

Effect of dilution of canine blood samples on the specificity of saline agglutination tests for immune-mediated hemolysis

Prudence L. Sun¹ | Unity Jeffery² 

Introduction

- ・犬の免疫介在性溶血性貧血（IMHA）の診断には生理食塩水凝集試験（SATs）が広く推奨されているが、偽陽性が頻発している。
- ・IMHAの偽陽性診断は適切な治療を遅らせ、不必要な免疫抑制療法のリスク（感染症やコルチコステロイド誘発性胃潰瘍など）がある
- ・本研究では、免疫介在性溶血（IMH）に対するSATsの特異度は、生理食塩水と血液の希釈率が高いほど向上するという仮説を検証した
- ・目的 1）1：1、4：1、9：1、49：1の希釈率でSATsを実施した場合の特異度を調べる
2）希釈率がSATsの感度および診断精度に及ぼす影響を調べる

Methods and Materials

- ・Prospective study
- ・組み入れ基準：K2EDTA抗凝固血液サンプルのヘマトクリットが30%以下の犬
- ・組み入れた150頭をIMH、非IMHに分類し、各希釈率でSATsを実施した
- ・分類：直接抗グロブリン試験（DAT）陽性で溶血あり→IMHの影響を受けている
貧血が非免疫介在性の機序で説明でき、DATが陰性または溶血がない場合→IMHの影響を受けていない
- ・溶血の基準（以下のうち少なくとも1つ）
 - 1.血液塗抹標本にてHPFあたり5個以上の球状赤血球が存在する
 - 2.血液塗抹標本にてゴースト細胞が赤血球の5%以上を構成する
 - 3.血漿溶血が目視で検出可能である
 - 4.尿試験紙検査で中度～重度のヘモグロビン陽性
 - 5.血漿ビリルビンの上昇、または尿試験紙検査で中度～重度のビリルビン陽性（ALT、ALP、またはGGTの上昇を伴わない）

Results

- ・9/150頭がIMH、138/150頭が非IMHと分類され、3頭はIMHの診断または除外ができず研究から除かれた（表1）
- ・SATsにおける偽陽性の割合は、低希釈ほど有意に高かった
特異度は1：1希釈で29%から49：1希釈で97%に上昇した
感度は1：1および4：1希釈で88%，9：1および49：1希釈で67%であった
診断精度は、1：1希釈では33%であったが、49：1希釈では95%に上昇した（表2）

Discussion

- ・低希釈での偽陽性率が高かったことから、低希釈での陽性結果は抗体を介した凝集ではなく、赤血球の連鎖形成や重なりの結果であった可能性が高いと考えられる
- ・SATsの感度は希釈度を上げると低下したが、慎重な解釈が必要である
→IMHの基準を満たす犬の数が少なく、感度の信頼区間が広がった
→凝集を示さないIMHA症例が以前の研究で報告されている
- ・非免疫介在性の機序による貧血とされたDAT陽性例の中には、新生物などの基礎疾患や薬物治療によって引き起こされた二次的なIMHAの影響を受けている可能性がある

Review

- ・SATsは49：1の希釈率であれば、IMHの診断に高い特異性を発揮する
→他の臨床症状がIMHAと一致しており、SATが陽性であればIMHAを支持できる
- ・感度が限られているため、溶血がある犬ではSAT陰性であってもIMHを除外することはできず、抗赤血球抗体検査を行うべきである

表1 シグナルメントと貧血の機序

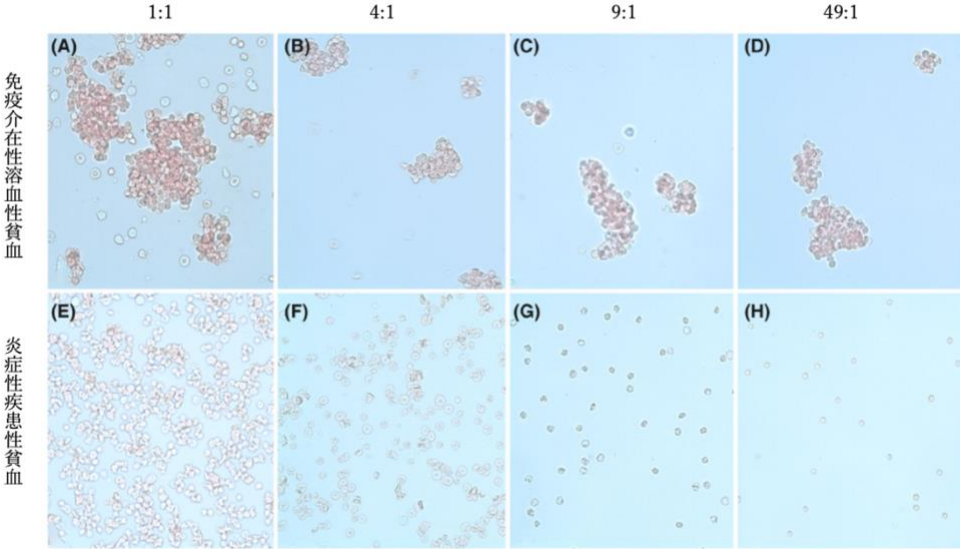
年齢、年（中央値、範囲）	犬種	性別	貧血の主な機序
DAT陽性、溶血あり (n=9)			
4 (2-8)	ビーグル (1) ダックスフンド (1) イングリッシュブルドッグ (1) ジャックラッセルテリア (3) シェットランドシープドッグ (1)	雌 (2) 避妊 (4) 去勢 (3)	免疫介在性溶血 n=9 一次IMHA (6) 二次IMHA (2) (セファロスポリン1、妊娠中1) 免疫学的溶血性輸血反応 (1)
DAT陽性、溶血なし (n=27)			
6 (0.6-13)	ビーグル (1) バーニーズ・マウンテン・ドッグ (1) ブラックマウス・カー (1) ボーダーコリー (2) チワワ (1) キャバリアキングチャールズスパニエル(1) コッカースパニエル (1) ドゴ・アルヘンタイノ (1) イングリッシュ・ブルドッグ (1) ジャーマンシェパード (1) ジャック・ラッセル・テリア (1) ラブラドル (1) マルチーズ (2) ミニチュアシュナウザー (1) ミックス (3) ブードル (1) バグ (1) ロットワイラー (1) シェリアンハスキー (2) シルキーテリア (1) ヨークシャーテリア (2)	雌 (4) 避妊 (9) 雄 (6) 去勢 (8)	炎症性疾患性貧血/非溶血性腫瘍随伴性貧血 n=10 うっ血性心不全 (1) 先天性 (1) (PSS 1) 感染性 (4) (ジステンパー1、ピシウム1、敗血症性腹症1、創傷感染症1) 炎症性 (1) (肺炎1) 腫瘍性 (3) (リンパ腫3) 出血 n=22 非消化管新生物 (2) (血管肉腫1、脾臓間質肉腫1) 消化管病変 (4) 特発性血小板減少性紫斑病 (2) 外科的出血 (1) 外傷 (2) 血友病疑い (1) 化学療法 n=3 リンパ腫・リンパ性白血病 (3) その他 n=2 フェノバルビタル中毒 (1) 脾臓捻転 (1)
DAT陰性 (n=109)			
10 (0.3-16)	アメリカンブルドッグ (1) オーストラリアンキャトルドッグ (1) パセットハウンド (1) ビションフリーゼ (2) ブラックマウスカー (1) ブルーヒーラー (1) ボーダーコリー (1) ボクサー (2) カタホッグドッグ (1) キャバリアキングチャールズスパニエル (1) コッカースパニエル (4) ダックスフンド (6) イングリッシュ・シェパード (1) ファックスハウンド (1) ジャーマンシェパード (1) ジャイアントシュナウザー (1) ゴールデンリバー (5) グレートピレニーズ (1) グレイハウンド (1) ジャックラッセルテリア (2) ラブラドル (6) マルチーズ (2) マスティフ (1) ミニチュアシュナウザー (4) ミックス (16) ベンブルック・ウェルシュ・コーギー (1) ビットブル (5) ボメラニアン (1) ブードル (7) バグ (2) ロットワイラー (1) サモエド (1) シェットランドシープドッグ (2) 柴犬 (1) シーズー (4) シェリアンハスキー (2) ウエストハイランドホワイトテリア (2) ヨークシャーテリア (2)	雌 (14) 避妊 (42) 雄 (13) 去勢 (40)	炎症性疾患性貧血/非溶血性腫瘍随伴性貧血 n=40 先天性 (1) (PSS 1) 内分泌性 (2) (糖尿病1、副腎皮質機能低下症1) 免疫介在性 (4) (筋炎1、免疫介在性多発性関節炎1、多発性神経炎1、蛋白漏出性腸症1) 感染性 (10) (腹腔膿瘍1、細菌性肝炎1、大糸状虫症1、心内膜炎1、 骨髄炎1、中耳炎1、血糸食道虫症1、創傷感染症3) 炎症性 (5) (誤嚥性肺炎2、胆汁性腹膜炎1、肺炎2) 多発性慢性全身疾患 (2) 新生物 (10) (播種性腺癌3、リンパ腫3、髄膜腫1、骨肉腫1、軟部組織肉腫1、 疑われるが組織学的に確認されていない1) その他 (6) (急性網膜剥離1、不明熱1、慢性下痢1、胃拡張転位候群手術後の気管支炎1、肺高血圧症1、脳血管イベント1) 出血 n=45 肝ヒストプラズマ症に続発する凝固障害 (1) 消化管病変 (9) 副腎皮質機能低下症 (1) 特発性血尿 (1) 特発性血小板減少性紫斑病 (12) 非消化管新生物 (5) (播種性神経内分泌腫瘍1、血管肉腫4) 外科的出血 (9) 大腸肉腫に伴う血小板減少症に伴う二次的出血 (1) 外傷 (6) 化学療法 n=12 リンパ腫・リンパ性白血病 (6) 肥満細胞腫 (4) 多発性骨髄腫 (1) 心基底部腫瘍 (1) 腎不全 n=7 (急性腎悪2、慢性5) その他 n=5 (麻酔有害事象後の大量輸液による血液希釈1、エーリア症関連汎血球減少症1、バルゴ感染症1、前駆細胞標的免疫介在性貧血1、毒誘発性溶血1)
DAT失敗、溶血なし (n=2)			
0.3-11	マスティフ (1) ミックス (1)	避妊 (1) 雄 (1)	炎症性疾患性貧血 n=1 骨髄炎に伴う敗血症 (1) 出血 n=1 リンパ腫に対する化学療法に伴う消化管出血 (1)
除外(n=3)			
8 (7-10)	ブリュッセル・グリフォン (1) ダックスフント (1)	避妊 (3)	不明 n=3

表2 生理食塩水と血液の比率を1：1、4：1、9：1、49：1に設定したSATの診断性能

		生理食塩水-血液 比率				
		SAT結果	1：1	4：1	9：1	49：1
IMH (n = 9)		濃過ぎて観察不可	9	1/9	0/9	0/9
		陽性	7/9	7/9	6/9	6/9
		陰性	1/9	1/9	3/9	3/9
非IMH/DAT陽性 (n = 27)		濃過ぎて観察不可	10/27	0/27	0/27	0/27
		陽性	11/27	15/27	10/27	1/27
		陰性	6/27	12/27	17/27	26/27
非IMH/DAT陰性 (n = 109)		濃過ぎて観察不可	23/109	1/109	0/109	0/109
		陽性	62/109	55/109	31/109	3/109
		陰性	24/109	53/109	78/109	106/109
非IMH/DAT失敗 (n = 2)		濃過ぎて観察不可	0/2	0/2	0/2	0/2
		陽性	2/2	0/2	0/2	0/2
		陰性	0/2	2/2	2/2	2/2
感度	% (95% CI)	88 (47~100)	88 (47~100)	67 (30~93)	67 (30~93)	
特異度	% (95% CI)	29 (20~38)	49 (40~58)	70 (62~78)	97 (93~99)	
診断精度	% (95% CI)	33 (24~42)	51 (43~59)	70 (62~77)	95 (90~98)	

CI, 信頼区間 DAT, 直接抗グロブリン検査 IMH, 免疫介在性溶血 SAT, 生理食塩水凝集試験

図1 各希釈率でのSATの例



(×40対物、無染色)