

## Quali test possono aiutarmi a diagnosticare un'anemia emolitica immuno-mediata (IMHA) e quali campioni devo prelevare?

Dott.ssa Nadine Idalan, dott.ssa Maria Brockmann



I Cocker Spaniel sono tra le razze predisposte all'IMHA

Immagine: envatoelements

### Quando sospettare l'emolisi?

Sospettiamo l'emolisi soprattutto nell'anemia rigenerativa, quando è stata esclusa la perdita di sangue (fig. 1).

Nella maggior parte dei casi, l'anemia emolitica è grave e mostra segni di rigenerazione più forti rispetto all'anemia da perdita di sangue. In caso di emolisi, gli eritrociti vengono distrutti. Oltre all'IMHA primaria (indicata come IMHA non associativa), molte altre patologie sottostanti possono causare emolisi (fig. 2).

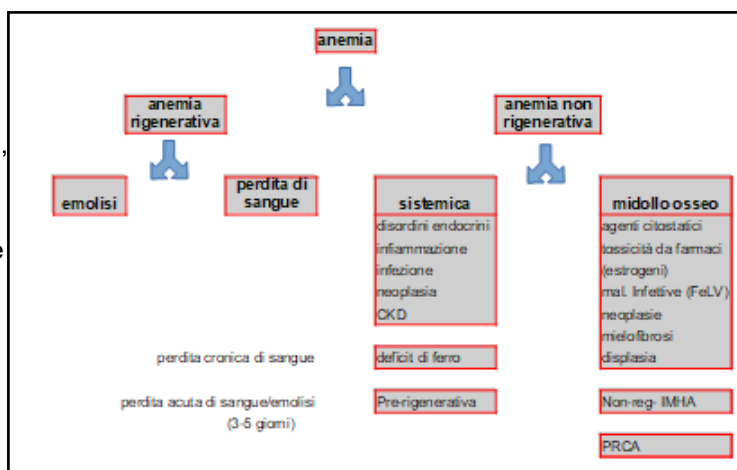


Fig. 1: Elaborazione schematica dell'anemia.

NOTA BENE: l'emolisi molto precoce potrebbe non essere ancora o essere solo leggermente rigenerativa (il midollo osseo ha bisogno di alcuni giorni per reagire). Inoltre, esistono forme non rigenerative di IMHA (formazione di anticorpi contro i precursori degli eritrociti).

Immagine: Dott.ssa Jennifer von Luckner

Cause di emolisi	
<b>Immunomediata</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. primaria (non associativa)</li> <li>2. secondaria (associativa) <ul style="list-style-type: none"> <li>- malattie infettive</li> <li>- farmaci</li> <li>- neoplasie</li> </ul> </li> <li>3. alloimmune <ul style="list-style-type: none"> <li>- trasfusione</li> <li>- neonatale (gatto)</li> </ul> </li> </ol>
<b>Infezioni</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➔ Babesia</li> <li>➔ Micoplasmi emotropi</li> </ul>
<b>Difetti di membrana</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➔ tossine / farmaci</li> <li>➔ ipofosfatemia</li> <li>➔ difetti congeniti</li> </ul>

Fig. 2: Possibili cause di emolisi

Immagine: Dott.ssa Jennifer von Luckner

## Quali test devono essere eseguiti?

Il materiale richiesto per la diagnosi di IMHA è elencato nella fig. 3.

### Emocromo/citomorfologia (striscio di sangue):

fornisce informazioni sulla rigenerazione ed è utile come prima panoramica, ad es. per rilevare agenti infettivi. La morfologia degli eritrociti può anche fornire informazioni importanti sulla causa dell'anemia. In Laboklin, la conta reticolocitaria è inclusa in ogni emocromo di cane e gatto. L'emocromo deve essere misurato su sangue in EDTA il prima possibile dopo il prelievo, poiché la fragilità eritrocitaria dei cani con IMHA è aumentata.

**Chimica del sangue:** la misurazione della bilirubina sierica e delle proteine totali per identificare la causa dell'anemia può aiutare a differenziare emolisi ed emorragie.

**Analisi delle urine:** in alcuni casi di emolisi possono essere presenti bilirubinuria o emoglobinuria. Da notare che nei cani, specialmente nei cani maschi, un risultato del test debolmente positivo può essere fisiologico.

Campioni per la diagnosi di IMHA	
1 ml sangue in EDTA (fresco)	test di Coombs + CBC + PCR
2 – 3 strisci di sangue	citomorfologia
1 ml siero	chimica clinica
(urine)	(bilirubinuria)

Fig. 3: Campioni da inviare quando si sospetta una IMHA

Immagine: Laboklin

**Agenti infettivi:** per rilevare agenti infettivi come la babesia e il micoplasma emotropo nelle fasi acute, si raccomanda l'analisi molecolare (PCR). Inoltre, dovrebbero venire esclusi agenti patogeni come ehrlichia e anaplasma.

Per l'ehrlichia, può essere utile un'ulteriore determinazione del titolo anticorpale.

## Test per diagnosticare la distruzione immunomediata

**Sferociti:** la presenza dei cosiddetti sferociti (fig. 4) nello striscio di sangue può fornire preziose informazioni su una distruzione immunomediata degli eritrociti. Il materiale da campionare richiesto per il loro rilevamento è di **due - tre strisci di sangue** preparati direttamente dopo il prelievo.

**Autoagglutinazione:** osservando il campione in EDTA, si può notare la presenza di un'autoagglutinazione non specifica. Questo risultato dovrebbe essere seguito da un test di agglutinazione salina e da un test di Coombs.

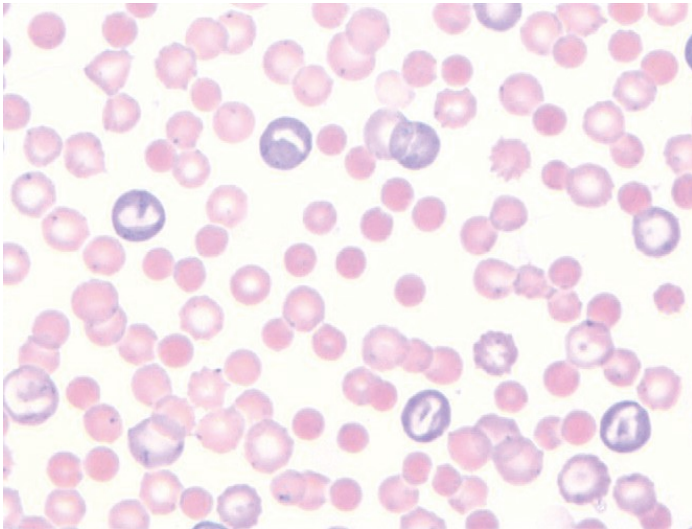
**Test di Coombs:** adatto a rilevare la presenza di autoanticorpi sulla superficie degli eritrociti. Materiale da prelevare: **sangue fresco in EDTA**. Se il campione viene conservato refrigerato, il test può essere valutato fino a 5 giorni dal prelievo.

## Domande frequenti sulla valutazione del test di Coombs

### Qual è il principio del test di Coombs?

Il test di Coombs, chiamato anche DAT (Direct Antiglobulin Test), verifica la presenza di anticorpi sulla superficie dei globuli rossi (fig. 5).

Sul mercato sono disponibili diversi metodi di test: gel test, strip test, test di citometria a flusso, il noto test su micropiastra e altro ancora.



**Fig. 4:** Striscio di sangue di un cane con IMHA che mostra sferociti, anisocitosi e policromasia.

Immagine: dott.ssa Nadine Idalan

Tutti i test menzionati sono adeguati per la diagnosi di IMHA nell'uomo e nel cane. Alcuni test sono disponibili in commercio anche per gatti e cavalli.

## Qual è il principio del metodo della micropiastra?

In medicina veterinaria, la micropiastra è il metodo più utilizzato. L'antiglobulina (reagente di Coombs) viene gradualmente diluita (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, ecc.), quindi vengono aggiunti eritrociti lavati e incubati per almeno 30 minuti.



**Fig. 5:** Il reagente di Coombs (mostrato in viola) induce un'agglutinazione quando gli anticorpi anti-eritrocitici sono presenti sulla superficie dei globuli rossi.

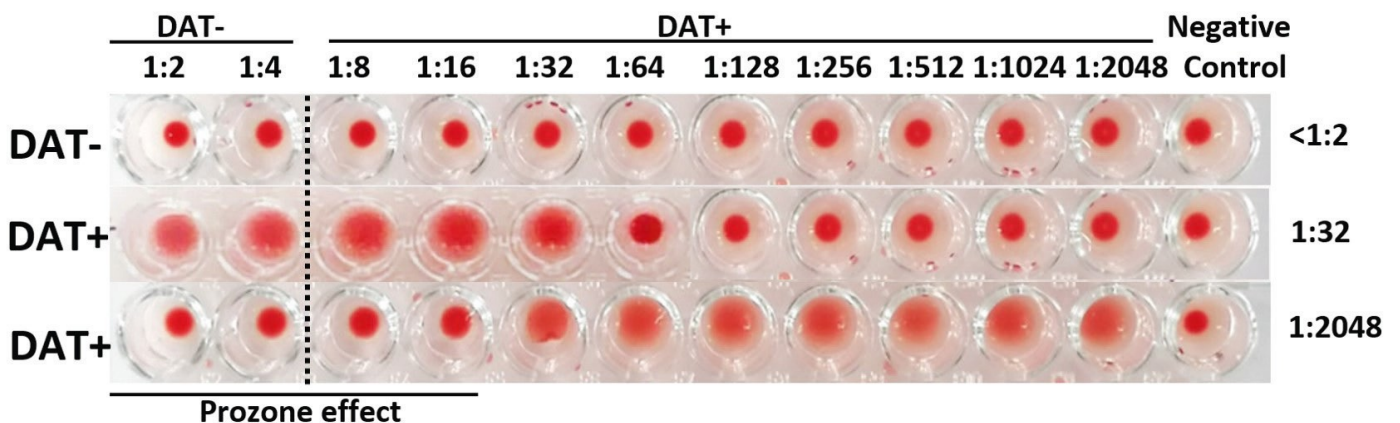
Immagine: dott.ssa Nadine Idalan

Se non si verifica alcuna reazione, le cellule del sangue sedimenteranno sul fondo dei pozzetti e dopo l'incubazione si osserverà solo un minuscolo punto rosso: il test sarà negativo.

Se il test è positivo, le antiglobuline aggiunte legano gli eritrociti impedendo loro di cadere sul fondo del pozzetto. Gli eritrociti ricoprono completamente o quasi il pozzo. Se solo i primi due pozzetti (1:2 e 1:4) mostrano positività, il test è ancora considerato negativo, perché questi titoli bassi sono considerati aspecifici. I titoli da 1:8 in su sono considerati positivi. Non è raro vedere titoli superiori a 1:1024 in caso di IMHA.

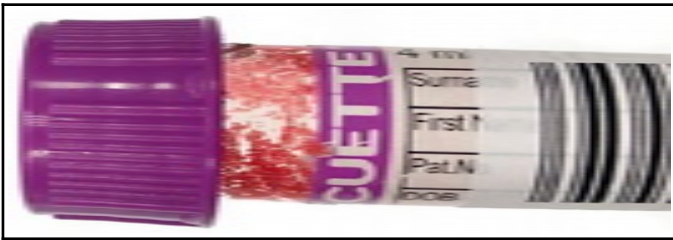
## Che cos'è un effetto prozona?

L'effetto prozona è un fenomeno osservato in campioni altamente positivi. L'alta concentrazione di anticorpi anti-eritrociti inibisce la reazione positiva. Un esempio è illustrato di seguito (fig. 6).



**Fig. 6:** Test di Coombs eseguiti con il metodo della micropiastra. I titoli vengono letti da sinistra (titoli bassi) a destra (titoli alti fino a 1:2048). L'ultima riga contiene solo una miscela di NaCl e cellule del sangue senza reagenti e viene utilizzata come autocontrollo negativo. I titoli inferiori a 1:8 sono considerati negativi. La prima riga è un campione negativo (DAT-), la seconda riga è un campione positivo con il titolo 1:32 (DAT+), sull'ultima riga i titoli da 1:2 a 1:16 sono negativi (effetto prozona), tuttavia questo campione è fortemente positivo (1:2048).

Immagine: Dr. Nadine Idalan et al.



**Fig. 7:** Autoagglutinazione in una provetta con EDTA prima del lavaggio.

*Immagine: dott.ssa Nadine Idalan*

## Il campione di sangue EDTA presenta un coagulo di sangue, il test di Coombs è in grado di superarlo?

Sfortunatamente no. La presenza di globuli rossi intatti è indispensabile per l'esecuzione di un corretto test di Coombs. Tuttavia, è importante conoscere la differenza tra un coagulo di sangue e un'agglutinazione. Il coagulo di sangue è il risultato della coagulazione fisiologica, e può verificarsi quando il campione non è miscelato correttamente con l'anticoagulante EDTA. Il coagulo di sangue è irreversibile. Per evitare ciò: dopo il campionamento, capovolgere delicatamente e ripetutamente il campione. L'agglutinazione può essere causato da diversi fattori. Nella maggior parte dei casi, l'agglutinazione è reversibile, ad es. riscaldando il campione in mano o lavando le cellule.

## Autoagglutinazione nel mio campione: può ancora essere testato?

Gli eritrociti vengono lavati prima del test di Coombs. Nonostante l'autoagglutinazione, è quindi possibile eseguire un test di Coombs sulla maggior parte di questi campioni. Una rara eccezione: se l'autoagglutinazione persiste dopo il lavaggio, il risultato del test di Coombs non può essere letto.

## Il mio campione mostra autoagglutinazione: è necessario un test di Coombs o l'agglutinazione è sufficiente per fare una diagnosi?

Bisogna distinguere tra autoagglutinazione persistente **dopo** il lavaggio e autoagglutinazione prima del lavaggio dei globuli rossi. In molti casi l'agglutinazione **prima** del lavaggio non è diagnostica. L'autoagglutinazione persistente è comunque fortemente indicativa di IMHA. Il

nostro rapporto di laboratorio ti informerà sull'autoagglutinazione persistente nel tuo campione.

## Ho già iniziato la terapia immunosoppressiva: ha ancora senso richiedere il test di Coombs?

Il test di Coombs può rimanere positivo fino a 24 settimane dopo il trattamento nonostante i farmaci immunosoppressivi. Un risultato negativo, tuttavia, non esclude IMHA.

## Ho già valutato lo striscio di sangue al microscopio e ho trovato gli sferociti: devo ancora eseguire il test di Coombs o posso già diagnosticare l'IMHA?

Gli sferociti possono essere visti in piccola quantità nei cani sani e in quantità moderata in altre malattie (intossicazione da zinco, avvelenamento, CID...). Tuttavia, cinque sferociti per campo visivo a 100 ingrandimenti sono considerati di supporto per IMHA. La sferocitosi ereditaria è una diagnosi differenziale importante ma molto rara. Si noti che i gatti hanno fisiologicamente eritrociti rotondi senza pallore centrale, il che rende la valutazione degli sferociti nei gatti inaffidabile.

## Ho già testato il mio paziente, il titolo del test di Coombs era alto, cosa significa?

Titoli alti e bassi hanno lo stesso significato: gli eritrociti sono rivestiti con autoanticorpi. Finora, non ci sono prove – nell'uomo e medicina veterinaria - che un titolo più elevato sia correlato con anemia più forte, emolisi o prognosi peggiore.

### Approfondimenti

Garden OA, Kidd L, Mexas AM, Chang YM, Jeffery U, Blois SL, Fogle JE, MacNeill AL, Lubas G, Birkenheuer A, Buoncompagni S, Dandrieux JRS, Di Loria A, Fellman CL, Glanemann B, Goggs R, Granick JL, LeVine DN, Sharp CR, Smith-Carr S, Swann JW, Szladovits B. ACVIM consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 2019; (2):313-334.

Idalan N, Zeitz JO, Weber CN, Müller E, Giger U. Comparative study of immunohematological tests with canine blood samples submitted for a direct antiglobulin (Coombs') test. *Canine Med Genet* 2021;8(1):10.