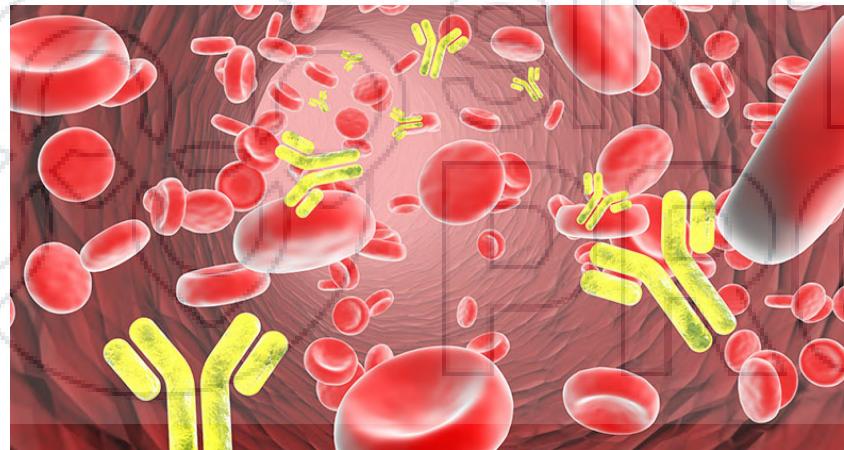


Malattia emolitica da anticorpi freddi: documento di consenso per la gestione diagnostica immunoematologica



La ricerca di crioagglutinine: indicazioni tecniche

Antonella Matteocci

UOS Produzione Interaziendale Emocomponenti e Immunoematologia di II livello

UOC Medicina Trasfusionale e Cellule Staminali

A.O. S. Camillo Forlanini - ROMA

La sottoscritta **Antonella Matteocci**, 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.

REVIEW ARTICLE

TRANSFUSION

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

²Department of Hematology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

³Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

⁴Medical Affairs and Innovation, Canadian Blood Services, Ottawa, Ontario, Canada

⁵Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA

⁶Department of Pathology, Microbiology and Immunology, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, Tennessee, USA

⁷Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Vermont Medical Center, Burlington, Vermont, USA

Indicazioni alle indagini immunoematologiche

6. Rilievi incidentali nei test immunoematologici, o difficoltà nella determinazione del gruppo, anch'essi indurre a un'approfondita valutazione.
7. Le indicazioni cliniche per eseguire test includono: anemia emolitica, segni/sintomi di patologie sottostanti associate.
8. Le indicazioni di laboratorio comprendono: compatibili con emolisi (come iperbilirubinato dell'LDH, riduzione dell'aptoglobina), esposizione al freddo, o agglutinazione macroscopica del campione ematico.
9. Il test diretto dell'antiglobulina (DAT) è indicato per la glutinazione al test indiretto dell'antiglobulina tra la tipizzazione ABO diretta e indiretta, così al rilievo di inattese positività, alla determinazione indiretta di gruppo sanguigno.
10. Il DAT deve essere eseguito utilizzando anticorpi (IgG e C3d) sia monospecifici (IgG, C3d, così come IgM) sia polispecifici.
11. Il test per la ricerca delle agglutinine fredde (cold agglutinin test - DAT) risulta positivo, con una conferma della reattività IgM per C3d (con antisiero monospecifico), indicando la presenza di IgG.
12. I laboratori dovrebbero definire protocolli operativi per la valutazione del DAT, anche in presenza di alterazioni tipiche della CAD (autoagglutinazione) e presenza di anticorpi panreattivi liberi nel plasma, con una logica di valutazione del rischio.
13. In caso di campione agglutinato all'arrivo, l'occorre un secondo campione mantenuto a 37 °C, ma nonché all'analisi del primo campione.
14. Le condizioni di esecuzione dei test devono essere riportate nel referto di laboratorio.

Arearie tematiche

Fase analitica

Raccomandazioni finali

16. La ricerca delle crioagglutinine deve essere eseguita in provetta a temperatura controllata di 20 °C, utilizzando emazie da donatore adulto, emazie da cordone ombelicale ABO-compatibili ed emazie autologhe. Successivamente, il test va ripetuto a 4 °C, preferibilmente dopo incubazione notturna (overnight).
17. In caso di DAT positivo anche per IgG (oltre che per il complemento), è indicata l'esecuzione di un eluato eritrocitario per evidenziare la presenza di eventuali alloanticorpi o autoanticorpi IgG.
18. L'estensione termica dell'anticorpo deve essere valutata a diverse temperature per determinarne la potenziale rilevanza clinica. Le temperature di test obbligatorie sono 4 °C (con incubazione notturna) e 37 °C; è inoltre preferibile includere anche la temperatura ambiente.
19. Particolare attenzione va riservata ai campioni in cui si osserva agglutinazione anche a 37 °C, poiché ciò può suggerire la presenza di anticorpi IgM a termotropismo insolitamente elevato ("IgM calde"), potenzialmente associati a forme più severe di emolisi.
20. La titolazione va eseguita in provetta, effettuando diluizioni seriali in doppio del siero del paziente.
21. La titolazione ha lo scopo di quantificare l'autoanticorpo e valutarne la significatività clinica.
22. La titolazione condotta con emazie da adulto, da cordone ombelicale ABO-compatibili e autologhe permette di valutare la specificità antigenica dell'autoanticorpo.
23. Il titolo di agglutinine fredde è definito come l'inverso della massima diluizione del siero che produce ancora un'agglutinazione visibile (+1) alla specifica temperatura di prova.
24. Un titolo di agglutinine fredde ≥1:64 (a 4 °C) è generalmente considerato clinicamente significativo e dovrebbe essere riportato insieme all'estensione termica.
25. La differenziazione tra specificità anti-I e anti-i può aiutare a distinguere la CAD primaria dalla CAS secondaria, specialmente in contesti infettivi (es. infezione da EBV) o linfoproliferativi.

Fase preanalitica

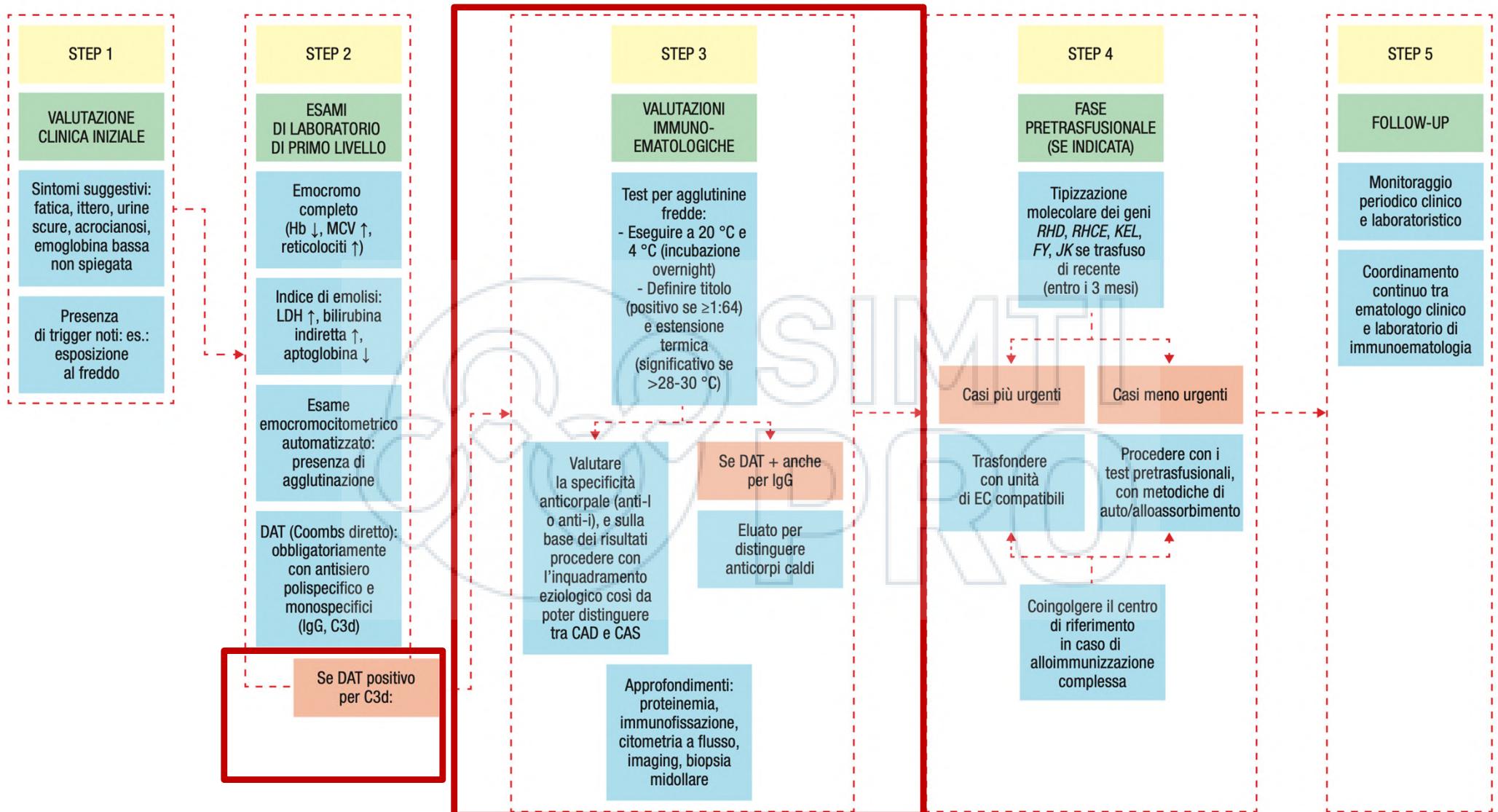
15. Il campione finalizzato alla ricerca e titolazione deve essere conservato a 37 °C fino alla valutazione delle componenti.

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



Algoritmo diagnostico per la gestione della CAD



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

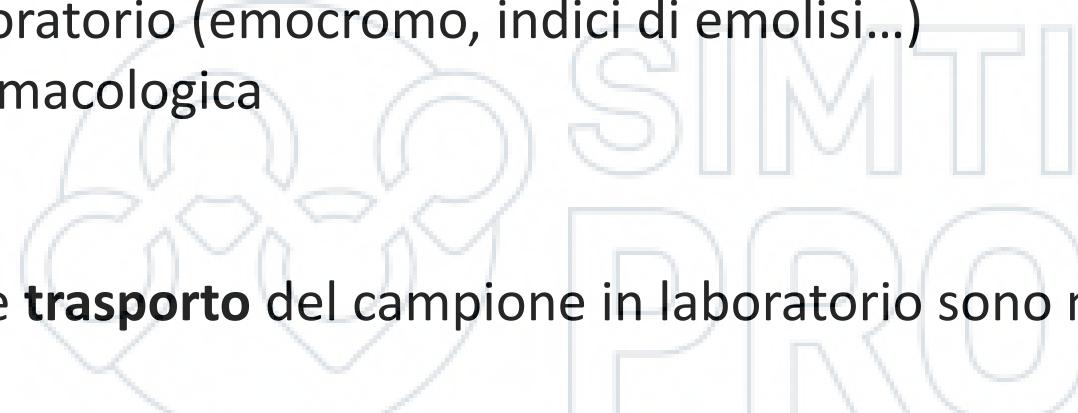
Ricerca e titolazione delle agglutinine fredde: rilevanza della fase pre-analitica

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: 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**

Work up immuno-ematologico in paziente con sospetta anemia emolitica da autoanticorpi freddi - 1

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

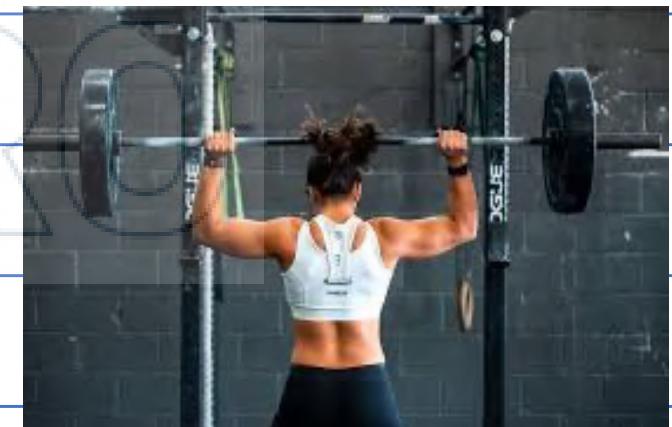
Titolazione delle agglutinine fredde a 4°C

Studio del range termico

Dimostrazione della classe Ig dell'autoanticorpo

Identificazione di eventuali alloanticorpi associati

Determinazione del gruppo ABO/fenotipo Rh completo/K



Work up immuno-ematologico in paziente con sospetta anemia emolitica da autoanticorpi freddi - 2

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.

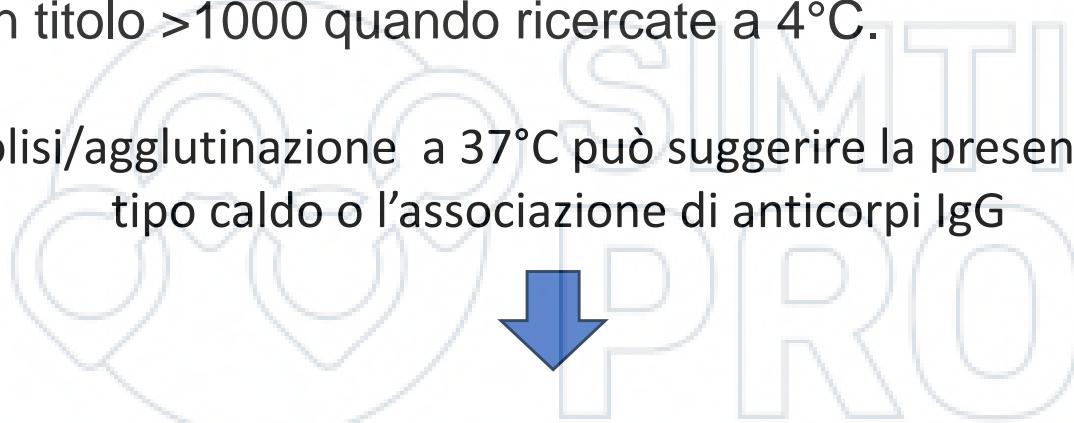
Work up immuno-ematologico in paziente con sospetta anemia emolitica da autoanticorpi freddi - 3

- 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, A1B)
- 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)

Studio dell' amplitudine termica dell'anticorpo

- L' amplitudine termica dovrebbe essere valutata a diverse temperature, 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/agglutinazione a 37°C può suggerire la presenza di anticorpi IgM di tipo caldo o l'associazione di anticorpi IgG



Studio dell'amplitudine a temperature diverse
Impiego dei reagenti tiolici per definire la classe Ig

Ricerca e titolazione agglutinine fredde: schema di lavoro

RICERCA E TITOLAZIONE DI CRIA|AGGLUTININE

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 _____

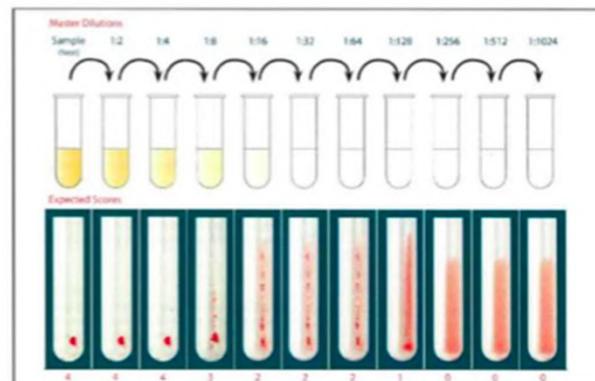
Titolazione delle crioagglutinine: procedura tecnica_1

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 anticoagulante.

- 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

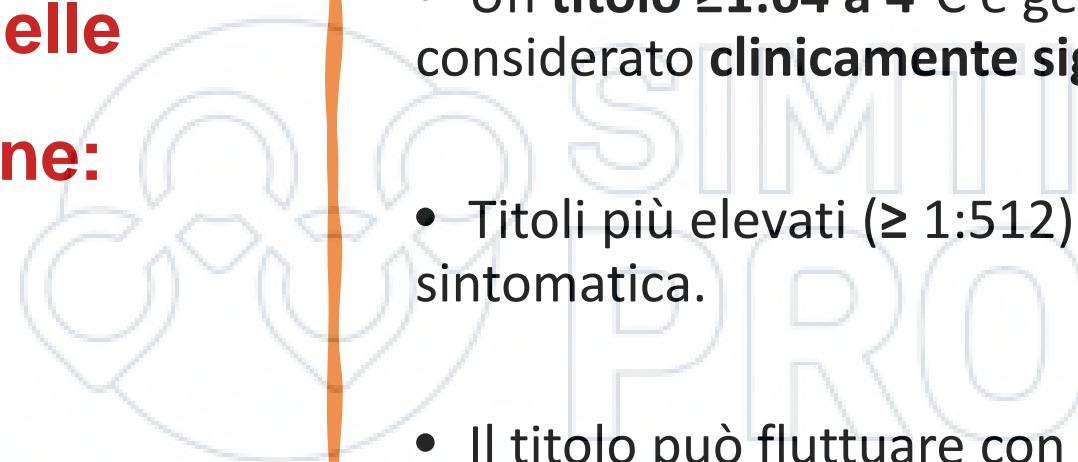
2. Incubazione con eritrociti: step critico per permettere l'agglutinazione

- 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. La misurazione deve essere ripetuta per monitorare la risposta alla terapia.
- In soggetti sani, titoli bassi ($< 1:16/1:32$) sono comuni (crioagglutinine fisiologiche).

Titolazione delle crioagglutinine: variabili che influenzano i risultati

- Caratteristiche del campione
- Metodo scelto
- Trattamento del campione
- Espressione antigenica emazie testo(omozigosi/eterozigosi, singole suspensioni vs pool)
- Concentrazione delle suspensioni 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

RIPETITIVITA' RIPRODUCIBILITA'

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

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

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: 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 di fornirne 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
- Infatti 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 sierica

Conclusioni_1

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

L'accuracy 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; è indispensabile pertanto che questa fase sia rigorosamente strutturata e standardizzata, al fine di garantire **accuratezza diagnostica, riproducibilità dei risultati e utilità clinica**.

Agglutinine fredde: ulteriori approfondimenti diagnostici

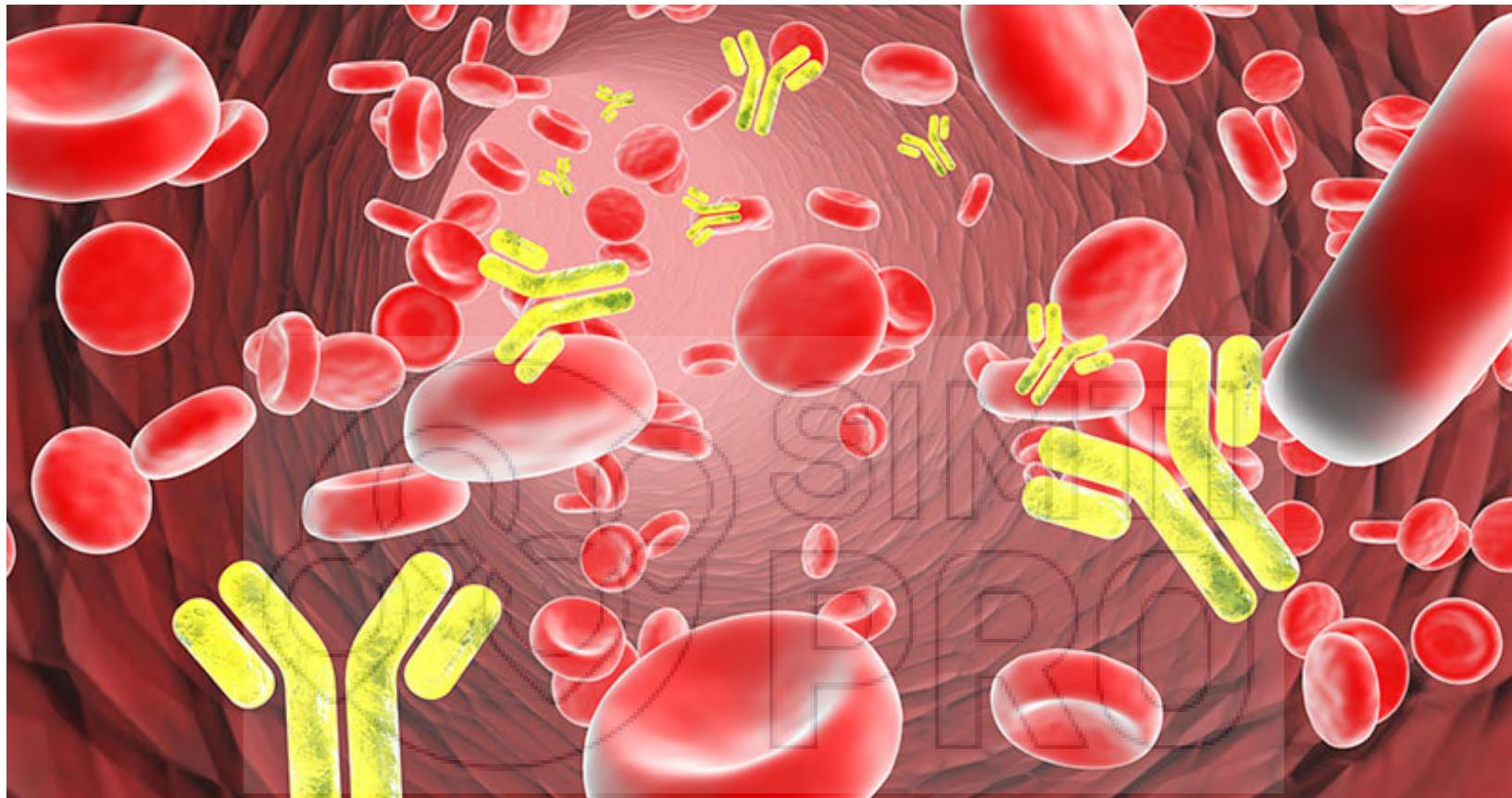
Importanti per definire se trattasi di CAD o di CAS (*cold agglutinin syndrome*)

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 policlonali) → infettivologo, immunologo

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



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!