ACCADEMIA di FORMAZIONE

SIMTI

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

La ricerca di crioagglutinine: indicazione al test e ruolo della cooperazione tra clinica e laboratori

Gianluca Ubezio

U.O. Medicina Trasfusionale

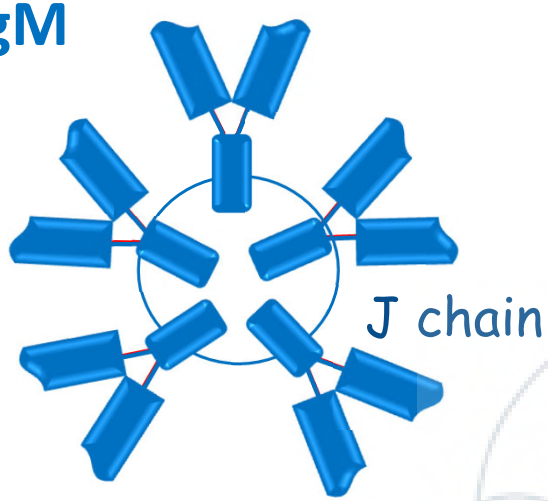
Ospedale Policlinico San Martino di Genova

Il sottoscritto, in qualità di Relatore
dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatore 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.

TEST ALL'ANTIGLOBULINA DIRETTO

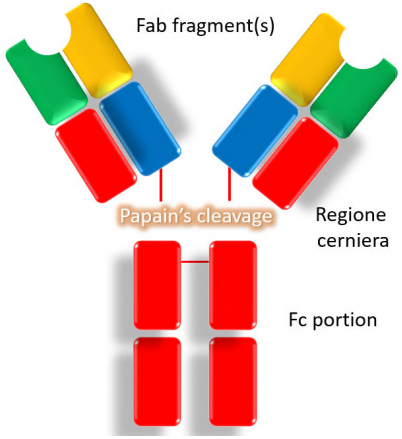
IgM



- 75% nel plasma (0.5-2.0 g/l)
- Spiccata capacità di attivazione del complemento.

- La loro produzione aumenta a partire da pochi giorni dopo la nascita, raggiunge la concentrazione di circa il 50% a 2-3 mesi ed è definitiva a circa 9 mesi. Solitamente si osserva una transitoria riduzione tra i 5 ed i 9 anni di età.

IgG

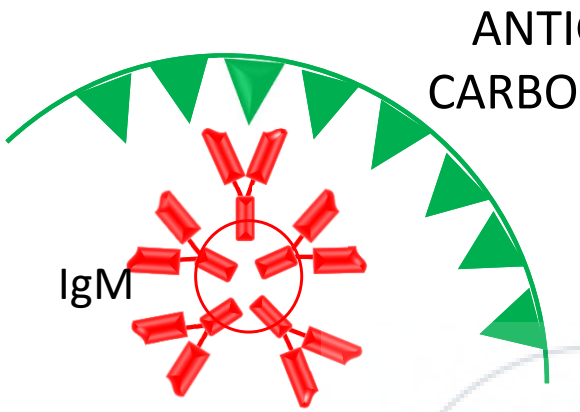


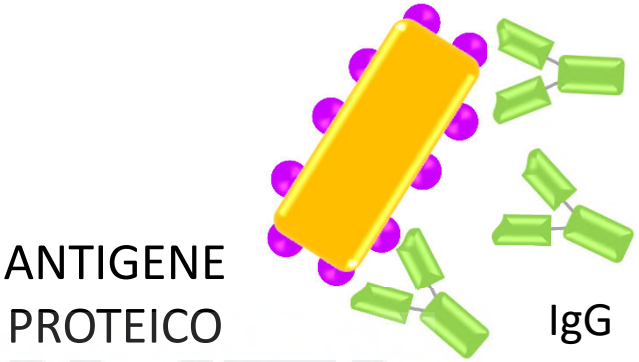
Funzione	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Neutralizzazione	+	++	++	++	++
Opsonizzazione	+	+++	+/-	++	+
Attivazione complementare	+++	++	+	+++	-

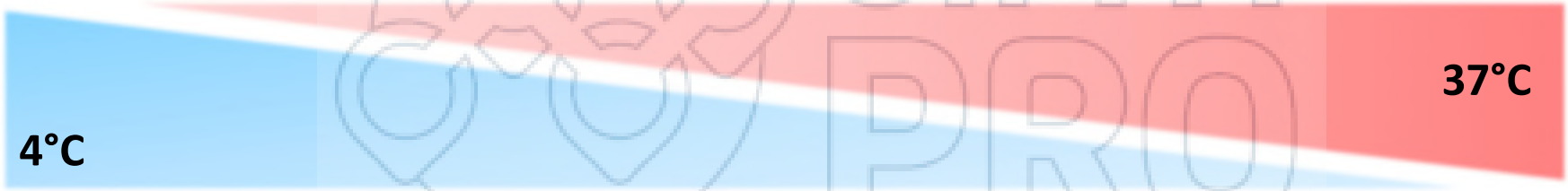
- IgG: Ig maggiormente rappresentata nel plasma (8-16 g/l). 50% nel plasma e 50% nei tessuti.
- 4 sottoclassi (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), che variano per regione cerniera, emivita e funzione.

ANEMIA EMOLITICA AUTOIMMUNE: CLASSIFICAZIONE SIEROLOGICA

RANGE TERMICO E REATTIVITA' ANTICORPALE







" complete antibody"

" incomplete antibody"

CRIOAGGLUTININE E FENOTIPO PATOLOGICO

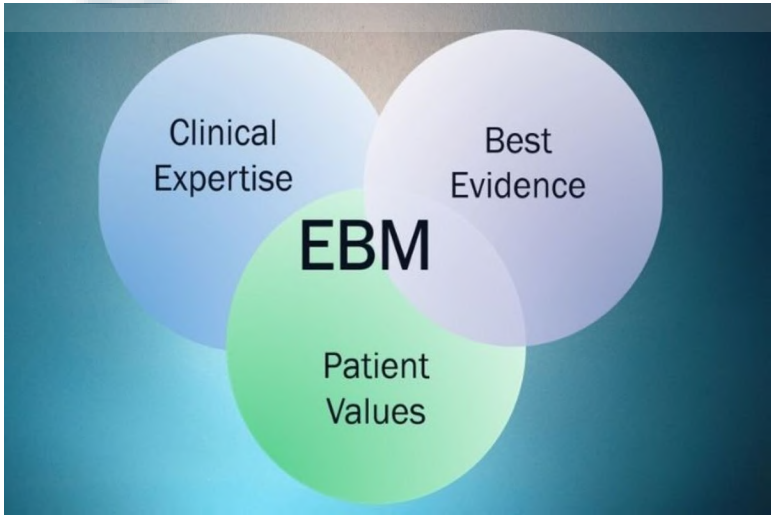
CAUSE ETEROGENEE → CRIOAGGLUTININE A TITOLO PATOLOGICO → PROGNOSI ETEROGENEA

TITOLO ANTICORPALE

AMPLITUDINE TERMICA

DEFINIZIONE DELLA SPECIFICITA'

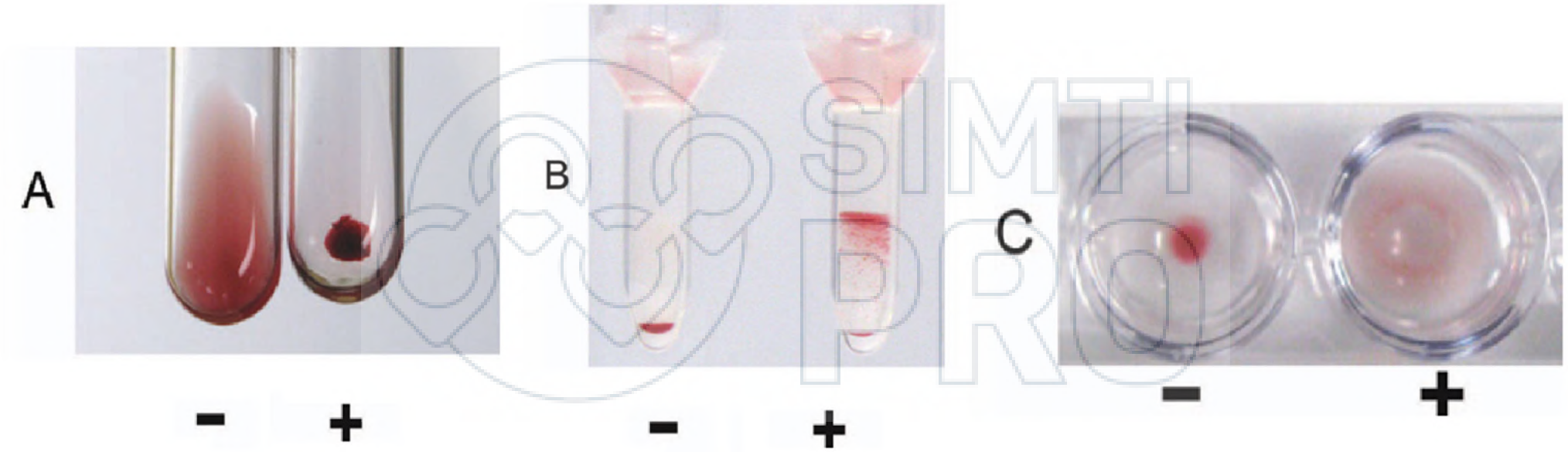
MECCANISMI EFFETTORI



TEST ALL'ANTIGLOBULINA DIRETTO

The direct antiglobulin test: a critical step in the evaluation of hemolysis

Zantek ND[1], Koepsell SA, Tharp DR Jr, Cohn CS. Am J Hematol. 2012 Jul;87(7):707-9

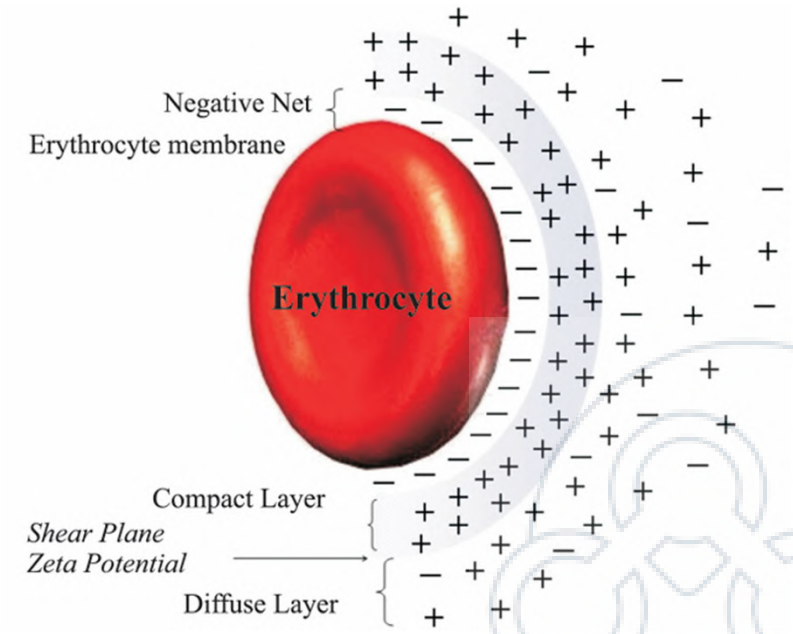


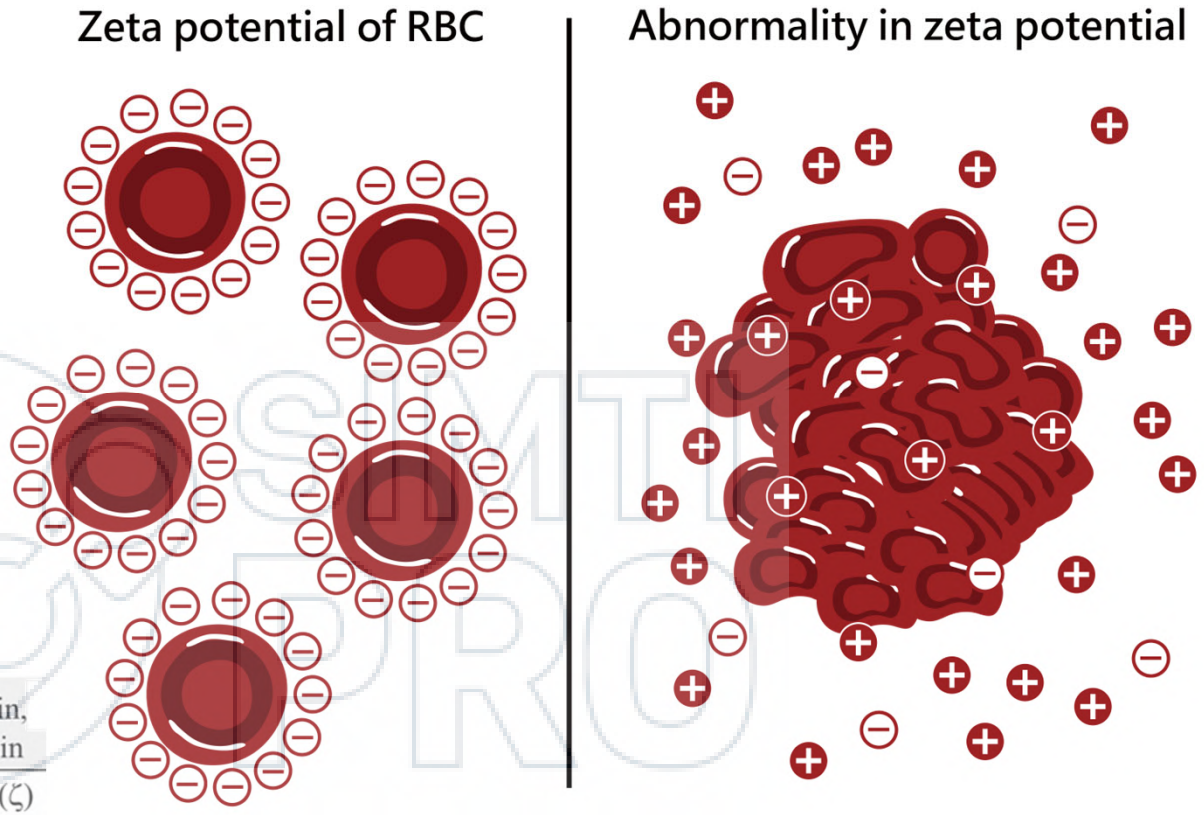
TECNOLOGIA – SENSIBILITA' – SPECIFICITA'

POTENZIALE ZETA ERITROCITARIO

- Gli eritrociti, come altre particelle in soluzione, sono carichi negativamente a causa della loro superficie e della composizione del glicocalice.
- Un potenziale zeta negativo elevato (per esempio, <-30mV) aumenta le forze repulsive, evitando che gli eritrociti si aggreghino.
- Questa stabilità elettrica favorisce un buon flusso sanguigno e una ridotta viscosità, importanti per la salute cardiovascolare

POTENZIALE ZETA ERITROCITARIO





Effects of enzyme treatment of red blood cells using bromelain, chymotrypsin, dispase, ficin, neuraminidase, pepsin and trypsin

Results were obtained from the zeta potential measurements (ζ) (Modified from Omi et al., 1994 [21])

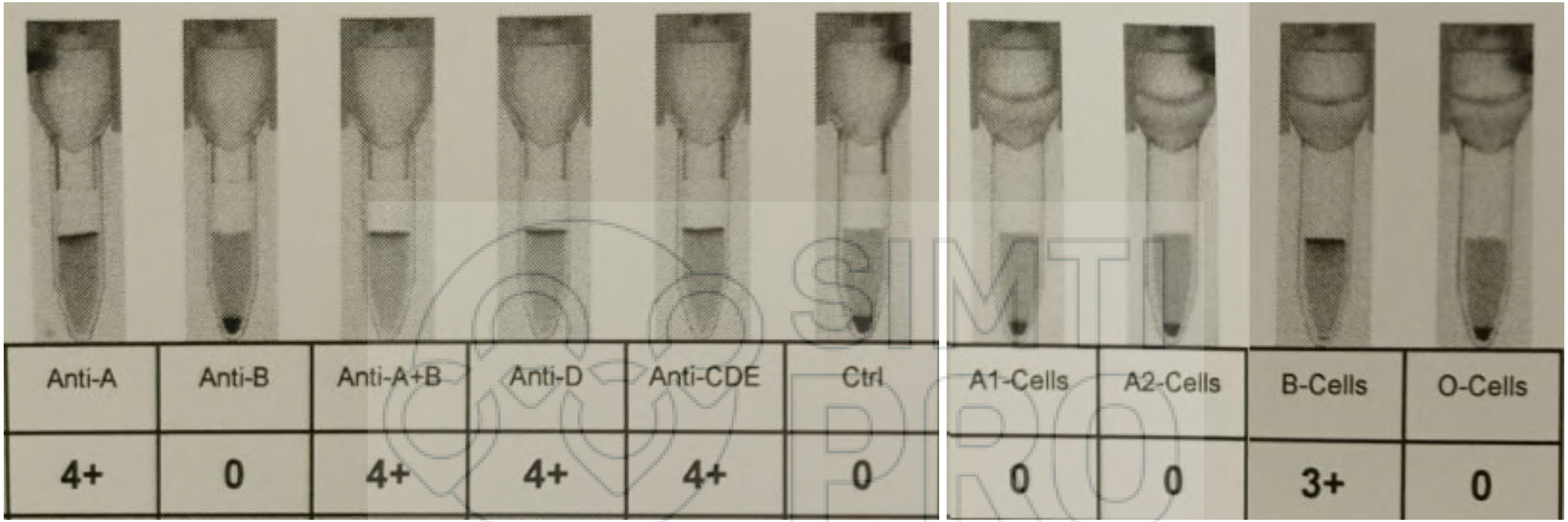
Enzyme	Zeta potential ζ (mV)	% Zeta potential Reduction
Bromelain	-6.05	55.8
Chymotrypsin	-7.91	42.3
Dispase	-9.04	34.0
Ficin	-4.38	68.0
Neuramidase	-1.31	90.4
Papain	-8.52	37.8
Trypsin	-7.28	46.8
Normal	-13.70	0

The zeta potential (ζ) can be shown by an equation (Figure 6) and depends on electronegativity (charge) of the RBC (σ), the dielectric constant of the medium (D) and ionic strength (μ) [1,13]

$$Z = f\left[\sigma, \frac{1}{D}, \frac{1}{\sqrt{D\mu}}\right]$$

Rev Bras Hematol Hemoter. 2011;33(4):297-301

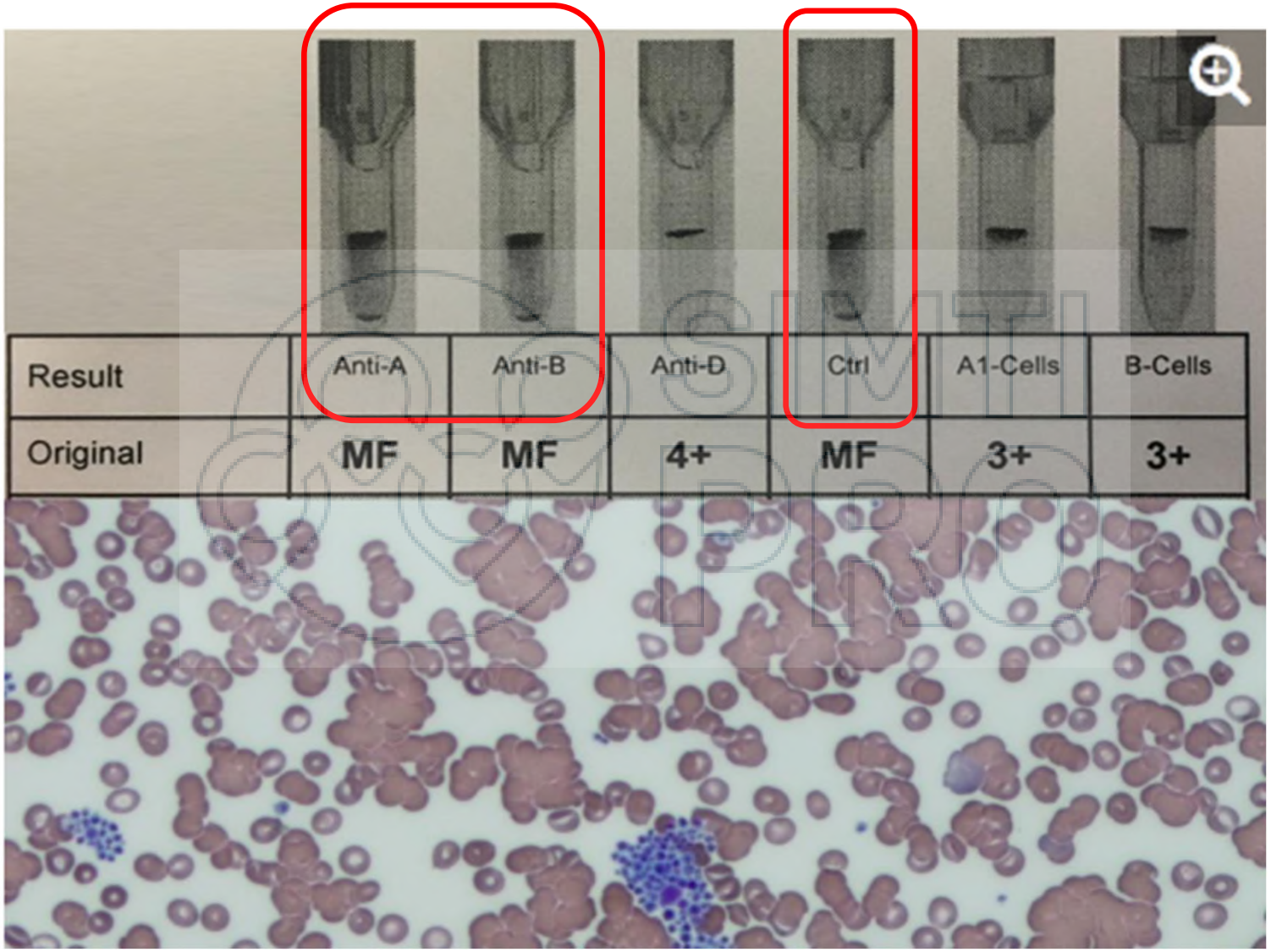
DETERMINAZIONE DI GRUPPO SANGUIGNO E INTERFERENZA DA CRIOAGGLUTININE



Anti-A	Anti-B	Anti-A+B	Anti-D	Anti-CDE	Ctrl	A1-Cells	A2-Cells	B-Cells	O-Cells
4+	0	4+	4+	4+	0	0	0	3+	0

DETERMINAZIONE DI GRUPPO SANGUIGNO E INTERFERENZA DA CRIOAGGLUTININE

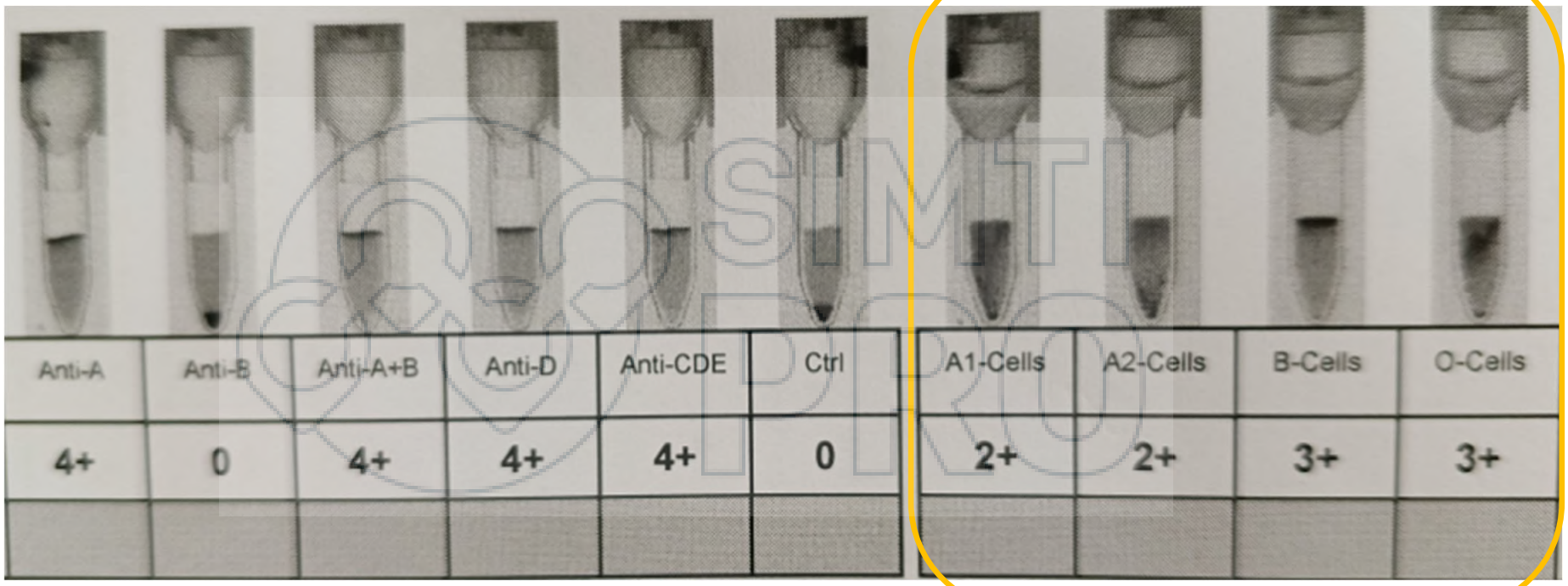
ERITROCITI



DAT

DETERMINAZIONE DI GRUPPO SANGUIGNO E INTERFERENZA DA CRIOAGGLUTININE

PLASMA

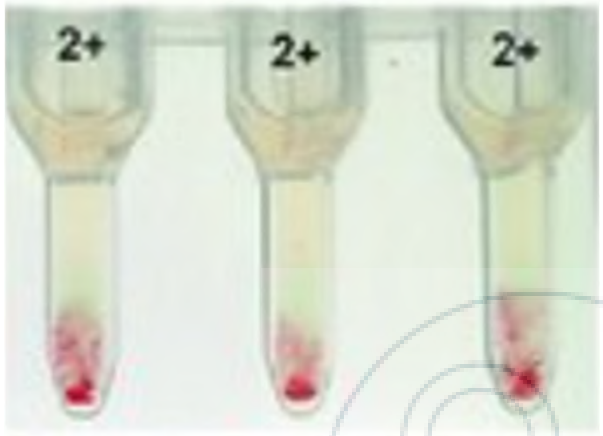


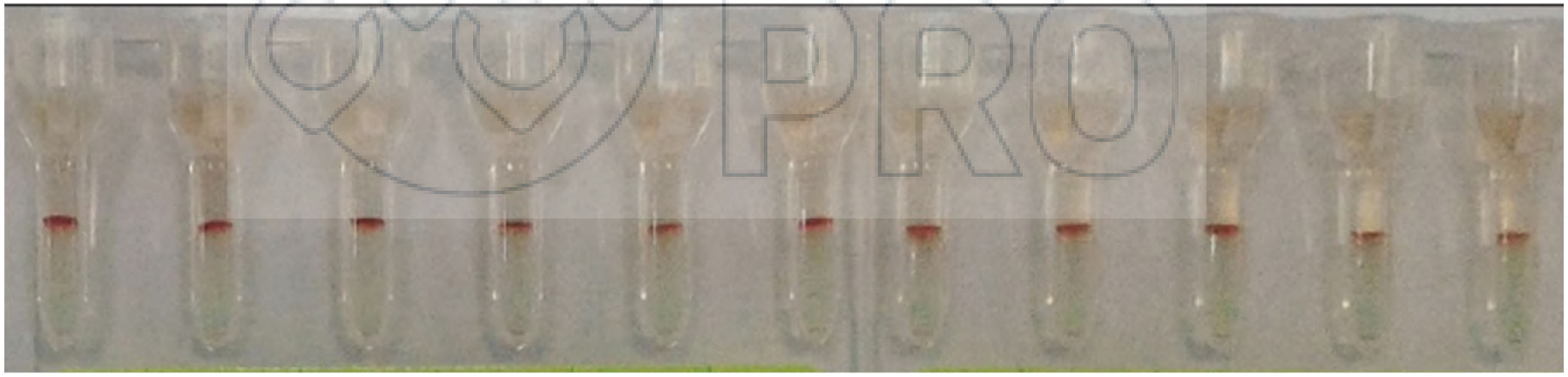
Anti-A	Anti-B	Anti-A+B	Anti-D	Anti-CDE	Ctrl	A1-Cells	A2-Cells	B-Cells	O-Cells
4+	0	4+	4+	4+	0	2+	2+	3+	3+

DAT

TEST ALL'ANTIGLOBULINA INDIRETTO E PRESENZA DI CRIOAGGLUTININE

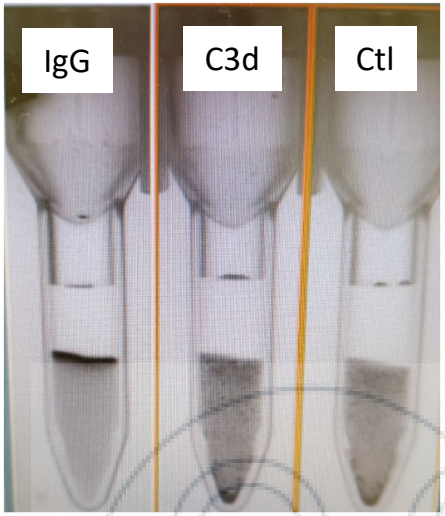
PLASMA

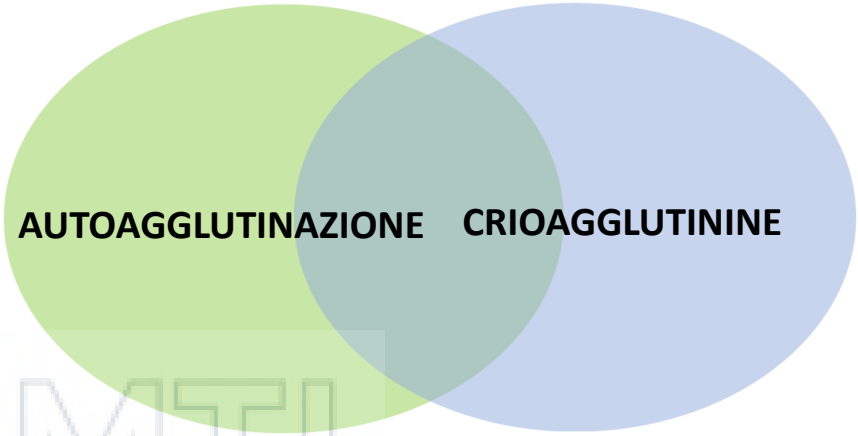


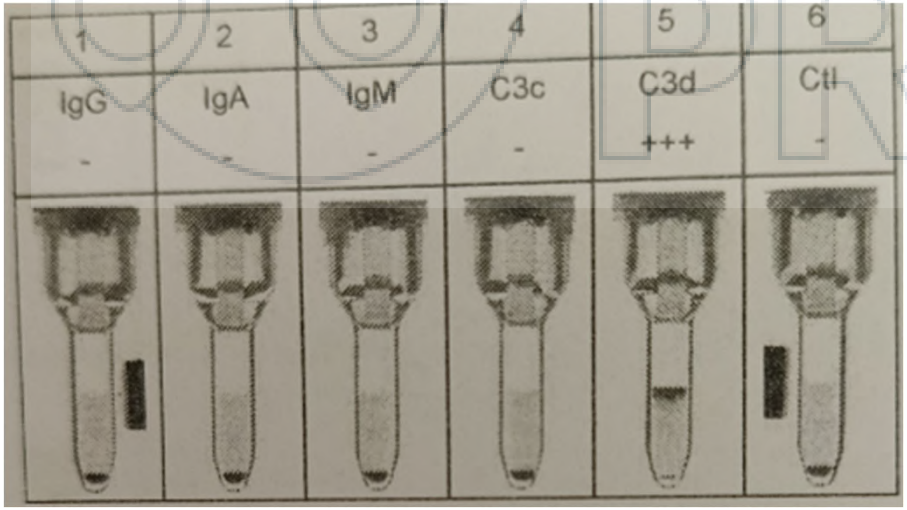


DAT

DAT ED AUTOAGGLUTINAZIONE







RUOLO DEL NETWORKING CLINICO – LABORATORISTICO NEL RILIEVO DI CRIOAGGLUTININE PATOLOGICHE

CRITERI DIAGNOSTICI DI CAD

Chronic hemolysis
(Clinical or laboratory[a] evidence of hemolysis)

Positive polyspecific DAT[b] (Coombs Test)

Monospecific DAT strongly positive for C3d

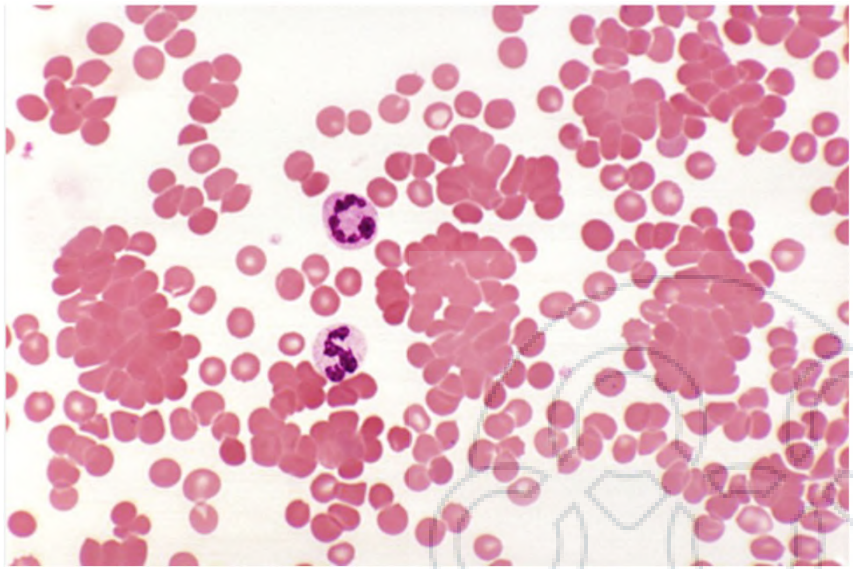
Monospecific DAT negative or weakly positive for IgG

Cold agglutinin titer ≥64 at 4°C

Absence of underlying clinical disease
(infection, overt malignancy)[c]

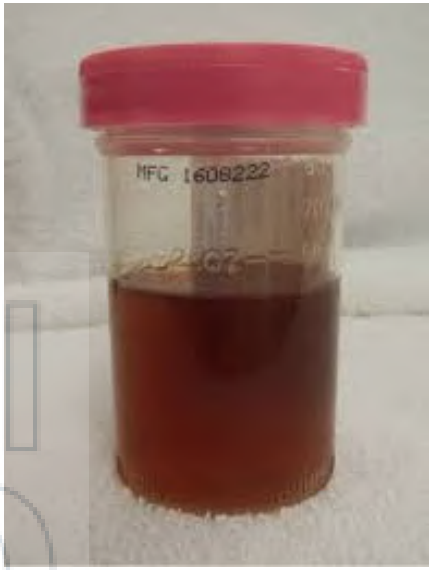
SEGNI DI CAD

AUTOAGGLUTINAZIONE

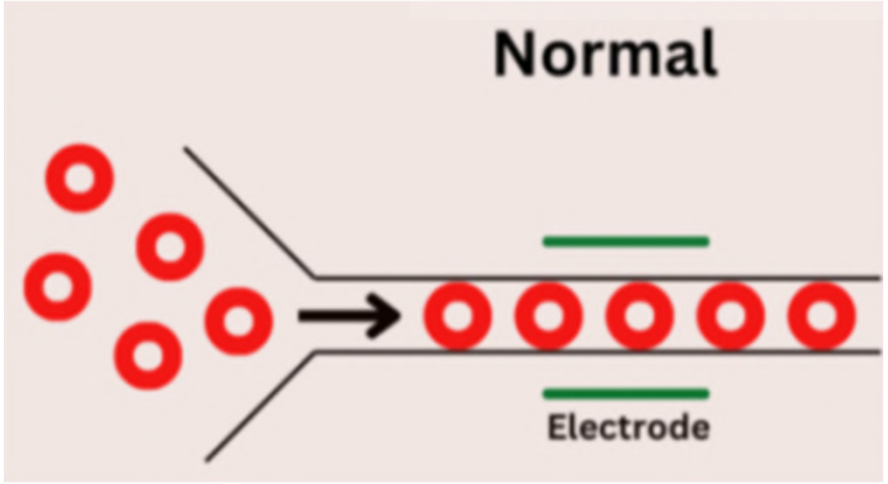


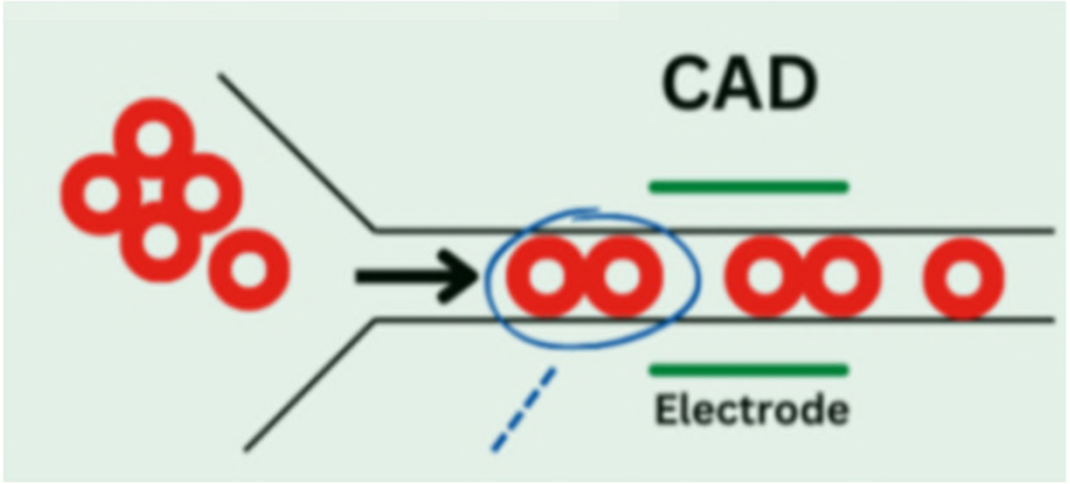
ANEMIA

URINE COCA-COLA



EMOCROMOCITOMETRICO





PRESENTAZIONE CLINICA

Clinical phenotype		Frequency	
Type	**Definition**	**n**	**%**
1	Hemolytic anemia with circulatory symptoms grade 1 or absent	146	69.5
2	Hemolytic anemia with circulatory symptoms grade 2-3	44	21.0
3	Circulatory symptoms with compensated hemolysis	20	9.5
All patients with available data		210	100.0

Circulatory symptoms grade 1, acrocyanosis only; grade 2, Raynaud-like symptoms interfering with daily living; grade 3, gangrene or ulcerations.

INCIDENZA E FATTORI AMBIENTALI

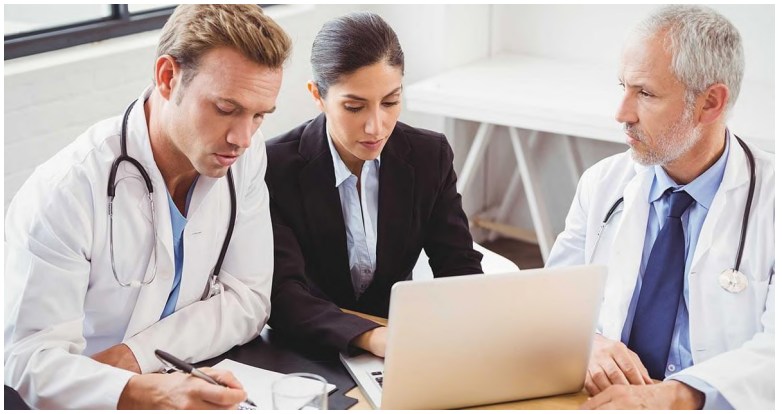
	Population, 10^6	Prevalence, cases/10^6 inhabitants	Incidence, cases/10^6 inhabitants/y	Outdoor temperature, °C, yearly-average
Norway	5.32	20.5	1.9	6.0*
Lombardy, Italy	7.0†	5.0	0.48	13.1

Calculation of prevalence was based on the number of patients still alive at the end of the study period. The yearly number of newly diagnosed cases was approximately constant from 2007 and was used to estimate incidence.

*Heterogeneous. Estimate based on yearly-average in Oslo, Bergen, and Trondheim.

†Refers to the relevant part of the region.

Blood (2020) 136 (4): 480–488.



"It is of critical importance that blood samples for CA titration, TA determination, Ig quantification, electrophoresis, and immunofixation are kept at 37–38°C from sampling to separation of serum or plasma to avoid false low values and low sensitivity.

Even automated cell counts and Hb levels in ethylene diamine tetra acetate (EDTA) blood are sometimes difficult to obtain because of agglutination in the tube.

Prewarming at 37°C for up to 2 hrs will usually overcome this problem; if not, a short preheating at 41°C for 1 min may be tried."

Journal of Blood Medicine 2019:10 93–103

CONCLUSIONI

La **cooperazione tra diversi ambiti clinico-laboratoristici** può favorire la segnalazione di casi sospetti, per i quali valga la pena definire un percorso diagnostico per sospetto di CAD/CAS.

Inoltre, il riscontro di crioagglutinine può rappresentare un evento occasionale, in corso di effettuazione di **test immunoematologici** (determinazione di gruppo, test all'antiglobulina indiretto e diretto).

La presenza di **autoagglutinazione** non è indicatore certo di crioagglutinine (potenziale zeta).

Il **test all'antiglobulina diretto**, positivo per **frazione complementare** è un riscontro abituale, in caso di crioagglutinine a titolo patologico.