

Polyklonální a monoklonální antiséra a AIHA

5. Hradecká imunohematologická konference
20.1.2015

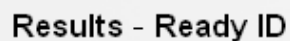
Helena Košťálková

AIHA

- U AIHA onemocnění se nejčastěji setkáváme s IgG protilátkami, které reagují při 37°C.
- Vede k problémům při vyšetření screeningu protilátek, typizaci Ag, identifikaci Ab a provedení testu compatibility.
- U AIHA se můžeme setkat i s protilátkami typu IgM reagující při 4°C.
- Oba typy protilátek mohou vést k aktivaci C1q složky komplementu a následné lýze erytrocytů komplementem.



- Vyšetření PAT, NAT, testu kompatibility, autokontrola.



Sample ID	Interp.	Flags	R-ID 1	R-ID 2	R-ID 3	R-ID 4	R-ID 5	R-ID 6	R-ID 7	R-ID 8
	Complete	*	4+	3+	3+	4+	4+	4+	3+	?
										
Sample ID	Interp.	Flags	R-ID 9	R-ID 10	R-ID 11	R-ID 12	R-ID 13	R-ID 14	Pos Ctrl	Neg Ctrl
	Complete	*	3+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0
										

Diagnostika používaná pro transfuzní vyšetření

- Komerčně připravované diagnostika rozdělujeme na

- Polyklonální

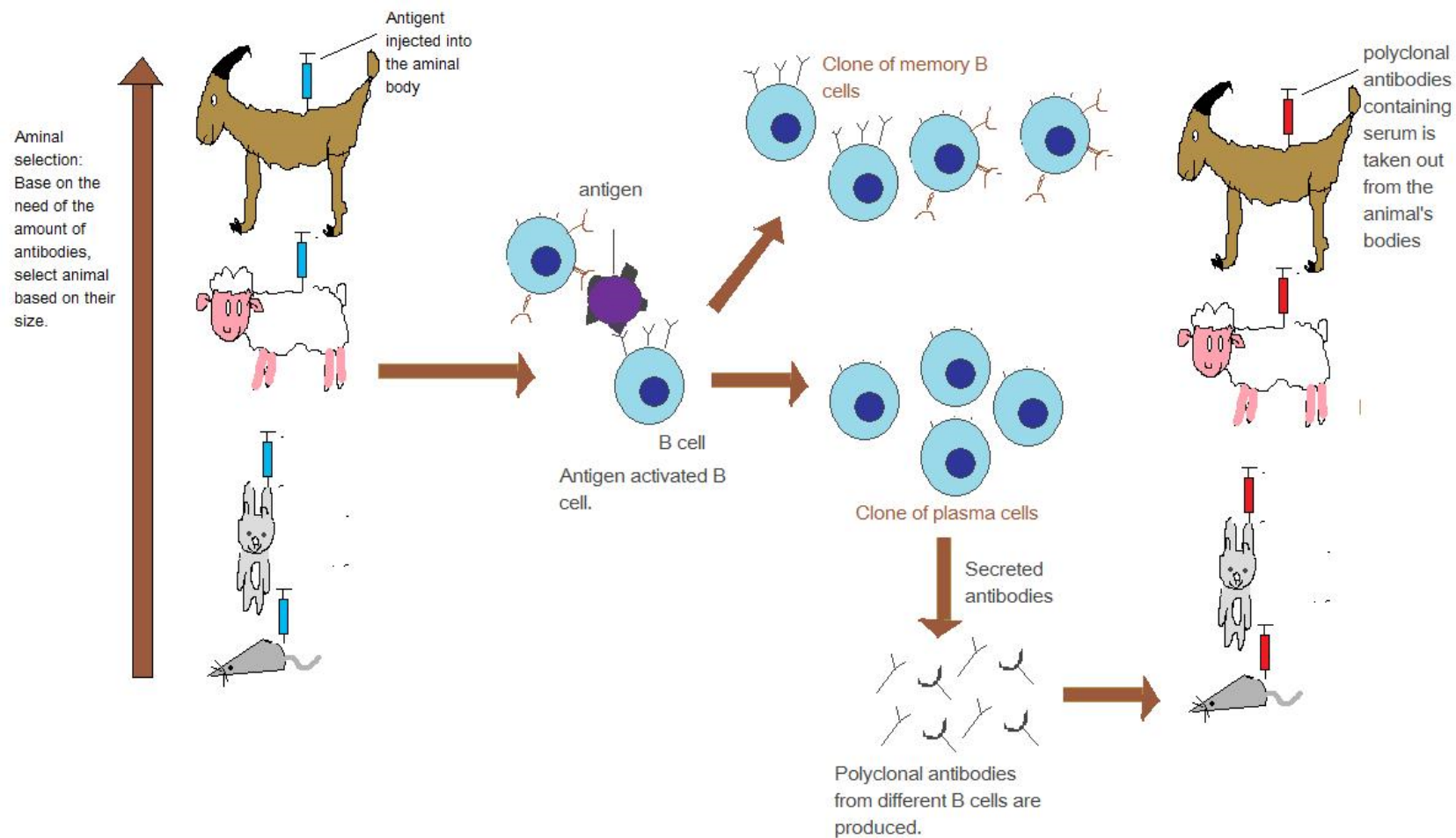
Polyklonální protilátky jsou produktem mnoha aktivovaných klonů B lymfocytů a proto jsou namířeny proti více epitopům určitého antigenu nebo směsi antigenů.

- Monoklonální

Monoklonální protilátka je imunoglobulin pocházející z produkce **jednoho klonu aktivovaných B-lymfocytů**, respektive jejich efektorových buněk (plazmocytů) po styku s konkrétním antigenním epitopem.



Výroba polyklonálních protilátek



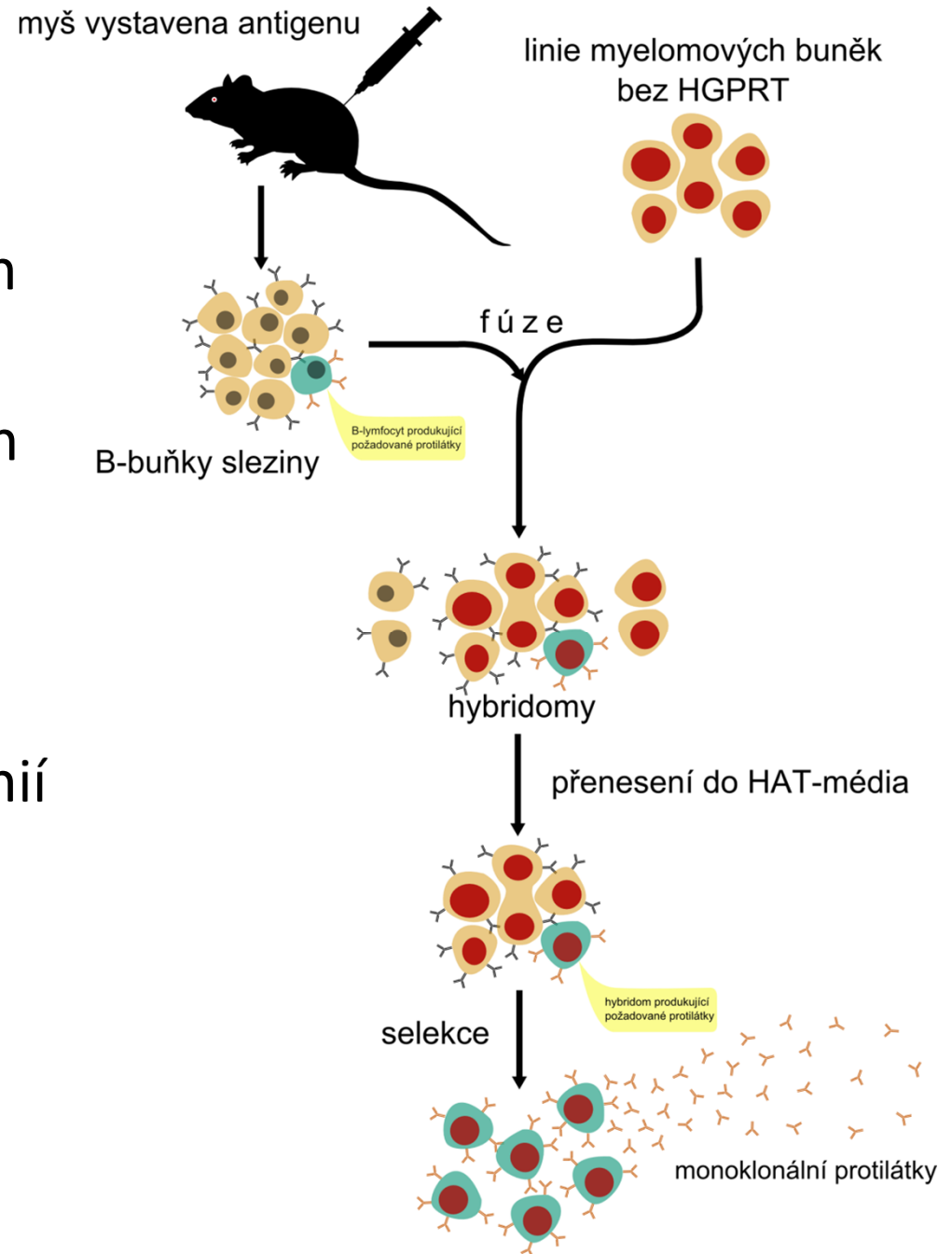
Polyklonální protilátky

- Výroba levná
- Požadavek na technologii je nízký
- Dovednosti pro výroby minimální
- Časová náročnost krátká
- Produkuje velké množství nespecifických protilátek
- Namířeny proti více epitopům určitého antigenu
- Může být šarže od šarže koncentrace Ab o různé síle

Monoklonální protilátky

- Jsou vyráběny pomocí tzv. hybridomové technologie, která byla vynalezena r. 1975 biology Césarem Milsteinem a Georgem Köhlerem
- Hybridom – „nesmrtelná“ buněčná linie, vytvořená spojením buňky (B – plazmatické buňky) s nádorovou buňkou, která ztratila kontrolu nad svým dělením.

1. Imunizace myši specifickým antigenem
2. Izolace B plazmatických buněk ze sleziny
3. Kultivace myelomových buněk
4. Spojení myelomových buněk a B lymfocytů
5. Separace buněčných linií
6. Namnožení in vitro
7. Nasbírání monoklonálních protilátek



Monoklonální antiséra

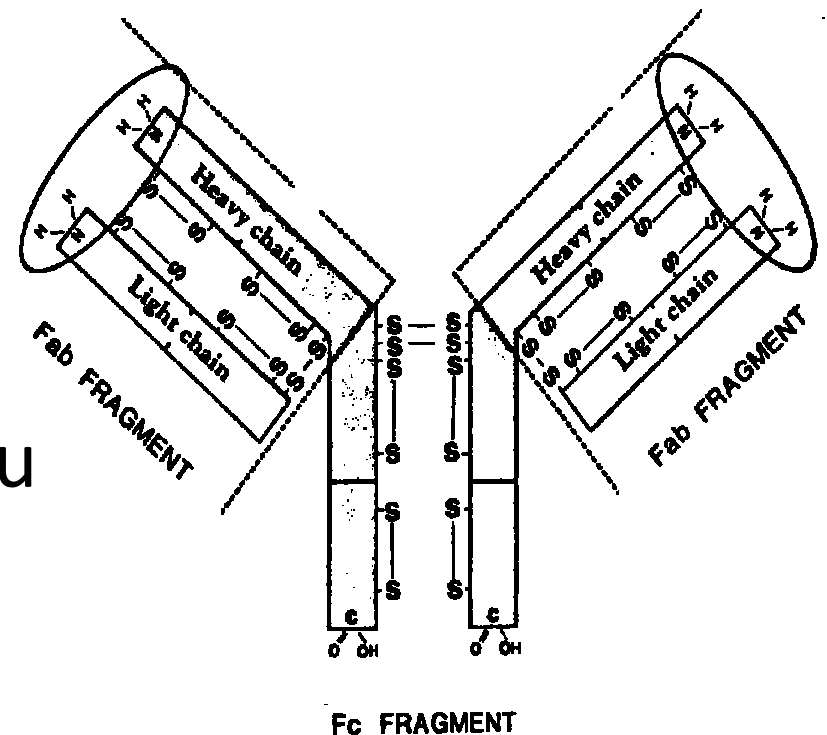
- Drahá výroba
- Požadovaná vyspělá technologie
- Vyžaduje zkušenosti pro výrobu
- Časově náročná z důvodu tvorby hybridomů
- Může produkovat velké množství specifických protilátek, ale mohou být příliš specifické
- Rozpoznává pouze jeden epitop na antigenu
- Je-li hybridom vytvořen – je konstantní a obnovitelný zdroj pro jednotlivé šarže

Shrnutí monoklonálních a polyklonálních protilátek

Monoklonální	Polyklonální
Protilátky jsou produkovány jedním klonem (B lymfocytu)	Protilátky jsou produkovány několika klony (B lymfocyty)
Jeden typ imunoglobulinu (IgG nebo IgM)	Směs protilátek
Jedinečná specifita na vybraný epitop	Směs protilátek, které mohou být zaměřené proti odlišným epitopům jediného antigenu
Stabilní titr	Různá síla
Krátká inkubace	Dlouhá inkubace
Spolehlivá výroba	Nestálost ve výrobě

ANTI HUMAN GLOBULIN

- ANTIHUMAN: Protilátky proti lidským antigenům
- GLOBULIN: všechny molekuly protilátky jsou globuliny.
- PROTO: AGH je protilátka přímo proti Fc části lidské protilátky a/nebo komponentů komplementu



Vyšetření screeningu protilátek u AIHA

- Antihuman Globulin AGH
- NAT



AGH: Anti-IgG, -C3b

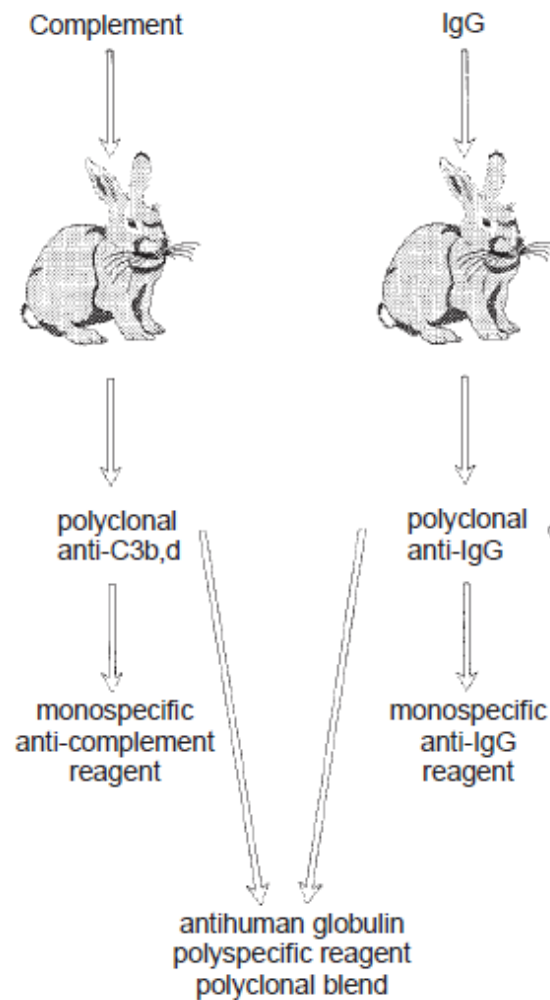
- PAT



AHG; Anti-IgG, Anti-C3b, -C3d, Anti-IgG, -C3d, Anti-IgA, Anti-IgM

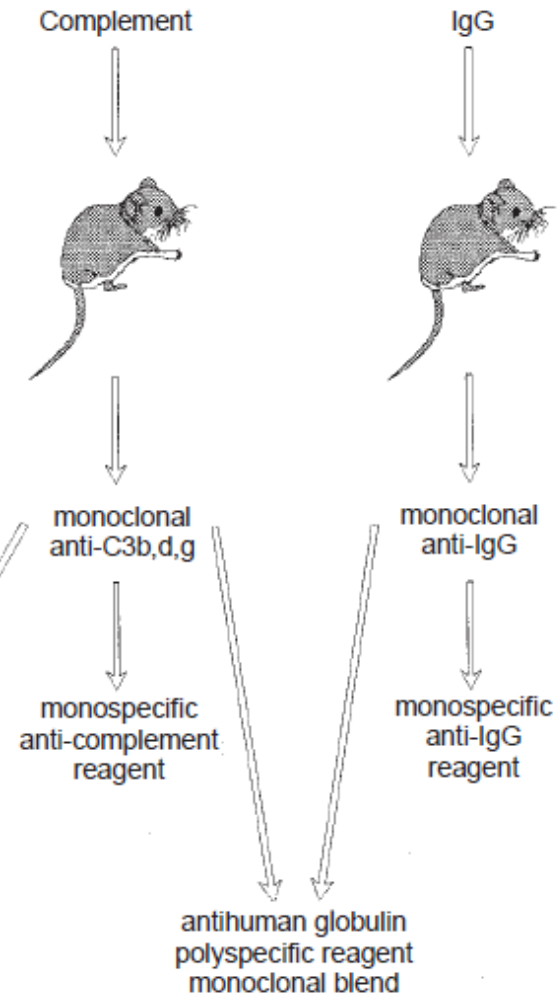
Conventional Method

Polyclonal Antihuman Globulin



Hybridoma Technology

Monoclonal Antihuman Globulin



POLYSPECIFICKÉ AGH

Králičí
polyklonální

- Anti-IgG, Anti-C3d (další komponenty komplementu a imunoglobuliny)

Králičí/Myší
monoklonální
blend

- Směs králičí polyklonální IgG a myší monoklonální anti-C3b a - C3d

Myší
monoklonální

- Myší monoklonální anti-IgG, -C3b a – C3d

MONOSPECIFICKÉ AGH

Anti-IgG

- Polyklonální IgG
- Monoklonální IgG

Anti-C3d a -C3b;
Anti-C3d, -C4b, -C4d

- Polyklonální Anti-C3d a C3b
- Polyklonální Anti-C3d, -C4b, -C4d

Anti-C3d
Anti-C3b, C3d

- Myší monoklonální Anti-C3d
- Myší monoklonální Anti-C3b, C3d

Využití polyspecifického AGH

- Polyspecifické AGH se převážně používá u PAT a v některých laboratořích pro test compatibility, ale i pro screening protilátek.
- Nejdůležitější záchyt IgG protilátek u testu compatibility a NAT
- Antikomplement – zbytečné
- Anti-C3d důležité při vyšetření PAT a u testování AIHA

Využití monospecifického AGH

- U PAT – charakterizace navázaných proteinů + podtřídy IgG (IgG1+IgG3).
- U NAT (především anti-IgG)
- U testu kompatibility
- Dweak (Vždy anti-IgG)

Komerční AGH

Společnost	AGH
Immucor	Capture: Monoklonální anti-IgG Tekutá diagnostika: Anti-IgG i anti-C3d
Grifols	DGGel: Směs králičí anti-IgG polyklonální, a monoklonální IgM a Anti-C3d Ab
Bio-Rad	DiaMed-ID: Směs králičí anti-IgG polyklonální, a monoklonální Anti-C3d Ab
Ortho	Směs králičí anti-IgG polyklonální, a monoklonální Anti-C3d Ab

Typizace antigenů u AIHA

Nevhodné:

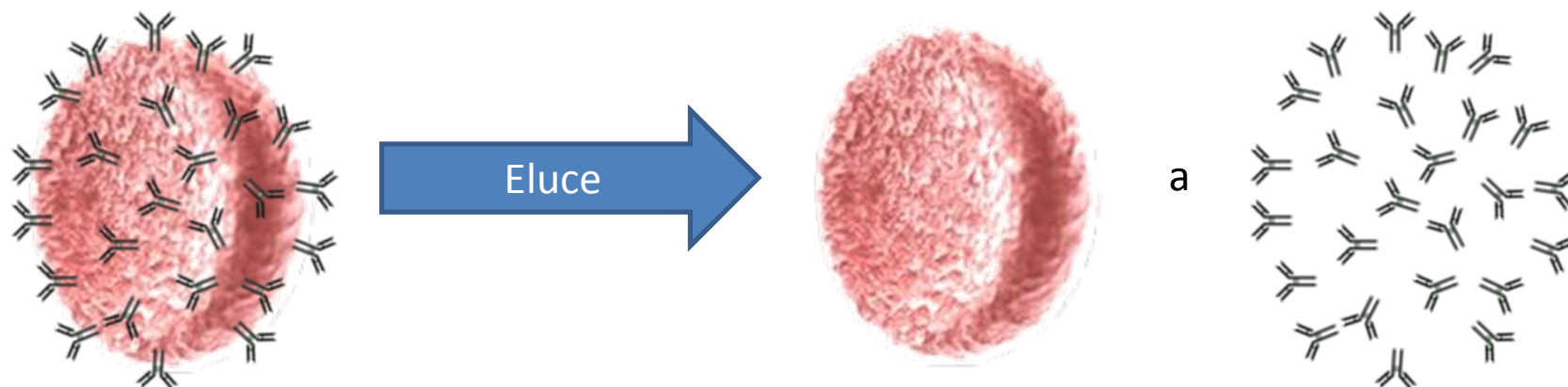
- Monoklonální IgG
- Polyklonální IgG

Vhodné:

- Monoklonální IgM
- Genotypování

Krevně skupinový systém	Immucor	Bio-Rad			Grifols	Dynex (Milipore)	Exbio
		DiaClone Tekutá	DiaClone ID karty	Seraclone			
ABOD	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM
CcEeCw	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM
Kell	IgM	IgG	Náplav bromelin	IgM	IgM	IgM	IgM
Cellano	IgG	IgG		IgM	IgG	-	IgM
Kpa	IgG	IgG		-	IgG	-	IgG
Kpb	IgG	IgG		-	IgG	-	IgG
Jka	IgM	IgM	Náplav bromelin	IgM	IgM	IgM	IgM
Jkb	IgM	IgM		IgM	IgM	IgM	IgM
Fya	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG	IgGMon	IgG
Fyb	IgG	IgG			IgG	IgM	IgG
Lea	IgM	IgA	Náplav bromelin	IgM	IgM	IgM	IgM
Leb	IgM	IgM			IgM		IgA
M	IgM	IgM	IgM	IgM	IgG	IgM	IgG
N	IgM	IgM	IgM	IgM	IgG	IgM	IgG
S	IgM	IgG	IgG	IgM	IgG	IgM	IgM
s	IgM	IgG	IgG	IgG	IgG	IgM	IgG

ELUCE



Uvolnění IgG protilátky s vazby na
erytrocytární povrch

a p r

Reagenty k odstranění Ab z erytrocytů

- Gamma-Quin[®] Chloroquine Diphosphate
- Gamma EGA[™] KIT
- Gamma ELU-KIT[™] II
- W.A.R.M.[™]
(Warm Autoantibody Removal Medium)



Gamma-Quin® Chloroquine Diphosphate

- Odstraňuje či zeslabuje navázané IgG na erytrocytech k otypování antigeny pomocí polyklonálních reagentů nebo absorpční studie
- Odstraňuje IgG Ab
- Neinaktivuje erytrocytární Ag
- 5 testů
- Zkumavkový test



Gamma EGA™ KIT

- Odstraňuje IgG navázané na erytrocytech pro otypování erytrocytárních antigenů a další testování
- Kyselá eluce
- 20 testů
- Rychlé
- Inaktivace Ag: Kell KS
- Typování Ag:
 - M, N, S, s
 - D, C, E, c, e
 - Fy^a, Fy^b
 - Jk^a, Jk^b



Gamma ELU-KIT™ II

- Uvolnění protilátek navázaných na erytrocytech a jejich identifikace
- Kyselá eluce
- AIHA
- HON
 - 10 testů



Děkuji za pozornost