

DIAGNOSI IMMUNOLOGICA DELL' ANEMIA EMOLITICA AUTOIMMUNE

**Francesca Imperiali, Anna Zaninoni
Fondazione IRCCS Ca' Granda
Ospedale Maggiore Policlinico, Milano**



1° PATIENT'S DAY 13 NOVEMBRE 2010

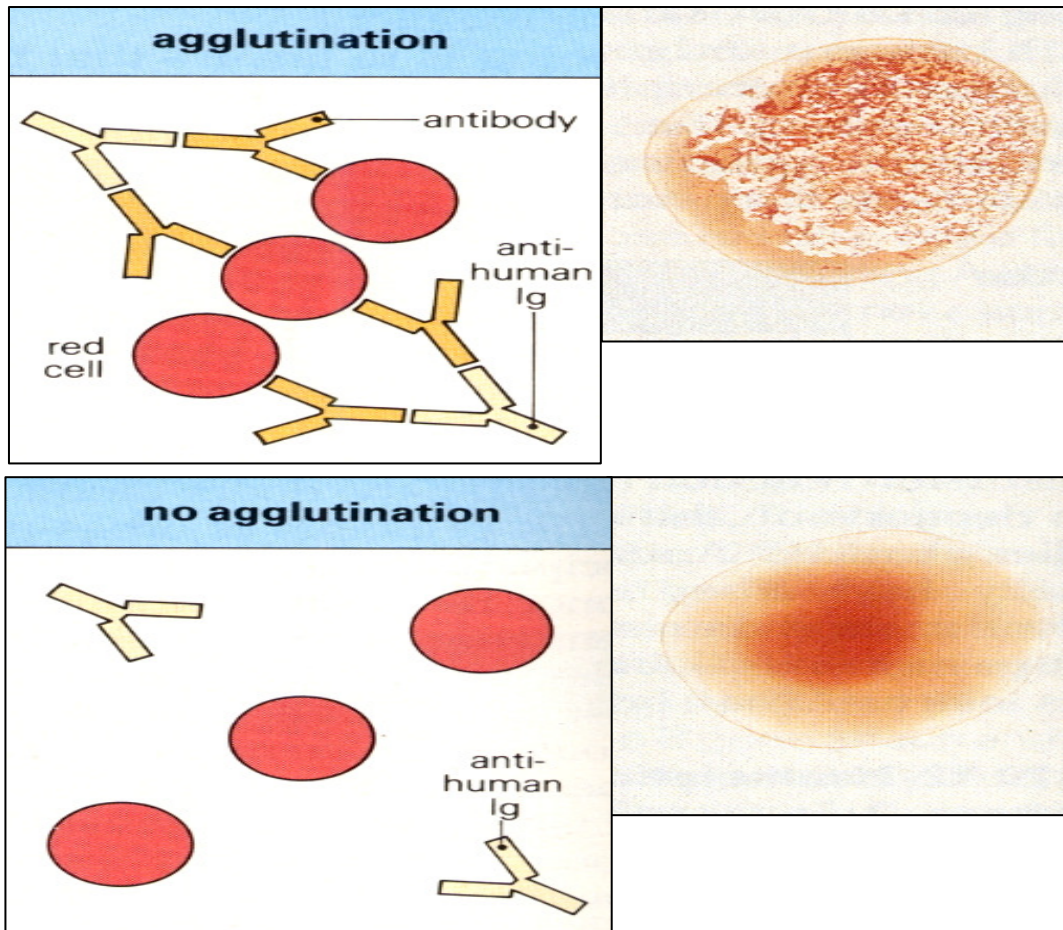
Diagnosi immunologica della anemia emolitica autoimmune

**Ha lo scopo di dimostrare la presenza di
autoanticorpi diretti contro antigeni eritrocitari**

- **Test dell'antiglobulina diretto (DAT)**
- **Ricerca degli autoanticorpi nel siero e nell'eluato**
- **Identificazione della specificità antigenica**

Test dell'antiglobulina diretto (DAT)

Chiamato anche test di Coombs diretto, rileva l'agglutinazione dei globuli rossi con antisieri polispecifici in provetta. E' l'esame più semplice ed immediato e considerato ancora il "golden standard".

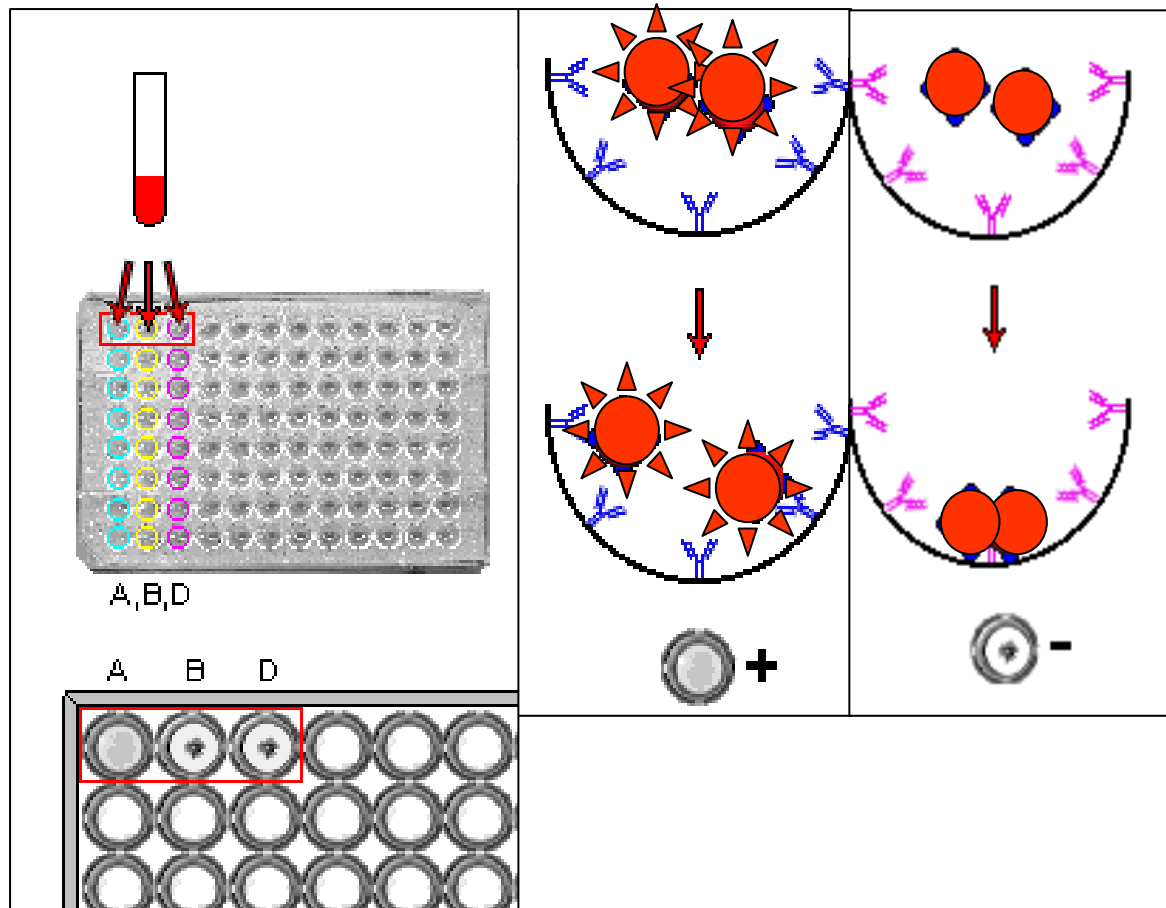


Se positivo si procede alla caratterizzazione con antisieri monospecifici (IgG, IgA, IgM, o anti-c) ed alla determinazione del range termico, del titolo e dello score.

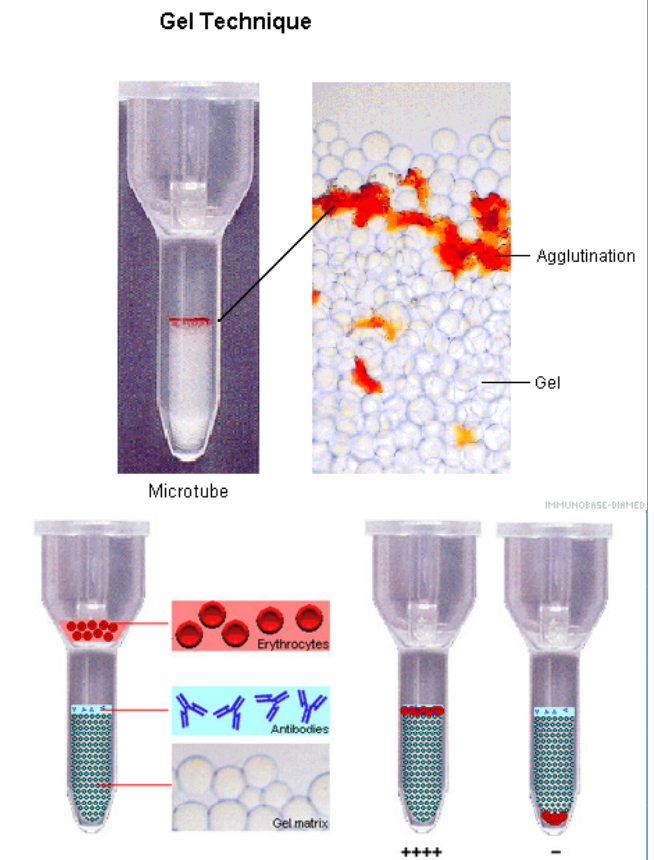
Tecniche con maggior sensibilità

Se il DAT in provetta risulta negativo si passa all'utilizzo di tecniche maggiormente sensibili:

DAT in fase solida



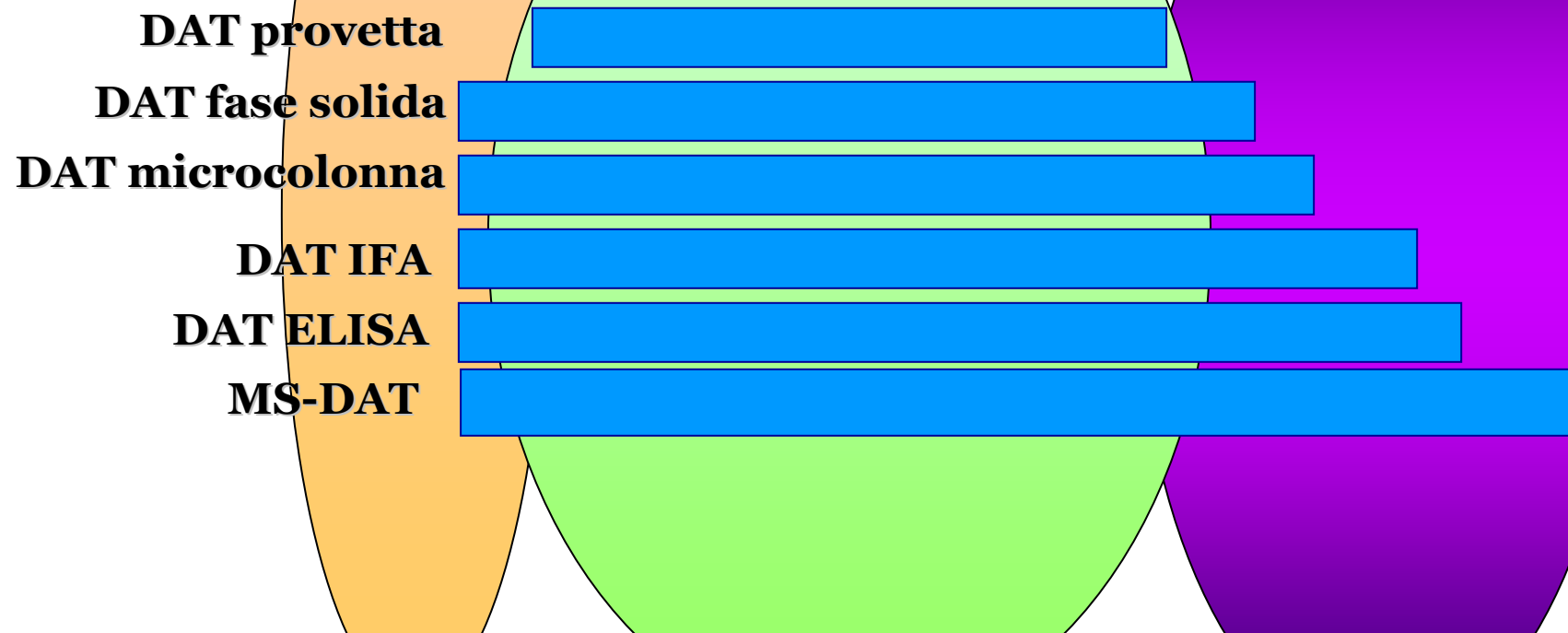
DAT in microcolonna



Falsi positivi

AEA DAT+

AEA DAT-



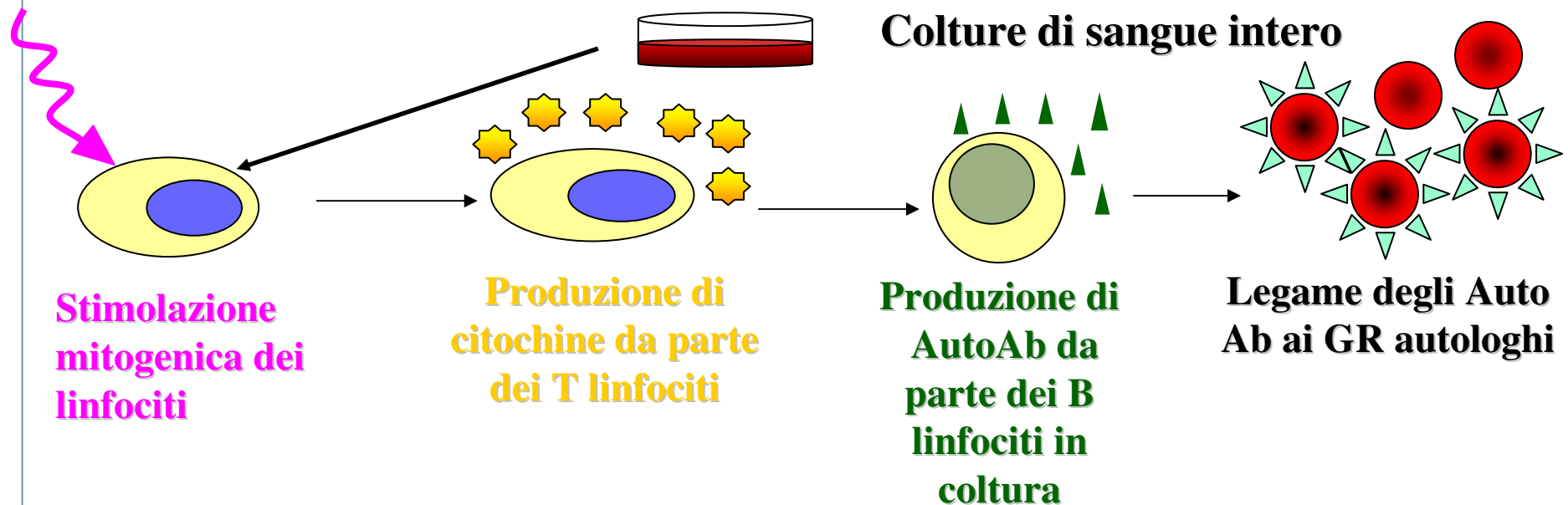
“Nessun test è ottimale; utilizzare una batteria di tests sembra essere l’approccio migliore per diagnosticare le AEA DAT-negative.”

Garratty & Arndt, Transfusion, 35, 157-178, 1995

Mitogen-stimulated DAT (MS-DAT)

La stimolazione in coltura

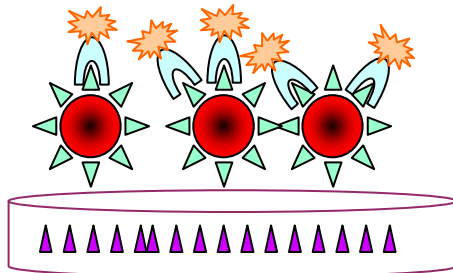
Il sangue del paziente viene piastrato con stimoli, chiamati mitogeni, in grado di far aumentare la produzione di autoanticorpi in 48 ore



Mitogen-stimulated DAT (MS-DAT)

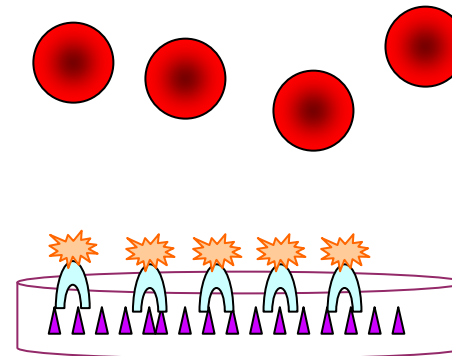
La rilevazione colorimetrica in ELISA

Dopo 48 ore le colture di sangue del paziente vengono processate con un test ELISA competitivo per la determinazione di Abs anti-GR



reazione colorimetrica negativa

Nel caso di GR ricoperti di anticorpi, non si sviluppa o si sviluppa in misura minore la colorazione; si ha una competizione che non fa legare gli anticorpi alla piastra



reazione colorimetrica positiva

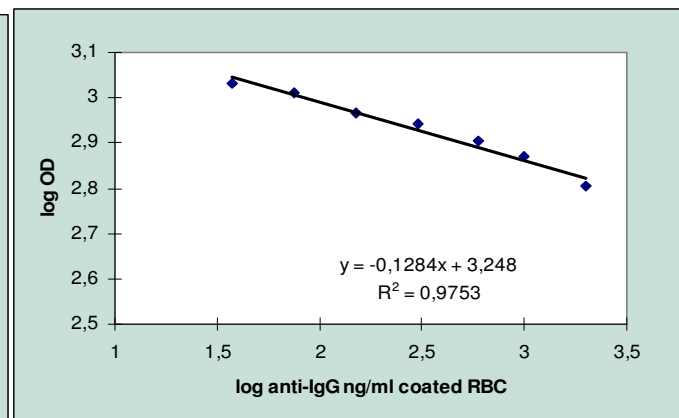
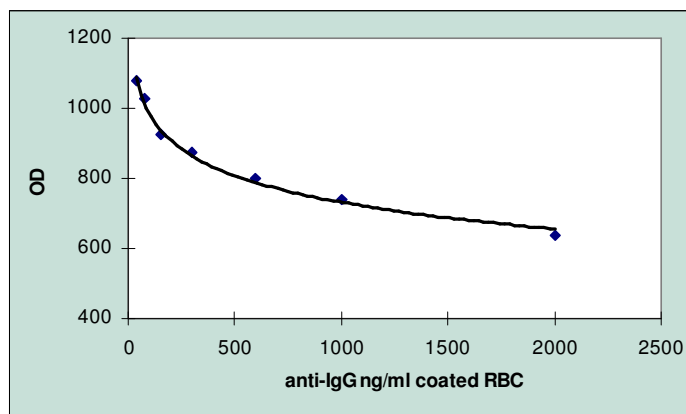
Nel caso di GR privi di anticorpi, l'anticorpo marcato è libero di legarsi alle IgG legate alla piastra sviluppando una intensa colorazione

Mitogen-stimulated DAT (MS-DAT)

La quantificazione degli autoanticorpi

La reazione colorimetrica genera densità ottiche (DO) quantificabili e trasformabili in concentrazione (ng/ml) di anticorpi anti-GR presenti nella coltura del paziente.

ng/ml	OD mean	OD 1	OD 2	OD 3	ng/ml log	OD log
16000	636	648	632	629	3,301030	2,803685
8000	739	721	746	750	3,000000	2,868644
4000	800	795	801	805	2,778151	2,903271
2000	876	845	850	933	2,477121	2,942504
1000	927	932	948	901	2,176091	2,967080
500	1027	1065	1056	961	1,875061	3,0117114
250	1077	1062	1069	1100	1,574031	3,032216
0	1089	1098	1120	1050		



POSSIBILI UTILIZZI DI MS-DAT

MS-DAT è in grado di rivelare un'autoimmunità latente sia a livello periferico che midollare. Può essere utile per lo studio di:

- Anemie emolitiche DAT-negative
- AEA in remissione e nel monitoraggio clinico routinario delle AEA
- Follow-up di AEA in trial clinici con terapie innovative (Protocollo Low dose Rituximab)
- Patologie con possibile presenza di autoimmunità anti-GR latente (LLC, SMD, AA)
- Autoimmunità a livello midollare in pazienti affetti da AEA DAT e MS-DAT negative su sangue periferico