

**CRCC REGIONE LIGURIA**

**Corso Regionale Avanzato di Immunoematologia**

**LA SIEROLOGIA DELLE  
MALATTIE EMOLITICHE AUTOIMMUNI  
DA AUTOANTICORPI CALDI**

**3 ottobre 2007**

**Dr. Federico Morelli**



Azienda Ospedaliera Universitaria "San Martino" di Genova  
Servizio di Immunoematologia e TrASFusionale  
Direttore Dr. Paolo Strada

## Le MEA vengono così classificate

- MEA da autoanticorpi caldi
- MEA da autoanticorpi freddi
- Emoglobinuria parossistica *a frigore*
- MEA farmaco-indotte

# Diagnosi delle MEA

Le MEA da autoAb caldi sono quelle di più frequente riscontro e le più gravi.

Si distinguono in *idiopatiche* e in *secondarie*.

Quest'ultime sono spesso la prima manifestazione di patologie particolarmente severe, quali: leucemie, linfomi (specie non-Hodgkin), LES, mielodisplasie e rappresentano circa il 75-80% dei casi di MEA "calde".

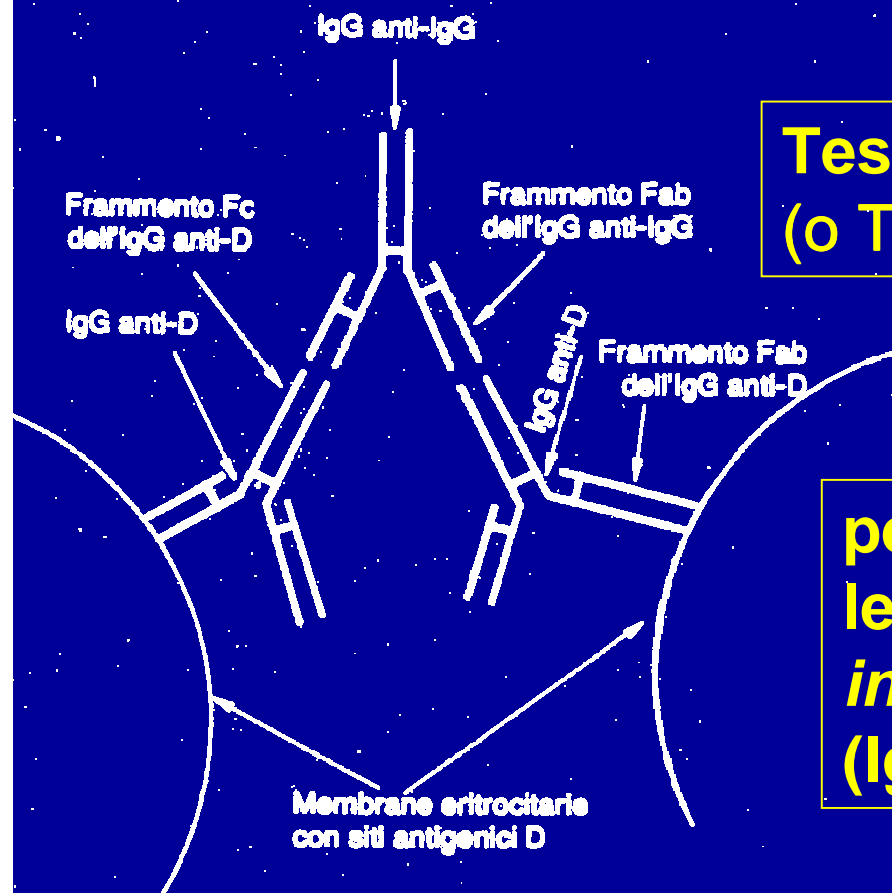
La diagnosi si basa essenzialmente sul riscontro di un TDA positivo.

# Diagnosi delle MEA

I sieri antiglobuline umane in uso nei laboratori di immunoematologia si suddividono in due grandi classi:

- sieri polispecifici (anti-IgG+C3d o C3d-C3b)
- sieri monospecifici.

Il siero polispecifico è di più largo impiego.



## Test Diretto all'Antiglobulina - DAT (o Test di Coombs Diretto - TCD)

permette di determinare se  
le emazie sono state ricoperte  
*in vivo* con globuline  
(IgG e/o Complemento)

- anemia emolitica autoimmune                      AIHA
- anemia emolitica farmaco-indotta              DIIHA
- malattia emolitica del neonato                  MEN o HDN
- reazione trasfusionale emolitica ritardata    DHTR

# Diagnosi delle MEA

Molto raramente (meno dell'1% dei casi), una MEA da autoAb “caldi” può essere sostenuta da IgA, piuttosto che da IgG o da frazioni complementari.

Con i comuni test di screening questa specificità non viene evidenziata, ma può essere sospettata (e ricercata) ogniqualvolta vi sia un quadro clinico compatibile con la diagnosi di MEA.

Sono oggi reperibili in commercio “schedine” contenenti sieri anti-IgA in grado di consentire la diagnosi di queste forme.

# Diagnosi delle MEA

MEA con test di Coombs diretto negativo (2 - 4%)

- errato lavaggio
- anti-IgA
- scarsa concentrazione Ig (< 25 - 120 molecole)
- alta costante di dissociazione

## Diagnosi delle MEA

Test di conferma di un TDA in caso di MEA è l'eluizione dell'autoAb dalle emazie del paziente.

Sull'eluato è possibile poi identificare la specificità dell'autoAb.

In genere gli autoAb sono diretti verso strutture di base della membrana eritrocitaria, il più spesso strutture Rh.

## ELUIZIONE

In chimica significa

- estrazione di un materiale da un altro (assorbente)
- usando generalmente un solvente organico

In immunoematologia

- il materiale estratto è costituito da immunoglobuline
- l'assorbente è costituito da emazie

Scopo: rimuovere anticorpi che sono adesi a emazie per

- accertamento diagnostico (emolisi immuno-mediata)
- tipizzazione gruppoemica (autoagglutinaz.-DAT positivo)

in associazione ad assorbimento per

- purificare o separare miscele di anticorpi
- tipizzare antigeni eritrocitari deboli
- conferma diagnostica di specificità antigeniche o anticorpali

## L'eluizione

è un'aggressione controllata al legame antigene-anticorpo (per non distruggere l'anticorpo e talvolta neanche l'antigene) al fine di causarne la dissoluzione

I metodi di eluizione agiscono

- cambiando la termodinamica della reazione antigene-anticorpo
- neutralizzando o contrastando le forze di attrazione
- alterando la complementarità strutturale

Le combinazioni Ag-Ab sono deboli e reversibili:

l'immunocomplesso può facilmente dissociarsi a seguito di

- cambiamenti del pH del mezzo
- applicazione di forze fisico-chimiche:
  - # meccaniche (scuotimento, ultrasuoni)
  - # termiche (caldo, freddo)
- agenti chimici vari (etere, cloroformio, xilene...)

## **Calore: [Ag] + [Ab] = [AgAb] + calorie**

l'aumento della temperatura riduce la forza dei legami idrogeno (esotermici) e aumenta l'entropia

- a +44°C quasi tutti gli anticorpi cominciano a staccarsi dalla superficie eritrocitaria
- a +56°C gli eritrociti emolizzano
- a +56°C per 5' gli eritrociti perdono gli antigeni Rh
- a +56°C per 10' Fy<sup>a</sup> e Jk<sup>b</sup> si distruggono, M e P<sup>1</sup> si indeboliscono
- a +60°C la struttura proteica degli anticorpi si denatura

Landsteiner e Miller *J Exp Med* 42, 853, 1925

Greewalt *J Lab Clin Med* 48, 634, 1956

Meier et al *Transf* 23, 411, 1983

## **Congelamento / scongelamento**

drammatico e rapido cambio della temperatura

Eicher et al *Transf* 18, 647, 1978

## **Onde acustiche ad alta frequenza**

le onde d'urto causate dalla implosione di microbolle e il conseguente sviluppo di calore staccano gli anticorpi

McCullough *Transf* 33, 725, 1993

## **Soluzioni saline ad alta forza ionica**

dissociazione dovuta a neutralizzazione di cariche nei siti di combinazione e ad alterazione della struttura terziaria (ioni caotropici SCN<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>)

Komninos et al *J Lab Clin Med* 41, 887, 1953 (NaCl 8%)

Edgington *J Immunol* 106, 673, 1971 (SCN<sup>-</sup>)

## **Cambiamenti del pH**

mutamenti di carica elettrostatica che causano repulsione molecolare e alterazione della struttura terziaria - pH acido (3.0 - 3,5)

Landsteiner e van der Scheer *J Exp Med* 63, 325, 1936

Kidd *J Clin Pathol* 2, 103, 1949

Kochwa e Rosenfield *J Immunol* 92, 682, 1964

Jenkins e Moore *Transf* 17, 110, 1977

Rekvig e Hannestad *Vox Sang* 33, 280, 1977

Louie et al *Transf* 26, 550, 1986

Kosanke et al *Transf* 29, 57S, 1989

Byrne *Immunohematology* 2, 46, 1991

## **Solventi organici**

etere, xilene...denaturano o distruggono i siti antigenici, alterano la struttura terziaria, abbassano la tensione superficiale del mezzo e causano repulsione

Vos e Kelsall Br *J Haematol* 2, 342, 1956

Rubin *J Clin Pathol* 16, 70, 1963

## **Clorochina**

neutralizzazione di cariche, simile agli ioni caotropici ma più debole

Edwards et al *Transf* 22, 59, 1982

## **Reagenti tiolici**

composti sulfidrilici 2-mercaptoetanololo (2-ME) e ditionitrotolo (DTT)  
rompono i legami disolfuro delle IgM

ZZAP (DTT + ficina o papaina) azione combinata di enzima e riducente  
(denatura completamente gli antigeni Kell, Duffy e MNS)

## **Metodi di eluizione da eritrociti intatti per tipizzazione eritrocitaria in *WAIHA DAT positive***

clorochina

glicina-HCL e acid/EDTA

calore a +56°C per 3'

## Fattori che influenzano il risultato dell'eluizione

### Considerazioni tecniche

- lavaggio incompleto (sopranatante ultimo lavaggio come controllo negativo)
- legame di anticorpi alle superfici (cambiare provetta alla fine dei lavaggi)
- dissociazione dell'anticorpo durante i lavaggi (lavaggi a freddo con LISS)
- falsi positivi con eluizione acida (LISS causa adesione aspecifica di IgG)

### Adesione aspecifica di anticorpi alle emazie

- fenomeno di Matuhasi-Ogata
- IgG citofiliche

### Sensibilità delle procedure di assorbimento-eluzione

- effetto concentrante
- effetto potenziante

## Composizione proteica degli eluati eritrocitari

La concentrazione proteica degli eluati allo xilene è 10 volte maggiore di quella degli eluati acidi  
- *globina derivata dalla rottura delle molecole emoglobiniche?*

In tutti i campioni, la proporzione di IgG è inferiore allo 0,13% del contenuto proteico totale

Gli eluati acidi da emazie sensibilizzate *in vitro* contengono più IgG degli eluati allo xilene  
- *l'eluizione acida è più efficace nel rimuovere le IgG citofiliche aspecifiche?*  
- *xilene interferisce con la rivelabilità biochimica delle IgG?*

I titoli anticorpali di eluati ottenuti da WAIHA sono minori di quelli ottenuti da emazie sensibilizzate

**Grado di positività del test all'antiglobulina in rapporto al numero di molecole IgG adese ad ogni eritrocita**

**test all'antiglobulina**

**molecole IgG per emazia**

**negativo**

**sino a 120**

**+/-**

**120**

**1 +**

**200**

**2 +**

**300 – 500**

**3 +, 4 +**

**oltre 500**

**Da PETZ & GARRATTY**

**Emazie sensibilizzate in vitro con IgG anti - D**

**Proteine adese alle emazie di pazienti affetti da MEA da autoAb  
“caldi” evidenziate con test diretto all’antiglobulina (%)**

Proteine	WORLLEDGE & BLAJCHMAN 121 paz.	ISSITT et al. 87 paz.	PETZ & GARRATTY 104 paz.	Policentrico italaino 565 paz.
IgG isolate	36	44	18	38
IgA isolate	2,5	0	2	0,2
solo C3d	10	0	10	20
IgG + C3D	43	47	46	24
IgA + C3d	0	0	2	0
IgM + C3d	0	0	2	2
miste	8,5	9	20	15

## Sottoclassi IgG coinvolte in MEA da autoAb “caldi”

Ig G1	79,0%	IgG1 + IgG4	1,0%
IgG2	2,3%	IgG2 + IgG4	0,3%
IgG3	1,7%	IgG1 + IgG2 + IgG3	1,4%
IgG4	0,3%	IgG1 + IgG2 + IgG4	0,8%
IgG1 + IgG2	6,5%	IgG1 + IgG2 + IgG3 + IgG4	1,7%
IgG1 + IgG3	5,0%		

Studio policentrico italiano (1986) su 382 pazienti

## Correlazione fra proteine adese alle emazie e grado lisi eritrocitaria mediata dai macrofagi

tipo di proteine adese	grado di lisi "in vivo"
IgG + C	massimo
IgG3	usualmente alto
IgG1	marcato (non sempre)
IgG2 e IgG4	nessuna lisi (di norma)
C3c isolato	limitato
C3d isolato	nessuna lisi

# Diagnosi delle MEA

## Specificità autoanticorpi caldi

### Evoluzione cronologica

- Wiener-Gordon (anti-sostanza Rh-Hr)
- Race et al. (anti-Rh, anti-emazie -D-)
- Weiner-Vos (anti-nl, pdl, dl)
- Worlledge et al. (anti-En<sup>a</sup>)
- Issitt et al. (anti-Wr<sup>b</sup>)
- Autoanticorpi *mimicking* alloanticorpi

# Diagnosi delle MEA

Impiegando emazie

- a normale patrimonio antigenico Rh ( $R_1r$ ,  $rr$ ,  $R_2r$ )
- a fenotipo Rh parzialmente deleto (-D-)
- a fenotipo Rh totalmente deleto ( $Rh_{null}$ )

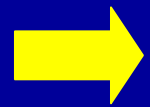
è possibile distinguere le più comuni specificità

- anti-*normal* (anti-e, anti-Rh17, -Rh18, -Rh 34)
- anti-pdl (anti-Rh29, -U, -LW)
- anti-dl (non collegate al sistema Rh: anti- $Wr^b$ ,  $En^a$ )

da Weiner & Vos - Ricerche su 60 eluati “aspecifici”

# Diagnosi delle MEA

- Dallo studio degli eluati in corso di MEA da autoanticorpi caldi, si può evidenziare come gli autoanticorpi a specificità Rh “semplice” rappresentino l’eccezione piuttosto che la regola.
- Inoltre, la maggioranza di tali anticorpi, sottoposti ad accurate indagini mediante sofisticate tecniche di assorbimento/eluizione, dimostra di essere diretta verso antigeni Rh “di base”, di possedere, cioè, in realtà, specificità anti-nl (anti-Rh17, Rh18 e similare) o anti-pdl (anti-Rh29)



**1953**

**non specific (= con etero - Ag)**

**1953**

**=**

**1953**

**RACE, SANGER & SELWYN = 2 possibili  
specificità (= con - D-)**

**1953 - 1963**

**tutti anti - Rh, tolti 2 casi anti - K e  
1 caso di anti - Jk<sup>a</sup>**

## WEINER & VOS Ricerche su 60 eluati “aspecifici”

**WEINER & VOS (1963), con 3 tipi di emazie:**

- 1. a fenotipo Rh “normale” ( $R_1r, rr, R_2r$ )**
- 2. a fenotipo Rh “parzialmente deleto” (- D-)**
- 3. a fenotipo Rh “totalmente deleto” ( $Rh_{null}$ )**

Fenotipo Rh

anticorpo

tipo 1

tipo2

tipo3

---

Rh “normale”

+

+

+

Rh “Parz.deleto”

-

-

-

Rh<sub>null</sub>  
specificità

-

-

+

anti-n1

anti-pd1

anti-d1

anti - n1

$\text{Hr}_0$  (Rh 17)

$\text{Hr}^S$  (Rh 18)

$\text{Hr}^B$  (Rh 34)

**Rh 29**

**anti -pd1**

**LW**

**U**

**Rh ?**

**anti – dl**

**Wr<sup>b</sup>**

**En<sup>a</sup>**