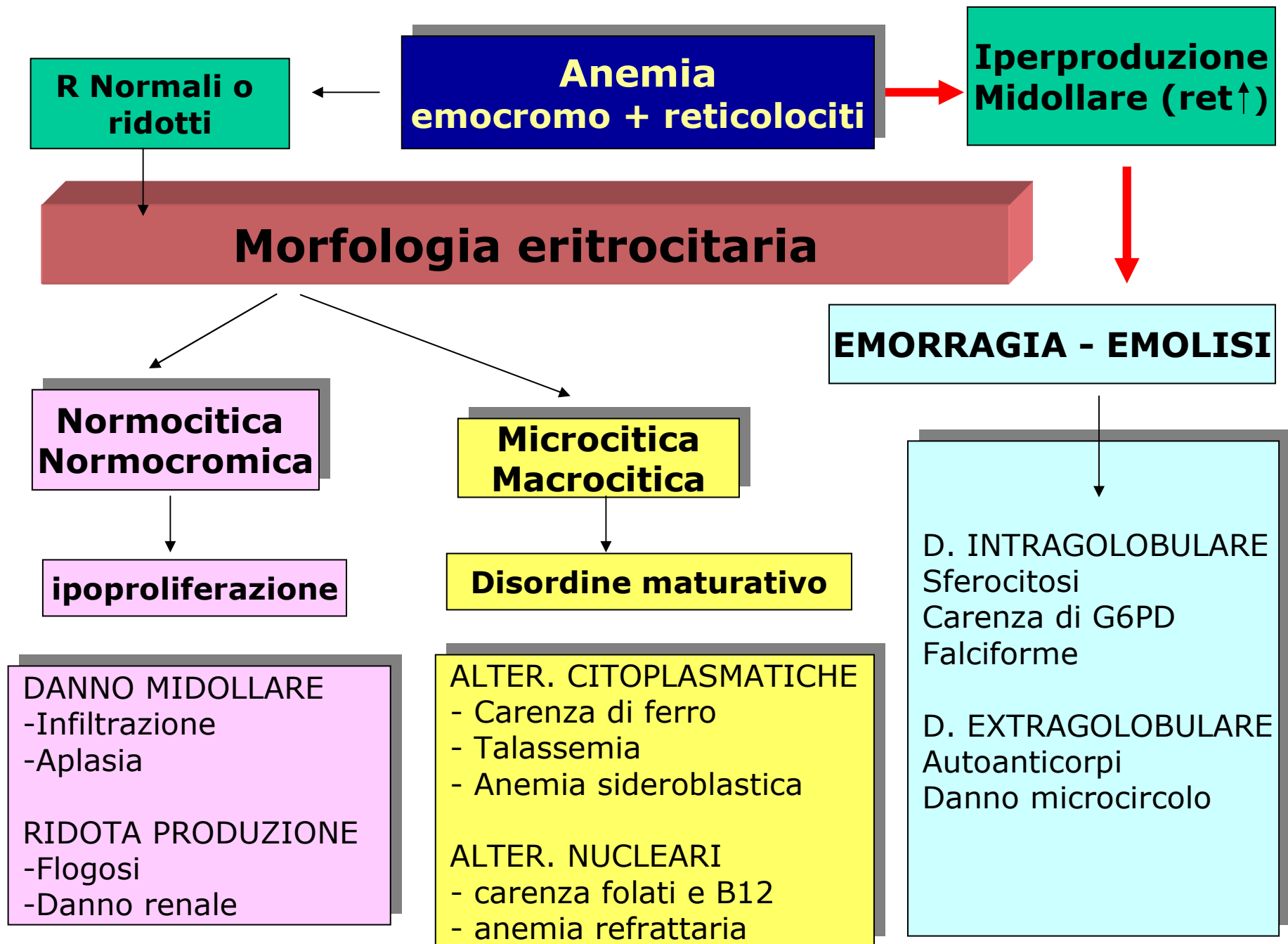


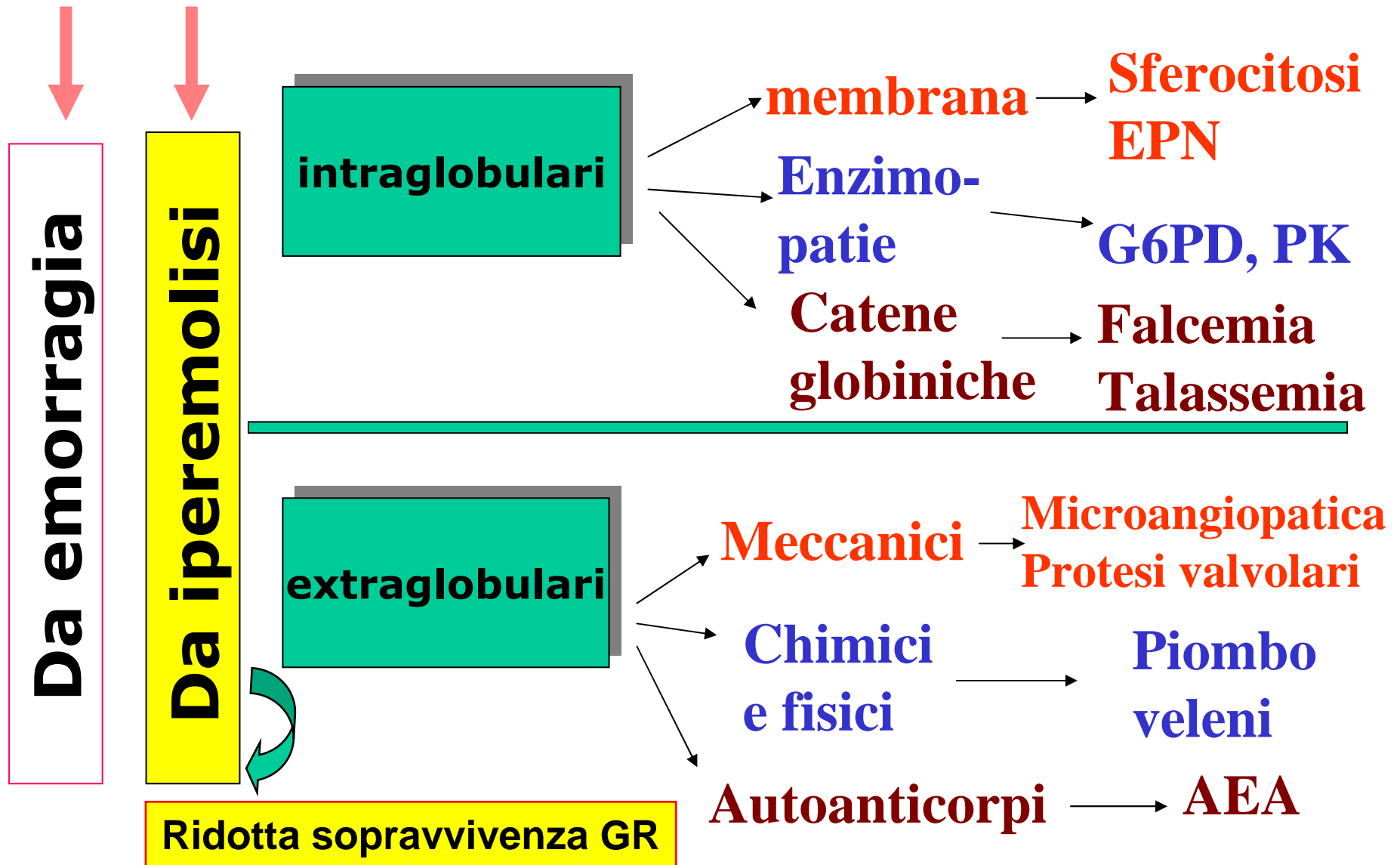
ANEMIE EMOLITICHE



Francesco Lanza
UO di Ematologia e
Centro Trapianti di Cellule
Staminali
Azienda “Istituti
Ospitalieri” Cremona



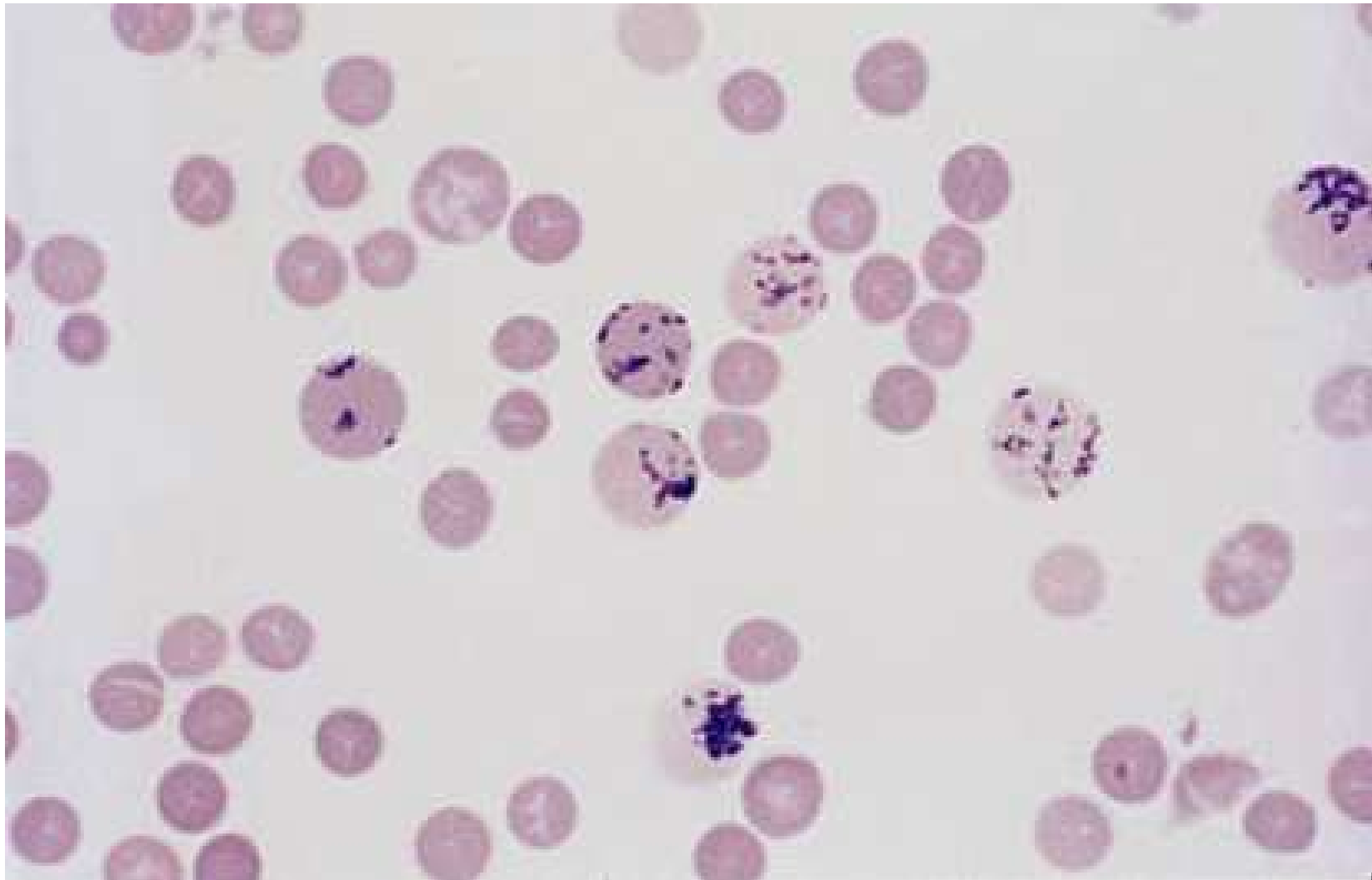
Classificazione anemie su base fisiopatologica e cinetica



ANEMIE EMOLITICHE IMMUNI

- **ANEMIE EMOLITICHE AUTOIMMUNI:**
 - a. **macrocitica ipercromica disomogenea** (MCV, MCH, RDW aumentati), con reticolocitosi
 - Atc caldi (IgG)
 - Atc freddi (IgM)
 - Atc bitermici (lisanti o agglutinanti)

Anemia immunoemolitica: sferociti, macrociti e reticulocitosi. Nelle cellule più grandi si vede materiale reticolare (RNA precipitato). Colorazione con blu di metilene (Controcolorazione con Giemsa)



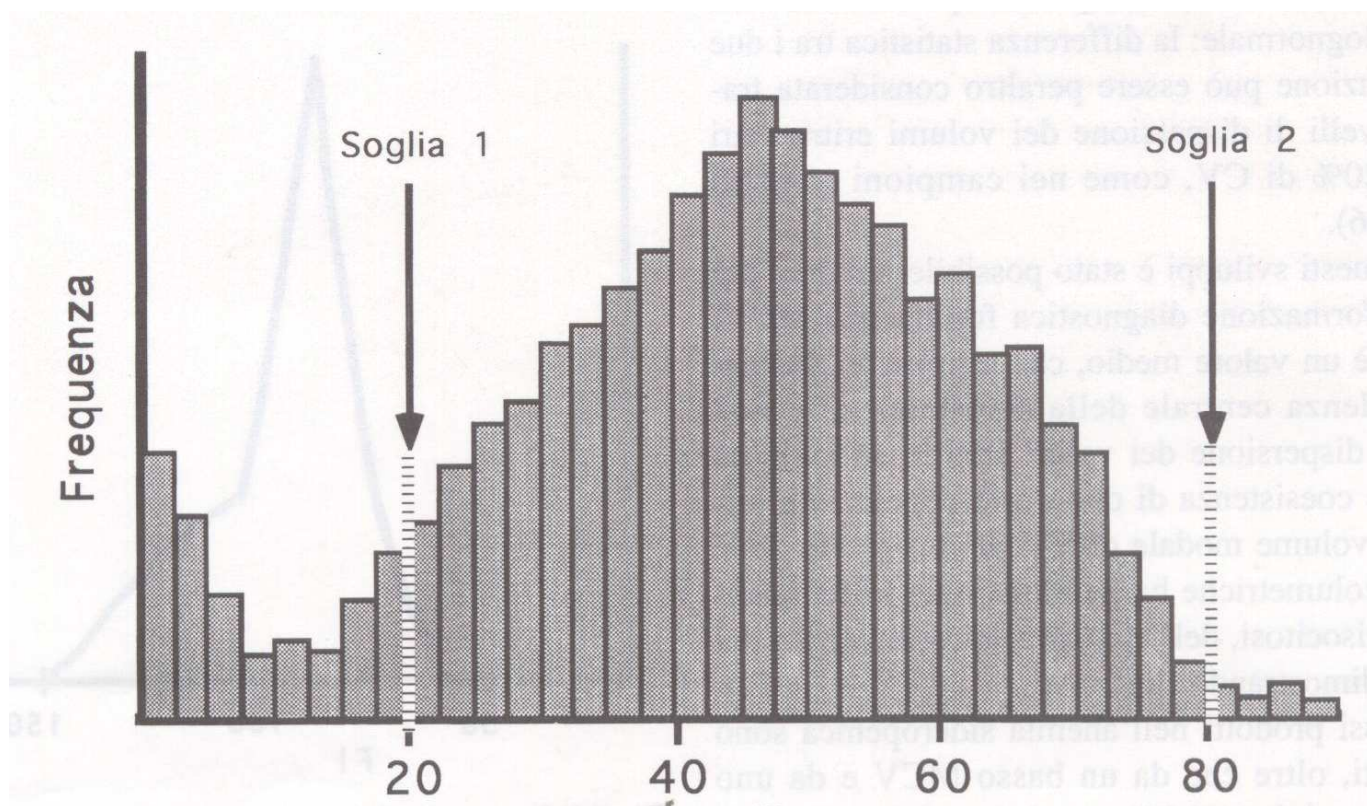
Principali indici eritrocitari

Parametro	Significato	Ruolo
MCV	Volume cellulare medio (misurato direttamente)	Classificazione e diagnosi anemie
RDW	Ampiezza della distribuzione dei diametri eritrocitari	Indice di anisocitosi Differenza tra anemia sideropenica e talassemia
% microciti	GR con diametro inferiore a soglia prestabilita	Diagnosi precoce di ferrocarenza
% macrociti	GR con diametro superiore a soglia prestabilita	Reticolociti, carenza B12,folati
Concentrazione Hb (MCH, MCHC)	Emazie ipocromiche o ipercromiche	Svariate condizioni con modificazione dell'eritropoiesi

Valutazione automatica parametri eritrocitari

Curve di distribuzione volume GR ed indici di dispersione

Red cell distribution width (RDW)



Canali volumetrici

RDW: CV% V dei GR
troncato 20%



DS distribuzione GR
tra 16-84 percentile

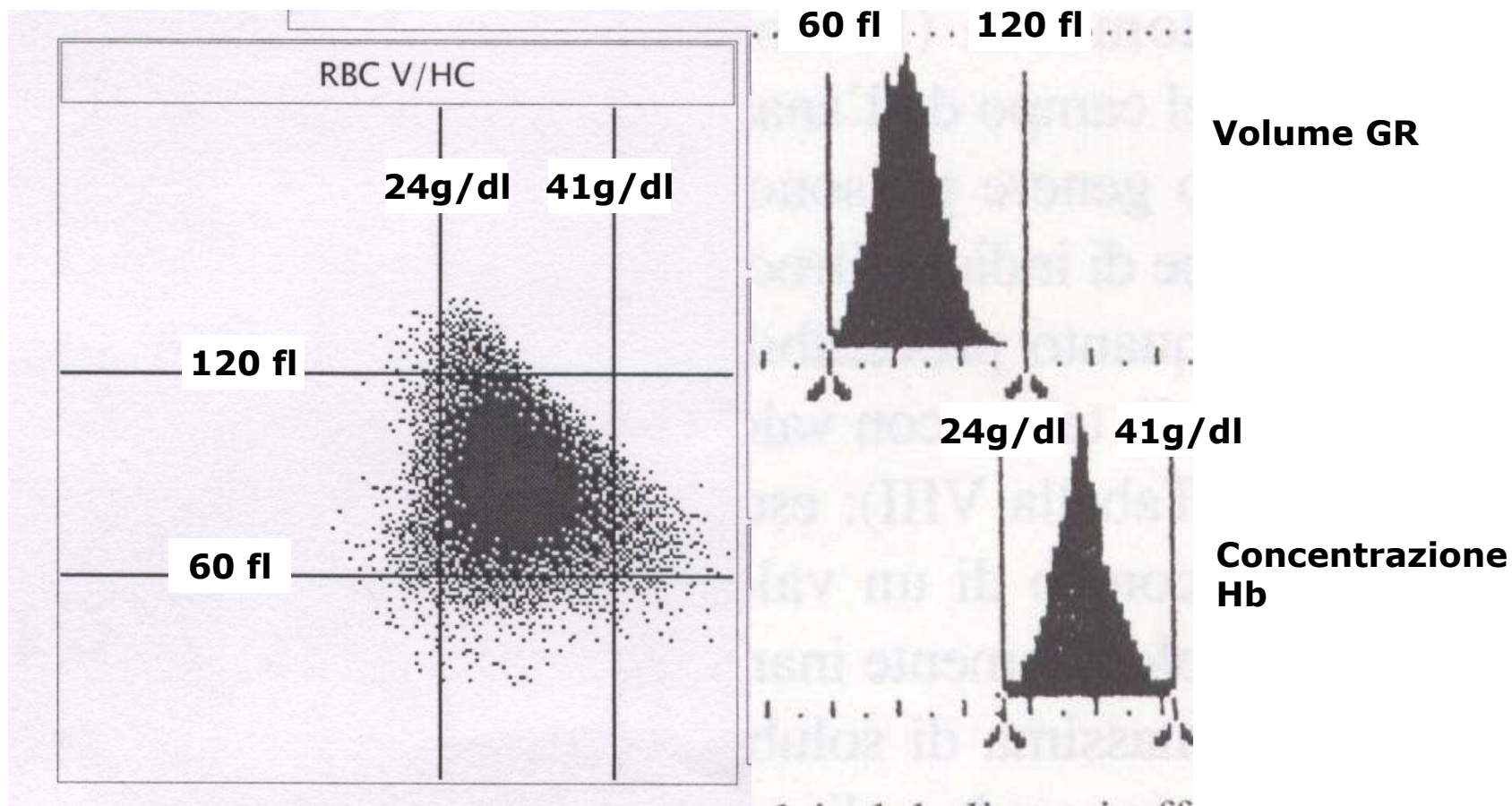
MCV (media) X 100



**Indice di
anisocitosi**

Valutazione automatica parametri eritrocitari

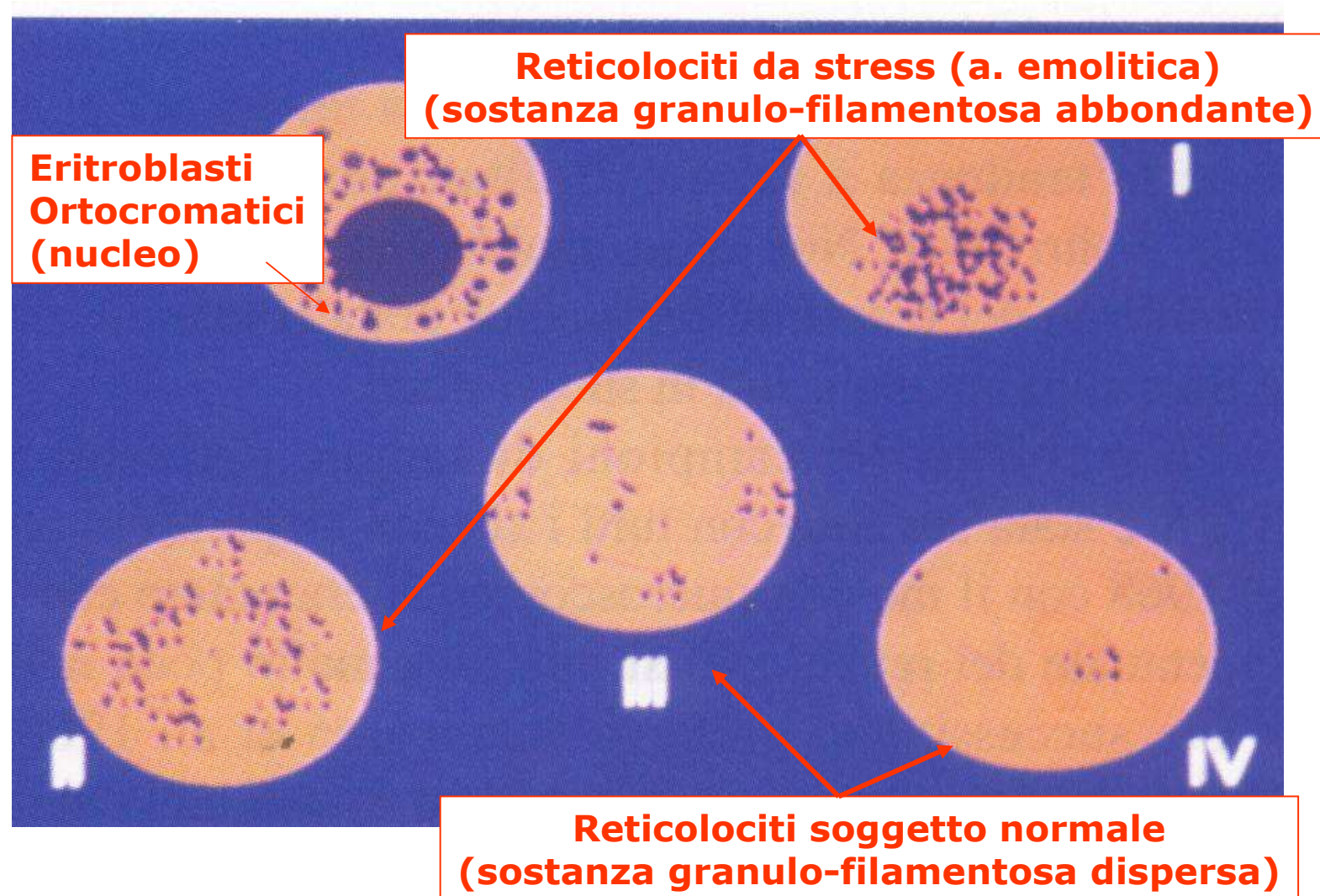
Analisi del volume cellulare e della concentrazione emoglobinica cellulare



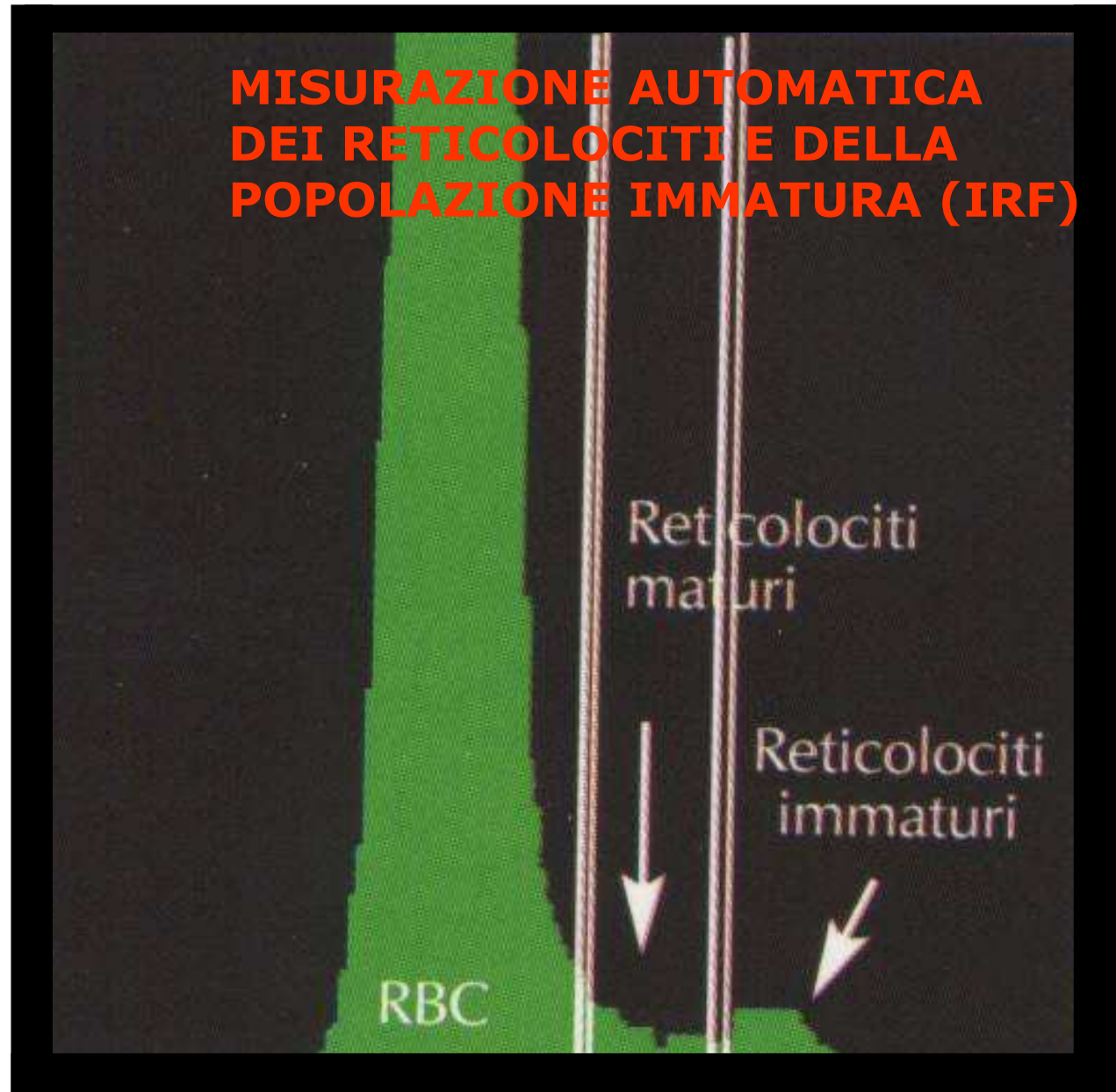
MEAN CELL VOLUME (MCV) cause di aumento spurio

- **Agglutinazione GR da autoanticorpi freddi (o caldi)**
- **Pan-agglutinazione da anticorpi EDTA dipendenti**
- **Iperosmolarità plasmatica (ipernatriemia, iperglicemia)**
- **Agitazione ripetuta di provetta chiusa (effetto da CO₂)**
- **Ostruzione parziale dell'apertura nei sistemi a resistenza**

Diverse classi di reticolociti



**MISURAZIONE AUTOMATICA
DEI RETICOLOCITI E DELLA
POPOLAZIONE IMMATURA (IRF)**

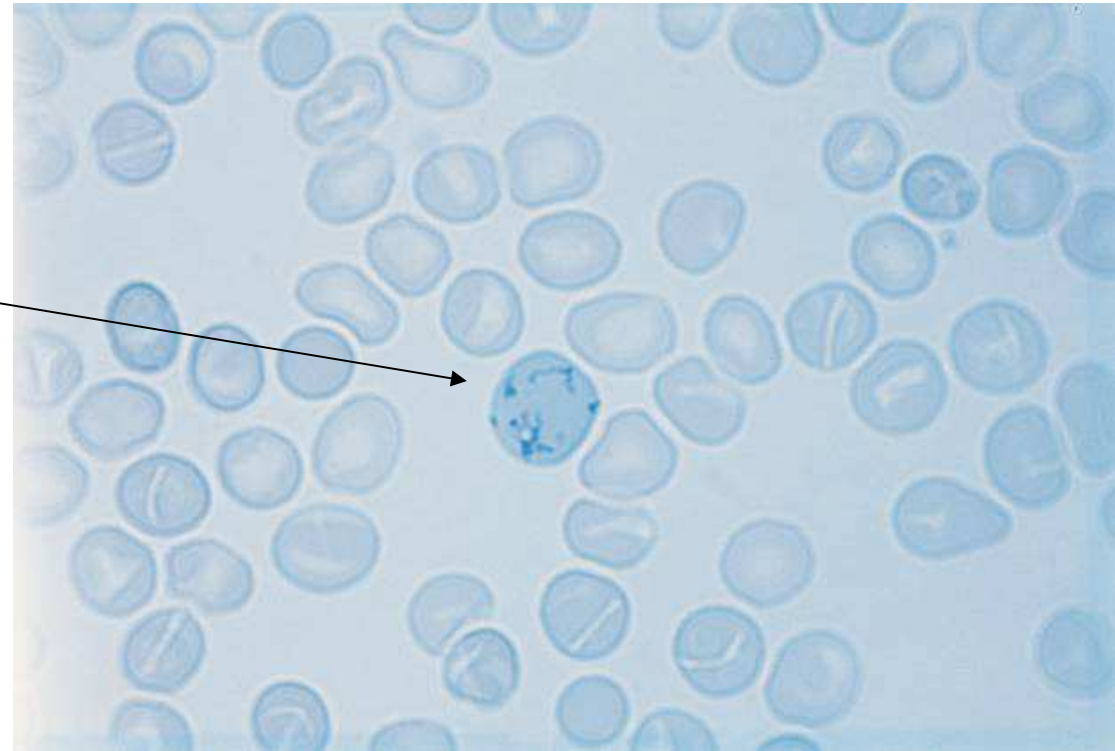


Intensità di fluorescenza

Reticolocito

caratteristiche

- La sostanza granulofilamentosa è Rna
- Le dimensioni sono > dei GR (24%)
- Densità < rispetto GR
- I reticolociti immaturi esprimono TfR

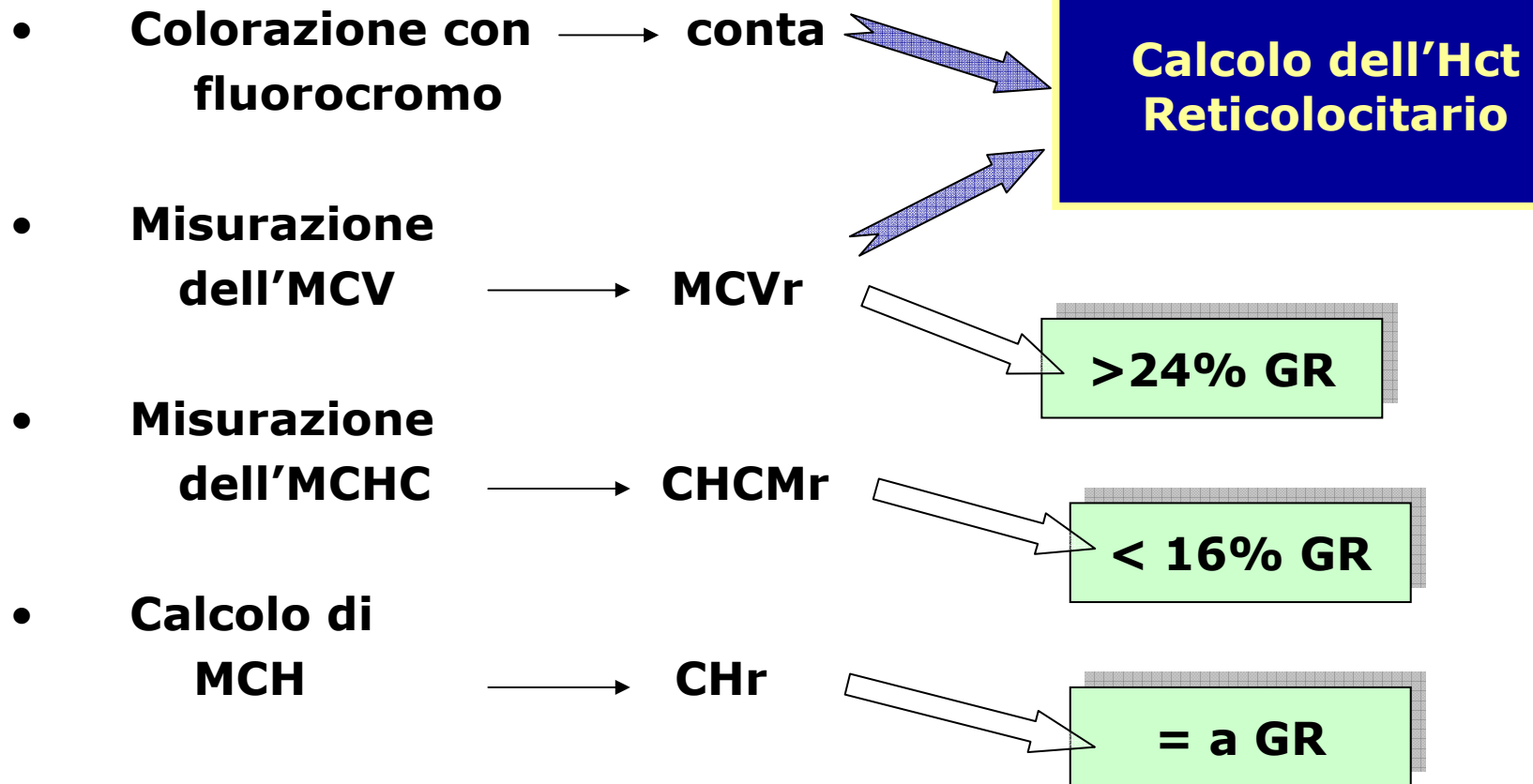


Utilizzo fluorocromi sopravitali per la conta automatica

Aumento 20 x fluorescenza di fondo nei R
Aumento 1,7 X nei GR

Conta in % e valore corretto
Conta assoluta

MISURAZIONE DI MCV ED MCH RETICOLOCITARI



Potenziali cause di interferenza nella conta automatica dei reticolociti

- Linfocitosi
- Piastrinosi

**Invasione settore
di conta**

- Eritroblasti
- Corpi di Howell-Jolly
- Corpi di Heinz
- Basophilic stippling

**DNA che lega
il fluorocromo**

- Porfiria
- Agenti chimici (B12)
- angiografia fundus oculi

Altra fluorescenza

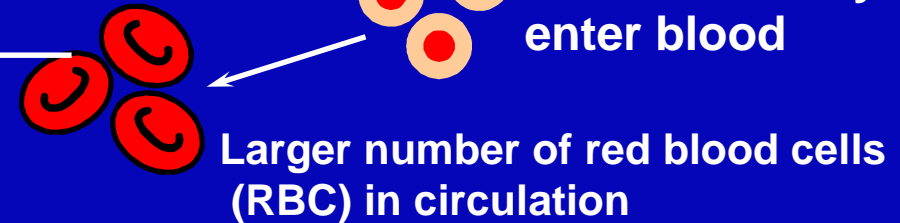
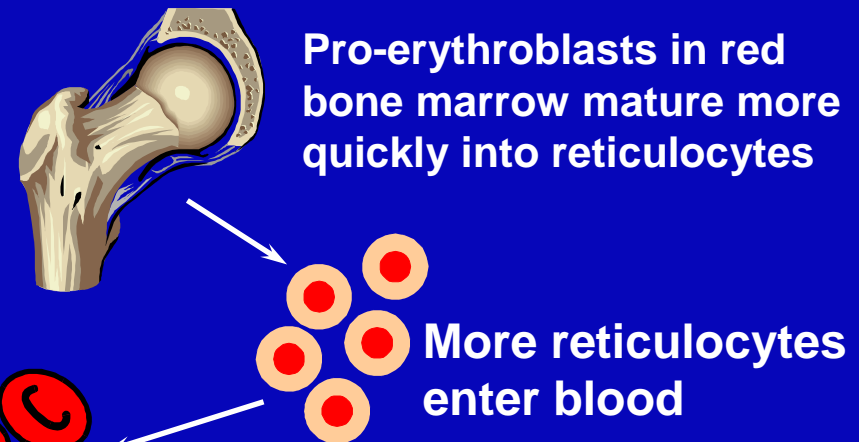
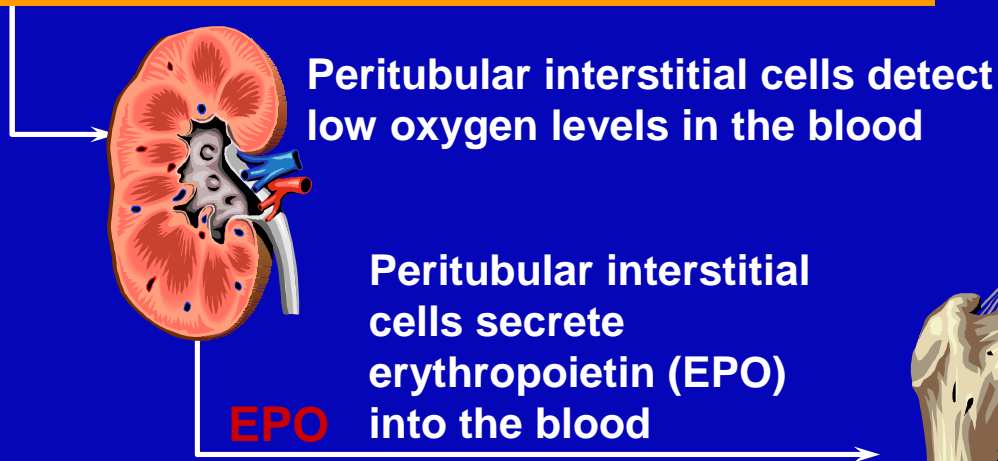
Classificazione dell'anemia (Hb g/dL)

Grado	0	1	2	3	4
WHO	≥ 11	$< 11-9.5$	$< 9.5-8.0$	$< 8.0-6.5$	< 6.5
EORTC	≥ 12	$< 12-10$	$< 10-8.0$	$< 8.0-6.5$	< 6.5



The physiological role of erythropoietin in the healthy adult

Decreased oxygen delivery to the kidneys



Increased oxygen delivery to tissues

Return to homeostasis when response brings oxygen delivery to kidneys back to normal

Emoglobinuria Parossistica Notturna (EPN)

- **Malattia clonale di natura acquisita delle cellule staminali** emopoietiche che provoca:
 1. **Anemia dovuta ad emolisi intravascolare** cronica e acuta;
 2. **Diatesi tromboembolica;**
 3. **Distonia della muscolatura liscia.**

TROMBOSI
VENOSA **ARTERIOSA**
EP/TVP Ictus/TIA
Cerebrale IM
Cutanea
Epatica/Portale
Ischemia addominale

**INSUFFICIENZA
RENALE CRONICA**
Insufficienza renale
Dialisi
Anemia

**DANNO A
CARICO DEGLI
ORGANI INTERNI**
Cervello
Fegato
Tratto
gastrointestinale

**IPERTENSIONE
POLMONARE**
Dispnea
Insufficienza
cardiaca

ANEMIA
Trasfusioni
Emosiderosi

**AFFATICAMENTO
RIDUZIONE DELLA
QUALITÀ DI VITA**
Dolore addominale
Disfagia
Stanchezza
Disfunzione erettile

Epidemiologia

EPN, una malattia orfana molto rara

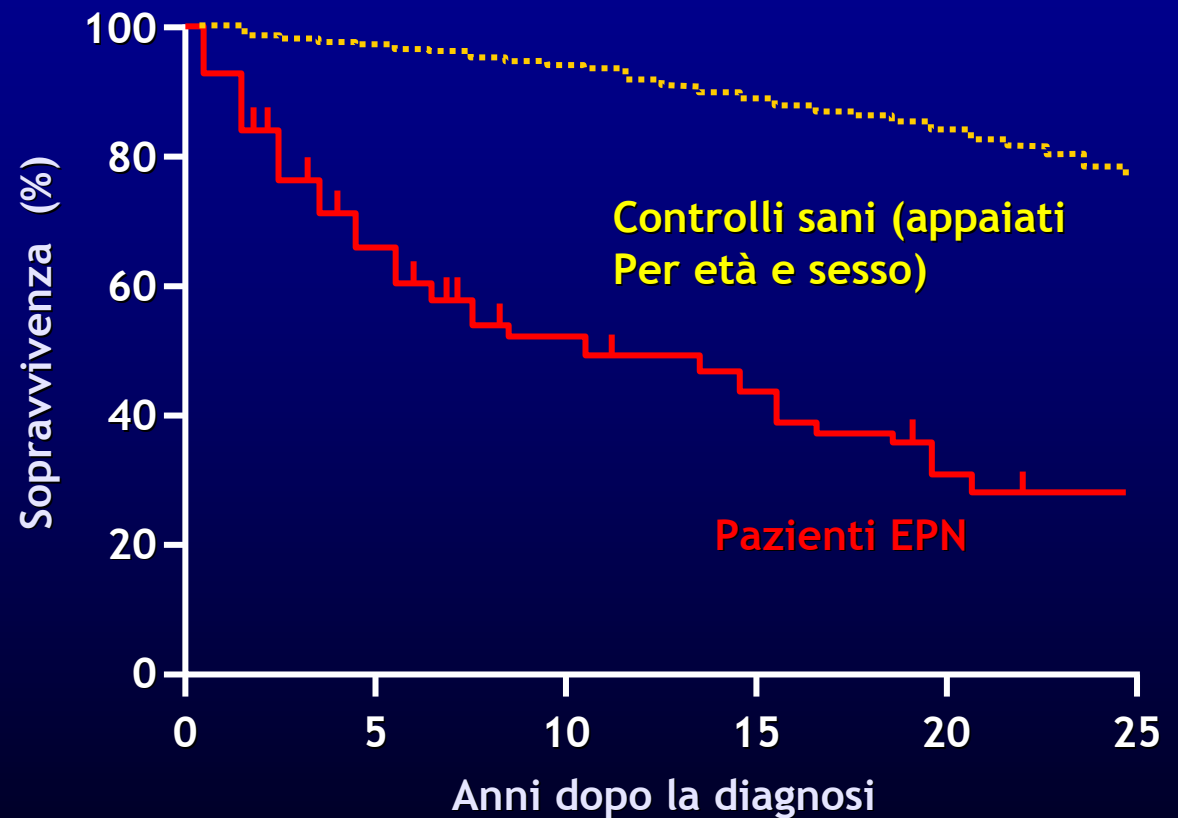
- Prevalenza
 - Primo studio francese → 220 casi / 1950 - 1995 (Lancet, 1996)³, aggiornato nel 2006 → 460 pazienti
 - British registry → 140 pazienti dal 1990
 - Prevalenza → 10/milione (7 - 15,9)
 - **Italia...?** (ad oggi noti circa **200 pazienti**)
- Età
 - media alla diagnosi : 30 anni ^{1,2,3}
- Sopravvivenza
 - media : 10 - 15 anni dopo diagnosi ^{2,4}

¹Moyo, et al. *Br J Haematol.* 2004;126:133-138. ²Socie, et al. *Lancet.* 1996;348:573-577. ³Nishimura, et al. *Medicine.* 2004;83:193-207. ⁴Hillmen, et al. *N Engl J Med.* 1995;333:1253-1258. ⁵Brodsky. Parosysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: Hoffman, R et al., eds. *Hematology - Basic Principles and Practices.* 4th ed. 2005; p. 419-427.

Elevate morbilità e mortalità

- Incidenza: 1-5 nuovi casi per milione/anno
- **Mortalità a 5 anni: 35%**
- Diagnosi a tutte le età, mediana a 30 anni.
- Malattia progressiva
- Impatto sulla qualità della vita

Tempo di sopravvivenza dopo la diagnosi di EPN - confronto con controlli sani



The expected survival of an age- and sex-matched control group is shown for comparison Hillmen et al 1995.

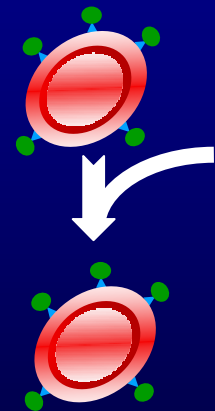
Fisiopatologia

- I globuli rossi EPN mancano delle proteine di membrana di regolazione del complemento.
- Tali proteine (CD55 e CD59), impediscono normalmente l'attivazione del sistema del complemento verso le cellule sane.
- Le cellule EPN ne sono parzialmente (tipo II) o totalmente (tipo III) deficitarie.

Fisiopatologia

L'emolisi nell'EPN

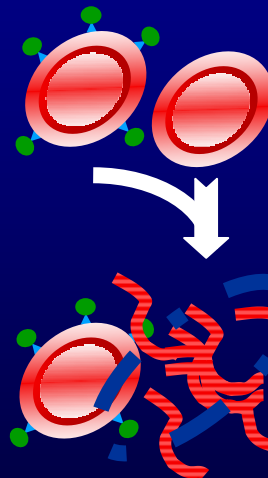
I globuli rossi normali sono protetti dall'attacco del complemento dalle proteine GPI-ancorate CD55 e CD59



GR intatti

Attivazione del complemento

I globuli rossi EPN, non essendo protetti, vengono lisati



Riduzione dei GR
Emoglobinemia

Anemia

Trombosi

Danno Renale

Ipertensione polmonare

Addominalgia

Dispnea

Affaticamento

Disfagia

Emoglobinuria

disfunzione erettile

Impatto sulla mortalità

Impatto sulla morbilità

TROMBOSI

Non c'è relazione tra i sintomi ed il rischio TEV/TA

Trombosi venosa pre-trattamento	Eventi	%
Trombosi venosa profonda	41	33,1%
- Arti inferiori	23	18,5%
- Altre	18	14,5%
Trombosi venosa mesenterica/splenica	23	18,5%
Trombosi portale	21	16,9%
Embolia Polmonare	8	6,5%
Trombosi venosa cerebrale	7	5,6%
Trombosi superficiale	5	4,0%
Trombosi arteriosa pre-trattamento		
Ictus/TIA	17	13,7%
Infarto miocardico / Angina instabile	2	1,6%
Total	124	100%

EPN: rilievi laboratoristici

Anemia, reticolocitosi

Citopenia: neutropenia, trombocitopenia

Aumento del valore serico LDH, <aptoglobina

Emoglobinuria a pousse

“Perpetual Hemosiderinuria”

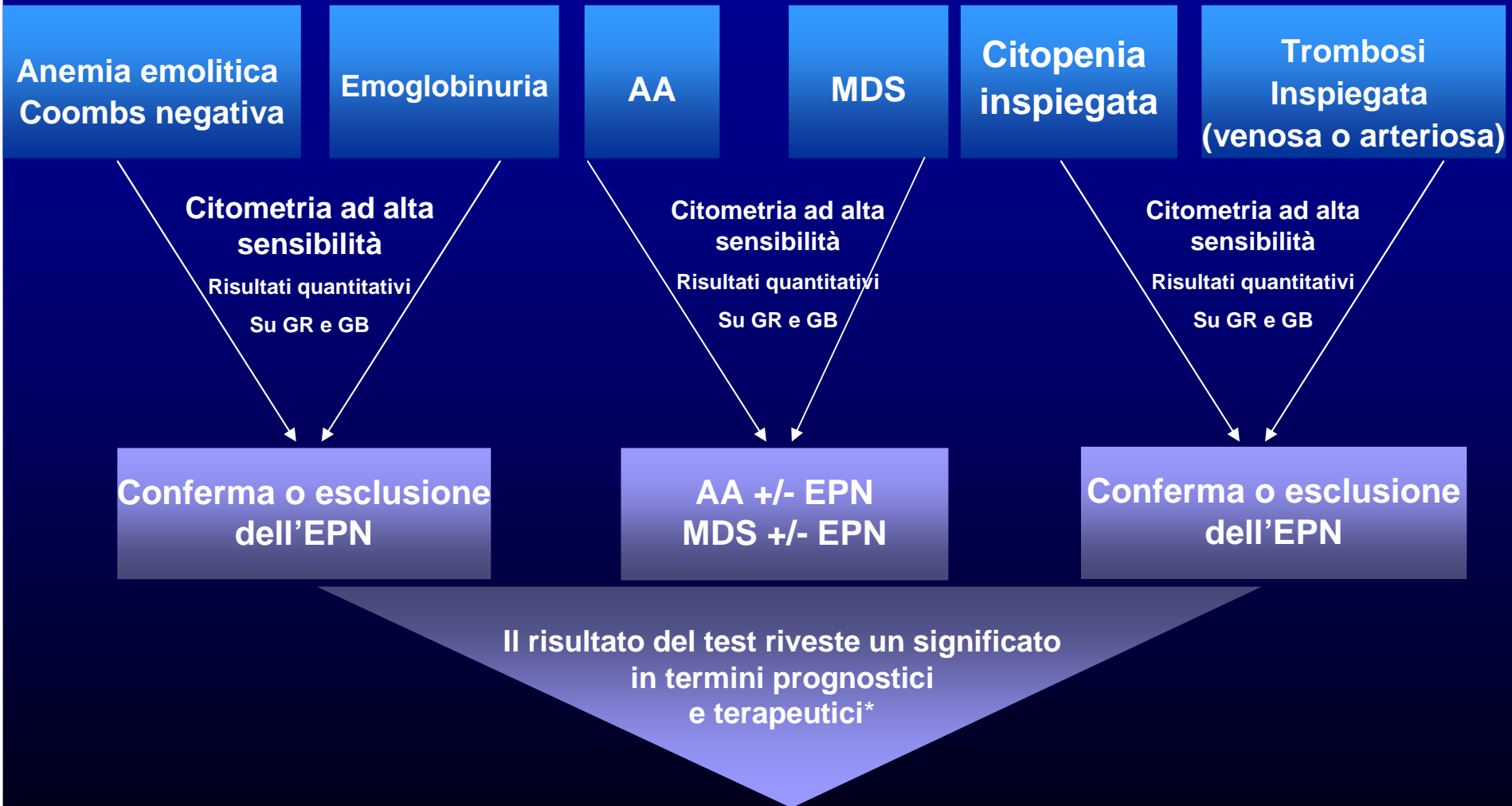
Ipertensione polmonare

Segni di trombosi (dimero D) >50% pts

Insufficienza renale

Aumento parametri di flogosi (infezioni)

Percorso diagnostico dell'EPN



* Parker, et al. *Blood*. 2005;106:3699-3709

Classificazione dell'EPN

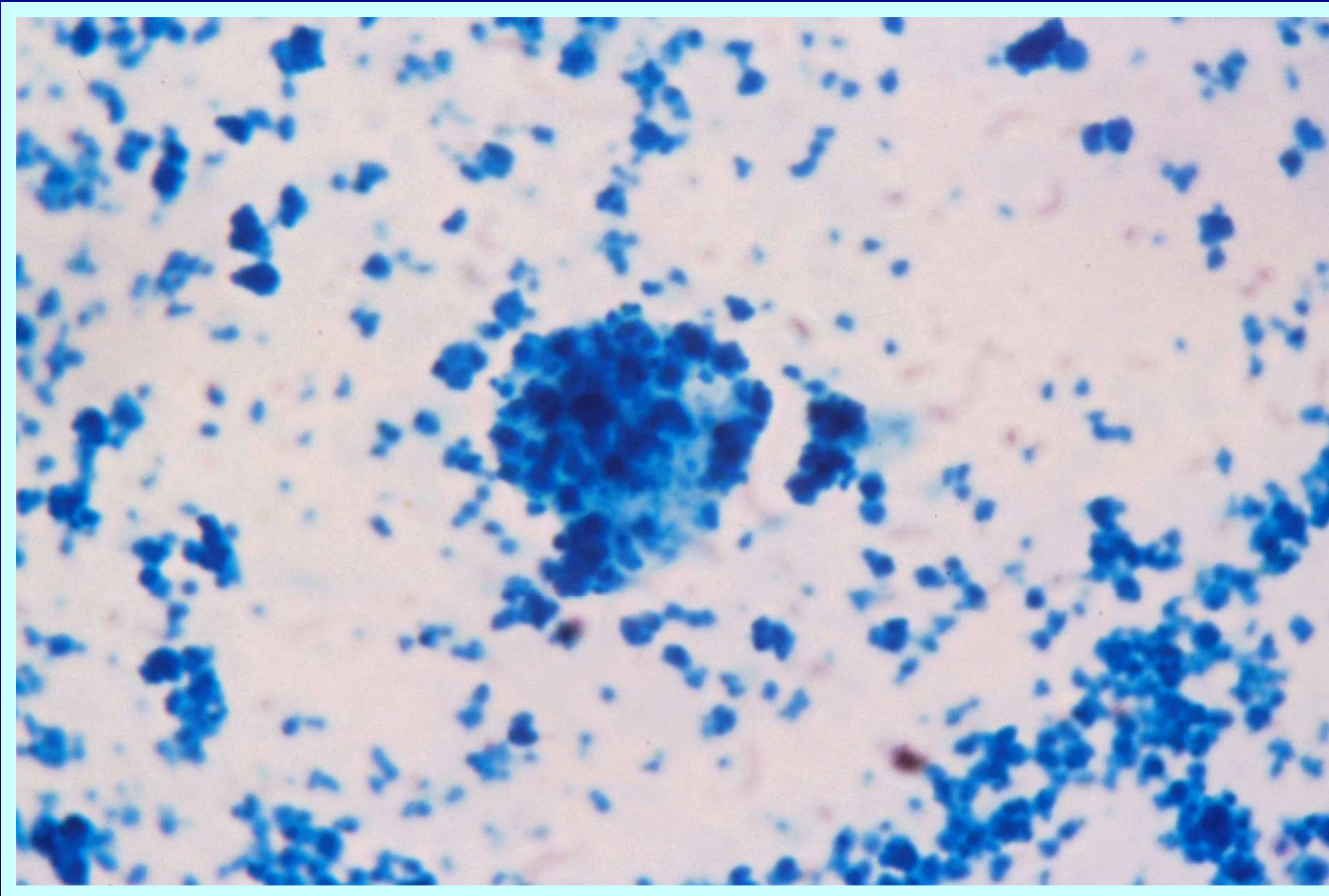
Parker et al, Blood 2005

Categorie	Emolisi	Fibrosi
Classica	+	-
EPN in corso di altre patologie midollari (MDS, AA)	+	+
Subclinica	-	+

Emoglobinuria



Emosiderinuria



Test di Ham in corso di EPN

dAc

dS

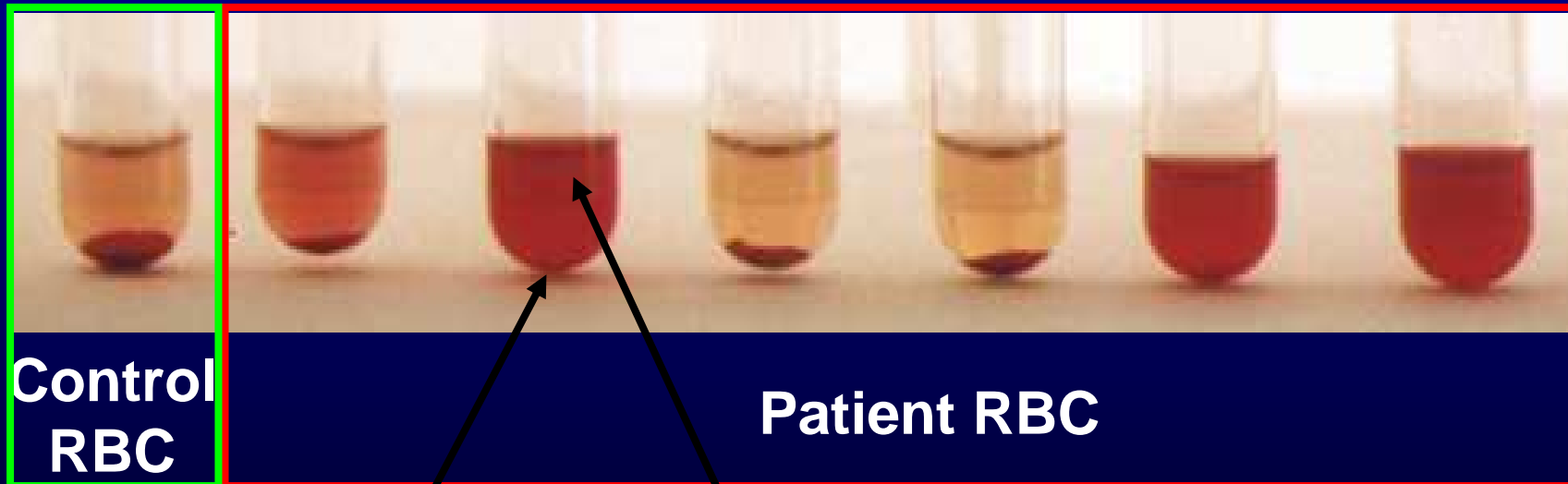
dAc

dHi

pHi

pAc

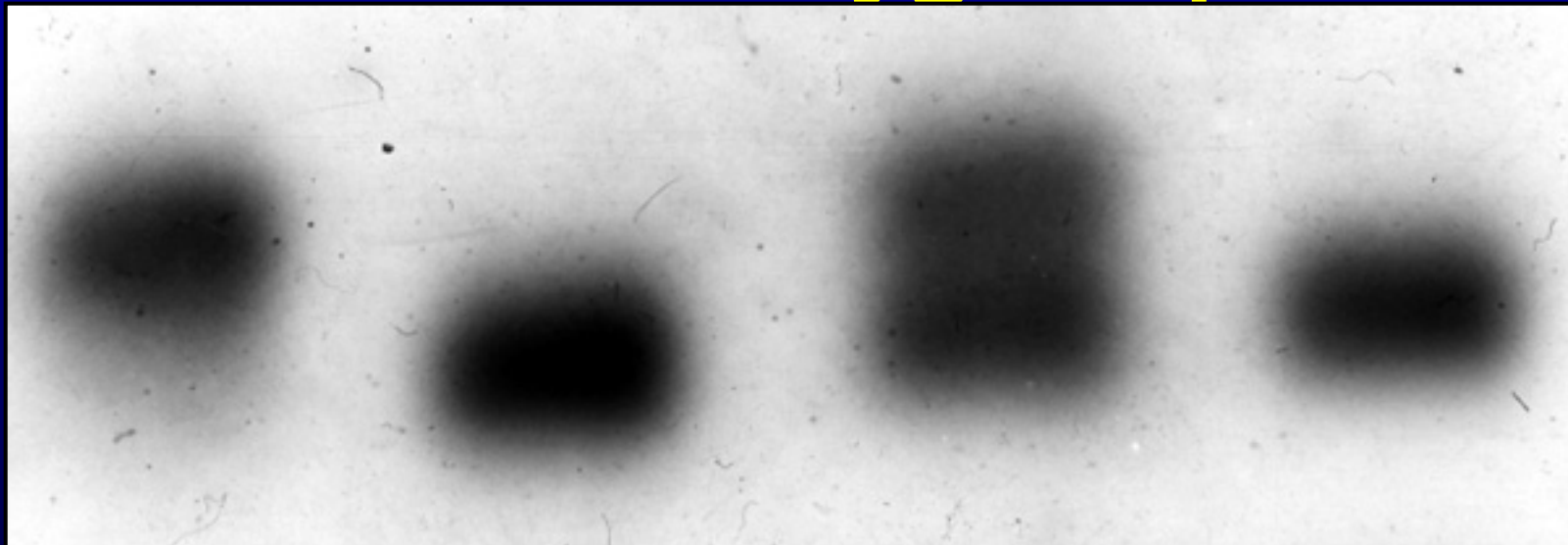
H₂O



GR Normali

GR lisati

Clonal origin of PNH cells in a G6PD A/B heterozygous patient



G6PD-A

Controls

G6PD-B

Whole RBC

Patient

PNH RBC

Somatic mutation(s) in the X-linked PIG-A gene

Gene

Disease / Function

	F2L	Coagulation Factor II like
	XG	Xg blood group
	XGR	Expression of Xg on Erythrocytes
	PIG A	PNH
	CYBB	Chronic granulomatous disease
	XK	McLeod's Phenotype
	THC	Thrombocytopenia 1
	WAS	Wiskott-Aldrich Syndrome
	GF1	Globin transcriptase factor 1
	ASB	Anaemia, Sideroblastic, Hypochromic
	ALA S2	Aminolevulinate synthase 2
	SCIDX1	Severe Combined Imm. Def.
	AGMX1	Bruton Agammaglobulinaemia
	HIGM1	Hyper IgM Syndrome
	LYP	Lymphoproliferative Syndrome
	F9	Coagulation Factor IX
	F8C	Coagulation Factor VIII C
	G&PD	Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase
	AGHX2	Agammaglobulinaemia (with GH deficit)

Pathogenesis - The Defect

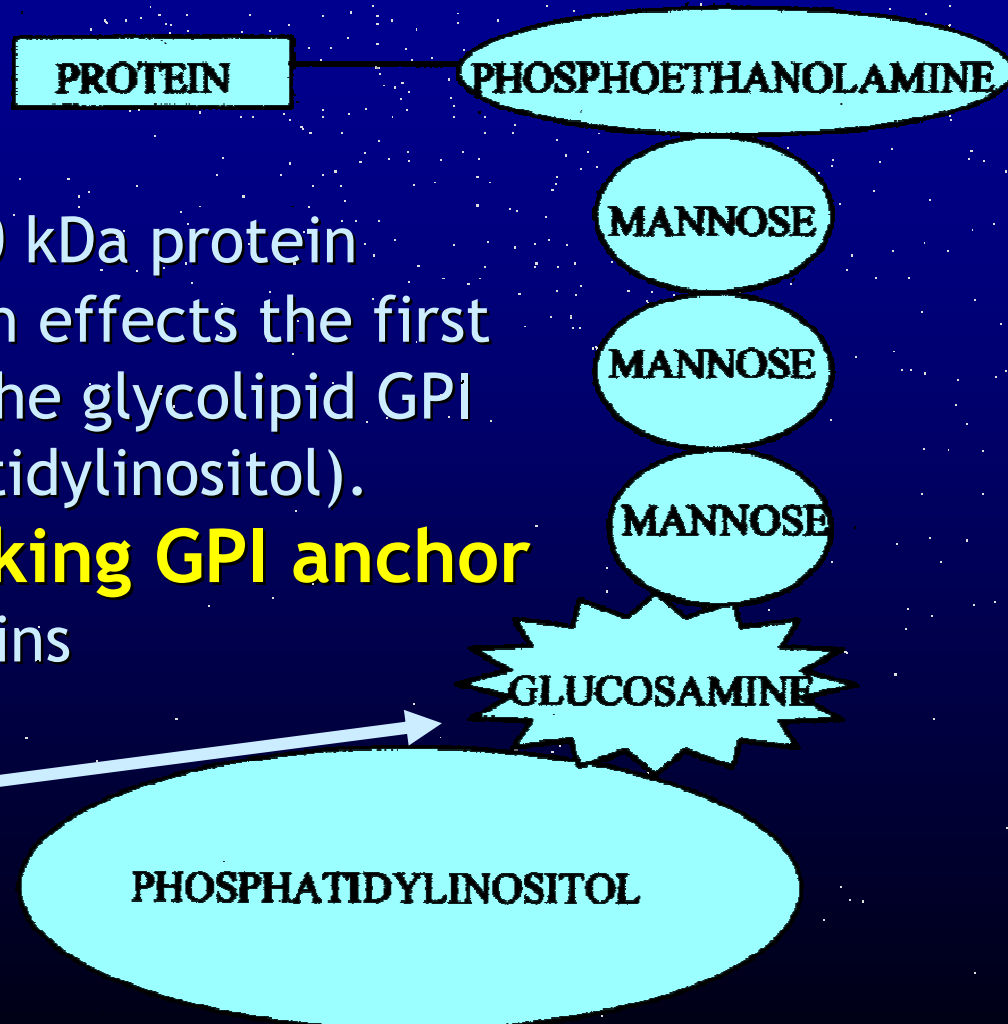
GPI Anchor

PIG - A gene codes for 60 kDa protein glycosyltransferase which effects the first step in the synthesis of the glycolipid GPI anchor (glycosylphosphatidylinositol).

Results in clones lacking GPI anchor

- in turn, attached proteins

PIG - A protein



PNH Diagnosis by Flow Cytometry

Of the long list of GPI anchored protein, monoclonal antibodies to the following antigens have been used in the diagnosis of PNH

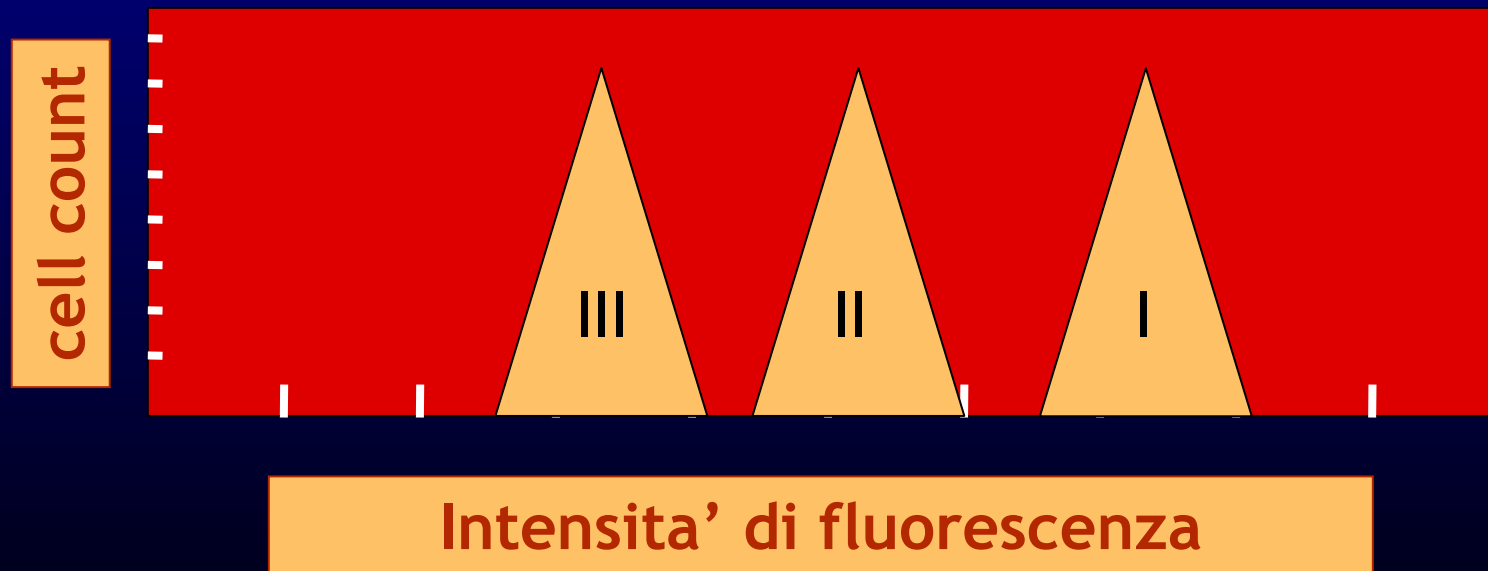
The most useful Abs are to CD14, 16, 55, 59, and 66.

Are all required? Probably not - more studies needed

<u>Antigen</u>	<u>Cell Lineage</u>	<u>Function</u>
CD14	monocytes	LPS receptor, MDF
CD16	neutrophils	Fc α III receptor
CD24	neutrophils	B-cell differentiation marker
CD55	all lineages	DAF
CD58	all lineages	possible adhesion
CD59	all lineages	MIRL, HRF, protectin
CD66b	neutrophils	CEA-related glycoprotein

Classificazione cellule EPN

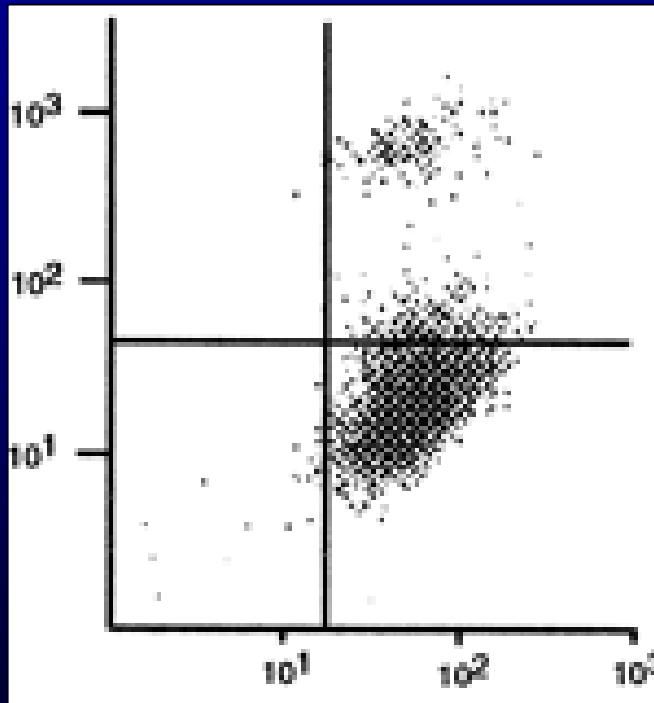
PNH I	Cellule Normali
PNH II	Deficit parziale
PNH III	Deficit Completo



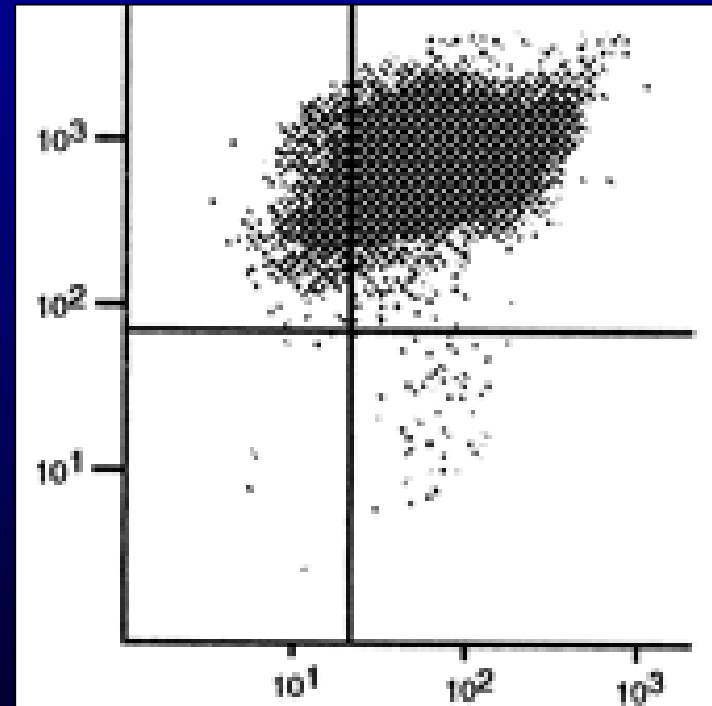
GPI neg /granulociti in soggetti normali

Paziente EPN

CD55, CD59 - PE

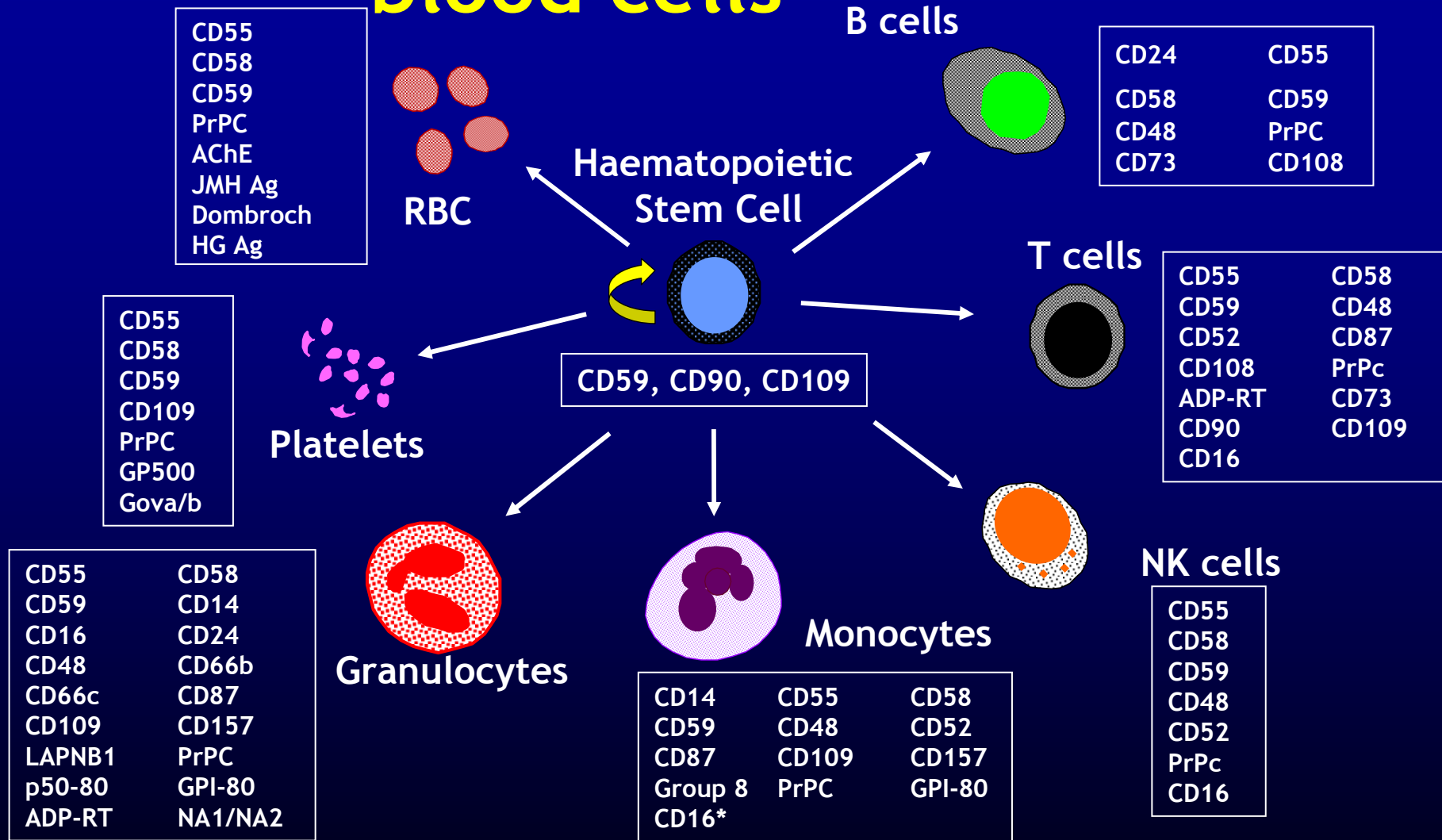


Soggetto Sano



CD11b-FITC

Proteins deficient on PNH blood cells



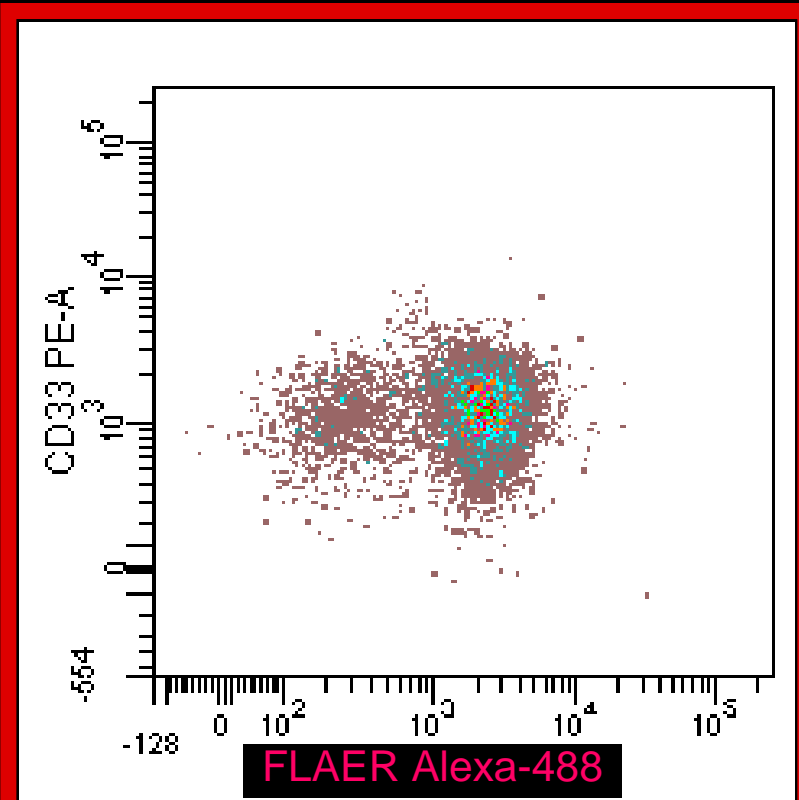
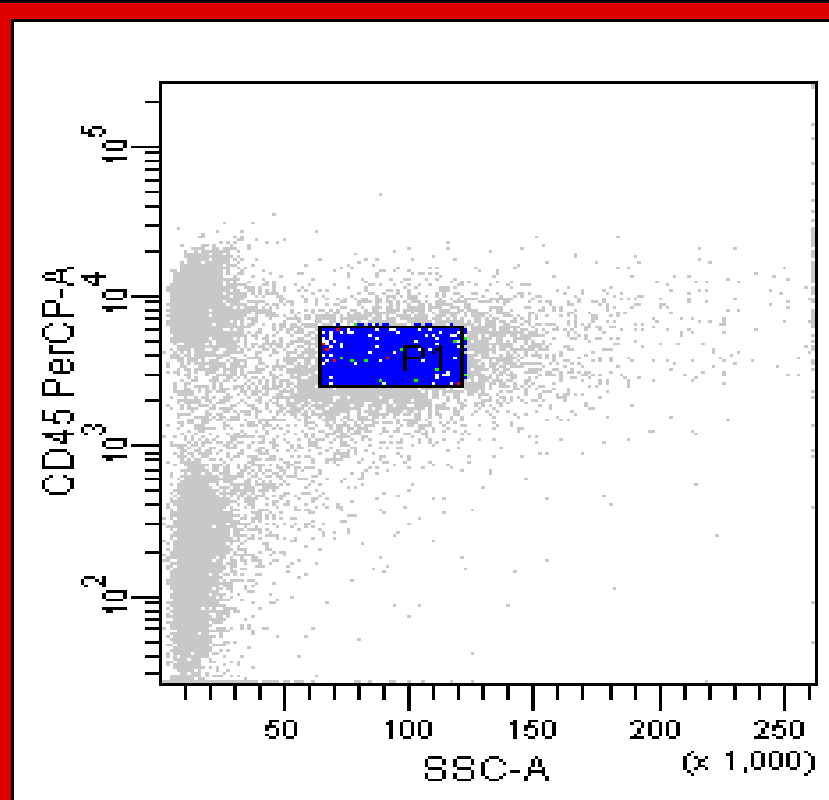
Courtesy L. Del Vecchio



**Scape
Project
2009 /
2010**

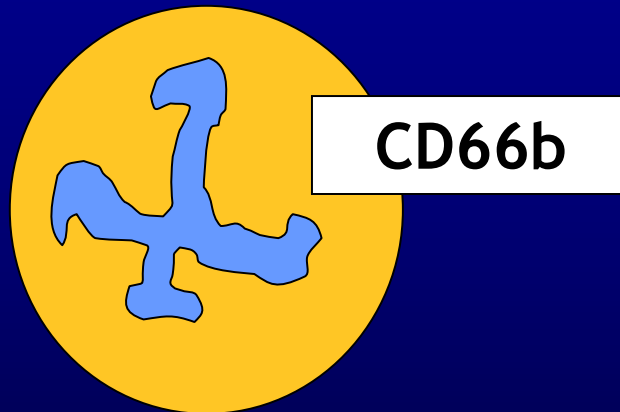


Studio midollare in corso di EPN: procedura errata a fini diagnostici

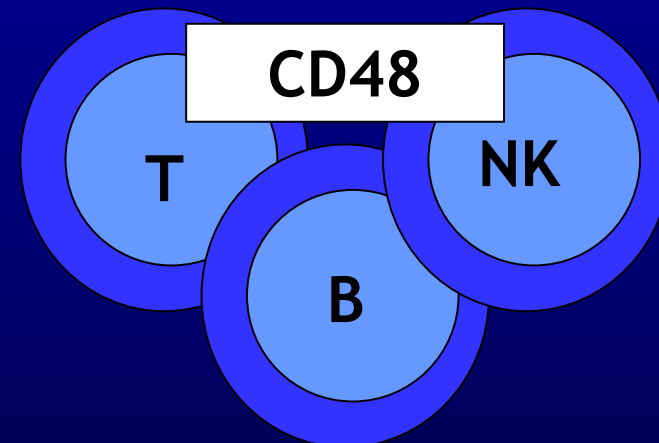


Panel for cytometric analysis in patients with suspected PNH

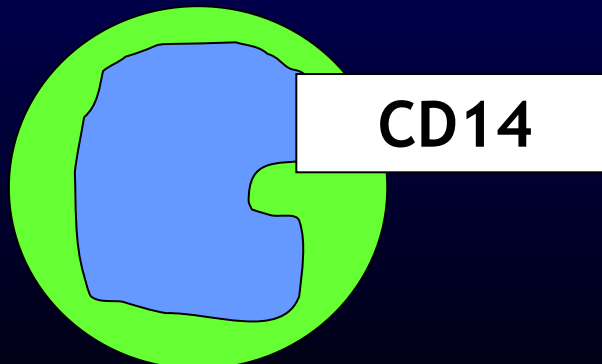
Granulocyte



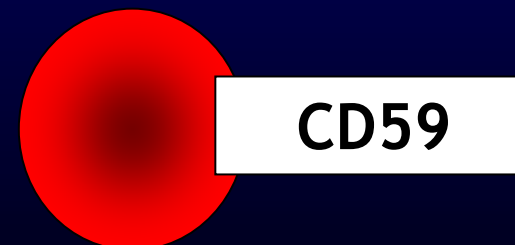
Lymphocyte



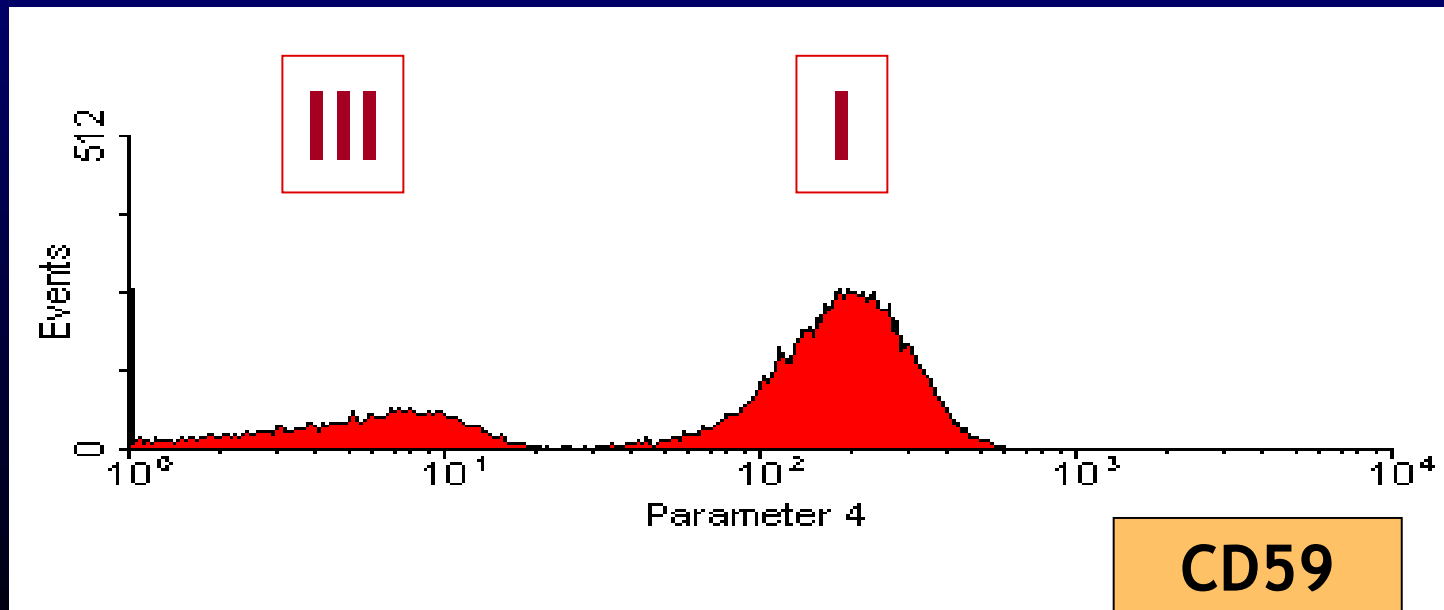
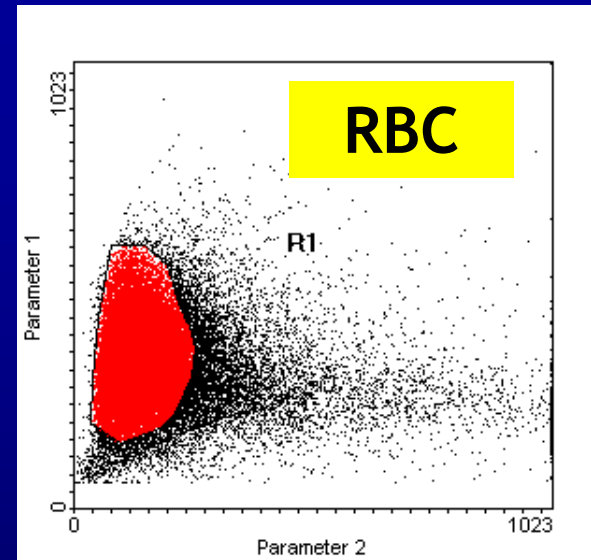
Monocyte



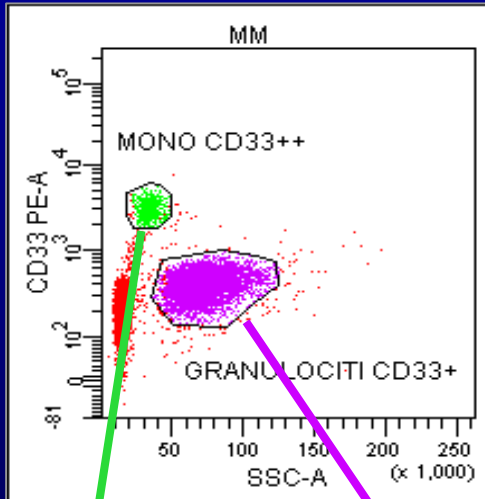
Erythrocyte



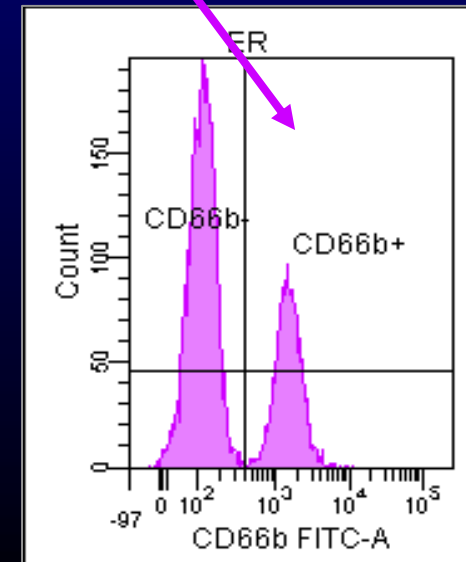
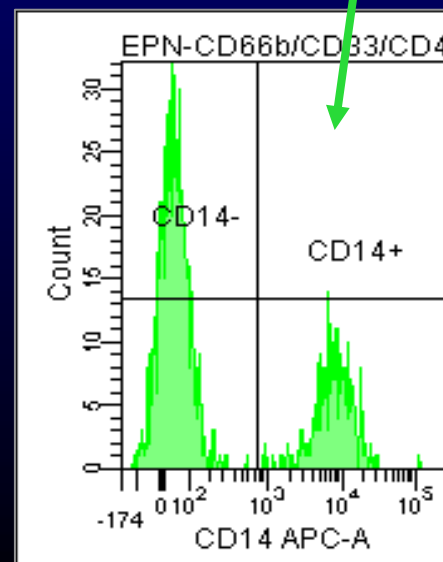
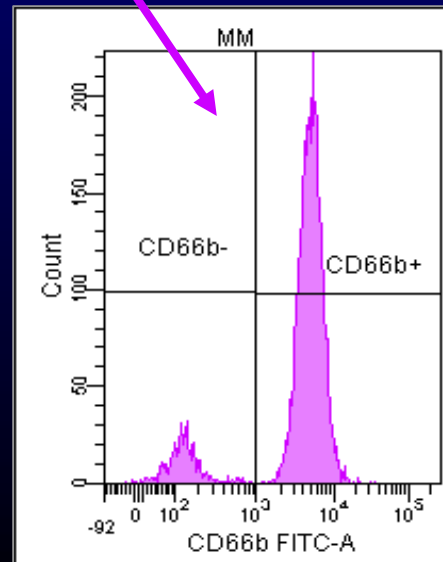
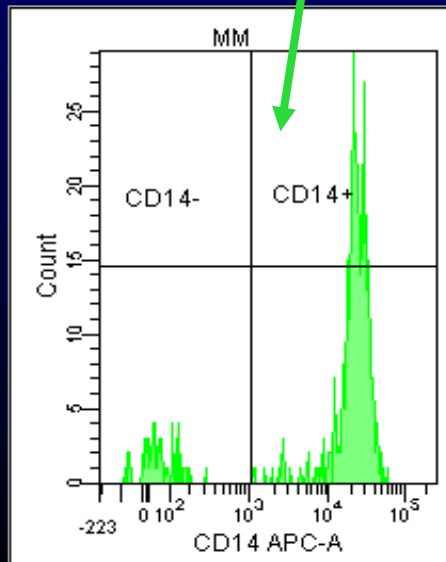
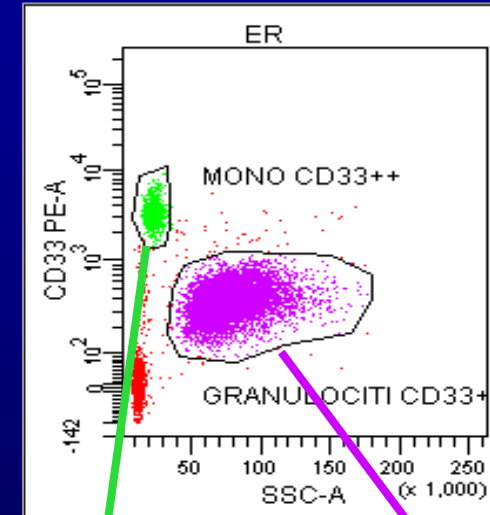
GR in EPN



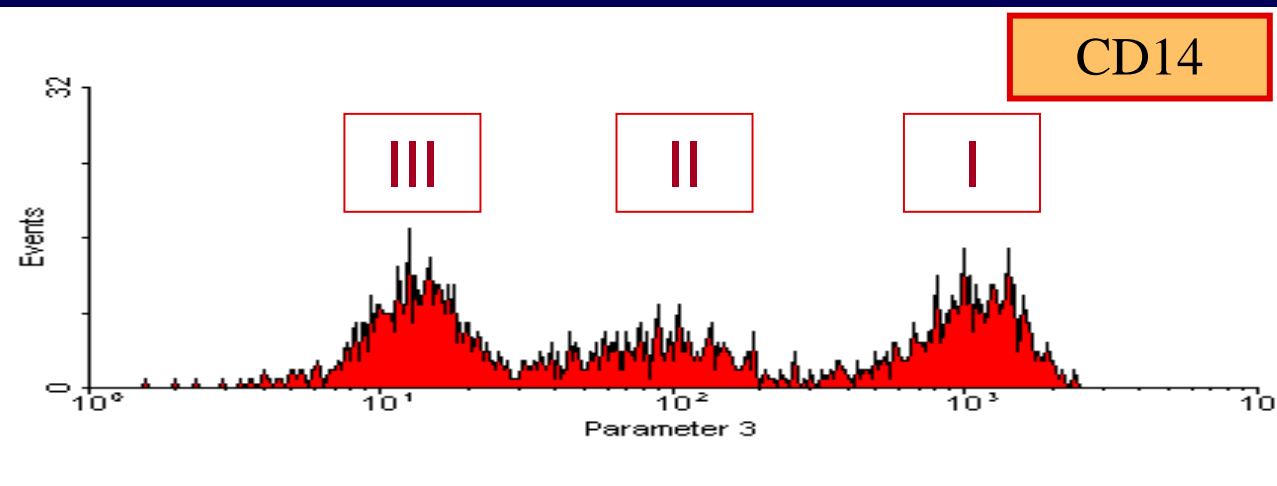
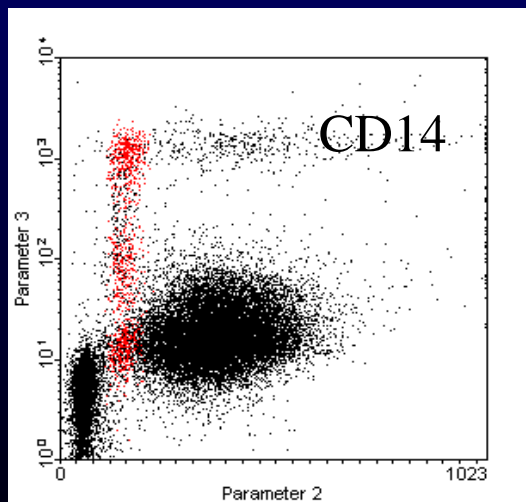
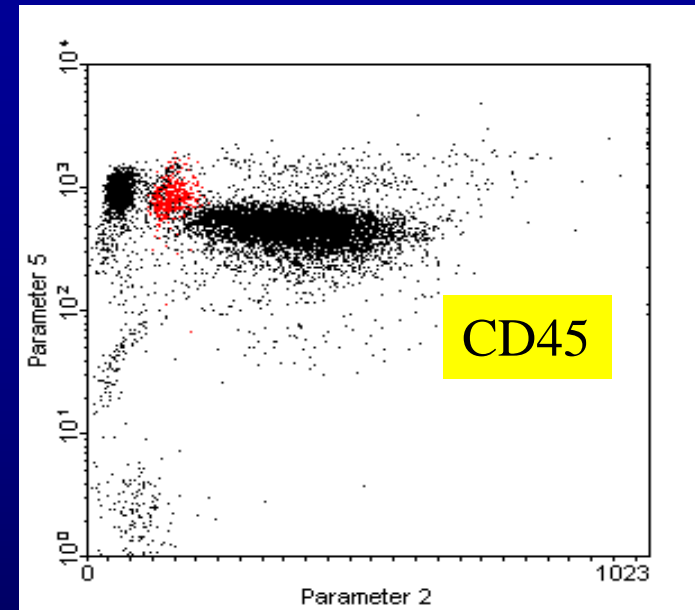
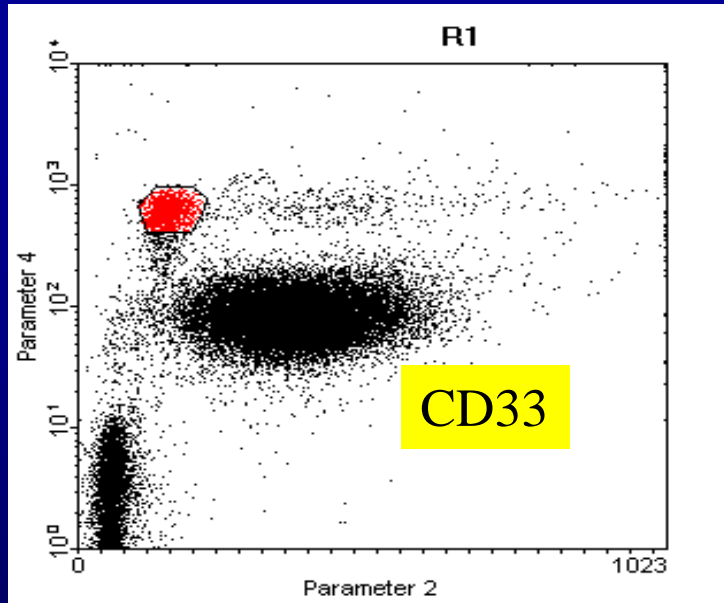
Monociti e granulociti: Monitoraggio nel tempo



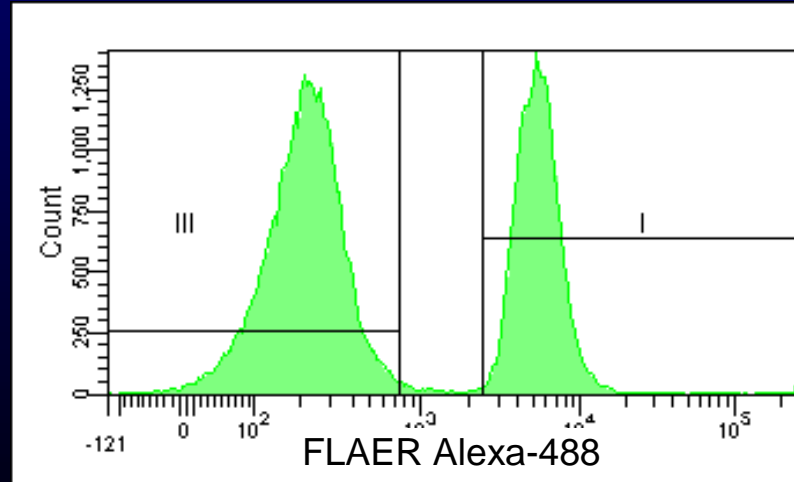
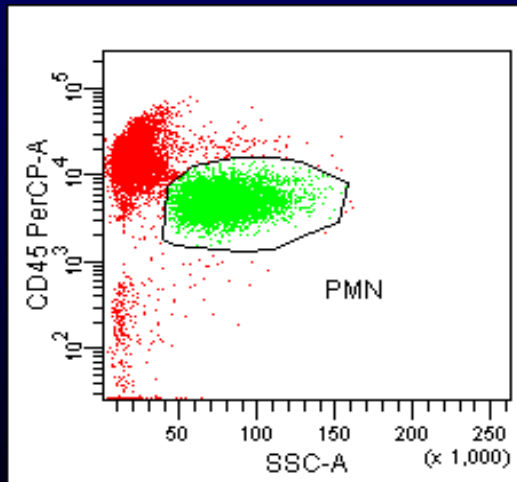
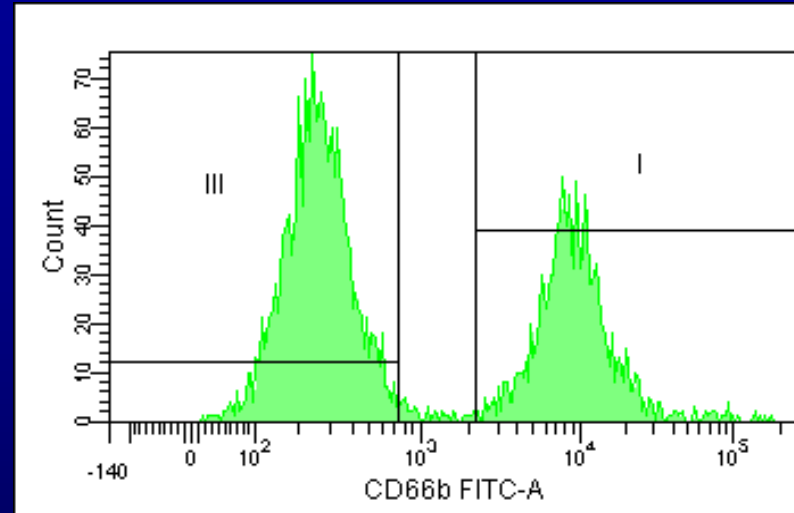
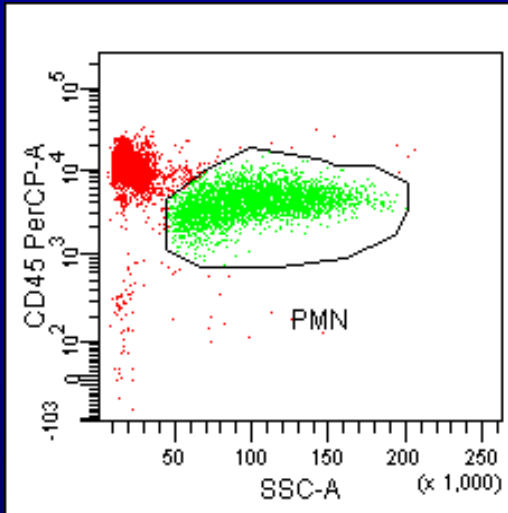
Livello
Soglia?
5%



EPN: Monociti 3 Popolazioni



FLAER vs CD66b



Borowitz MJ, et al.

Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders.

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 78B:211-230 (2010)

Anticorpi utili per l'analisi dell'EPN nei campioni di sangue periferico¹

Tipo di analisi	Cellula bersaglio	Strategie di gating	Reagenti informativi
Routine	Eritrociti [#]	Log FSC/SSC; glicoforina A opzionale	CD59 (CD55)
	Granulociti	CD45/SSC o CD15 (o equivalente)/SSC	FLAER, CD24, CD66b, CD16*; 2 reagenti preferiti Combinazione CD55/CD59 non consigliata
	Monociti	CD45/SSC o CD33/SSC o CD64/SSC o CD163/ SSC	FLAER, CD14, [‡] CD48, [§] CD55, [§] CD157 [§]
Alta sensibilità	Eritrociti [#]	Glicoforina A + scatter	CD59 ± CD55 in uguali o diversi colori
	Granulociti	CD15/SSC	FLAER, CD24, CD66b, CD16*; 2 reagenti essenziali Combinazione CD55/CD59 non consigliata
	Monociti [†]		

Borowitz MJ, et al.

Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders.

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 78B:211-230 (2010)

Possibili combinazioni di reagenti per la conta leucocitaria¹

		Colori					
	Cellule	1	2	3	4	5	6
3 colori	G	FLAER	CD24	CD15			
3 colori	M	FLAER	CD14	CD33			
4 colori	G	FLAER	CD24	CD15	CD45		
4 colori	M	FLAER	CD14	CD33	CD45		
4 colori	G+M	FLAER	CD24	CD14	CD33		
5 colori*	G+M	FLAER	CD24	CD14	CD15/CD33	CD45	
5 colori	G+M	FLAER	CD24	CD14	CD15	CD33	
6 colori	G+M	FLAER	CD24	CD14	CD15	CD33	CD45

Abbreviazioni: G, granulociti; M, monociti.

terapia con Eculizumab

SOLIRIS

- Anticorpo monoclonale umanizzato diretto alla proteina C5 del complemento che blocca il “terminal complement activation” sui GR EPN

