

Malattia emolitica da anticorpi freddi: documento di consenso per la gestione diagnostica immunoematologica



La ricerca di crioagglutinine: indicazioni tecniche

Serelina Coluzzi

*Laboratorio di Immunoematologia Speciale
UOC Immunoematologia e Medicina Trasfusionale
AOU-Policlinico Umberto I-Sampierza, Roma*

La sottoscritta Serelna Coluzzi, in qualità di Relatrice
dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatrice di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le mie funzioni al fine di trarne vantaggio.



Caratteristiche degli autoanticorpi freddi

- Prevalentemente **IgM** monoclonali (policlonali nelle CAS)
- Reagiscono in maniera ottimale a temperature $\leq 4^{\circ}\text{C}$
- A differenza delle agglutinine fredde fisiologiche, hanno un **range termico elevato** (fino a $30\text{-}37^{\circ}\text{C}$) e possono causare emolisi
- Hanno **specificità** per gli antigeni del sistema I/i (soprattutto verso l'antigene I)
- Agiscono attivando il complemento (via classica) causando **emolisi soprattutto di tipo extra-vascolare**, in prevalenza a livello epatico



Fisiopatologia della malattie da anticorpi freddi

La struttura pentamerica delle IgM conferisce a questi anticorpi una maggiore capacità di legare contemporaneamente più globuli rossi, superando le forze di repulsione e inducendo una rapida massiccia **aggregazione**, prioritariamente nelle zone corporee esposte al freddo



Causa diretta dei sintomi circolatori transitori
(acrocianosi e fenomeno di Raynaud)

Il legame delle IgM agli antigeni eritrocitari target agisce innescando la cascata complementare (emolisi, prevalentemente extra-vascolare)



Causa diretta dei sintomi sistemicci (anemia,
ittero, *fatigue*)

TABLE 1 Summary of study results in determining cold agglutinins (CAs).

	Case-control studies (5/56, 9% of total studies)	Case series (18/56, 32% of total studies)
	Number of studies (n)	
Serological characteristics defining CA		
DAT C3d+	0	1
DAT C3d + and increased CA titer	1	3
DAT C3d + and positive thermal amplitude (reactivity at $\geq 30^\circ$ C)	1	1

TABLE 1 (Continued)

	Case-control studies (5/56, 9% of total studies)	Case series (18/56, 32% of total studies)
	Number of studies (n)	
Antibody specificity		
Indicative at 30° C	0	2
Indicative at 37° C	0	1
Not described	5	8
DAT strength		
Yes	0	6
No, but performed/ described	0	7
Not described	5	5

Systematic review for the serological testing for cold agglutinins: The BEST collaborative study

Marit Jalink^{1,2} | Matthew T. S. Yan^{3,4} | Claudia S. Cohn⁵ |
Quentin G. Eichbaum⁶ | Mark K. Fung⁷ | Wen Lu⁸ |
Michael F. Murphy⁹ | Monica B. Pagano¹⁰ | Simon J. Stanworth⁹ |
Andrew W. Shih^{11,12} | on behalf of The Biomedical Excellence for Safer Transfusion Collaborative

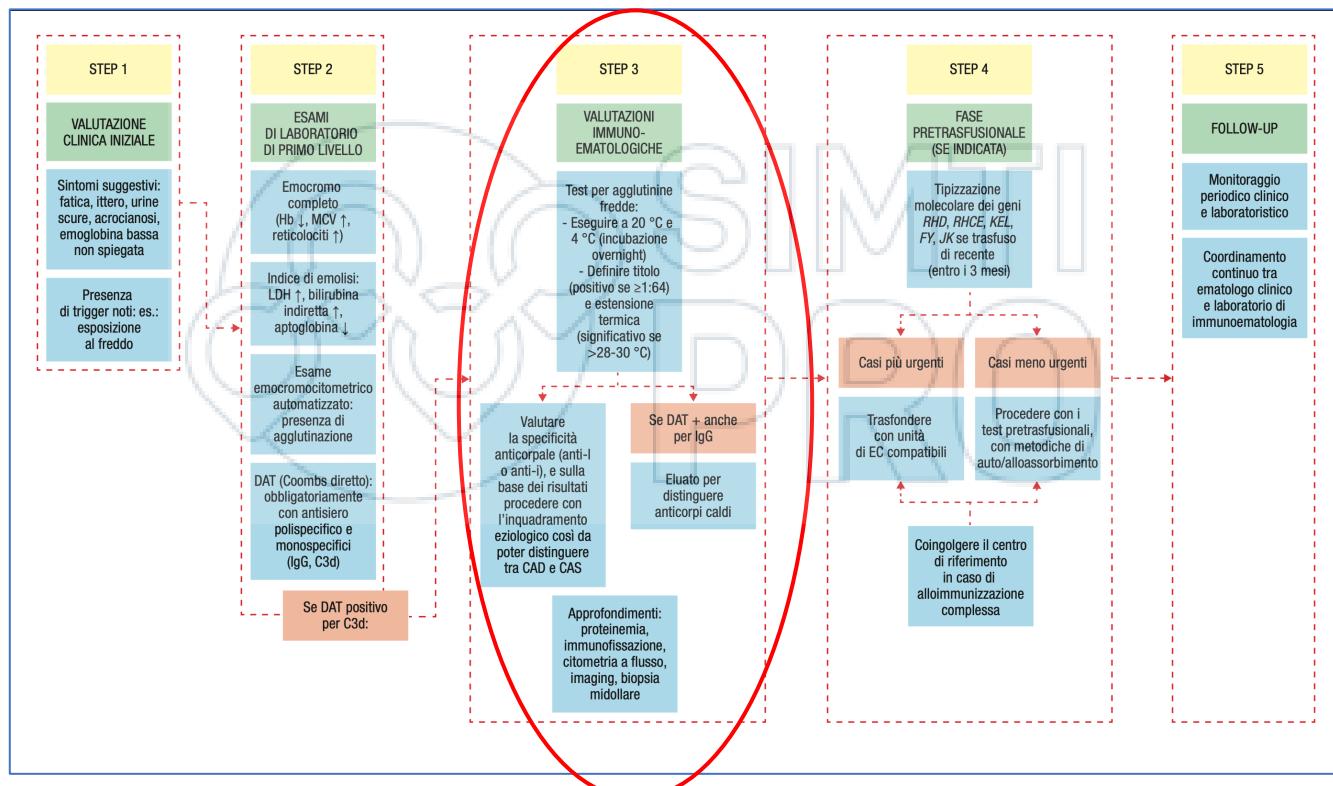
¹Center for Clinical Transfusion Research, Sanquin Research, Amsterdam, The Netherlands

TABLE 4 Tests for clinically significant cold agglutinin disease supported by the literature.

Test	Study design	Number of studies	Studies referenced
DAT C3d positivity	Case-control studies	1	[53]
Elevated CA titers	Case Series	7	[43,48,49,51,57,59,65]
	Case-control studies	2	No defined cutoff ⁵³ ≤ 64 not indicative of CAD ¹⁴
	Case Series	7	Studies that used a titer as part of definition for inclusion ^{43,45,48,50,51,63,64}
Thermal Amplitude	Case Series	Described: 7 Indicative of clinical significance: 3	Described ^{48–51,56,57,64} Indicative of clinical significance ^{52,54,65}
Antibody specificity	Case Series	6	Indicative ^{43,45,48,51,56,57}
DAT Strength	Case-control studies	2	[46,58]
	Case Series	5	[47,50,57,61,62]
Agglutinating RBCs	Case Series	2	[56,63]
Monocyte monolayer assay (MMA)	Case Series	2	[47,65]
Complement binding assay	Case Series	1	[50]
M-protein glycosylation (and cold in vitro hemolysis assays)	Cohort study	1	[13]
Serum complement levels	Case-control study	1	[15]

hogeneità in termini di one sierologica delle edde e definizione di

Algoritmo diagnostico per la gestione della CAD



Raccomandazioni per la corretta diagnosi della Malattia da Agglutinine Fredde (CAD)

Ricerca e titolazione delle agglutinine fredde : rilevanza della fase pre-analitica

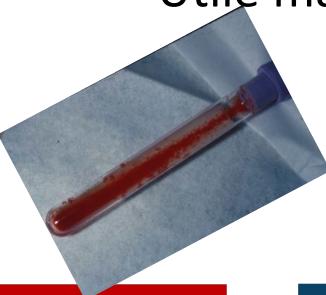
Prima di iniziare lo studio ie, prendere informazioni su:

- Anamnesi trasfusionale e ostetrica
- Diagnosi
- Dati di laboratorio (emocromo, indici di emolisi...)
- Terapia farmacologica



Prelievo e trasporto del campione in laboratorio sono momenti cruciali

Prelievo: andrebbe effettuato mantenendo il sangue costantemente a 37°C per evitare l'agglutinazione in vitro, anche nelle fasi di trasporto e centrifugazione. Utile mantenere il campione per circa 30' a 37°C prima della separazione.



Il siero viene **separato** a 37 °C per prevenire il legame degli Ac IgM sugli eritrociti



Ricerca e titolazione delle agglutinine fredde : rilevanza della fase pre-analitica



La **tipologia del campione** utilizzato per la ricerca anticorpale può condizionare la possibilità di rilevare i suddetti anticorpi:



campioni prelevati con anticoagulanti chelanti il calcio possono inibire l'attivazione del complemento, e conseguentemente ridurre le possibilità di evidenziare gli anticorpi che esplicano attività prevalentemente/esclusivamente di tipo emolitico



E' raccomandato quindi utilizzare **campioni di siero senza gel né additivi**

Workout immuno-ematologico in paziente con sospetta anemia emolitica da autoanticorpi freddi

Test di Coombs diretto (con antiglobulina polispecifica e con reagenti monospecifici almeno anti-IgG e anti-C3d)

Test di eluizione in caso di TAD pos anche IgG/IgA (AEA di tipo misto)

Ricerca delle agglutinine fredde patologiche (inizialmente) a 20 °C

Titolazione delle agglutinine fredde a 4°C

Studio del range termico

Dimostrazione della classe Ig dell'autoanticorpo

Identificazione di eventuali alloanticorpi associati

Determinazione del gruppo ABO/fenotipo Rh completo/K



Workout immuno-ematologico in paziente con sospetta anemia emolitica da autoanticorpi freddi

- **Test di autoagglutinazione** →



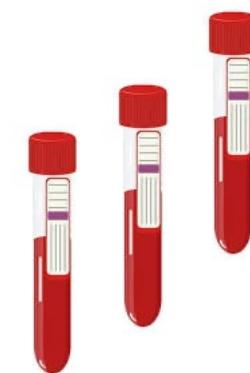
- **TAD: quasi sempre positivo di tipo C3d**



La presenza C3d sugli eritrociti in pazienti con quadro emolitico supporta il sospetto di emolisi complemento-mediata e correla in maniera significativa con la presenza di autoanticorpi freddi

Tipo di eritrociti da impiegare per la ricerca crioagglutinine:

- Emazie autologhe
- Emazie omologhe (O da adulto)
- Emazie omologhe (O da cordone)



Il trattamento enzimatico delle emazie: contribuisce alla definizione della specificità anticorpale.

Workout immuno-ematologico in paziente con sospetta anemia emolitica da autoanticorpi freddi

- **Perché le emazie autologhe:** gli autoanticorpi freddi devono reagire anche con le emazie autologhe
- La presenza dell'agglutinazione esclusivamente o in maniera molto più evidente con le emazie omologhe può sottindere la presenza di:
 - un alloanticorpo naturale (es.: M,Le, P1...)
 - un alloanticorpo anti-Vel (Ac IgM rivolto verso Ag ad elevata frequenza, clinicamente significativo)
 - un alloanticorpo anti-IH (> nei fenotipi A1, AB)
- **Perché le emazie O da adulto e O da cordone:** gli autoanticorpi freddi mostrano prevalentemente specificità anti-I (O da adulto) (circa 90%), in casi più rari, anti-i (O da cordone)

MEA di tipo freddo: caratteristiche sierologiche

2935 casi di MEA diagnosticati in circa 40 anni

732 (24,9%) casi sostenute da Ac freddi

TAD:

-di tipo C3d: 501 (68,4%)

-neg: 224 (30%)

Specificità:

Anti-I: 572 (78,1%)

Anti-i: 17 (2,3%)

Anti-non-li: 140 (19,1%)

Anti-Pr: 3 (0,4%)

Valore mediano del titolo: 256 (range 64-1.024.000)

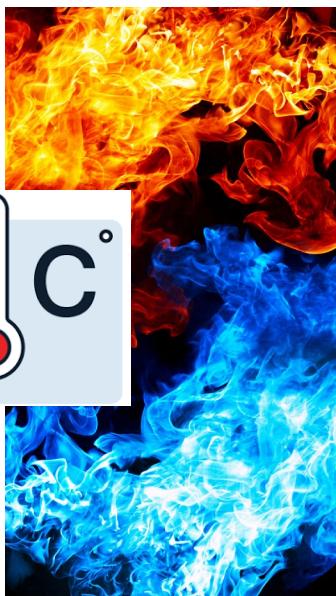
SIMTI
PRO

Policlinico Umberto I-Sapienza, Roma

Studio dell' amplitudine termica dell'anticorpo

- L' amplitudine termica dovrebbe essere valutata a diverse temperature (4°C, 20°C, 30°C, 37°C), in ogni caso **sempre a 4 °C (overnight)** e a **37 °C**
- Le **agglutinine fredde associate ad emolisi** generalmente reagiscono a 30°C e il 60% hanno un titolo >1000 quando ricercate a 4°C.

La presenza di emolisi,



Amplitudine termica in 732 casi di MEA di tipo freddo

- 70 (9,5%): 20°C
- 87 (11,8%): 30°C
- 574 (78,4%): 35-37°C

In

Policlinico Umberto I-Sapienza, Roma

Ricerca e titolazione agglutinine fredde:

RICERCA E TITOLAZIONE DI CRIAAGGLUTININE

Codice identificativo

Cognome

Nome

Data di nascita

Data campioni _____

Data test _____

Temperatura a cui perviene il campione

37°C

Temperatura ambiente

Titolo	Temp	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096		
Emazie Donatore Gruppo 0	37°C															
	T°amb															
	4°C															
Emazie Funicolo Gruppo 0	37°C															
	T°amb															
	4°C															
Emazie Paziente	37°C															
	T°amb															
	4°C															

CONCLUSIONI / NOTE

(per es. registrare la eventuale presenza di **emolisi** evidenziata alla lettura o la variazione della titolazione dopo eventuale **incubazione over-night**)

Firma Operatore Tecnico _____ Firma Dirigente _____ Data della refertazione _____

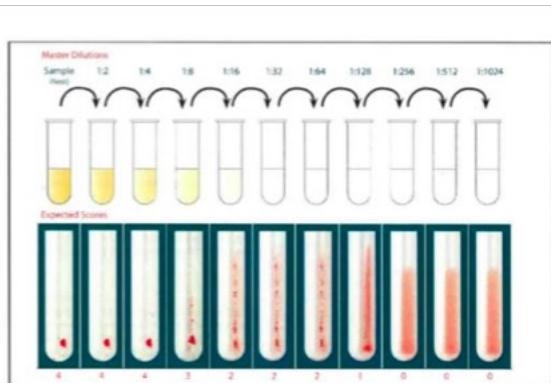
Titolazione delle crioagglutinine: procedura tecnica_1

Obiettivo: quantificare gli anticorpi, definire la diagnosi, valutare la significatività clinica

La ricerca delle crioagglutinine patologiche deve essere **eseguita in provetta** alla temperatura controllata di 20 °C

1. Diluizione seriale: è il punto cruciale della titolazione anticorpale.

- Si prepara una serie di provette, ognuna contenente una quantità fissa di soluzione salina.
- Si parte da una provetta in cui si aggiunge una quantità uguale di siero e soluzione salina, ottenendo una diluizione 1:2. Da questa provetta si trasferisce metà del volume nella provetta successiva contenente solo soluzione salina, ottenendo una diluizione 1:4, 1:8 e così via. Questo processo si ripete, creando diluizioni progressive (...1:16, 1:32, etc...)



Titolazione delle crioagglutinine: procedura tecnica_2

- **2. Incubazione con eritrociti:** step critico per permettere l'agglutinazione
La miscela di siero e sospensione eritrocitaria (al 3-5%) viene incubata a 20°C a temperatura controllata per 1-2 ore, successivamente a 4 °C, preferibilmente con incubazione notturna (*overnight*).
- **3. Lettura:** macroscopica, dopo centrifugazione a bassa velocità per 30''
L'ultima provetta in cui si osserva agglutinazione o emolisi definisce il titolo dell'anticorpo

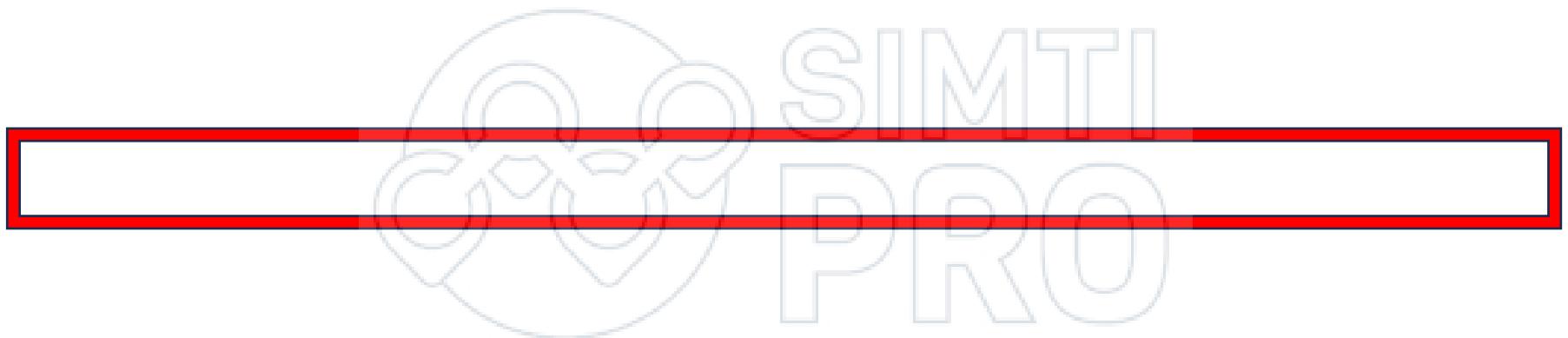
Titolazione delle crioagglutinine: procedura tecnica_3



4. Interpretazione dei risultati

- Il **titolo dell'anticorpo** è espresso come l'inverso della massima diluizione del siero che determina ancora un'agglutinazione visibile (+1).
 - Un **titolo $\geq 1:64$ a 4°C** è generalmente considerato **clinicamente significativo**
 - Titoli più elevati ($\geq 1:512$) sono tipici della CAD sintomatica
- Il titolo può fluttuare con la temperatura corporea e la stagione.
- In soggetti sani, titoli bassi ($< 1:16/1:32$) sono comuni (crioagglutinine fisiologiche).

Titolazione delle crioagglutinine



Titolo contro emazie O (adulto): 2048

Titolo contro emazie O cord: 64



Specificità dell'anticorpo: anti-I

Titolazione delle crioagglutinine: variabili che influenzano i risultati



Caratteristiche del campione



Metodo scelto



Trattamento del campione



Espressione antigenica emazie testo (singole sospensioni vs pool)



Concentrazione delle sospensioni eritrocitarie



Rapporto Ag/Ac



Tempo/Temperatura di incubazione



Interpretazione del risultato (fase liquida)



PRECISIONE ACCURATEZZA

Precisione: indica quanto vicini o quanto ripetibili siano i risultati

Accuratezza: indica quanto una misura è vicina al valore accettato

Accordo tra risultati di **misurazioni ripetute** dello stesso misurando eseguite **nelle stesse condizioni** (laboratorio, giorno, operatore)

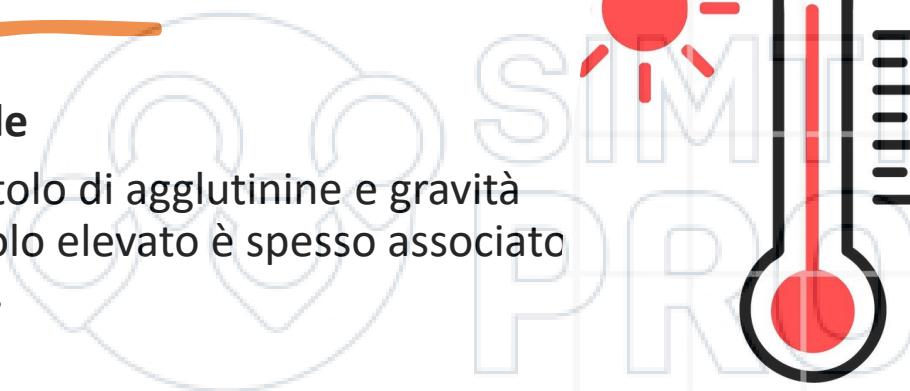
RIPETITIVITÀ RIPRODUCIBILITÀ

Accordo tra risultati di **misurazioni ripetute** dello stesso misurando **ottenute da diversi laboratori**

Significato clinico degli anticorpi freddi

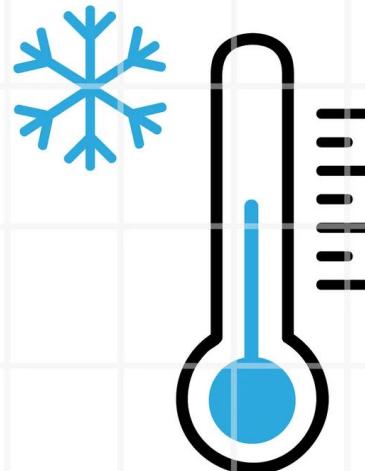
- **Titolo anticorpale**

Correlazione tra titolo di agglutinine e gravità dell'anemia: un titolo elevato è spesso associato a emolisi più grave.



- **Patogenicità:** non è solo la quantità di IgM; il range termico è importante per determinare la significatività clinica degli anticorpi e la possibilità che causino emolisi .

Questo è il motivo per cui a volte un titolo elevato non coincide con una clinica severa e viceversa.



Test ulteriori: impiego di enzimi

- In rari casi la specificità è di tipo **anti-*Pr*** (proteasi): l'anticorpo mostra pressocchè esclusiva reattività nei confronti di Ag sensibili all'impiego delle proteasi (a differenza delle classiche crioagglutinine fredde, che reagiscono meglio con gli eritrociti trattati con enzima).
- Questi Ag sono presenti nel contesto del complesso glicoforinico dei globuli rossi, per cui talvolta l'autoanticorpo freddo documentato alle basse temperature può mostrare nei pannelli di identificazione in pazienti M+ un comportamento anti-*M*-like.

Test ulteriori: eluizione

- Un TAD pos anche per IgG o IgA richiede l'effettuazione di un test di eluizione allo scopo di dimostrare la presenza effettiva di anticorpi IgG sugli eritrociti e definirne la specificità.
- AEA di tipo caldo e CAD sono causate entrambe da un disturbo dell'immuno-tolleranza e può capitare che non siano sempre distinguibili in maniera chiara



circa il 5-7% delle AEA sono di tipo misto, dove coesistono anticorpi caldi IgG e anticorpi freddi IgM

Pertanto è necessario lavorare in maniera rigorosa rispettando per la diagnosi i criteri che la comunità scientifica condivide per la distinzione delle due entità cliniche

Test ulteriori: identificazione di alloanticorpi associati

Pannelli di identificazione anticorpale

- con siero dopo autoadsorbimento a freddo
- con siero trattato con reagenti tiolici

Test ulteriori: determinazione del fenotipo eritrocitario

La tipizzazione del paziente deve includere la determinazione degli antigeni ABO/RH e di quelli appartenenti ai sistemi clinicamente significativi (KEL, JK, FY, MNS)

- mediante sierologia con antisieri monoclonali IgM per evitare l'interferenza dovuta alla positività del test di Coombs
- qualora il paziente sia stato trasfuso negli ultimi 3 mesi, tramite tecniche di biologia molecolare.

Per la **determinazione del fenotipo ABO** è spesso necessario tipizzare gli eritrociti dopo lavaggi a caldo con soluzione fisiologica e dopo incubazione per 1 ora a 37°C della prova plasmica

Conclusioni_1

La **titolazione delle agglutinine fredde** è uno strumento diagnostico essenziale nella CAD.

L' accuratezza del risultato dipende dal rigoroso rispetto dei protocolli pre-analitici e analitici.

Un **TCD** pos di tipo C3d, un **titolo** significativo delle agglutinine fredde in presenza di **anemia emolitica** ed altri segni e sintomi tipici consentono in genere di porre diagnosi di AEA da anticorpi freddi.

Conclusioni_2

- Fondamentale importanza riveste il **confronto tra clinico e laboratorio**, specialmente nei casi complessi e di non immediata interpretazione
- Nei casi sospetti e non documentabili sierologicamente è utile il coinvolgimento di laboratori di riferimento
- La diagnosi di CAD si basa in larga parte su indagini immunoematologiche mirate
- E' indispensabile pertanto che questa fase sia rigorosamente strutturata e standardizzata, al fine di garantire **accuratezza diagnostica, riproducibilità dei risultati e utilità clinica**
- **La standardizzazione dei protocolli di laboratorio è fondamentale per garantire un'accuratezza diagnostica uniforme.**

Agglutinine fredde: ulteriori approfondimenti diagnostici

Importanti per definire se trattasi di CAD o di CAS (cold agglutinin syndrome)

La **CAD** è considerata una entità clinico-patologica distinta, dovuta ad una malattia clonale dei linfociti B.

- In caso di diagnosi di AEA di tipo freddo è importante ricercare i segni di una disfunzione linfoproliferativa di basso grado (linfocitosi clonale o infiltrazione linfocitaria nel midollo osseo) → ematologo

La **CAS** è una sindrome secondaria, pertanto vanno ricercate altre condizioni (m. infettive, m. autoimmuni, neoplasie) in grado di stimolare il sistema immunitario (in questo caso le agglutinine fredde sono polyclonali) → infettivologo, immunologo

Pertanto la distinzione si basa su una combinazione di dati clinici, ematologici e di laboratorio.

GRAZIE

