



46° Convegno Nazionale di Studi di Medicina Trasfusionale

Rimini, 13-15 maggio 2026

Sezione Academy 1

Significato e utilizzo del Test di Coombs diretto

Serelina Coluzzi

UOC Immunoematologia e Medicina Trasfusionale

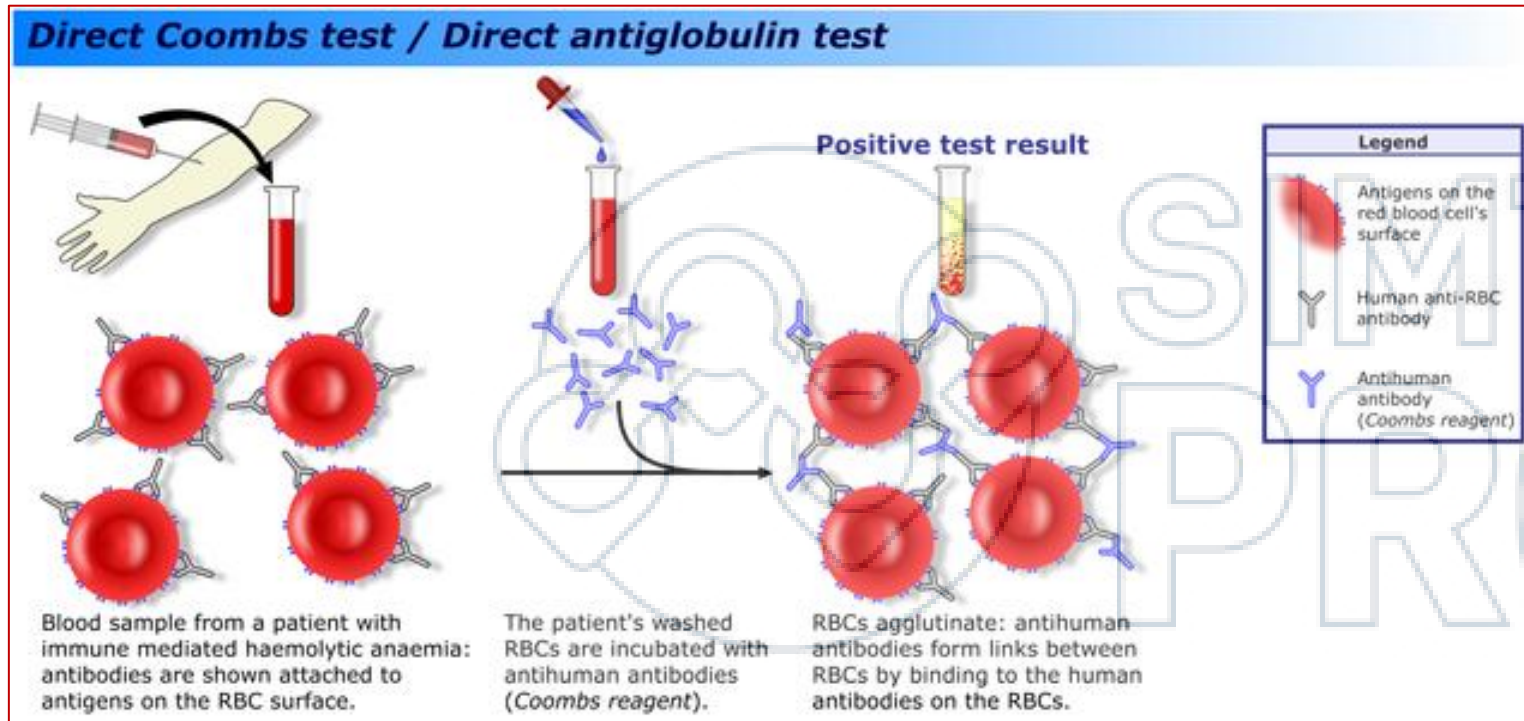
AOU Policlinico Umberto I-Sapienza, Roma

La sottoscritta Serelina 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 sue funzioni al fine di trarne vantaggio.



Il test dell'antiglobulina diretto (TAD) , o test di Coombs diretto



1908, Moreschi

1945, Coombs, Mourant, Race

Descrivono le procedure per evidenziare gli anticorpi adesi alle emazie che non producono agglutinazione

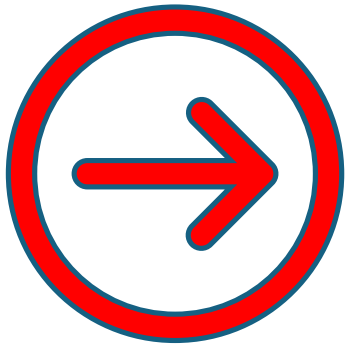
«....it is elegantly simple in design, yet it is widely complex in its applications and interpretations» Parker V, 2017

TAD: principio del test

Uso di anti-globulina umana per evidenziare l'agglutinazione

Reagenti disponibili:

- Polispecifici (IgG + C3d)
- Monospecifici (IgA, IgG, IgM, C3d)



Campione: sangue in EDTA (chelante del calcio, previene la fissazione in vitro del complemento)



TAD: metodi di esecuzione

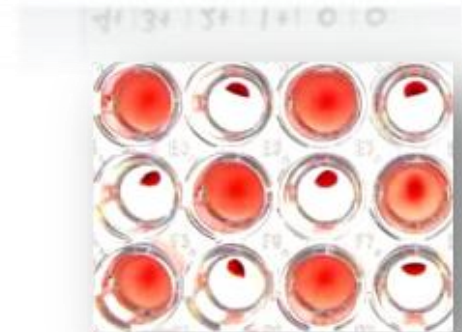
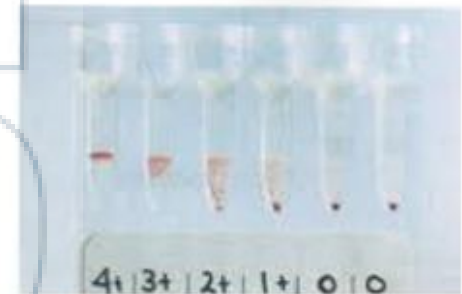
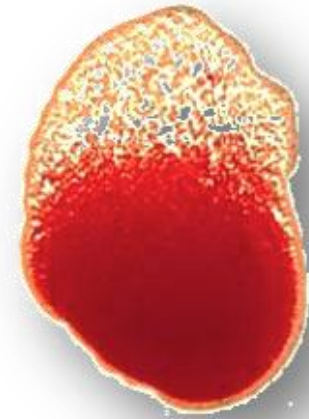
- Metodo in fase liquida (provetta, vetrino)
- Gel-card
- Microcolonna
- Fase solida

Sistemi automatizzati

Sensibilità

Provetta: almeno 500 molecole
Microcolonna: 200-300 molecole
Fase solida: <100 molecole
Citofluorimetria: <50 molecole

Inserire un controllo negativo ed un controllo positivo



TAD: indicazioni cliniche

AEA calda

Cold Agglutinin Disease

Emolisi da farmaci

Reazioni trasfusionali

Malattia emolitica del neonato

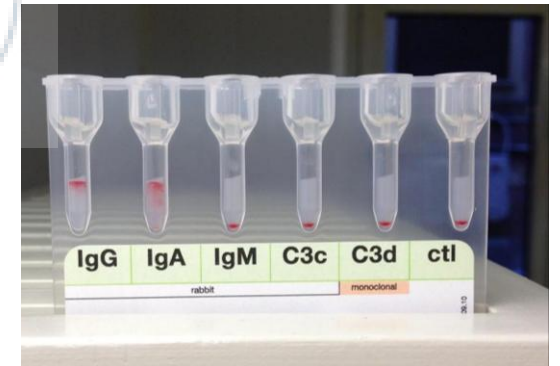
TAD e anemia emolitica autoimmune

Estremamente utile per **effettuare la diagnosi** e per **classificare** il tipo di AEA

AEA di tipo caldo: TAD positivo di tipo **IgG (> IgG1)** e/o **IgA e/o C3d**

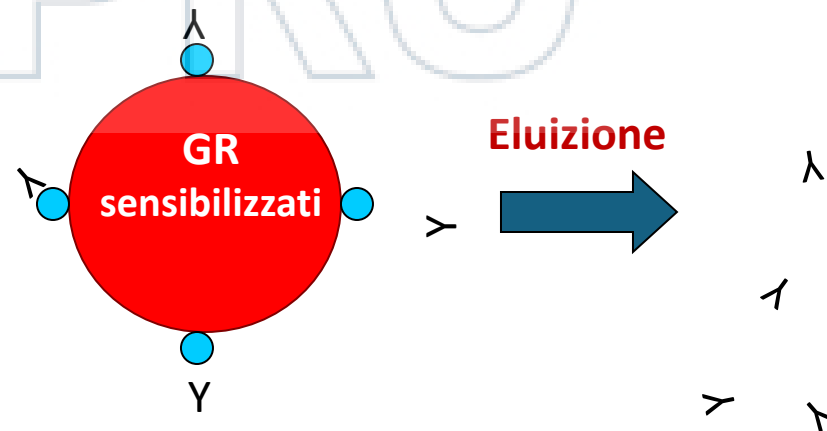
- Occorrono almeno 1180 molecole IgG/eritrocita per l'adesione ai recettori del sistema reticolo-istiocitario
- Coinvolgimento della sottoclasse IgG3 in casi di AEA sierologicamente negativi
- Gli autoanticorpi di tipo caldo sono in genere dimostrabili nell'eluato e nel siero
- Gli autoanticorpi reagiscono contro gli eritrociti normali

Polyspecific AHG	3 - 4+
Anti-IgG	3 - 4+
Anti-C3	0 - 3+
Control	0



AEA: test di eluizione

Impiego di metodiche che permettono di **staccare gli anticorpi** adesi ai GR e di **identificarli** mediante pannelli di emazie note e test dell'antiglobulina indiretto



Test di eluizione: procedure tecniche

- **Congelamento-Scongelamento rapido**
- **Calore**
- **Etere**
- **Glicina acida**
- **Glicina/EDTA**



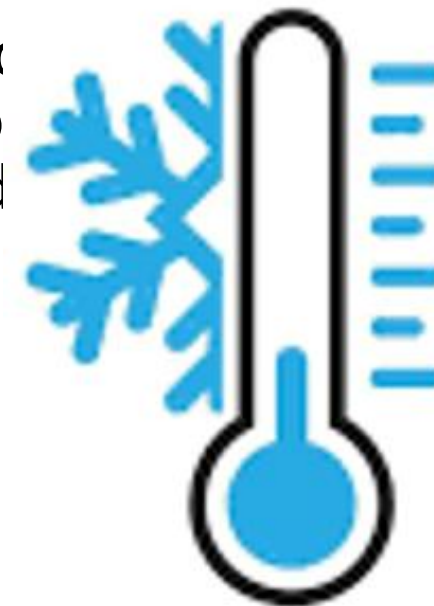
AEA di tipo freddo : CAD/CAS

- **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



Ricerca nel siero gli autoanticorpi freddi:

- mostrano prevalentemente specificità anti-I (O da adulto) (circa 90%)
- in casi più rari, anti-i (O da cordone)



TAD in caso di sospetta CAD/CAS

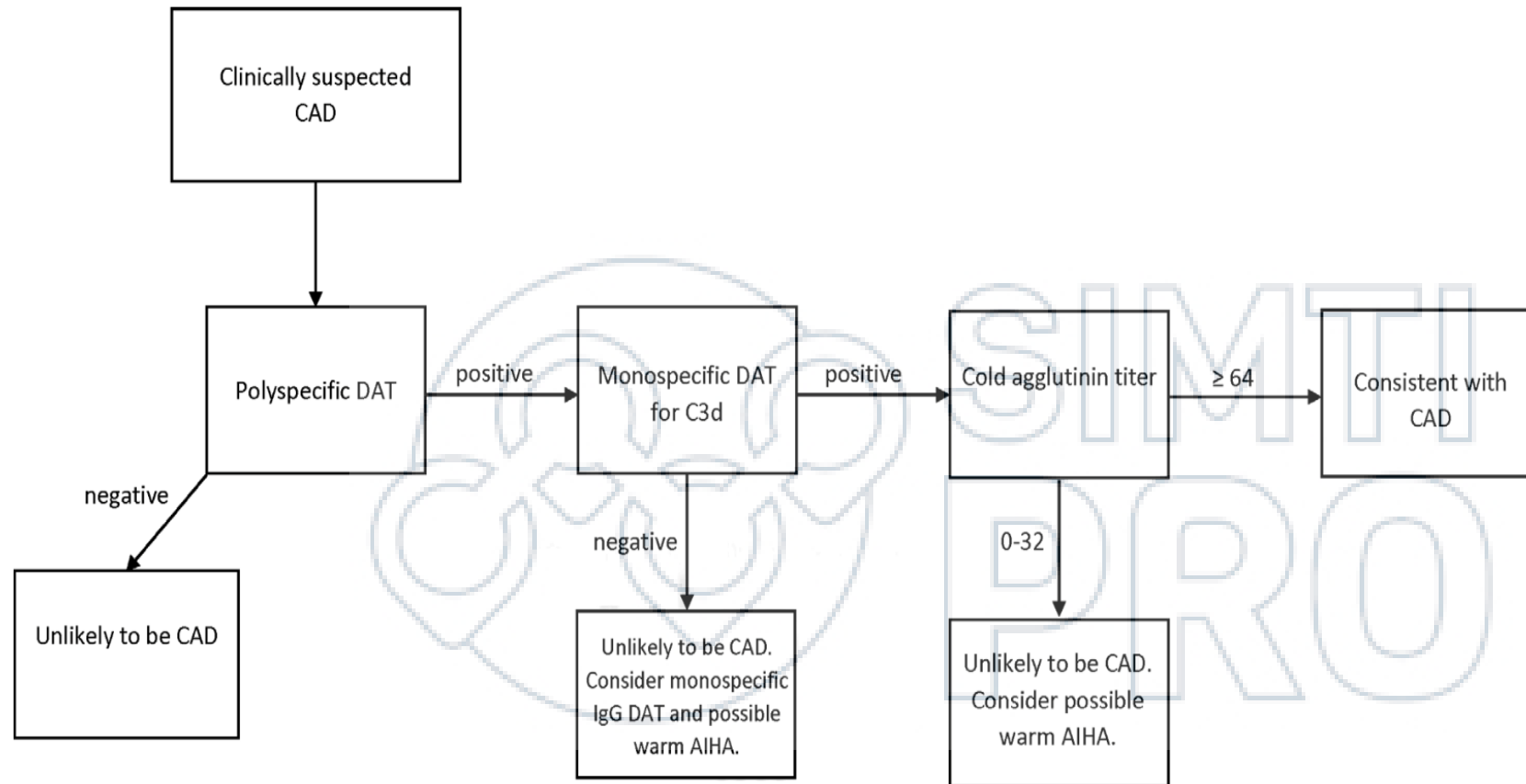
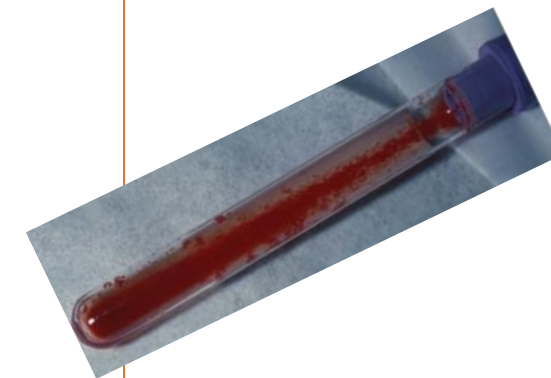
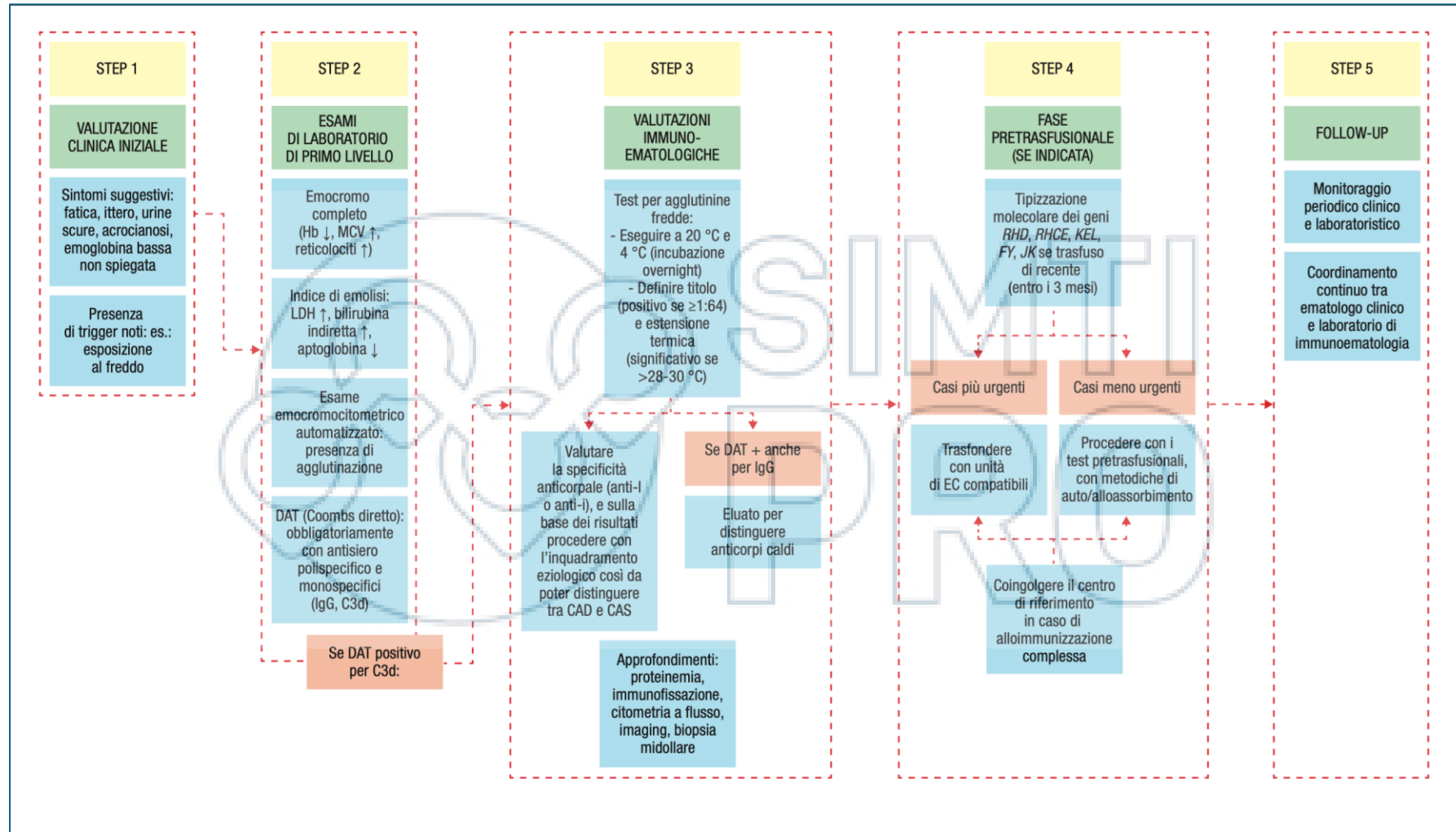


Figure 1 | Lab workup for suspected cold agglutinin disease. CAD, cold agglutinin disease; DAT, direct antiglobulin test; AIHA, auto immune hemolytic anemia.

A.P. Gabbard, G.S. Booth, Clinical Hematology International, 2020



Algoritmo diagnostico per la gestione della CAD



Raccomandazioni per la corretta diagnosi della Malattia da Agglutinine Freddi (CAD)-Simti 2025

AEA TAD negative



Seminars in
HEMATOLOGY

Immune Hemolytic Anemia Associated With Negative Routine Serology

George Garratty

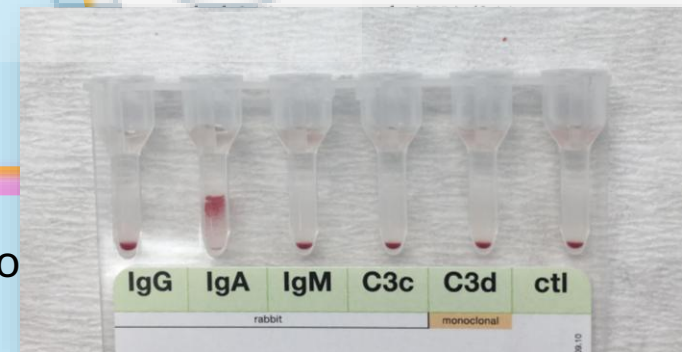
Fino al 10% delle AEA

Ridotto N° molecole anticorpo (> IgG3)

Scarsa affinità Ag/Ac o dissociazione durante la fase di allestimento della sospensione eritrocitaria

IgA o IgM non rivelate dal TAD con reagente polispecifico (anti-IgG+C3d)

who have no antibodies detectable by [DAT] antiglobulin tests). DAT-negative autoantibodies account for up to 10% of all AIHAs. Three causes have been identified: (1) low (RBC)-bound IgG molecules below the detection limit; (2) IgA and IgM antibodies; and (3) low-affinity autoantibodies. Natural killer (NK) cells have also been implicated. False-negative results may occur when tested by reference laboratories, due to poor technique in reading antiglobulin tests in hospital laboratories. Hemolytic autoantibodies are detectable by routine serologic procedures. Phenotypically matched RBCs survive well in vitro, suggesting a specificity (like anti-C) other than to blood group antigens, such as HLA antigens, which may sometimes be involved. All rights reserved.



AEA TAD negative



Seminars in
HEMATOLOGY

Immune Hemolytic Anemia Associated With Negative Routine Serology

George Garratty

Fino al 10% delle AEA

Impiego di tecniche «troppo» sensibili:
“Small amounts of both IgG and Complement appear to be present on all red cells. A range of 5 to 90 IgG molecules/red cell and 5 to 40 C3d molecules/red cells appears to be normal on the red cells of healthy individuals” (Technical Manual, AABB)

IgA o IgM non rivelate dal TAD con reagente polispecifico (anti-IgG+C3d)

who have no antibodies detectable by
antiglobulin tests). DAT-negative auto-
to 10% of all AIHAs. Three causes have
all (RBC)-bound IgG molecules below the
dies; and (3) low-affinity autoantibodies.

IgG	IgA	IgM	C3c	C3d	ctl

rabbit monoclonal

Algoritmo diagnostico AEA

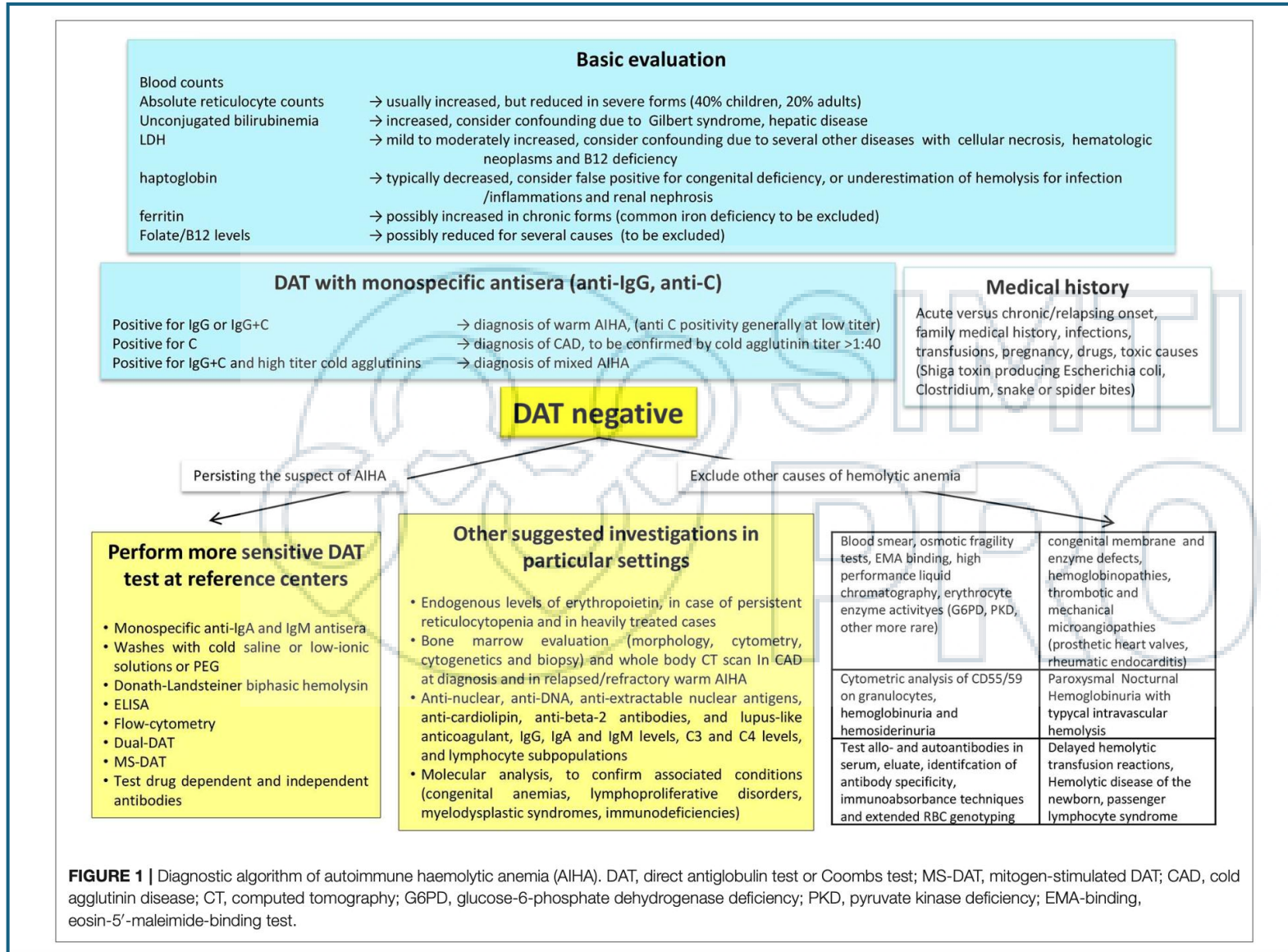


FIGURE 1 | Diagnostic algorithm of autoimmune haemolytic anemia (AIHA). DAT, direct antiglobulin test or Coombs test; MS-DAT, mitogen-stimulated DAT; CAD, cold agglutinin disease; CT, computed tomography; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency; PKD, pyruvate kinase deficiency; EMA-binding, eosin-5'-maleimide-binding test.

W.Barcellini, B. Fattizzo,
2020

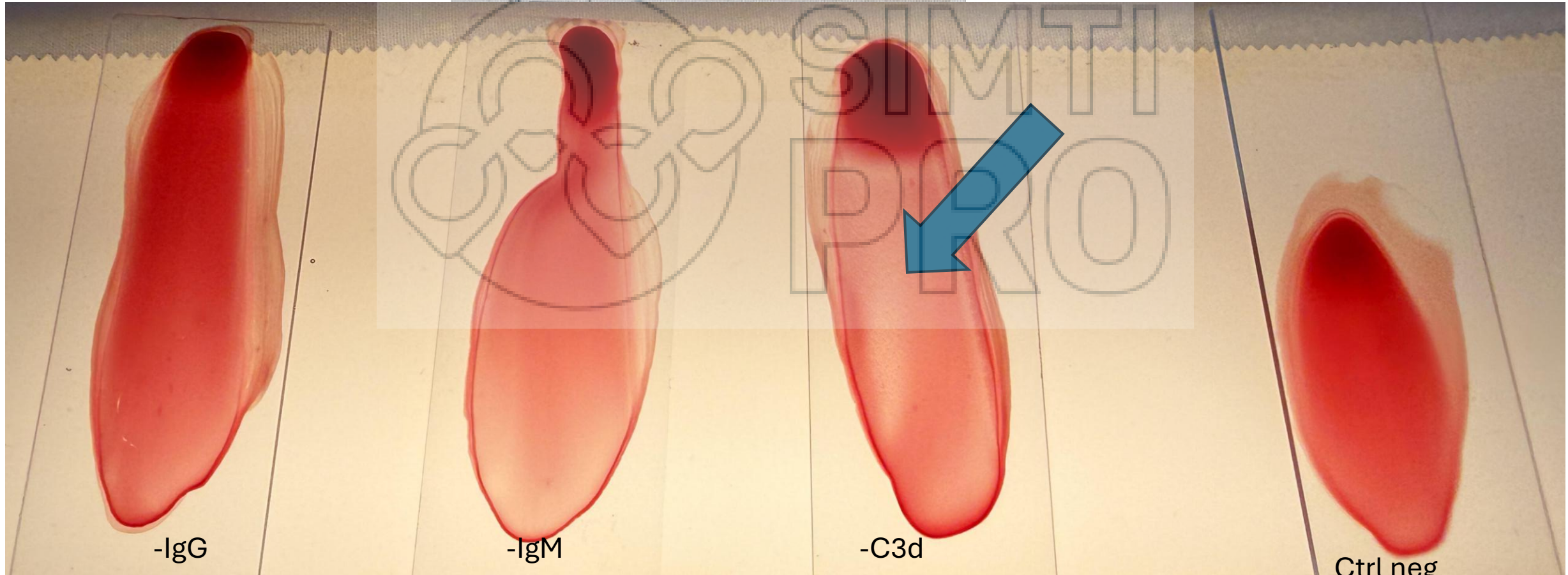
TAD: significato clinico

Il TAD da solo non definisce una condizione di AEA:

- può risultare positivo in individui sani e in pazienti senza evidenza di emolisi (< 0,1% dei donatori sani e nello 0,3-8% dei pz ospedalizzati. L.D. Petz, G. Garratty, 2004)
- quasi tutti gli individui hanno IgG sulla superficie dei propri GR , in genere al di sotto dei limiti di rilevazione (< 50 molecole IgG/GR)
- in corso di patologia acuta la percentuale di individui con TAD+ aumenta
- può rimanere positivo in pazienti con AEA in remissione clinica
- può essere positivo per altre circostanze (alloimmunizzazione, farmaci, infezioni, interferenze...)

TAD: risultati discrepanti

Paziente con autoac IgM di tipo caldo



TAD: reazione trasfusionale emolitica

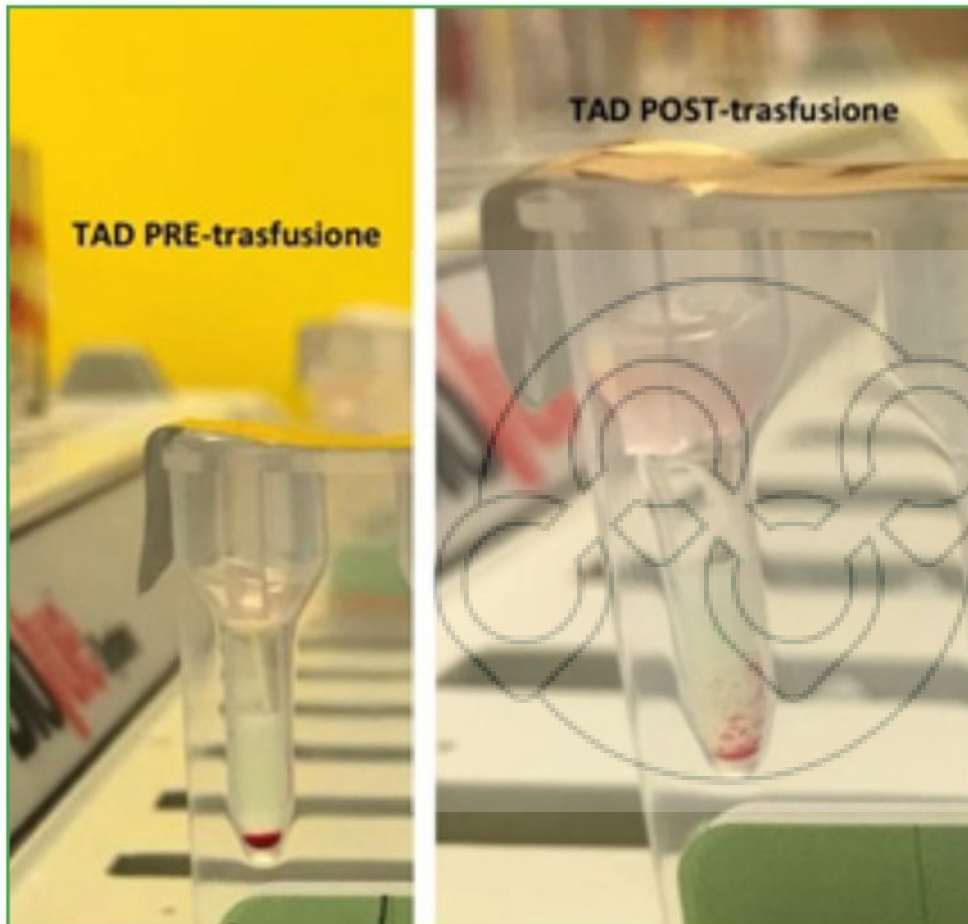


Figura 1 - Risultato del TAD sulle emazie del paziente prima e dopo 5 gg dalla trasfusione.

- TAD (test dell'antiglobulina diretto) sul campione del paziente prima della trasfusione e sul tubo pilota dell'unità trasfusa: esito negativo
- TAD sul campione pervenuto in laboratorio in seguito alla notifica della reazione trasfusionale: reazione positiva (IgG e C3d)

TAD: reazione trasfusionale emolitica

Positivizzazione del TAD a distanza da qualche ora
ad alcuni giorni dalla trasfusione



- Ripetizione della ricerca anticorpale sul campione pre e post-trasfusione con la stessa metodica
- Identificazione anticorpale anche con l'impiego di tecniche enzimatiche
- Identificazione anticorpale anche su eluato

Reazione di tipo anamnestic

Reazione trasfusionale emolitica: test di eluizione

- Nel caso di sospetto di reazione trasfusionale emolitica, anche in presenza di un TAD debolmente positivo (o negativo) → **ELUIZIONE**
- La letteratura suggerisce che il rilevamento degli anticorpi mediante eluzione è efficace quanto l'esecuzione della citometria a flusso per il rilevamento di anticorpi da una piccola popolazione di cellule opsonizzate



un eluato può dimostrare anticorpi che non sono ancora rilevabili (titolo basso) nel plasma.

TAD: emolisi post-trapianto



- **Trapianto di CSE:** in questo contesto clinico, l'emolisi può essere dovuta ad una incompatibilità ABO tra donatore e ricevente
- Il **TAD** può essere **positivo** e l'eluato reagire solo con eritrociti che esprimono la specificità ABO verso cui sono rivolte le isoagglutinine del ricevente (incompatibilità maggiore) o del donatore (incompatibilità minore) (eluato non reattivo contro eritrociti O); in quest'ultimo caso si configura la cosiddetta «sindrome del linfocita passeggero»
- Anche altre specificità anticorpali non-ABO possono essere coinvolte in casi di emolisi nel decorso post-trapianto.

Trapianto d'organo solido: sindrome del linfocita passeggero, sostenuta da anticorpi prodotti dal sistema immunitario del donatore contro antigeni espressi su elementi cellulari del ricevente

TAD: sindrome del linfocita passeggero

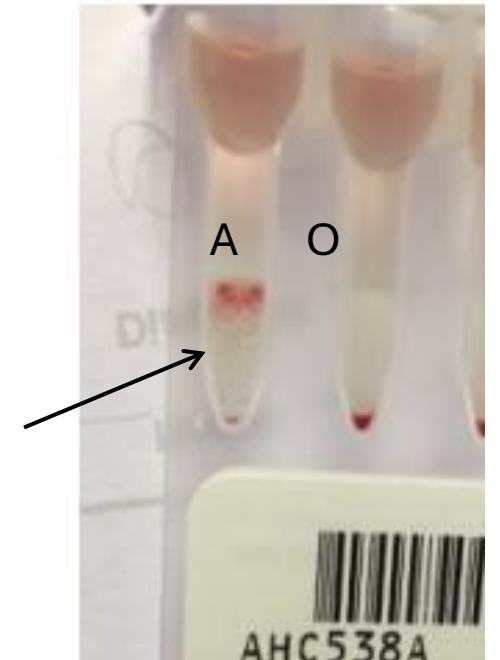
□ **TAD:** positivo IgG

□ **Eluato:** reattivo, con la stessa specificità dell'Ab dimostrato nel siero; tipicamente con GR di fenotipo A/B, negativo con GR di fenotipo O

□ **Siero:** Ab reattivo contro Ag espressi sui GR del ricevente (necessaria la ricerca anticorpale utilizzando anche GR del fenotipo ABO del ricevente)

Solo il 10-15% dei pazienti con positività sierologica sviluppa un quadro di franca emolisi

Eluato testato con emazie di fenotipo A e O



TAD e malattia emolitica fetoneonatale (MEFN)

Il tipo più comune di MEFN è dovuto ad incompatibilità ABO tra madre e feto (dal 15% al 25% delle gravidanze)



solo 1% di queste mostra un TAD+ IgG sulle emazie di cordone allo screening neonatale



TAD e malattia emolitica fetoneonatale (MEFN)

Test di eluizione: per confermare la presenza di anticorpi anti-eritrocitari e definirne la specificità

In caso di **incompatibilità ABO:** eluato + emazie A/B ed emazie O di controllo

In caso di **incompatibilità non-ABO:** eluato + pannello di identificazione

In caso di **TAD+ e risultato negativo del test di eluizione:** in presenza di segni clinici di MEFN cimentare l'eluato con le emazie del padre (valutare la possibilità di **anticorpi materni rivolti verso antigeni a bassa frequenza**)

LAVARE LE EMAZIE (gelatina di Wharton)



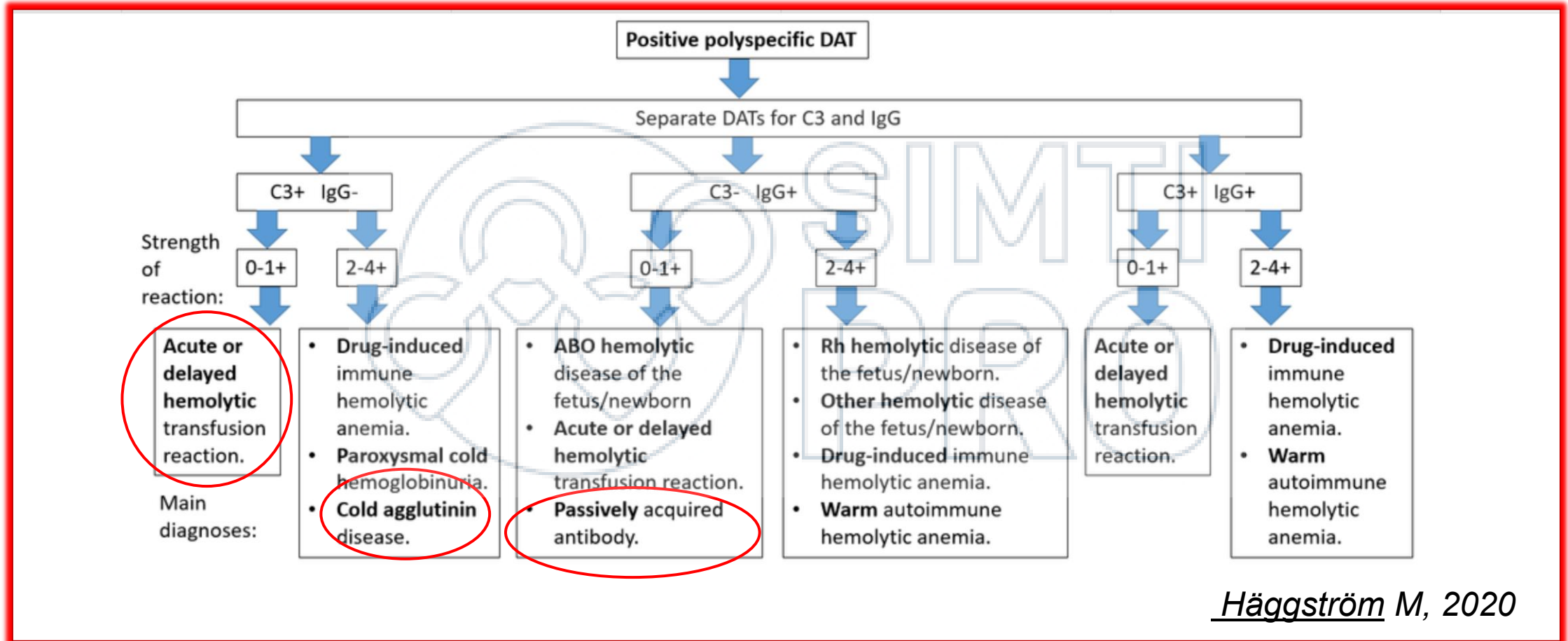
TAD: interpretazione del risultato

Condizione clinica	Risultato del TAD	Classe Ig anticorpo	Specificità anticorpo
AEA			
▪ Calda	IgG, C3d, IgG+ C3d	IgG	Variabile (> Rh)
▪ Fredda (CAD/CAS)	C3d	IgM	Anti-I/anti-i
▪ Mista	IgG+C3d	IgG (calda)+IgM (fredda)	Vedi calda e fredda
▪ Bifasica (PCH)	Neg o C3d	IgG	Anti-P

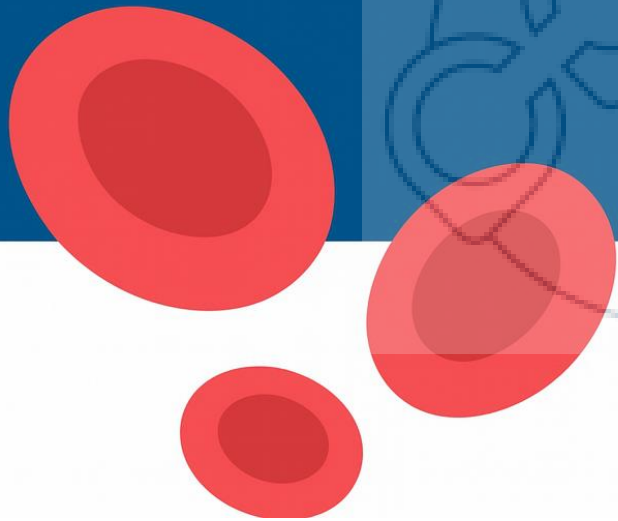
Un risultato TAD positivo deve essere interpretato nel contesto della situazione clinica, sulla base della quale verrà anche impostata la prosecuzione delle indagini immunoematologiche.

AE farmaco indipendente	IgG +/- C3d	IgG	variabile
AE alloimmune			
▪ Reazione trasfusionale	IgG , C3d, IgG +/- C3d	IgG	Variabile
▪ MEN	IgG	IgG	Variabile (> anti-D,anti-K, anti-c)

TAD: interpretazione del risultato



TAD: Falsi Positivi



Errori pre-analitici

- Prelievo non ottimale
- Ritardo nell'analisi
- Mancato rispetto della temperatura del campione
- Campione coagulato

Interferenze tecniche

- Presenza di fibrina
- Lavaggi inadeguati
- Reagenti deteriorati

TAD: falsi positivi e falsi negativi

Table 2. Potential Causes of False-Positive or False-Negative Direct Antiglobulin Test (DAT) Results Commonly Seen in Clinical Practice^a

Potential causes of false-positive results and/or positive results due to presence of nonspecific immunoglobulins

- Clotted specimen causing in vitro complement binding
- High serum immunoglobulin levels or proteins/rouleaux
- Intravenous immune globulin administration
- Antiphospholipid syndrome
- Infections: HIV, malaria
- Wharton jelly (in the setting of pregnancy and cord blood testing)
- Inadequate serologic technique or technical error

Potential causes of false-negative results

- Severe hemolysis
- Hemolysis mediated by IgA or IgM
- RBC-bound IgG below detectable limits of DAT
- Low-affinity antibodies
- Inadequate serologic technique or technical error

Abbreviations: HIV, human immunodeficiency virus; IgA, immunoglobulin A; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; RBC, red blood cell.

V.Parker e C.A. Tormey, 2017

TAD: falsi positivi e falsi negativi

Table 2. Potential Causes of False-Positive or False-Negative Direct Antiglobulin Test (DAT) Results Commonly Seen in Clinical Practice^a

Potential causes of false-positive results and/or positive results due to presence of nonspecific immunoglobulins

- Clotted specimen causing in vitro complement binding
- High serum immunoglobulin levels or proteins/rouleaux
- Intravenous immune globulin administration
- Antiphospholipid syndrome
- Infection
- White blood cell antibodies
- Inadequate washing of RBCs

Ac anti-fosfolipidi cross-reagiscono con la membrana dei GR (nel 16% dei pz con sindrome da Ac anti-fosfolipidi e nel 4,3% dei pz con LES)

Potential causes of false-negative results

- Severe hemolysis
- Hemolysis mediated by IgA or IgM
- RBC-bound IgG below detectable limits of DAT
- Low-affinity antibodies
- Inadequate serologic technique or technical error

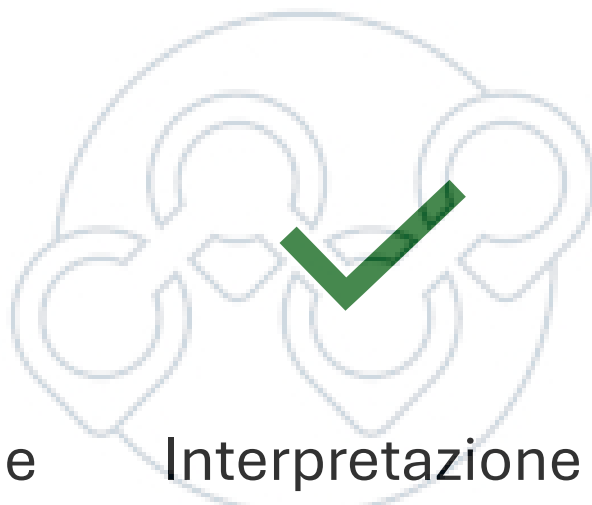
Abbreviations: HIV, human immunodeficiency virus; IgA, immunoglobulin A; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; RBC, red blood cell.

V.Parker e C.A. Tormey, 2017

Ruolo dell'immunoematologo



Correlazione
con il quadro
clinico e di
laboratorio



Interpretazione
del pattern
(almeno
IgG/C3d)



Identificazione
possibili
interferenze



Collaborazione
con il clinico



46° Convegno Nazionale di Studi di Medicina Trasfusionale

Rimini, 13-15 maggio 2026

Grazie per l'attenzione.....

...e buon convegno