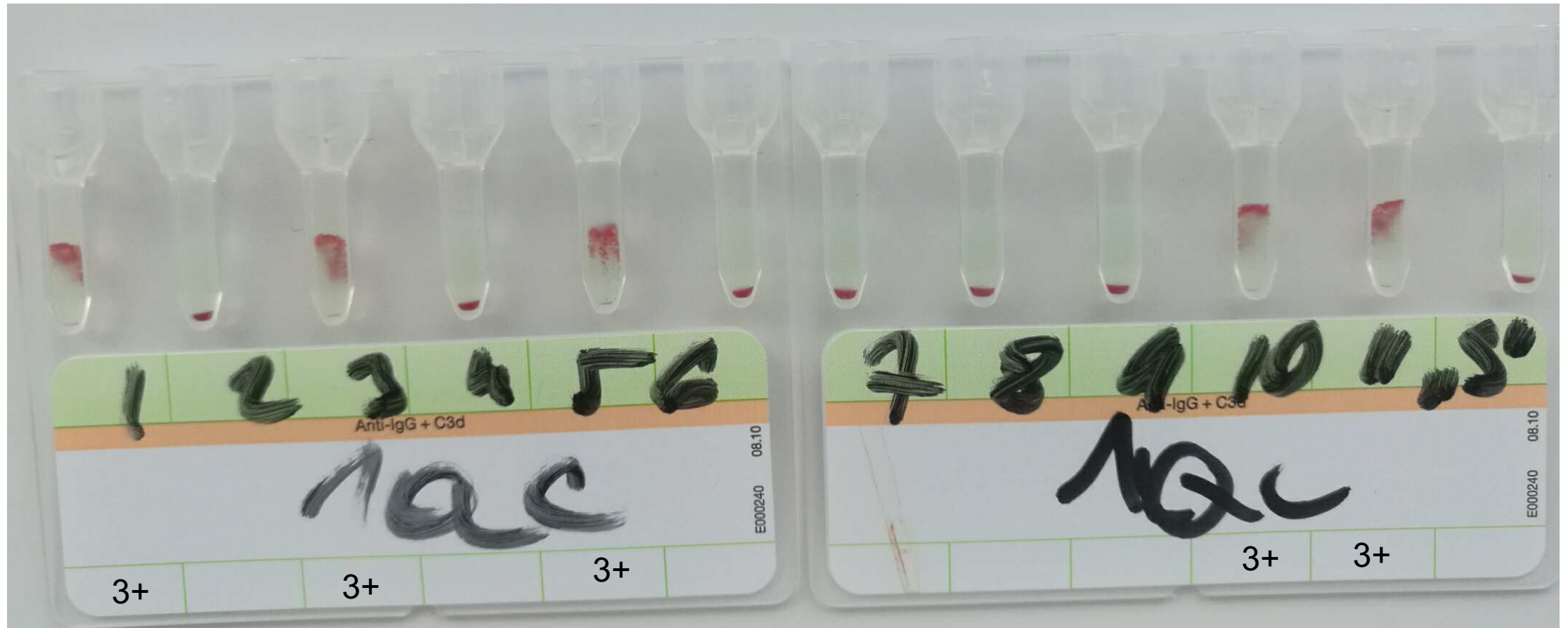
Enzim közeg: negatív eredményű

LISS/Coombs közeg: pozitív eredményű

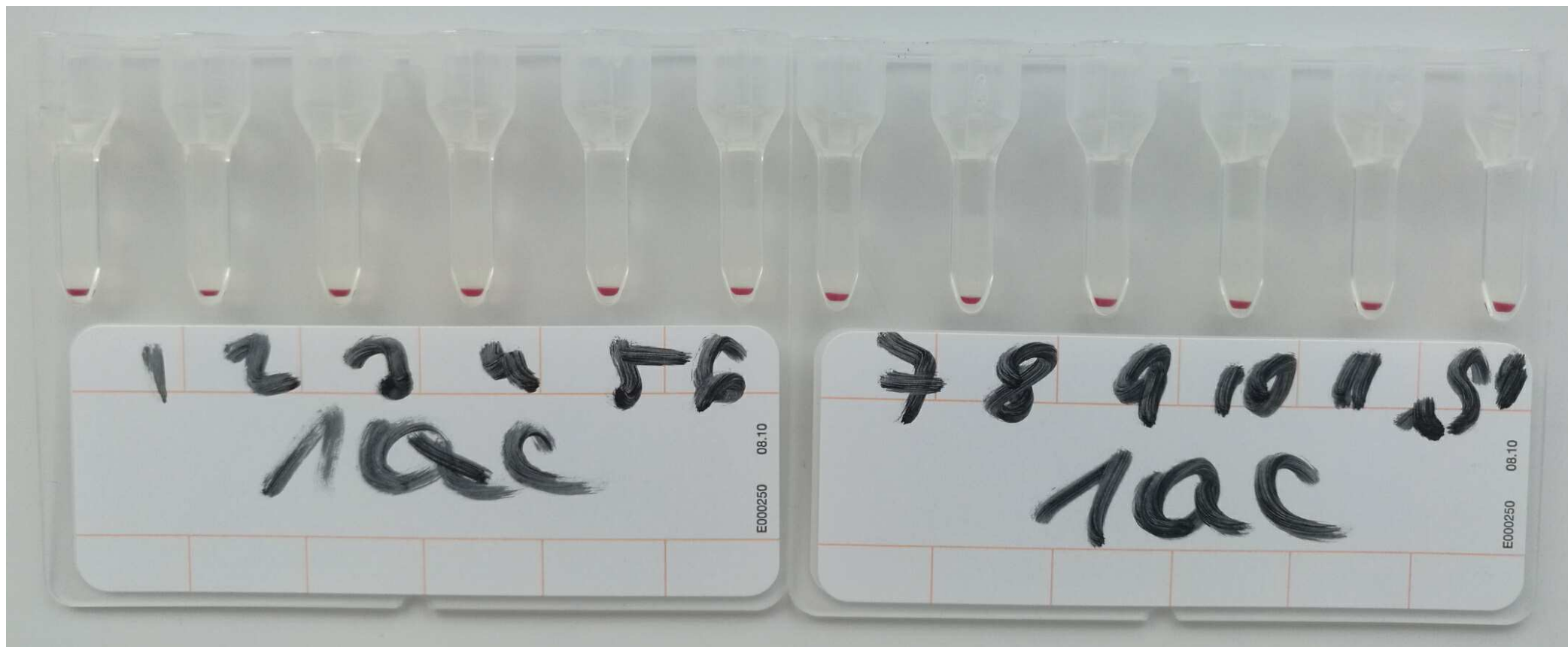
Ellenanyag azonosítás

- Pozitív ellenanyagszűrés esetén
- 11 tagú, 0-s fenotípusú teszt vvt történik – a sejtek antigén tulajdonsága ismert, bizonyos tulajdonságban megegyeznek, másban eltérnek
- Gélkártyán – oszlopagglutinációs technikával (mikromódszer), de csöves technikával is történhet (makromódszer)
- Szintén 2 közegben – LISS/Coombs és enzim

Ellenanyag azonosítás– Liss/Coombs közeg



Ellenanyag azonosítás– enzimkezelt közeg

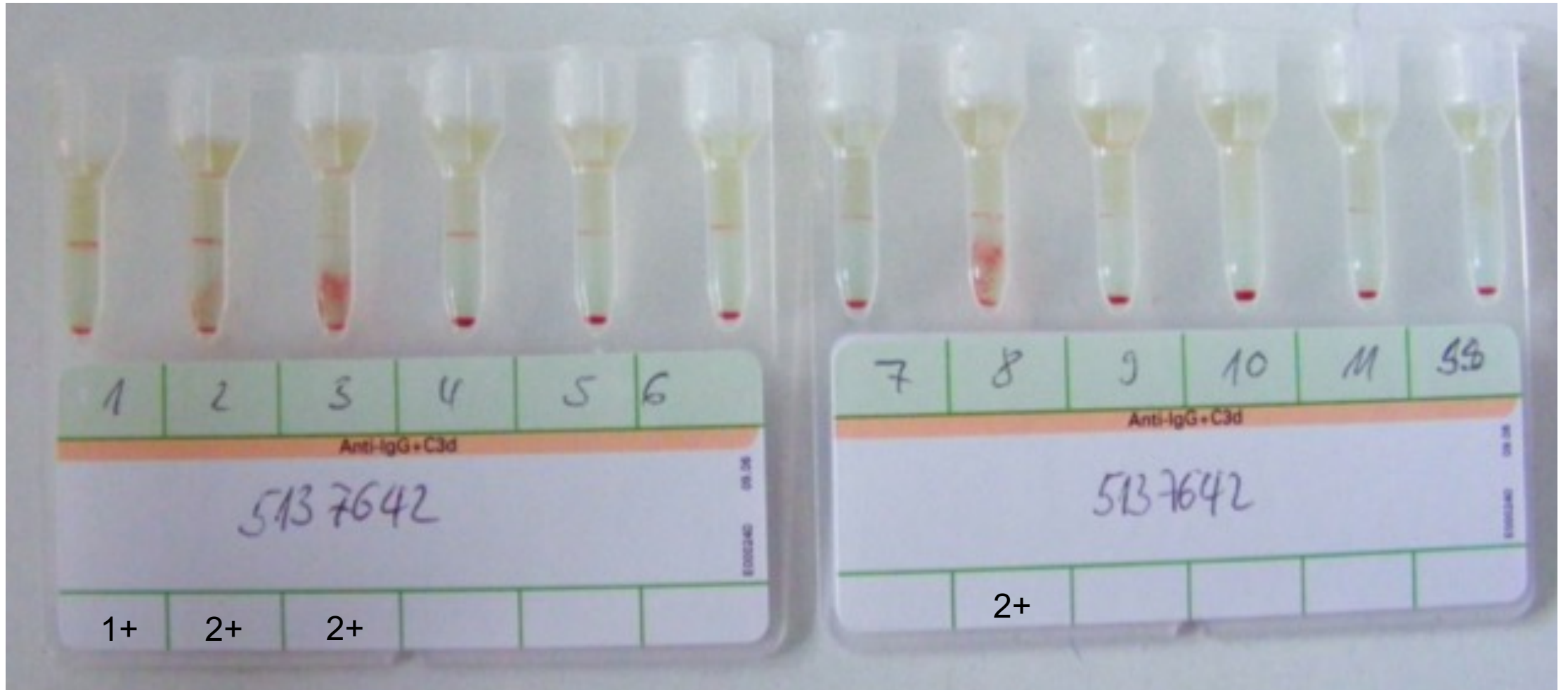


Minden teszt vvt-vel negatív reakció látható.

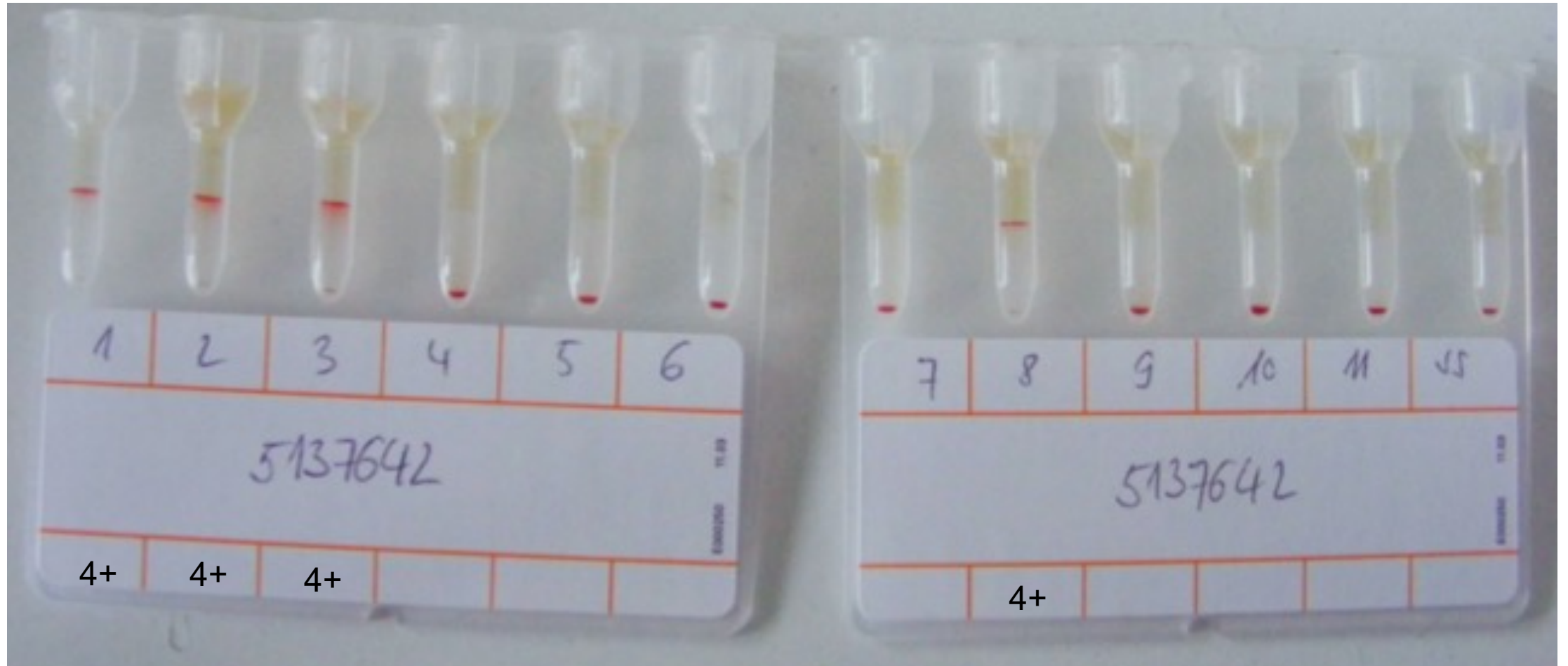
Antigen-Tabelle / Antigen-Table / Table d'antigènes / Tabella antigenica / Tabla de antígenos / Tabela de antígenos
Antikörper-Identifizierung / Antibody identification / Identification d'anticorps / Identificazione anticorpale / Identificación del anticuerpo / Identificação do anticorpo

[illegible]

Liss/Coombs közeg



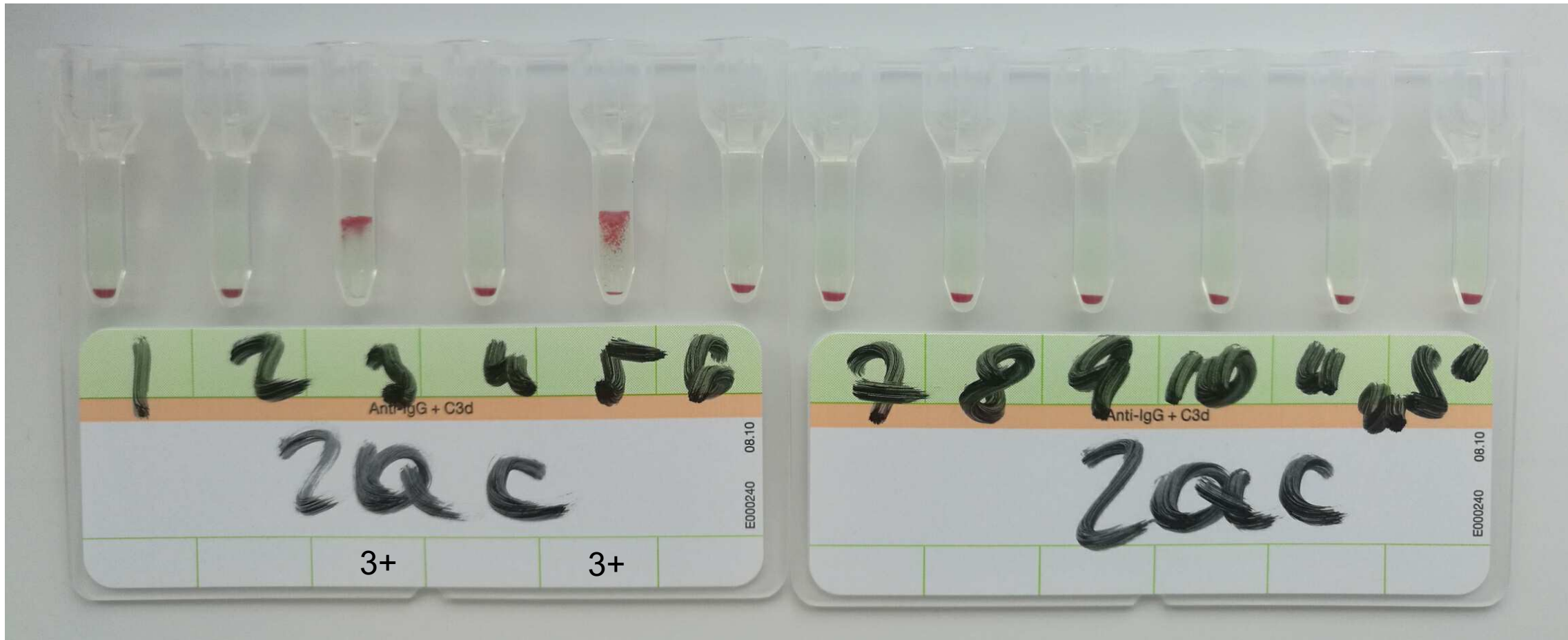
Enzim közeg



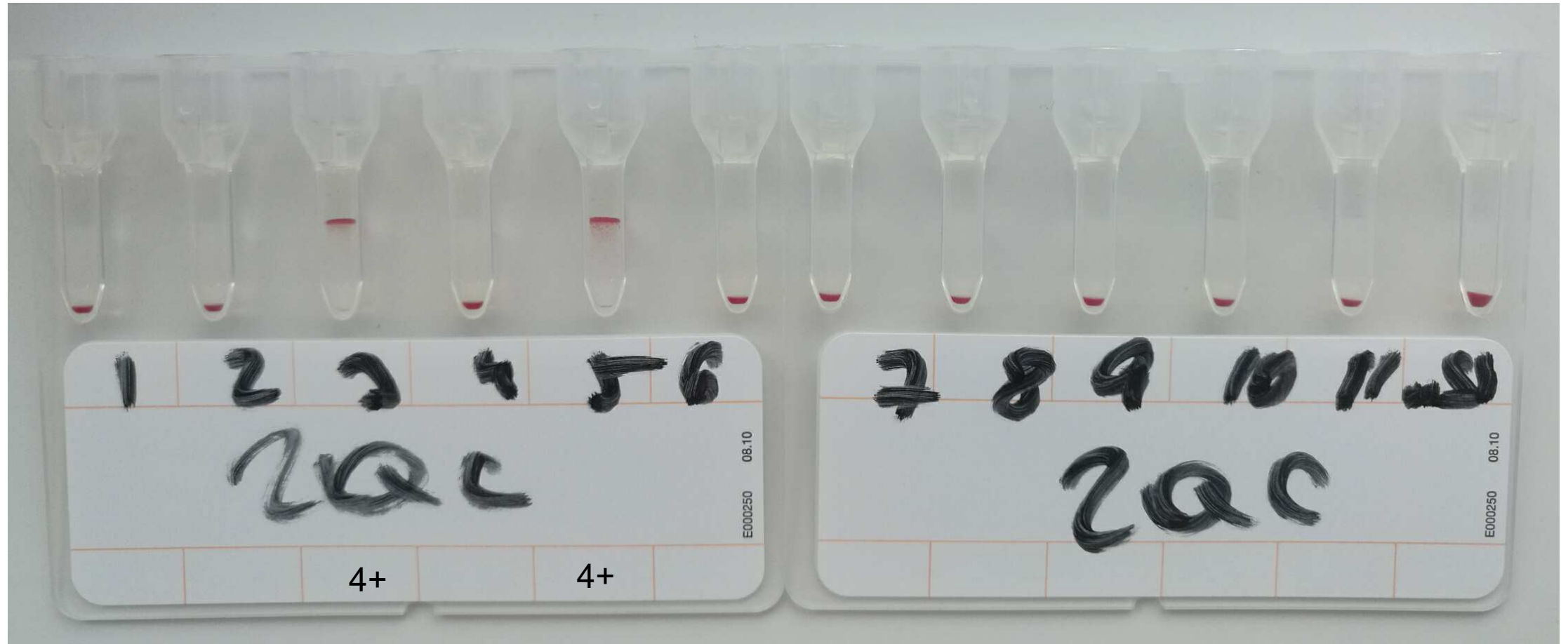
Antigen-Tabelle / Antigen-Table / Table d'antigènes / Tabella antigenica / Tabla de antígenos / Tabela de antígenos
Antikörper-Identifizierung / Antibody identification / Identification d'anticorps / Identificazione anticorpale / Identificación del anticuerpo / Identificação do anticorpo

[illegible]

Liss/Coombs közeg



Enzim közeg



Antigen-Tabelle / Antigen-Table / Table d'antigènes / Tabella antigenica / Tabla de antígenos / Tabela de antígenos
Antikörper-Identifizierung / Antibody identification / Identification d'anticorps / Identificazione anticorpale / Identificación del anticuerpo / Identificação do anticorpo

[illegible]

Ellenanyag azonosítás

- Az azonosított antitest lehet allo- vagy autoantitest
 - Ennek érdekében elvégezzük a beteg fenotípusának meghatározását
 - Leggyakrabban az Rh rendszerbeli antitesteket mutatjuk ki – Rh fenotípus meghatározás történik
- **Az antitest specifikitásának megfelelő antigénre negatív vérkészítményt kell biztosítani a betegnek – szerológiai kompatibilitás!**
- Ha egy korábban azonosított antitest koncentrációja a kimutathatósági szint alá csökken (értsd negatív az ellenanyagszűrés), a transzfúziós utasítás nem változtatható meg – memóriasejtek!
- Irreguláris antitest minden transzfúzió után megjelenhet
- Antitestek kimutathatósága változó
 - vannak évekig perzisztáló antitestek
 - vannak olyanok, amik gyakran eltűnnek a keringésből: pl. Jk (Kidd) rendszer antitestjei

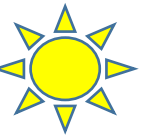
Transzfúziós nyilvántartás

- Az OVSz saját, országos informatikai rendszert működtet
 - Donor és beteg adatok
 - Vizsgálati eredmények
 - Transzfúziós nyilvántartás donorra visszavezethetően

Vércsoport-szerológiai kompatibilitás

A kompatibilitási vizsgálat elemei:

- Laboratóriumi vércsoport-meghatározás,
ennek része:
 - *AB0 meghatározás kétoldalas technikával*
 - *RhD meghatározás*
- ✓ **Ellenanyagszűrés** – pozitív ellenanyagszűrés esetén az ellenanyag azonosítása, sz.e. további vizsgálatok
- ✓ **DAT vizsgálat**



Vércsoport-szerológiai kompatibilitás

- Antigén kimutatása: ismert antitestet tartalmazó reagenssel
- pl.: AB0 és Rh tulajdonság meghatározás *(lásd Szerológia I. és II. gyakorlat)*