

## Diagnostika pri podozrení na imunitne sprostredkovanú hemolytickú anémiu

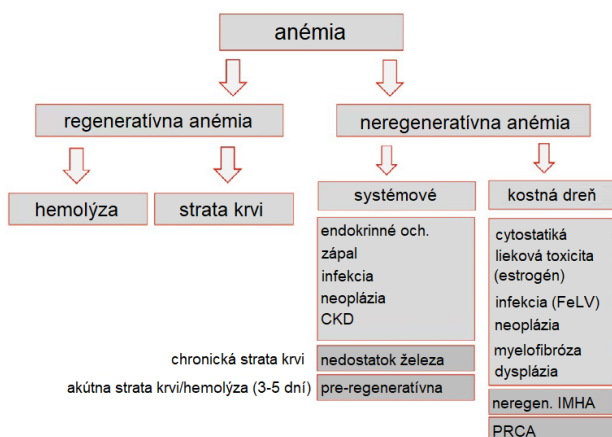


Kokeršpaniele patria k predisponovaným plemenám pre IMHA

Zdroj obrázka: Envato Elements

### Kedy vzniká podozrenie na hemolýzu?

Na hemolýzu máme podozrenie obzvlášť pri regeneratívnych anémiách, keď sme vylúčili stratu krvi (obr. 1).



**Obr. 1:** Schematické spracovanie anémie. POZOR: Veľmi skorá hemolýza môže byť ešte neregeneratívna alebo málo regeneratívna (kostná dreň potrebuje niekoľko dní na reakciu). Okrem toho existujú neregeneratívne formy IMHA (tvorba protilátok proti prekursorom erytrocytov).

Zdroj obrázka: Dr. Jennifer von Luckner

Hemolytické anémie sú v mnohých prípadoch závažné. Často je regenerácia vyššia ako u anémií zo straty krvi. Pri hemolýze dochádza k deštrukcii erytrocytov. Popri primárnych IMHA (označovaných ako neasociovaných) prichádzajú do úvahy rôzne sekundárne príčiny hemolýzy (obr.2).



**Obr. 2:** Možné príčiny hemolýzy

Zdroj obrázka: Dr. Jennifer von Luckner

Materiál pre diagnostiku IMHA	
1 ml EDTA krvi (čerstvej)	Coombsov test + krvný obraz + PCR
2 – 3 krvné nátery	cytomorfológia
1 ml séra	klinická biochémia
(moč)	(bilirubinúria)

Obr. 3: Materiál vzoriek na vyšetrenia pri podozrení na IMHA  
Zdroj: Laboklin

### Ktoré vyšetrenia by mali nasledovať?

Vhodný materiál vzoriek na vyšetrenia pri podozrení na IMHA nájdete na obr. 3.

### Krvný obraz / cytológia krvného náteru:

Poskytnú nám informácie o regenerácii a sú užitočné na získanie počiatočného prehľadu o prípadných infekčných pôvodcoch. Morfológia erytrocytov môže tiež poskytnúť dôležité informácie o príčine anémie. V Labokline je počet retikulocytov zahrnutý v každom krvnom obraze psov a mačiek. Vyšetrenie krvného obrazu by sa malo uskutočniť čo najskôr po odobratí vzorky EDTA krvi, pretože erytrocyty psov s IMHA vykazujú zvýšenú fragilitu.

**Biochémia krvi:** Meranie bilirubínu a celkových bielkovín sa robí zo séra a môže pomôcť pri diferenciácii medzi hemolýzou a krvácaním.

**Vyšetrenie moču:** Pri hemolýze pozorujeme v niektorých prípadoch aj bilirubinúriu alebo hemoglobinúriu. Je však dôležité vedieť, že psy, najmä samce, môžu vykazovať slabú bilirubinúriu aj fyziologicky.

**Infekční pôvodcovia:** Na dôkaz možných infekčných pôvodcov, ako babézií a hemotrónnych mykoplaziem, je pri akútnej hemolýze vhodné predovšetkým molekulárne biologické vyšetrenie (PCR). Okrem toho je vhodné vylúčiť aj patogény ako ehrlichie a anaplazmy. U ehrlichii je zmysluplné aj stanovenie protilátok.

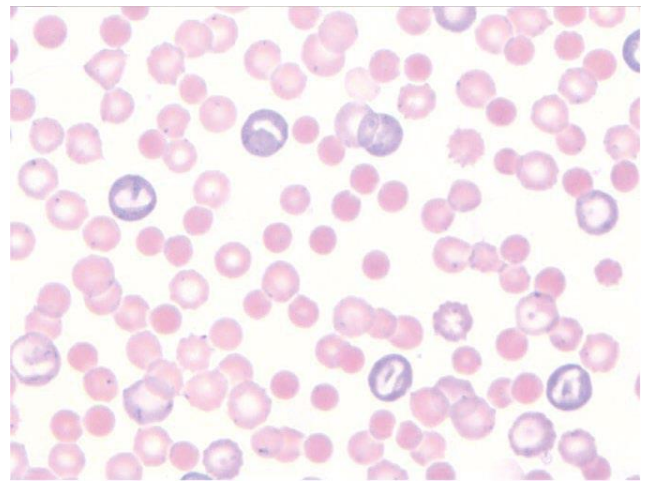
### Vyšetrenie na dôkaz imunitne sprostredkovaného procesu

**Sférocyty:** Prítomnosť tzv. sférocytov (obr. 4) v krvnom nátere môže poskytnúť cennú informáciu o imunologicky indukovanej deštrukcii erytrocytov. Materiálom potrebným na vyšetrenie

sú dva až tri krvné nátery zhotovené priamo v praxi.

**Autoaglutinácia:** Prvý znak autoaglutinácie možno nájsť už pri pohľade na vzorku v skúmavke. Potom nasleduje test na sklíčku a Coombsov test.

**Coombsov test:** Je vhodný na detekciu prítomnosti autoprotilátok na povrchu erytrocytov. Materiál vzorky: **čerstvá EDTA krv**. Ak je vzorka nepretržite chladená, test je možné vyhodnotiť do 5 dní po odbere vzorky.



Obr. 4: Krvný náter psa s IMHA so sférocytmi, anizocytózou a polychromáziou  
Zdroj: Dr. Nadine Idalan

### Často kladené otázky a odpovede o Coombsovom teste

#### Ako funguje Coombsov test?

Coombsov test, nazývaný aj DAT (priamy antiglobulínový test), deteguje protilátky na povrchu červených krviniek (obr. 5). Na vyvolanie viditeľnej aglutinácie sa používa druhovo špecifický antiglobulín proti IgG a/alebo IgM a/alebo C3. Vzorky, ktoré nevykazujú aglutináciu, sú hodnotené ako negatívne. V súčasnosti sú dostupné rôzne metódy testovania, ako napr. gélový test, prietoková cytometria, testovacie prúžky, mikroplatničkový test. Všetky spomínané testy sú na diagnostiku IMHA dobre použiteľné, niektoré z nich sú na trhu dostupné aj pre mačky a kone.



**Ako funguje metóda na mikrotitračných platničkách?**

Vo veterinárnej medicíne sa metóda s využitím mikrotitračných platničiek používa najčastejšie. Antiglobulín (Coombsova reagensia) sa postupne riedi (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, atď.), pridajú sa premyté erythrocyty a inkubuje sa po dobu minimálne 30 minút. Ak nedôjde k žiadnej reakcii, erythrocyty sedimentujú na dne príslušnej jamky, takže po inkubácii sú viditeľné ako malý červený zhluk na dne: výsledok pre túto jamku je negatívny. Ak antiglobulín naviaže erythrocyty, a tým zabráni ich sedimentácii, erythrocyty sa rozšíria po celej

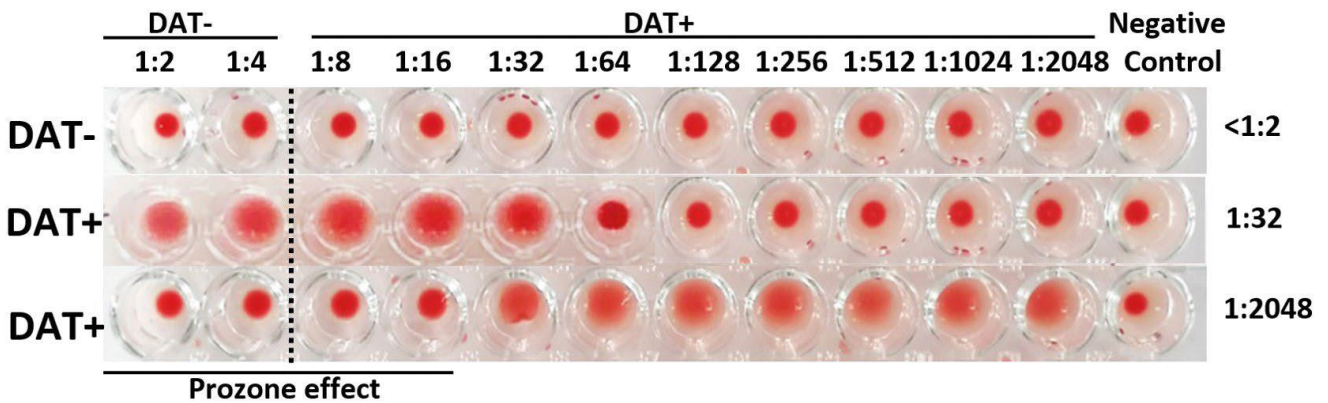
jamke. Ak iba prvé dve jamky (1:2 a 1:4) vykazujú pozitívne reakcie, test je stále hodnotený ako negatívny, pretože tieto nízke titre môžu predstavovať nešpecifické reakcie vzorky s pridaným antiglobulínom. Titre od 1:8 sú hodnotené ako pozitívne. Ak je prítomná IMHA, nie sú nezvyčajné titre až do 1:1024.

**Čo je takzvaný prozónový efekt?**

Prozónový efekt (obr. 6) je jav, ktorý možno pozorovať predovšetkým vo vysoko pozitívnych vzorkách. Vysoké koncentrácie antierythrocytárnych protilátok inhibujú pozitívnu reakciu. Príklad nájdete na nasledujúcom obrázku v poslednom riadku.

**Vo vzorke EDTA je krvná zrazenina: možno ešte vykonať Coombsov test?**

Žiaľ, z koagulovanej vzorky už nie je možné vykonať Coombsov test, pretože pre správny výsledok je nevyhnutná prítomnosť intaktných erythrocytov. Krvná zrazenina je nezvratná.



**Obr. 6:** Tri Coombsove testy na mikrotitračnej platničke. Titre sa odčítajú zľava (nízke titre) doprava (vysoké titre až po 1:2048). Posledný stĺpec obsahuje len zmes roztoku NaCl a krvných buniek bez reagensie, a teda funguje ako negatívna kontrola. Titre menšie ako 1: 8 sú hodnotené ako negatívne. V prvom riadku sa nachádza negatívna vzorka (DAT-), v druhom riadku pozitívna vzorka s titrom 1:32 (DAT+). V poslednom riadku sú titre 1:2 až 1:16 negatívne (prozónový efekt), vzorka je však vysoko pozitívna (1:2048).  
 Zdroj obrázka: Dr. Nadine Idalan et al.

Aby sa predišlo krvným zrazeninám, vzorka by sa mala ihneď po odbere niekoľkokrát jemne zamiešať preklopením skúmavky. Všimnite si, prosím, rozdiel medzi krvnou zrazeninou a aglutináciou: Krvná zrazenina je výsledkom fyziologickej koagulácie a vzniká vtedy, keď vzorka nie je správne zmiešaná s činidlom EDTA. Aglutinácia (obr. 7) môže mať rôzne príčiny a je vo väčšine prípadov reverzibilná, napríklad zahriatím vzorky v ruke alebo premytím erytrocytov.



Obr. 7: Autoaglutinácia v EDTA skúmavke pred premytím  
Zdroj obrázka: Dr. Nadine Idalan

### Moja vzorka vykazuje autoaglutináciu: dá sa ešte testovať?

Pred každým Coombsovým testom sa erytrocyty premývajú. Preto, napriek autoaglutinácii, je možné následne vykonať Coombsov test u väčšiny týchto vzoriek. Zriedkavá výnimka: ak autoaglutinácia pretrváva aj po premytí, výsledok Coombsovho testu sa nedá odčítať.

### Moja vzorka vykazuje autoaglutináciu: je Coombsov test stále potrebný alebo je autoaglutinácia dostatočná na diagnostiku IMHA?

Je dôležité rozlišovať medzi pretrvávajúcou autoaglutináciou **po** premytí červených krviniek a autoaglutináciou pred premytím erytrocytov. Aglutinácia pred premývaním v mnohých prípadoch nie je diagnostická. Avšak pretrvávajúca autoaglutinácia po premytí významne poukazuje na IMHA. Ak k tomu dôjde, nájdete o tom v náleze z vyšetrenia poznámku.

### Už som začal s imunosupresívnou liečbou: má Coombsov test ešte zmysel?

Coombsov test môže zostať pozitívny až 24 týždňov po liečbe imunosupresívnymi liekmi. Negatívny výsledok však nevylučuje IMHA.

### Krvný náter som už vyhodnotil pod mikroskopom a našiel som sférocyty: musím ešte urobiť Coombsov test alebo už môžem stanoviť diagnózu IMHA?

Sférocyty sa niekedy nachádzajú v malom počte aj u zdravých psov a môžu sa vyskytnúť aj pri iných ochoreniach (intoxikácia zinkom, otravy, DIC...). Ak je však viditeľných viac ako päť sférocytov na jedno zorné pole pri 100-násobnom zväčšení, IMHA je pravdepodobná. Dedičná sférocytóza je dôležitá, ale veľmi zriedkavá diferenciálna diagnóza. Upozorňujeme, že mačky majú fyziologicky okrúhle erytrocyty bez centrálneho prejasnenia, takže hodnotenie sférocytov u mačiek je nespoľahlivé.

### Už mám výsledok Coombsovho testu pre môjho pacienta. Titer je vysoký: čo to znamená?

Vysoké aj nízke titry znamenajú to isté: erytrocyty nesú na svojom povrchu autoprotilátky. V súčasnosti neexistuje žiadny dôkaz v humánnej ani veterinárnej medicíne, že vysoké titry poukazujú na závažnú anémiu alebo hemolýzu, alebo že prognóza závisí od hladiny titra. Preto má kvalitatívny Coombsov test, realizovaný v bratislavskom laboratóriu, rovnakú výpovednú hodnotu ako test na mikrotitračnej platničke.

*Dr. Nadine Idalan, Dr. Maria Brockmann*

### Ďalšia literatúra

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.