



46° Convegno Nazionale di Studi di Medicina Trasfusionale

Rimini, 13-15 maggio 2026

Agglutinine fredde: dal laboratorio alla clinica. Esperienza monocentrica *real life*

Dott.ssa S. Coluzzi

Policlinico Umberto I, 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 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 sue funzioni al fine di trarne vantaggio.



Anemie emolitiche autoimmuni

L'anemia emolitica autoimmune (AIHA) è una patologia rara (incidenza 1-3 su 10⁵/anno) ed è caratterizzata da un'aumentata distruzione dei globuli rossi mediata da autoanticorpi diretti contro antigeni self di superficie degli eritrociti, con o senza attivazione del complemento.

VARIABILITÀ CLINICA E LABORATORISTICA

	Autoantibody characteristics			DAT positivity	In vivo hemolysis (RBC sequestration)
	Class	Optimal T of reaction (range)	Specificity		
1. Warm AIHA 60-70%	IgG (possible complement fixation, IgG1 and IgG3)	37°C (0-40)	Rh system	IgG or IgG+ (weak) C	Extravascular (spleen)
2. Cold AIHA					
2a. Cold agglutinin disease (CAD) 20-25%	IgM (common complement fixation)	4°C (4-34)	I/i system	C	Intravascular and extravascular (liver/spleen)
2b. Paroxysmal Cold Hemoglobinuria (PCH) 1-5%	IgG (common complement fixation)	Reacts at 4°C and hemolyses at 37°C	P antigen	Positive Donath-Landsteiner test	Intravascular and extravascular
3. Mixed AIHA 5-10%	warm IgG and cold IgM	4°C and 37°C		IgG+high titer cold IgM	Extravascular/ Intravascular (spleen /liver)

Sindromi da agglutinine fredde e fisiopatogenesi

- **CA fisiologiche**

Titolo anticorpale <1:64 ed ampiezza termica <1:20

- **CA clinicamente rilevanti**

Titolo anticorpale elevato ed ampiezza termica significativa

Assenza di emolisi manifesta o anemia

- **COLD AGGLUTININ SYNDROME (CAS), secondaria**

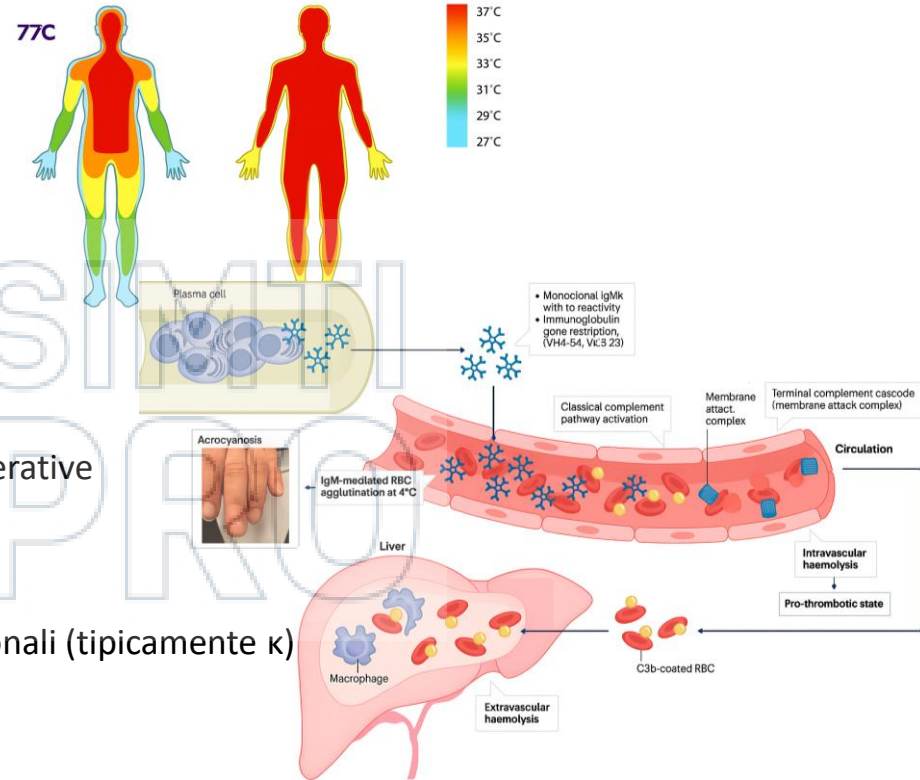
Associata ad infezioni acute, a neoplasie solide e m. linfoproliferative

- **COLD AGGLUTININ DISEASE (CAD) primaria**

Presenza di clonalità B linfoide con produzione di IgM monoclonali (tipicamente κ)

Emolisi cronica persistente

Nessuna condizione sottostante identificabile



REVIEW ARTICLE OPEN

Check for updates

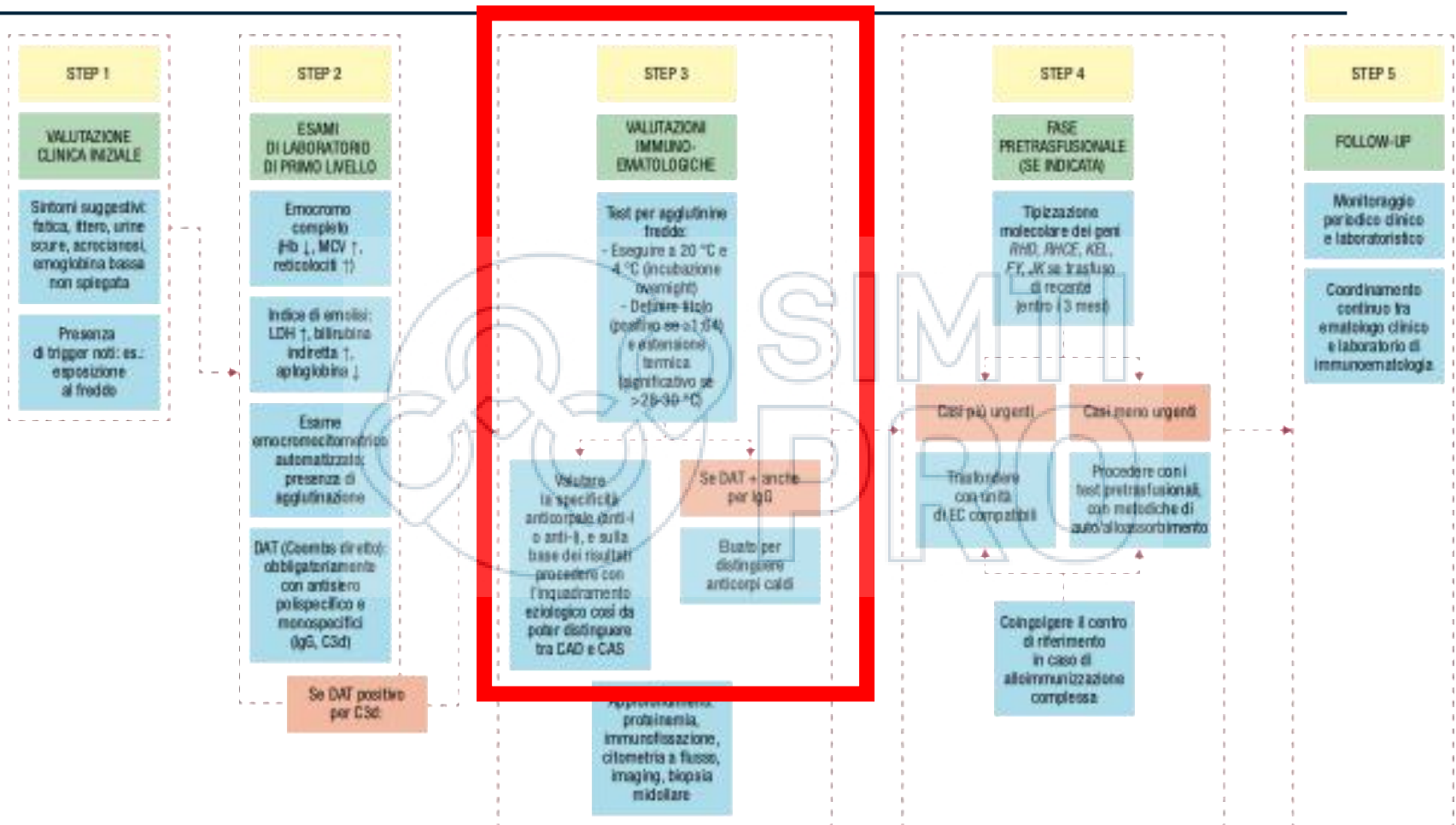
LYMPHOMA

The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms

Alaggio R, Amador C, et al. The 5th edition of the WHO Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022;
 Michel M, Crickx E, Fattizzo B, Barcellini W. Autoimmune haemolytic anaemias. *Nat Rev Dis Primers*. 2024

Cold agglutinin disease (CAD) is an autoimmune haemolytic anemia mediated by monoclonal cold agglutinins and driven by an underlying clonal B-cell lymphoid proliferation not fulfilling criteria for a B-cell lymphoma

Algoritmo diagnostico

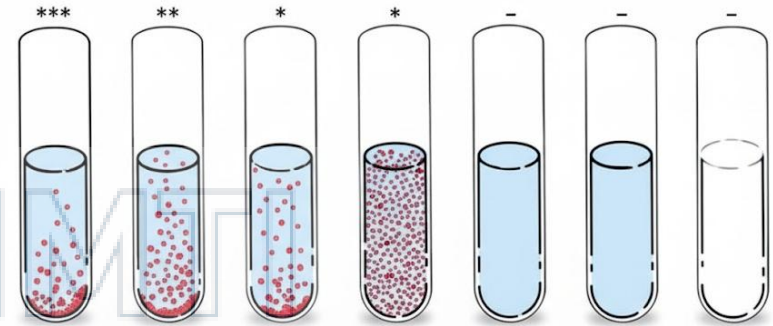


Raccomandazioni per la corretta diagnosi della Malattia da Agglutinine Freddhe (CAD), SIMTI 2025

Laboratorio di immunoematologia

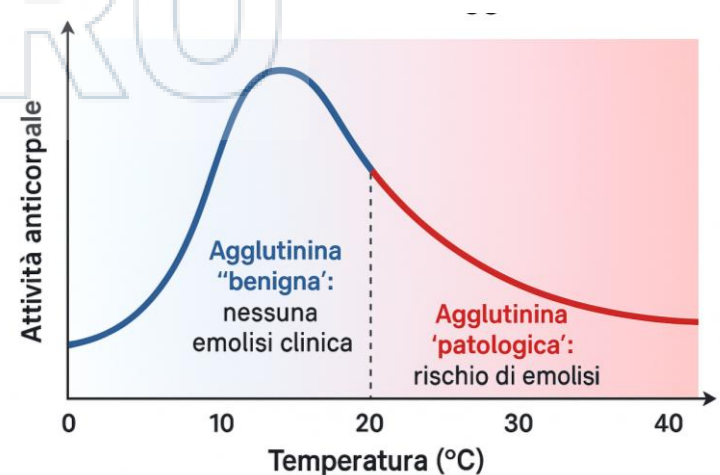
Titolo anticorpale

- massima diluizione sierica che produce agglutinazione macroscopica visibile (1+) a 4 °C
- Indica la quantità / forza dell'anticorpo
- Più alto è il titolo → maggiore concentrazione anticorpale



Ampiezza termica

- Intervallo di temperatura in cui l'anticorpo è attivo
- **Parametro clinico più rilevante:** se l'anticorpo reagisce a ≥ 20 °C → rischio di agglutinazione/emolisi in vivo



Moduli di registrazione

RICERCA E TITOLAZIONE DI CRIOAGGLUTININE

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 _____

Raccomandazioni per la corretta diagnosi della Malattia da Agglutinine Fredde (CAD), SIMTI 2025

Obiettivi dello studio e selezione dei campioni

Studio retrospettivo osservazionale (1990-2025)

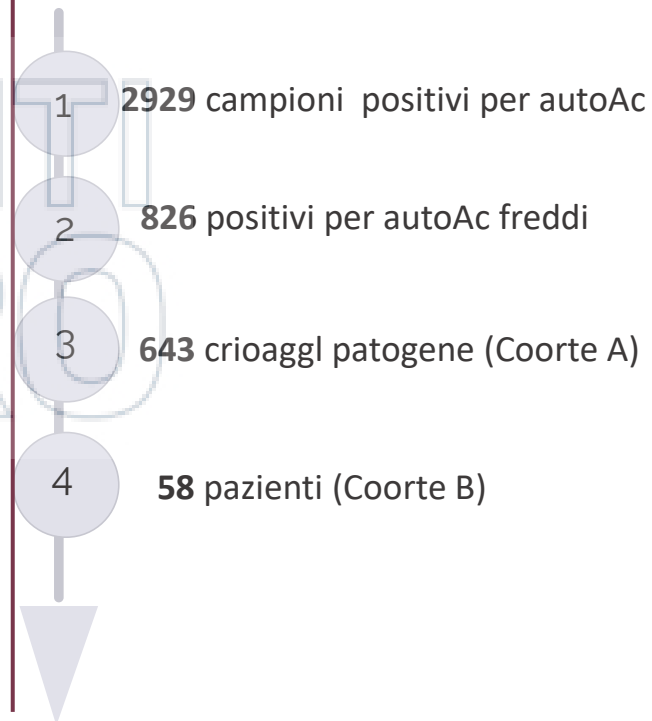
Analizzare retrospettivamente i casi di positività di agglutinine fredde individuati nel Laboratorio di Immunoematologia del Policlinico Umberto I (Coorte A), definendone la prevalenza in real-life e le caratteristiche immunoematologiche

Analizzare retrospettivamente le caratteristiche dei pazienti con agglutinine fredde seguiti clinicamente nel tempo individuando una più precisa definizione nosografica (Coorte B)

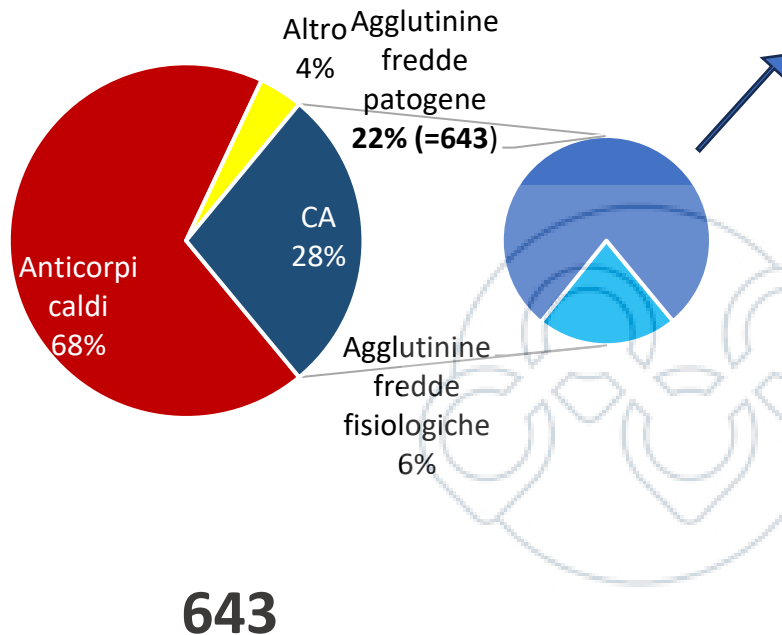
Individuare una possibile correlazione tra parametri laboratoristici, presentazione clinica e outcome terapeutico

Confrontare la nostra esperienza monocentrica di una malattia rara con i dati della letteratura

Selezione dei campioni



Coorte A: CA patogene caratteristiche immunematologiche



Campioni con agglutinine fredde potenzialmente patogene

Isotipo anticorpale

IgM nel 99% dei casi, con rari casi IgG o IgA. L'isotipo IgM è caratteristico per l'elevata capacità di attivare il complemento

Parametro	N=643
Titolo mediano	1:512 [128–1024]
Ampiezza termica fino a 37 °C	566 (88%)
TAD monospecifico C3d positivo	444 (69%)
TAD positivo anche per IgG	9 (1,4%)
TAD negativo	199 (31%)
Isotipo prevalente	IgM (99%)
Specificità anti-I	444 (69%)
Specificità anti-i	18 (2,8%)
Specificità anti-Pr	3 (0,5%)
Panagglutinanti / non determinabili (non -I-i)	178 (27,7%)

1:512

Titolo mediano

88%

Ampiezza termica fino a 37°C

Specificità anticorpale

Anti-I nel 69% dei casi, seguita da anti-i, anti-Pr e altre specificità rare. La specificità anti-I è tipica delle forme primarie (CAD)

Coorte B: caratteristiche dei pazienti

58

Pazienti totali

63 anni

Età mediana alla diagnosi

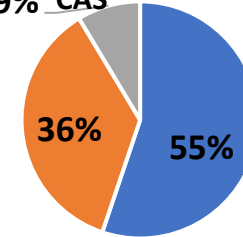
60%

Sesso femminile

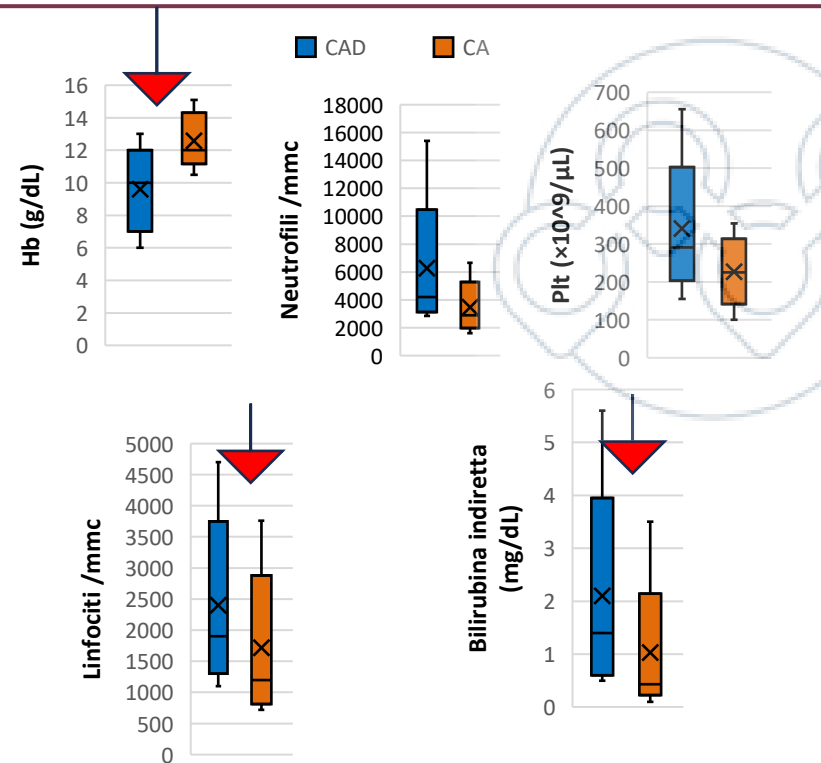
■ CAD n=32

■ CA rilevanti
 n=21

9% CAS



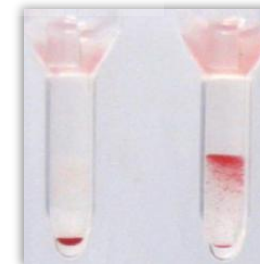
Seguiti longitudinalmente presso
 Ambulatorio AIHA e CLL



Parametro	Totale N=58	CAD N=32	CA clin. ril. N=21	CAS N=5	p value (CAD vs CA)
Median (IQR)					
Hb (g/dL)	11 [8,7–12]	10 [8–11]	12 [11,8–13,5]	10 [9–12,5]	p<0,001
MCV (fL)	93 [90–100]	94 [90–101]	93 [89–100]	91 [87–91]	p=0,315
GB (×10 ⁹ /μL)	6230 [4900– 8200]	6715 [6000– 8800]	5400 [4350– 7240]	4785 [4160– 5250]	p<0,001
Neutrofili (×10 ³ /μL)	3500 [2887–4777]	4195 [3380– 5525]	2900 [2350– 3900]	3065 [1900– 3400]	p<0,001
Linfociti (×10 ³ /μL)	1810 [1400–2460]	1900 [1500–2800]	1200 [900–2000]	1800 [1300–2150]	p=0,066
PLT (×10 ⁹ /μL)	256 [222–300]	291 [251–350]	225 [184–273]	222 [181–268]	p<0,001
Reticolociti (×10 ⁹ /L)	178 [108–220]	180 [125–218]	152 [67–229]	265 [111–265]	p=1
BMRI	132 [91–183]	127 [100–150]	160 [62–213]	180 [90–270]	p=0,4
LDH (U/L)	272 [200–390]	300 [218–428]	254 [200–355]	225 [160–285]	p=0,28
Bilirubina indiretta (mg/dL)	0,7 [0,4–1,6]	1,4 [0,7–2,3]	0,43 [0,35–0,78]	0,4 [0,2–0,8]	p<0,001

Dati immunoematologici

Parametro	Tutti (n=58)	CAD (n=32)	CA clin. ril. (n=21)	CAS (n=5)	p value (CAD vs CA)
TAD C3d positivo n (%)	48 (83)	30 (94)	14 (66,5)	4 (80)	p=0,028
TAD negativo n (%)	8 (13,8)	1 (3)	6 (28,5)	1 (20)	
TAD C3d+IgG positivo n (%)	2 (3,4)	1 (3)	1 (5)	0	
Titolo a 4 °C [range]	1024 [128–2048]	1024 [320–2048]	512 [128–2048]	256 [128–1024]	p=0,259
Ampiezza termica fino a 37 °C n (%)	55 (95)	31 (97)	18 (86)	5 (100)	p=0,056
Isotipo	IgM	IgM	IgM	IgM	p=0,99
Specificità anti-I n (%)	42 (73)	26 (80)	14 (66)	2 (40)	-
Specificità non I-i n (%)	16 (27)	6 (20)	7 (34)	3 (60)	-



Clonalità e imaging

Eseguita BOM

Perlopiù generici infiltrati linfoidi di vario grado, non diagnostici

81%

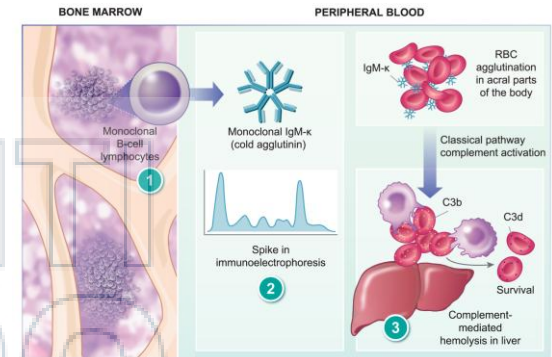
Diagnostica per CAD-LPD solo nel 13% (n=4) dei casi (impatto evoluzione tecnologica e sensibilità diagnostica)

50% (n=16)

Clonalità B documentata (tramite IF e/o Bio. Mol.)

Identificati piccoli cloni B CD20+ con restrizione di catena leggera e/o riarrangiamento IgH

Imaging: all'esordio non emerse linfadenopatie, solo epatosplenomegalia di grado lieve nel 25% dei pz



Studio (anno)	N CAD	% con LPD associata (CAD-LPD)	Tipo di LPD / immunofenotipo	Note
Berentsen et al., Haematologica 2006	86	76%	Infiltrato clonale B CD20+, κ+, CD5-/CD10-, a bassa densità	Descritta come "distinct bone marrow LPD" diversa dai linfomi noti; la definizione formale di "CAD-associated LPD" nasce qui.
Randen et al., Blood 2014 – "Clinical and immunologic features of CAD-associated LPD"	54	80% (tutti i CAD presentavano LPD clonale midollare)	Clonale κ-restricted, CD20+, CD19+, CD5-/CD10-/CD23-, spesso con MYD88 L265P negative	Studio istologico e molecolare chiave → definisce CAD-LPD come entità distinta da LPL/WM o MZL.
Berentsen et al., Blood 2020	232	76% con evidenza midollare di LPD clonale (quando eseguita)	Quadro simile a Randen: piccolo clone B κ+, CD20+, senza MYD88	Analisi completata in 150 pz: 114 (76%) con LPD midollare; in altri 24% nessun clone identificabile.

Clinica e Trattamento

Manifestazione cliniche	CAD n=32	CA clin. rilevanti n=21
Sintomi vascolari n (%)	8 (25)	2 (10)
Fatigue n (%)	22 (69)	5 (25)
Eventi trombotici all'esordio n (%)	2 (6)	0
Eventi trombotici in corso di follow up n (%)	3 (9)	-
Fenotipo tipo 1 / tipo 2 n (%)	27 (84) / 5 (16)	-

Non è stata osservata alcuna correlazione significativa tra il titolo anticorpale e la presenza di sintomi clinici ($p = 0,55$), né tra titolo ed indici di emolisi ($p = 0,463$).
 → **più importante ampiezza che titolo**

Corticosteroidi (n=19 59%)

Risposta parziale: 79%
 Durata mediana di risposta: **6 mesi**

Rituximab monoterapia (n=8 25%)

Risposte complete: 75%
 Durata mediana di risposta: **18 mesi**

Rituximab+chemioterapia (n=5 15%)

Risposte complete: 80%
 Durata mediana di rposta: **24 mesi**

Recidive 50%

50% (n=16)

Re-challenge con rituximab

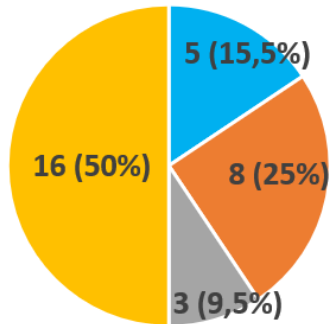
Berentsen S. How I treat cold agglutinin disease. *Blood*. 2021;137(10):1295–1303.
 Berentsen S. New Insights in the Pathogenesis and Therapy of Cold Agglutinin Disease. *Front Immunol*. 2020;11:590.

Follow Up

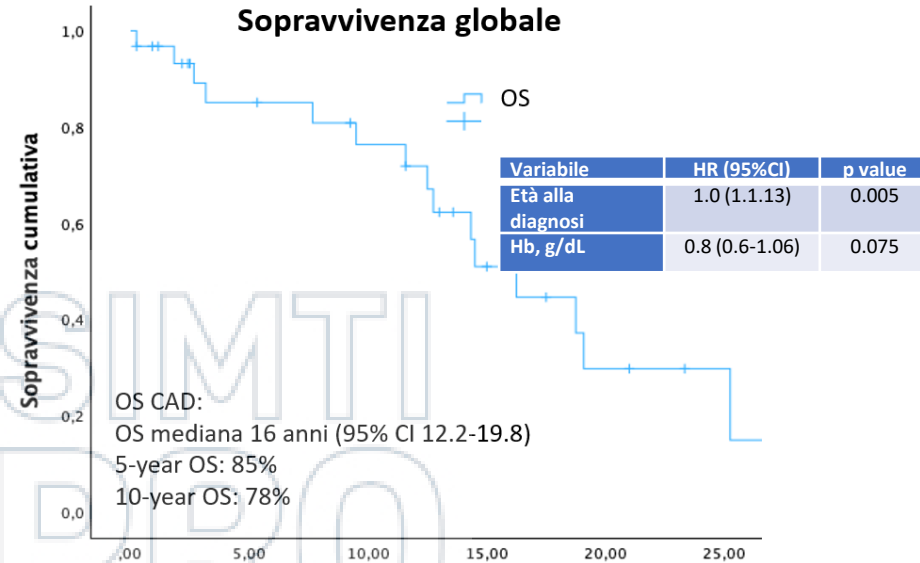
	CAD n=32	CA clin. ril. n=21	CAS n=5
Follow-up mediano (anni)	11 [2-15]	3 [2-10]	3 [1-9]
Persi al follow-up n (%)	0	10 (47,5)	0
Trasferiti ad altri centri n (%)	4 (12,5)	0	0
Trasformazioni linfoproliferative n (%)	3 (9)	0	0
Mielodisplasia n (%)	1 (3)	0	0

Vivi 50%

Deceduti 50%

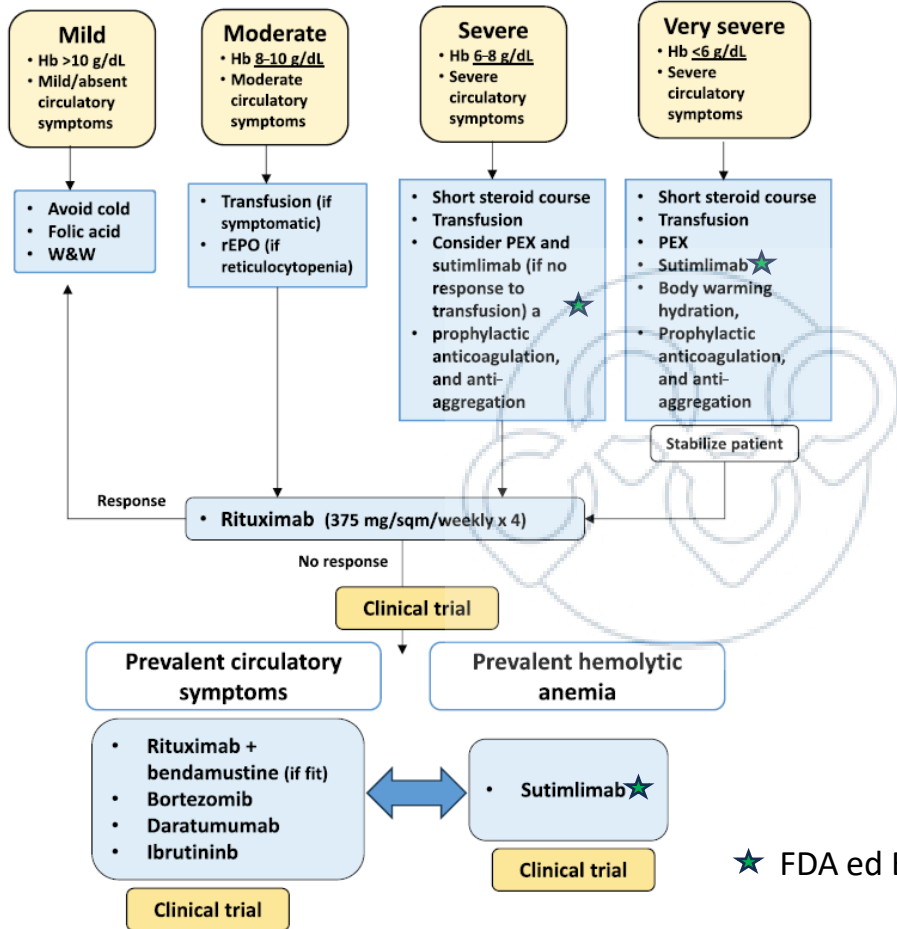


- Senectus
- Malattia attiva
- Correlati ad eventi ischemici

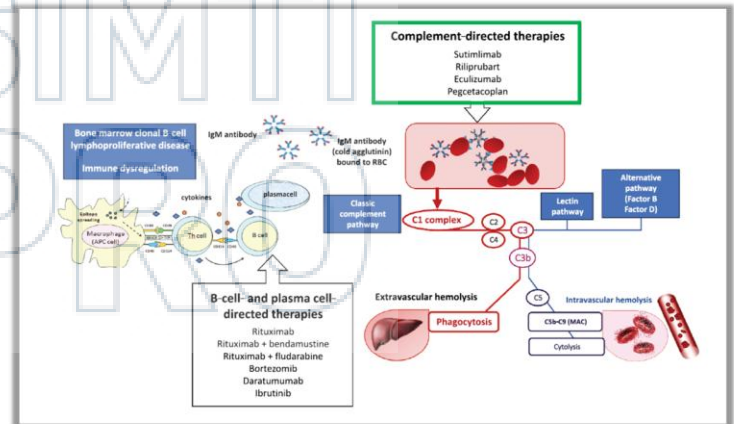


Ref.	N CAD	OS mediana (anni)	Follow-up	% trasformazione in patologie onco-ematologiche
Berentsen et al., 2006	86	12,5 anni dall'inizio dei sintomi	10 anni	3,5% trasformazione in linfoma aggressivo
Berentsen, Barcellini et al., 2020	232	16 anni dalla diagnosi	6 anni	DLBCL: 3,4%; altre neoplasie ematologiche 3% (MDS e mieloma)
Hansen et al., 2022	112	8,8 anni dalla prima diagnosi di CAD	follow-up fino a 37 anni	Aumento incidenza, ma non specificate trasformazioni

Algoritmo gestione paziente con CAD



INDICAZIONE AMMESSA ALLA RIMBORSABILITÀ:
 trattamento dell'anemia emolitica di grado da moderato a grave (Hb ≤ 10 g/dl) in pazienti adulti affetti da CAD primaria unfigit, non-responder o ricaduti dopo un precedente trattamento con rituximab.



The dual pathogenic mechanism in cold agglutinin disease (CAD): autoantibody production and complement activation and main available drugs targeting these mechanisms.

Wilma Barcellini & Bruno Fattizzo (2024) Expert Review of Hematology, 17:7, 287-294.

★ FDA ed EMA approved

Wilma Barcellini & Bruno Fattizzo (2024) Expert Review of Hematology, 17:7, 287-294,

Conclusioni



Laboratorio e approccio diagnostico integrato

Il laboratorio di Immunoematologia è il cardine nella diagnosi: solo attraverso la definizione di titolo, ampiezza termica e pattern del TAD possiamo definire correttamente le caratteristiche degli autoAc

Fondamentale un approccio integrato e multidisciplinare, che unisca immunoematologia, clinica, istologia e citofluorimetria/biologia molecolare per riconoscere la natura clonale delle CAD.



Evoluzione terapeutica

Le terapie mirate sono in espansione: rituximab come standard, inibitori del complemento (sutimlimab, pegcetacoplan) come nuova frontiera per controllo rapido dell'emolisi.



Follow Up

Il follow-up nel tempo è essenziale: alcuni pazienti evolvono da forme sierologiche clinicamente irrilevanti a CAD conclamate, e solo il monitoraggio continuo consente di cogliere questa transizione. Inoltre, ulteriori studi sono necessari per chiarire il rischio di evoluzione in altre patologie ematologiche.



Importanza dei dati real-world

Registri nazionali e studi monocentrici longitudinali come il nostro sono fondamentali per comprendere la storia naturale, la variabilità clinica e l'outcome a lungo termine di questa malattia rara.