

DIAGNOSTIKA PŘI PODEZŘENÍ NA IMUNITNĚ ZPROSTŘEDKOVANOU HEMOLYTICKOU ANÉMII (IMHA)



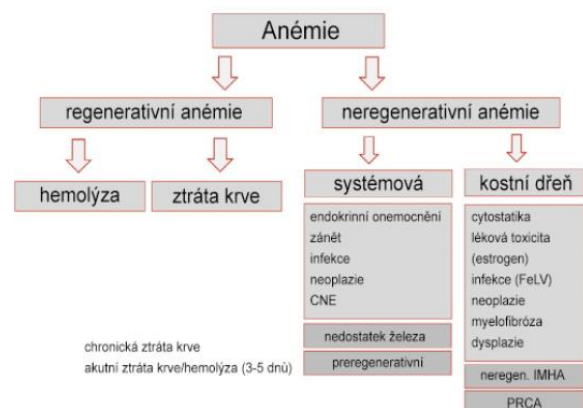
Kokršpaněle patří k predisponovaným plemenům s onemocněním IMHA.

Zdroj: Envato Elements

Kdy máme mít podezření na hemolýzu?

Hemolýzu předpokládáme po vyloučení krvácení především u regenerativních anémií (obrázek 1).

Hemolytické anémie jsou v mnoha případech těžké. Často jsou silněji regenerativní než anémie ze ztráty krve. Při hemolýze dochází k destrukci erytrocytů. Vedle primárních IMHA (nazývané jako neasociované) se vyskytují i diverzní sekundární příčiny hemolýzy (obrázek 2).



Obrázek 1: schematický algoritmus anémie. **POZOR: příliš raná/časná anémie ještě nemůže být regenerativní nebo pouze minimálně (kostní dřeň potřebuje několik dní, aby mohla na hemolýzu reagovat). Navíc existují neregativní formy IMHA (tvorba protilátek proti prekurzorům erytrocytů).**

Autorka: Dr. Jennifer von Luckner

Příznaky hemolýzy	
Imunitně zprostředkovaná	1. Primární (neasociovaná) 2. Sekundární (asociovaná) - infekce - léky - neoplazie 3. Alloimunní - krevní transfuze - neonatální (kočka)
Infekce	→ babezie → hemotropní mykoplazmata
Poškození membrány	→ toxiny/léky → hypofosfatémie → vrozené defekty

Obrázek 2: možné příčiny hemolýzy
 Autorka: Dr. Jennifer von Luckner

Jaká vyšetření by měla proběhnout?

Vhodný materiál pro odběr vzorků při podezření na onemocnění IMHA najdete v tabulce na obrázku č.3.

Materiál pro diagnostiku IMHA	
1 ml EDTA-krev (čerstvá)	Coombsův test, krevní obraz, PCR
2-3 nátěry	cytomorfologie
1 ml séra	biochemie
(moč)	(bilirubinurie)

Obrázek 3: materiál pro odběr vzorků při podezření na onemocnění IMHA

Krevní obraz/cytomorfologie (krevní nátěr):

Toto vyšetření nám podává informace o regeneraci a je smysluplné pro získání přehledu o potencionálně přítomných infekčních původcích. Morfologie erytrocytů je také důležitá kvůli poznatkům o příčině anémie. Počet retikulocytů je u Laboklinu součástí každého krevního obrazu u psa a kočky. Vyšetření krevního obrazu by mělo být provedeno co nejrychleji po odběru krve,

protože erytrocyty psů s IMHA jsou více fragilní.

Biochemie

Pro stanovení příčiny anémie a diferenciaci mezi hemolýzou a krvácením může pomoci stanovení hladiny bilirubinu a celkové bílkoviny ze séra.

Vyšetření moči

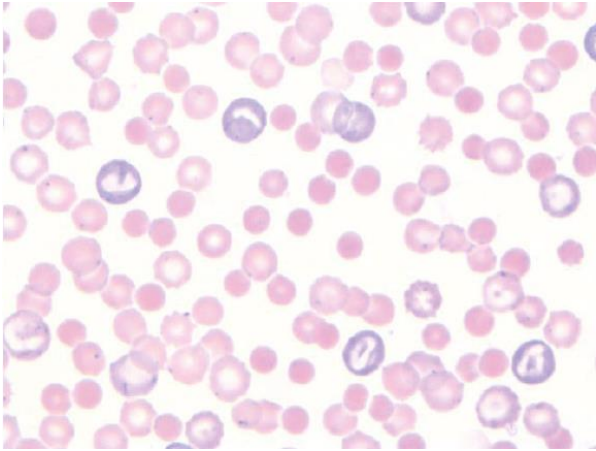
V některých případech se při hemolýze vyskytuje bilirubinurie nebo hemoglobinurie. Každopádně je důležité vědět, že psi (především feny) mohou mít fyziologicky mírnou bilirubinurii.

Infekční původci

Pro průkaz možných infekčních původců, např. babezií a hemotropních mykoplazmat u akutních hemolýz, je vhodným vyšetřením molekulárně biologické vyšetření (PCR). Mimo jiné by se měly vyloučit původci jako Ehrlichie a Anaplasma. U Ehrlichii je navíc doporučitelné vyšetření protilátek.

Laboratorní diagnostika k průkazu imunitně zprostředkovaného onemocnění

Sférocyty: přítomnost tzv. sférocytů v krevním nátěru (obrázek 4) je důležitým příznakem imunitně zprostředkované destrukce erytrocytů. Vhodným materiálem pro toto vyšetření jsou **2-3 v praxi zhotovené krevní nátěry.**



Obrázek 4: krevní nátěr od psa s IMHA se sférocyty, anizocytózou a polychromazií

Autoaglutinace

První příznak autoaglutinace je možné pozorovat již ve zkumavce s odebranou krví. Dále provádíme test na podložním sklíčku a Coombsův test.

Coombsův test je vhodný k průkazu autoprotilátek na povrchu erytrocytů. Vhodným materiálem pro toto vyšetření je **čerstvá EDTA krev**. Je-li krev chlazená, může být vyšetření provedeno až 5 dnů od odběru.

ČASTO KLADENÉ OTÁZKY A ODPOVĚDI KE COOMBSOVU TESTU

Jak funguje Coombsův test?

Coombsův test, nazývaný také DAT (přímý antiblobulinový test), detekuje protilátky na povrchu červených krvinek (obrázek 5). K indukci viditelné aglutinace používáme druhově specifický antiglobulin proti IgG a/nebo IgM a/nebo C3. Vzorky krve, které nevykazují aglutinaci, jsou posuzovány jako

negativní. Aktuálně jsou k dispozici různé metody testování, jako např. gelové testy, proužkové testy, průtoková cytometrie, stejně jako známý test na mikrotitračních destičkách. Všechny zmiňované testy mohou být použity k diagnostice IMHA u psa, některé z nich jsou použitelné také u koček a koní.



Obrázek 5: Aglutinace erytrocytů s autoprotilátkami na jejich povrchu vyvolaná Coombsovým činidlem (zobrazeno fialově).

Autorka: Dr. Nadine Idalan

Jak funguje test na mikrotitračních destičkách?

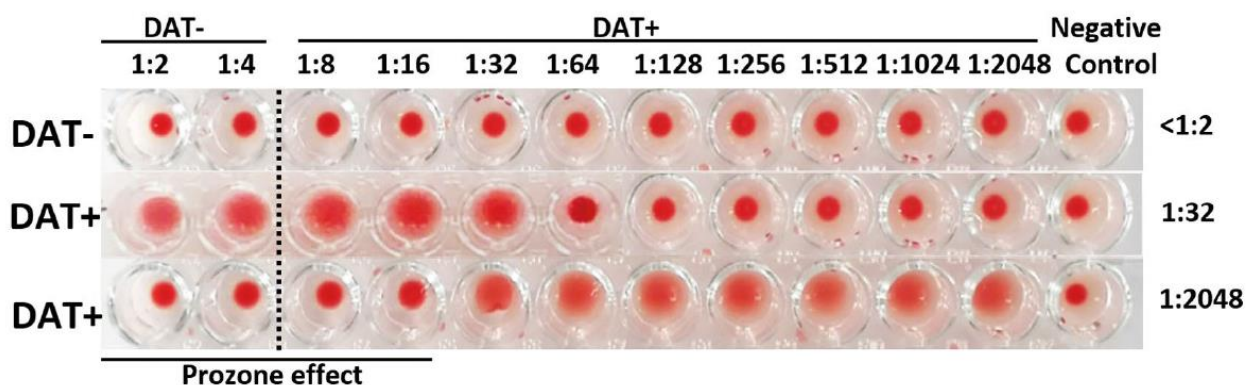
Ve veterinární medicíně se tato metoda používá nejčastěji. Antiglobulin (Coombsovo reagens) je stupňovitě ředěn (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, atd.), poté se k antiglobulinu přidají promyté erythrocyty a celek je inkubován minimálně 30 minut. Nedojde-li k reakci, sedimentují erythrocyty na dno jamky a jsou na konci inkubace viditelné jako malé červené knoflíky na dně jamky. Výsledek pro tuto jamku je negativní. Pokud dojde k navázání antiglobulinu na erythrocyty, nemohou tyto sedimentovat a jsou rozptýlené po celé jamce. Pokud jsou pozitivní pouze o první dvě jamky (1:2 a 1:4), je test stále posuzován jako negativní, protože takto nízké titry mohou vykazovat nespecifické reakce vzorku s dodaným antiglobulinem. Titry od 1:8 se hodnotí jako pozitivní. V případě onemocnění IMHA nejsou vzácné i titry 1:1024.

Co znamená tzv. prozónový efekt?

Prozónový efekt (obrázek 6), je fenomén, který pozorujeme především u vysoce pozitivních vzorků. Vysoké koncentrace antierytrocytárních protilátek inhibují pozitivní reakci. Tento příklad je viditelný na obrázku 6 v posledním řádku.

Můj vzorek autoaglutinuje. Může být i přesto vyšetřen?

Každému Coombsovu testu předchází promytí erytrocytů. Proto je i přes autoaglutinaci u většiny vzorků možné provést Coombsův test. Vzácná výjimka: při perzistující autoaglutinaci i přes promytí erytrocytů není možné vyhodnotit Coombsův test.



Obrázek 6: 3 Coombsovy testy na mikrotitrační destičce. Titry odečítáme zleva (nízké titry) doprava (vysoké titry až k 1:2048). Poslední sloupec obsahuje pouze roztok NaCl a krevních buněk, ale bez reagií a je používán jako negativní kontrola. Titry, které jsou menší než 1:8, jsou posuzovány jako negativní. V prvním řádku se nachází negativní vzorek (DAT-), ve druhém řádku pozitivní vzorek s titrem 1:32 (DAT+). V posledním řádku jsou titry od 1:2 do 1:16 negativní (prozónový efekt), přesto je vzorek vysoce pozitivní (1:2048). Autorka: Dr. Nadine Idalan a kol.

Ve vzorku EDTA krve je sraženina. Může být i přesto proveden Coombsův test?

Bohužel není možné provést Coombsův test ze sraženého vzorku, protože pro korektní výsledek musí být erytrocyty intaktní. Krevní sraženina je ireversibilní. K zabránění vzniku sraženiny by měl být vzorek ihned po odběru několikrát ve vodorovné poloze promíchán.

Prosím rozlišujte mezi krevní sraženinou a aglutinací. Krevní sraženina je výsledkem fyziologické koagulace a vzniká, pokud nedojde ke správnému promísení krve s EDTA. Aglutinace (obrázek 7) může mít různé příčiny a je ve většině případů reverzibilní, např. když zahřejeme vzorek krve v ruce nebo po promytí erytrocytů.

Můj vzorek autoaglutinuje. Je i přesto nutné provést Coombsův test nebo stačí autoaglutinace k potvrzení IMHA?

Důležité je rozlišit mezi perzistentní autoaglutinací po promytí erytrocytů a autoaglutinací před promytím erytrocytů. Aglutinace před promytím erytrocytů není v mnoha případech diagnostická. Perzistující autoaglutinace po promytí erytrocytů znamená vážné podezření na onemocnění IMHA. Pokud se tato vyskytne, najdete o ní záznam v laboratorním nálezu.



Obrázek 7: autoaglutinace krve ve zkumavce s EDTA, před promytím erytrocytů

Již jsem započal/a imunosupresivní léčbu. Má ještě smysl provádět Coombsův test?

Coombsův test může po ošetření imunosupresivy přetrvávat pozitivní i týdny. Negativní výsledek přesto onemocnění IMHA nevyklučuje.

Již jsem provedl/a vyšetření krevního nátěru pod mikroskopem a našel/la sférocyty. Musím i přesto provést Coombsův test nebo mohu rovnou stanovit diagnózu IMHA?

Sférocyty se občas vyskytují i u zdravý psů v omezeném počtu a mohou se vyskytovat

i u jiných onemocnění (intoxikace zinkem, otravy, ...). Pokud se však vyskytuje více než 5 sférocytů na zorné pole při 100násobném zvětšení, je IMHA velice pravděpodobná. Hereditární sférocytóza je sice velmi vzácná, ale je to důležitá diferenciální diagnóza. U koček pozor na fyziologický výskyt kulatých erytrocytů bez centrálního projasnění. Posuzování nátěru na přítomnost sférocytů není proto u koček spolehlivé.

Již jsem obdržel/a výsledek Coombsova testu mého pacienta. Titr je vysoký. Co to znamená?

Vysoké, stejně jako nízké titry znamenají to samé: erytrocyty nesou na svém povrchu autoprotilátky. Ani v humánní ani ve veterinární medicíně zatím neexistují důkazy, že by vysoké titry poukazovaly na silnější anémii nebo hemolýzu nebo že prognóza odvisí od výše titru.

Dr. Nadine Idalan, Dr. Maria Brockmann

Doporučená literatura

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.