

Autoimunitní hemolytické anemie

Hemolytické anemie

Anemie ze zvýšené destrukce erytrocytů

Dle příčiny

- Korpuskulární (porucha membrány, metabolismu, struktury Hb)
- Extrakorpuskulární
 - Imunitní (aloprotilátky, autoprotilátky)
 - Neimunitní (příčiny fyzikální, chemické, toxické, mechanické, mikroangiopatické)

Hemolytické anemie

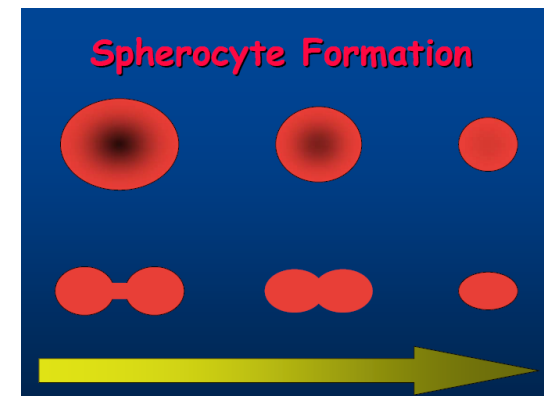
Skupina onemocnění charakterizovaná
zkráceným přežíváním erytrocytů

Dg. kritéria

- Klinické a laboratorní **známky hemolýzy**
- Klinické a laboratorní **známky anemie** / dle stupně kompenzace kostní dřeně
- **Autoprotilátky a/nebo aktivovaný komplement** na erytrocytech a/nebo volné autoprotilátky v séru

Laboratorní známky hemolýzy

- **Zvýšená erythropoeza** (elevace počtu rtc, erytroidní hyperplazie dřeně, snížení poměru G/E)
- **Zvýšená destrukce erytrocytů** (hemolýza intra x extravaskulární)
 - biochemické parametry: elevace LD, nekonj.bilirubinu, snížení sér.haptoglobinu, hemoglobinemie, hemoglobinurie, hemosiderinurie
 - morfologické změny erytrocytů (schistocyty)
 - zkrácené přežívání erytrocytů



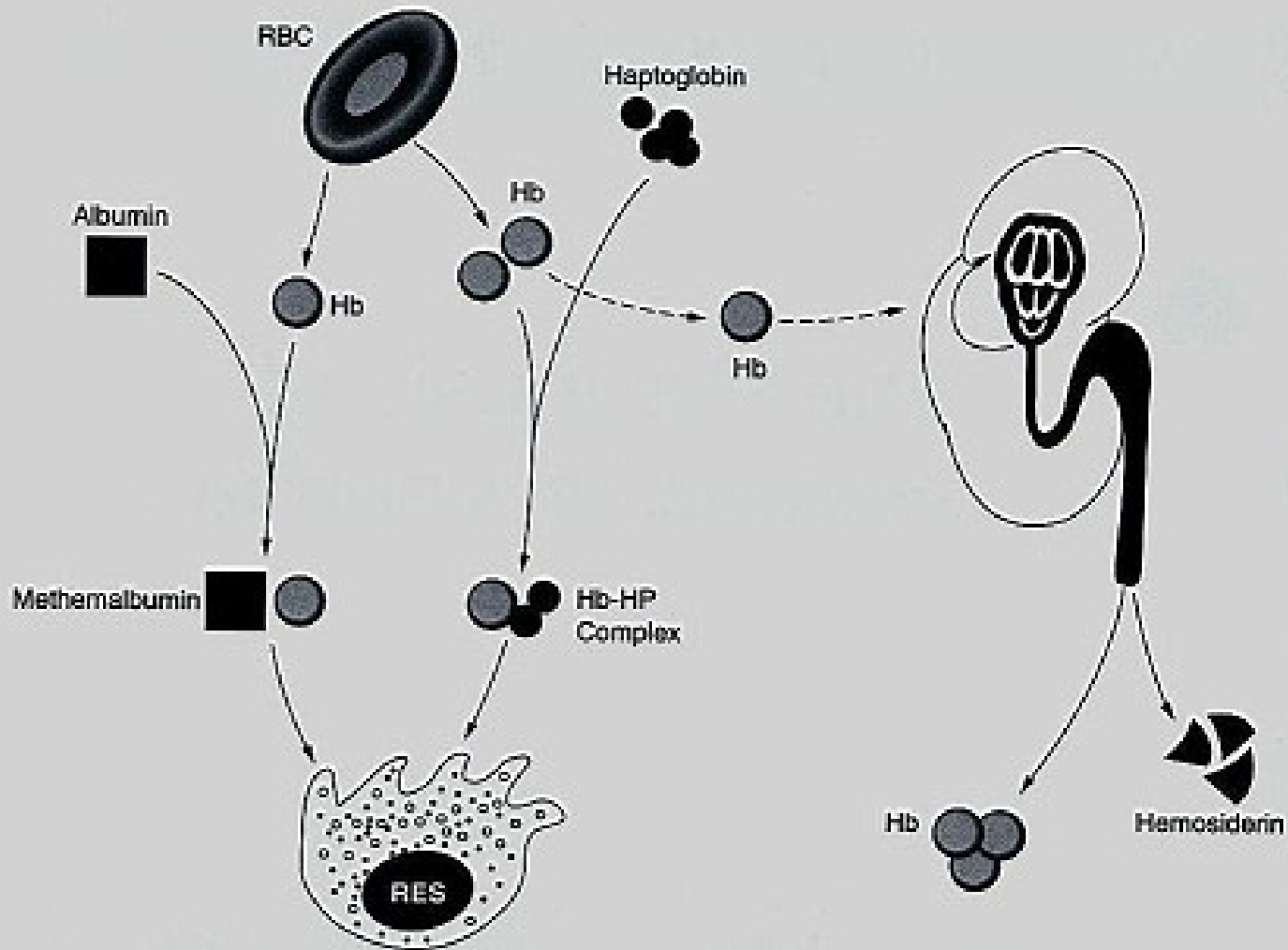


FIGURE 2-1. The destruction of red blood cells (RBCs) intravascularly results in the liberation of hemoglobin (Hb) from the RBC. The Hb combines with haptoglobin (HP), and the HP-Hb complexes are rapidly catabolized in the reticuloendothelial system (RES), resulting in low levels of serum Hp. Also, when Hb is liberated into the plasma in large quantities, some of the heme combines with plasma albumin, resulting in the formation of methemalbumin. When HP has been saturated and the level of plasma Hb exceeds the renal threshold, Hb appears in the urine. Hemoglobinuria persisting for at least several days results in the deposition in the renal tubules of hemosiderin derived from the breakdown of Hb. The hemosiderin may be excreted in the urine, probably as a result of the desquamation of the renal tubular cells.

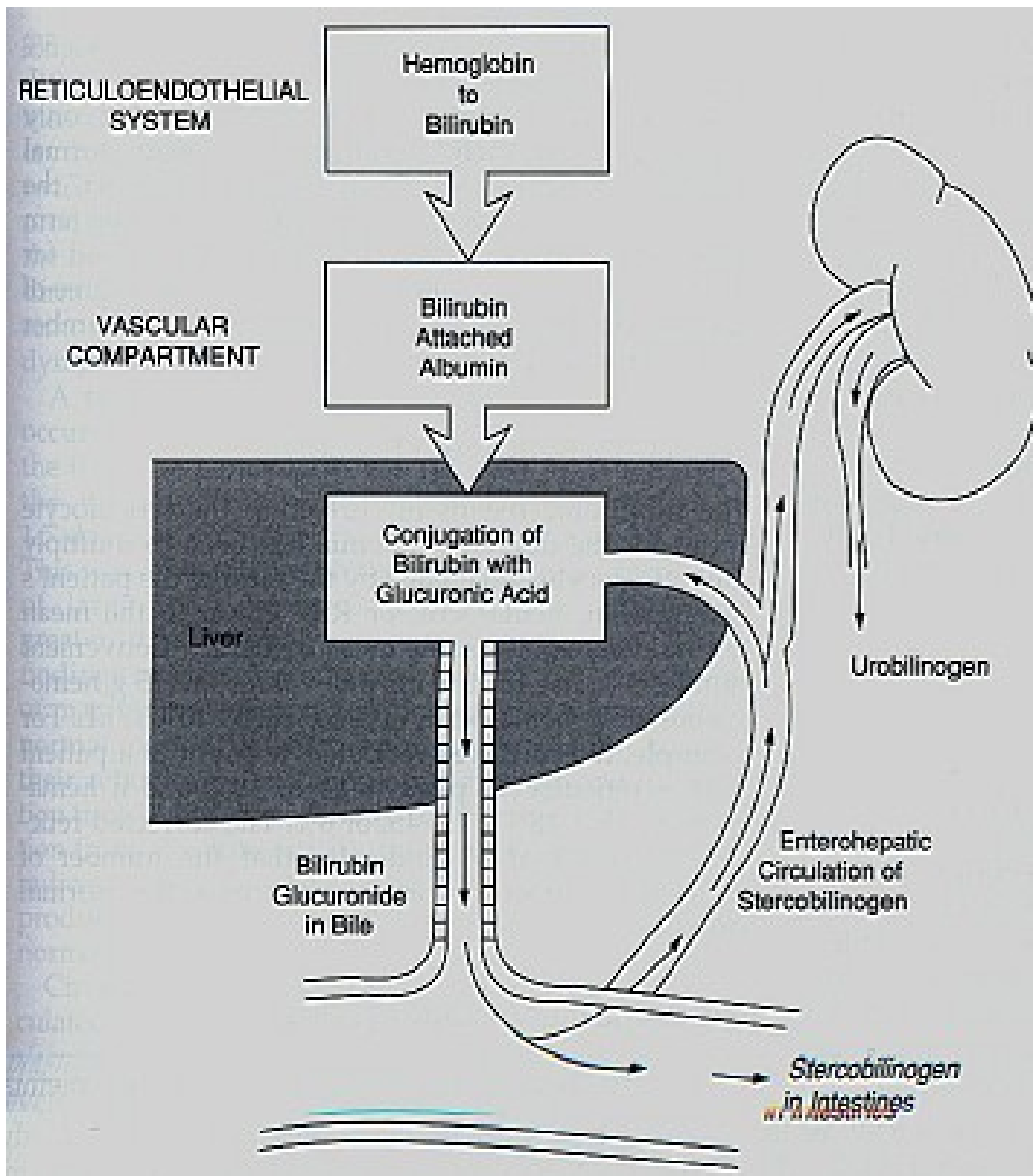


FIGURE 2-2. The destruction of RBCs extravascularly within the cells of the reticuloendothelial system results in the degradation of hemoglobin and the production of bilirubin. The bilirubin passes into the plasma, forms a loose complex with albumin, and is taken up by the liver, where it is conjugated with glucuronic acid. Conjugated bilirubin gives a positive direct van den Bergh test, whereas unconjugated bilirubin gives a positive indirect reaction. Only conjugated bilirubin is readily excreted into the urine. Conjugated bilirubin largely passes via the hepatic ducts to the intestine, where it is reduced to stercobilinogen and is excreted. Part of the stercobilinogen is absorbed from the bowel and is reexcreted by the liver (enterohepatic circulation). Some absorbed stercobilinogen is excreted by the kidneys as urobilinogen. In hemolytic anemia, the increased catabolism of bilirubin characteristically results in increased concentrations of unconjugated bilirubin in the plasma and increased concentrations of bilirubin degradation products in feces and urine.

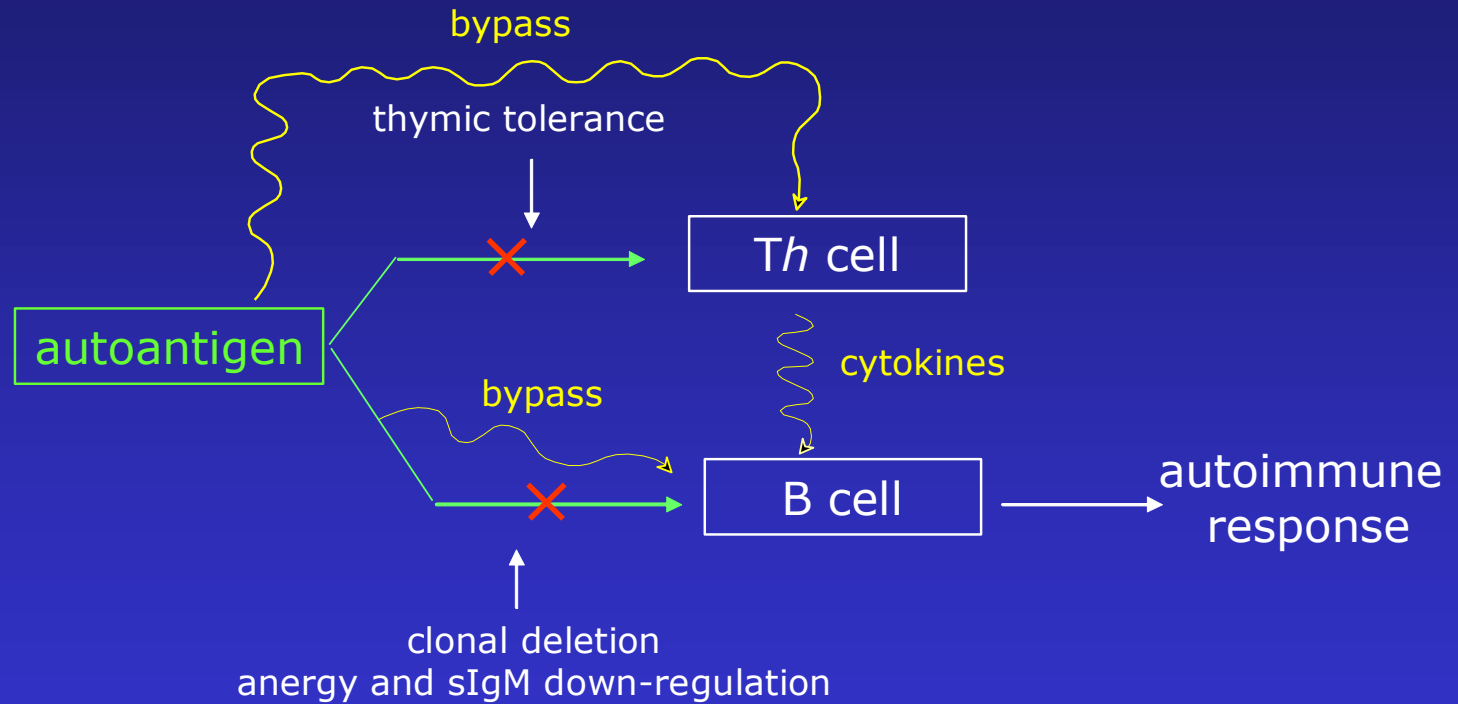
Autoimunitní hemolytická anemie

AIHA

Vzniká při poruše regulace mechanismů, které zajišťují imunologickou toleranci → únik klonu lymfocytů z imunologického dohledu + autoreaktivita B,T lymfocytů → vznik autoprotilátek proti vlastním erytrocytům

Spící “autoreaktivní“ lymfocyty mohou být aktivované cross-reaktivními aloantigeny, autoantigeny, mikrobiálními superantigeny, změnami v procesu prezentace antigenu...

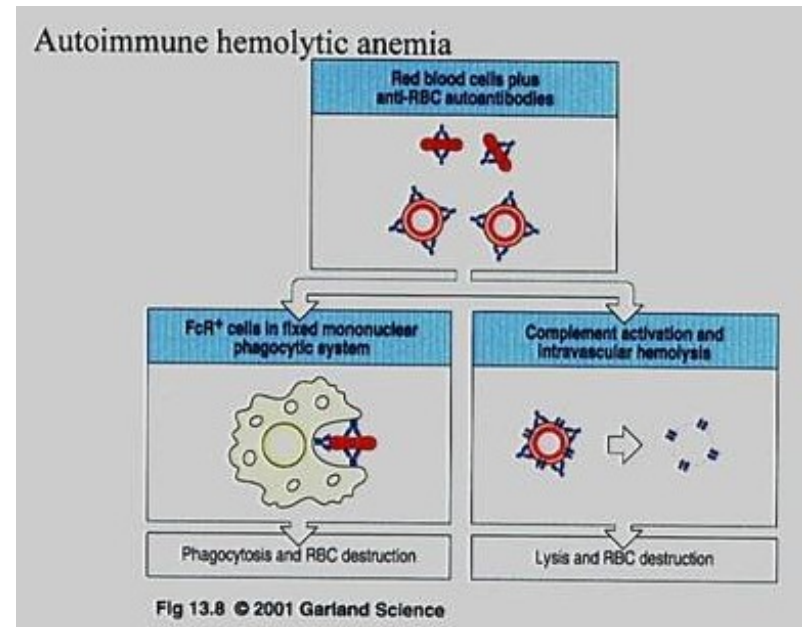
Autoimmunity arises through bypass of the control of auto-reactivity

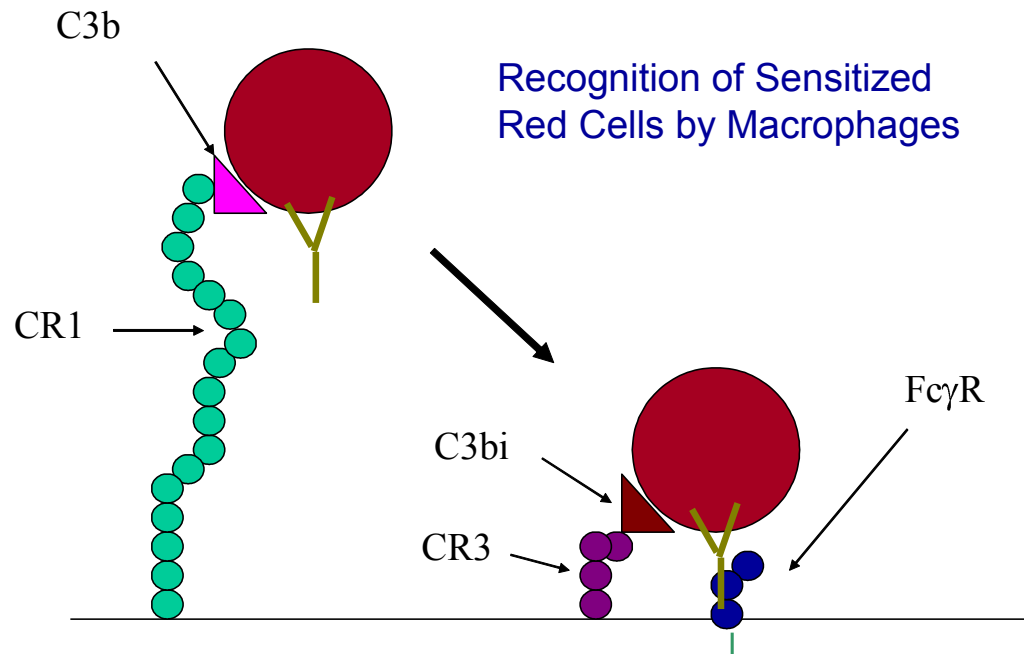


AIHA patogeneze

Autoprotilátky proti erytrocytům

- IgG nebo IgM (a/nebo aktivovaná C3 složka komplementu)
- Erys + IgG reagují s FcγRs makrofágů v RES fagocytózou – sférocyty – extravaskulární lýza
- Erys + C3 reagují s CRs makrofágů fagocytózou – extravaskulární nebo intravaskulární lýza





Z hlediska fagocytózy mají oba opsoniny (Ig a C) synergický účinek:

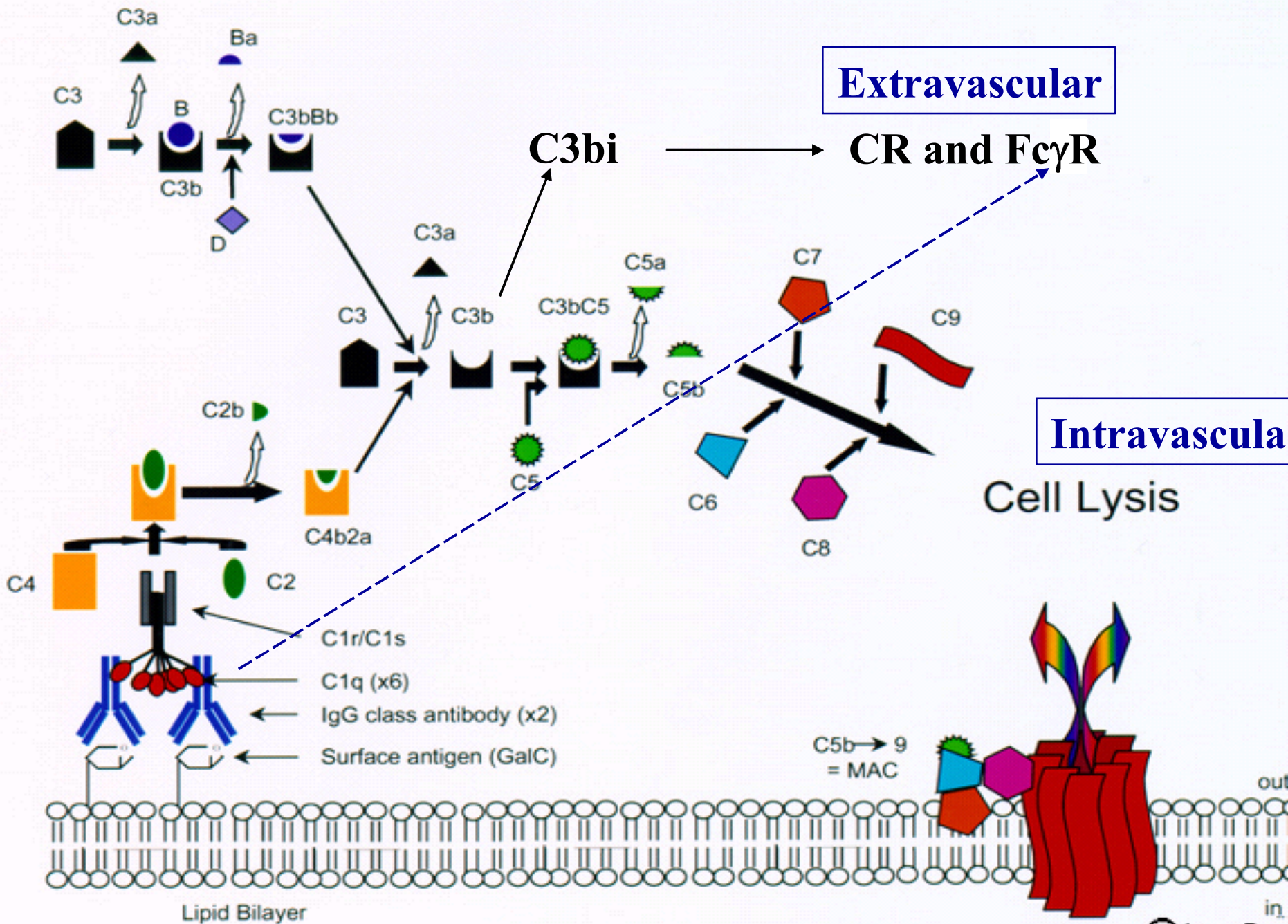
1. vazba s C umožňuje lepší přichycení a rozpoznání antigenu
2. vazba s protilátkou umožňuje lepší pohlcení (fagocytózu)

Intravaskulární hemolýza

- pokud protilátka aktivuje komplement až po C9
- obvykle pro **IgM**, méně často IgG
- „klasická cesta“ aktivace C' = „killer“ molekula - ruptura erytrocytu, uvolnění Hb do plazmy
- je přítomna hemoglobinemie a hemoglobinurie

Extravaskulární hemolýza

- když protilátka neaktivuje komplement
- nebo pokud neproběhne kompletní aktivace C až k lýze (aktivace jen do C3)
- typicky pro **IgG**
- erytrocyt s navázanou protilátkou je „jen“ rozpoznán a fagocytován v RES (Kupferovy bb. jater, červená pulpa sleziny)



Extravascular

CR and FcγR

Intravascular

Cell Lysis

C5b → 9
= MAC

Lipid Bilayer

Hemolytické anemie z imunitní příčiny

Dělení podle příčiny:

- způsobené autoprotilátkami (AIHA)
- způsobené aloprotilátkami (potransfuzní)
- způsobené léky

Co ovlivní hemolýzu?

Vlastnosti protilátky

- teplotní amplituda
- množství/titr v séru
- avidita k antigenu
- množství Ab navázané na ery
- schopnost Ab vázat komplement
- podtřída Ig (IgG3 > IgG1 > IgG2 > IgG4)

Vlastnosti buněk RES

- aktivita a počet makrofágů

Imunohematologický průkaz imunitní hemolýzy

Dva antiglobulinové testy: PAT, NAT

Jsou i další klinické a laboratorní souvislosti, suspektní pro imunitní hemolýzu:

- akrocycanoza/hemoglobinurie v chladu
- patologický KO při autoaglutinaci
- pozitivní léková anamneza
- nález aloprotilátek (HON, pozdní HTR)

AIHA: pozitivní PAT

- protilátky vytvořené proti autoantigenům erytrocytů
- protilátky vzniklé proti léku
a následně navázané na erytrocyty

Cave!

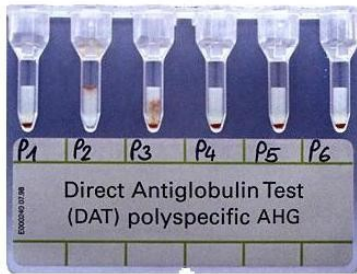
PAT+ při velké nebo malé inkompatibilitě (nejedná se o AIHA)

- protilátky z transfundované plazmy
- protilátky u příjemce proti inkompatibilním erytrocytům
- nestejnokupinové transfuze, transplantace, těhotenství

Určení PAT

- AGH séra polyspecifická (anti-IgG+C3)
- AGH séra monospecifická pro určení izotypu Ig (-IgG, -IgM,-IgA) a složky komplementu (-C3b, -C3d)
- stanovení množství protilátky (titrace Ab, ředění)
- event. další charakteristika protilátky (podtřídy IgG1-IgG4, množství protilátky)

- Zásadní je interpretace výsledků v kontextu klinických a ostatních laboratorních vyšetření:
 - **PAT+** mimo souvislost s IHA
 - **PAT+** při imunitní příčině, avšak bez HA



Negative

Negative

< 2+

Very weak positive

≥ 2+

Monospecific DAT card is recommended



Negative

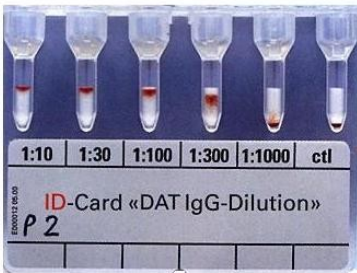
Negative

< 2+ (IgG)

Weak positive (IgG) (not titrated)

≥ 2+ (IgG)

IgG-Dilution (titration) card is recommended



Negative

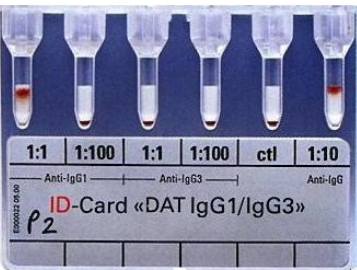
Negative

< = 1:30

Weak positive (IgG) Low risk of haemolysis

> 1:30

Strong positive (IgG) High risk of haemolysis



Interpretation of result:

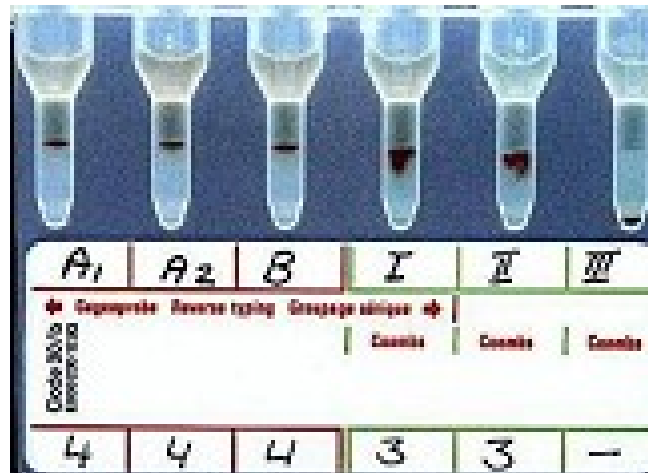
Positive 1:1 – moderate risk of haemolysis

Positive 1:100 – high risk of haemolysis

The ID-Card «DAT IgG1/IgG3» shows the clinical importance of a DAT, sensitized by IgG1 and/or IgG3 antibodies.

AIHA: pozitivní NAT

- rutinní vyšetření séra pacienta proti dg. erys 0 (screeningové erys)
- vyšetření při 37°C a 20°C
- došetření teplotní amplitudy a titru protilátek při pozitivitě chladových protilátek
- sledování hemolýzy



Screening spolu s PAT pomůže rozdělit AIHA na typy:

- AIHA s tepelnými protilátkami (WAIHA)
- Nemoc chladových aglutininů (CAD, CAS)
- Kombinovaný typ (tepelné + chladové protilátky)
- Paroxysmální chladová hemoglobinurie (PCH)

- Atypická AIHA
- Poléková AIHA

WAIHA

Warm-antibody AIHA

- obvykle IgG, ale i IgM nebo IgA
- při saturaci autoantigenů se nacházejí i volně v séru
- 67% IgG+C3, 20% pouze IgG, 13% pouze C3
- dobře reagují v přítomnosti potenciátorů (PEG, enzym)
- tepelné hemolyziny účinné při 37°C

Charakteristika WAIHA: Klinicky HA. PAT+. Abs v séru 37°
Obvykle reakce Abs se všemi typy erys (nespecifické proti autoAg, proti Rh autoantigenům)

WAIHA

- idiopatická vs. sekundární forma
- všechny věkové skupiny/ženy
- extravaskulární hemolýza – hepatosplenomegalie
- transfuzní praxe: testy k vyloučení aloprotilátky, zvážit klinický význam autoprotilátek
- erytrocytové přípravky dle shody antigenů Rh-K
- problémy v testech 37°C a při zkoušce kompatibility
- léčba (kortikoster., IVIG, imunosuprese, splenektomie)

CAD

Cold agglutinin disease

- přítomny **patologické IgM** chladové protilátky
- PAT+ pro C3 (vzácně i IgM)
- přítomnost protilátek v solném testu při 20° a 4°C
- potvrzení patologických aglutininů
 - titr vyšší 256 při 4°C, se zvýšením teploty se titr snižuje

Charakteristika CAS: Klinicky HA. PAT+ pro C3. Přítomnost patologických chladových autoaglutininů (titr, teplotní reaktivita).

CAD

- idiopatická vs. sekundární forma
- obvykle chronické onemocnění, vyšší věk
- někdy akutní těžká i.v. hemolýza
- autoaglutinace při laboratorní teplotě (KO,KS)
- specifické autoprotiátky anti-I, anti-i, anti-Pr, anti-HI..
- transfuzní praxe: diskrepance při stanovení AB0 skupiny (provádění testů při 37°C, někdy problém v testech 37°)
- význam předeřítí transfuzních přípravků
- léčba (zákl.onemocnění, chemoterapie)

Kombinovaná AIHA

- vzácná, často se SLE
- tepelné+ chladové protilátky
- obvykle PAT+ pro IgG a C3
- v séru jsou IgG 37°-reaktivní protilátky spolu s vysokotitrovými a do vysoké teploty reagujícími chladovými autoaglutininy
- někdy IgG 37°-reaktivní protilátky spolu s chladovými aglutininy v nízkém titru, avšak se širokou teplotní amplitudou

PCH

Paroxysmal cold hemoglobinuria

- autoprotilátkou je bifázický hemolyzin Donath-Landsteinerův
- IgG protilátka, obtížně detekovatelná v NAT (specifická anti-P)
 - v chladu 0°C senzibilizuje erys, při 37° je hemolyzuje – cirkuluje v krvi
- PAT silně pozitivní pro C3
- Donath Landsteinerův test k průkazu protilátky
- bývá u dětských pacientů/chřipka
- známky akutní a těžké i.v.hemolýzy

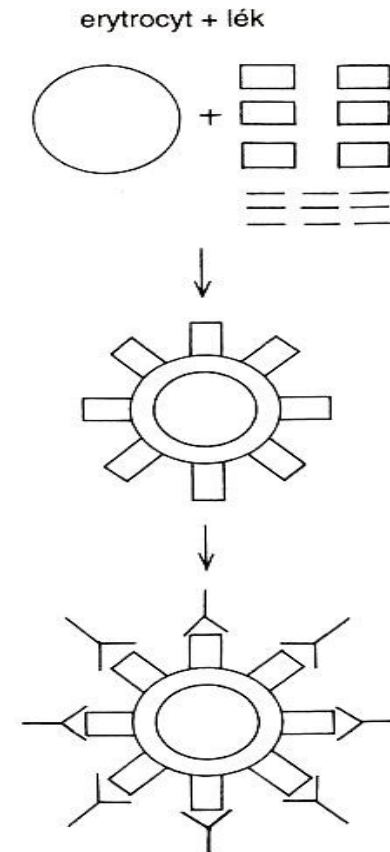
DIHA


Drug-induced immune hemolytic anaemia

- klasické dělení na typ imunní
 - hapténový + adsorpce léku, vznik imunokomplexů, indukce pravé AIHA
- typ neimunní
 - nespecifická adsorpce proteinů
- společný jmenovatel = vznik neoantigenu na erys
- průběh různě závažný
- hemolýza končí s vysazením léku
- někdy PAT+ po několik let bez hemolýzy

Adsorpce léku + haptenu = protilátky proti léku

- PNC,CFS
- nespecifická adsorpce léku navodí imunitní odpověď
- záleží na poměru Ag/Ab
- IgG (C3) protilátky
- i.v. hemolýza



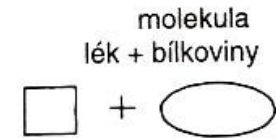
 = protilátky
IgG proti léku se vážou na haptenu (např. Penicilin). Při aktivaci komplementu dojde k hemolýze.

Imunokomplexy

m = protilátky proti komplexu
u = lék + plazmatické proteiny
n =

o
k
o
m
p
l
e
x
y

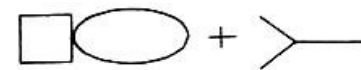
- chinidin
- lék + proteiny plazmy = imunogen
- proti němu Ab
- imunní komplex imunogen + protilátka
- nespecifická adsorpce na ery
- může se aktivovat komplement
- nově: lék + membrána = neoantigen, proti němu vzniká Ab
- IgM (IgG), C3
- i.v. i extr.v. hemolýza



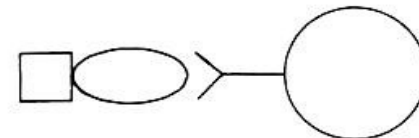
komplex léku
a bílkoviny



imunokomplex
váže komplement



imunokomplex
se váže na
erytrocyt

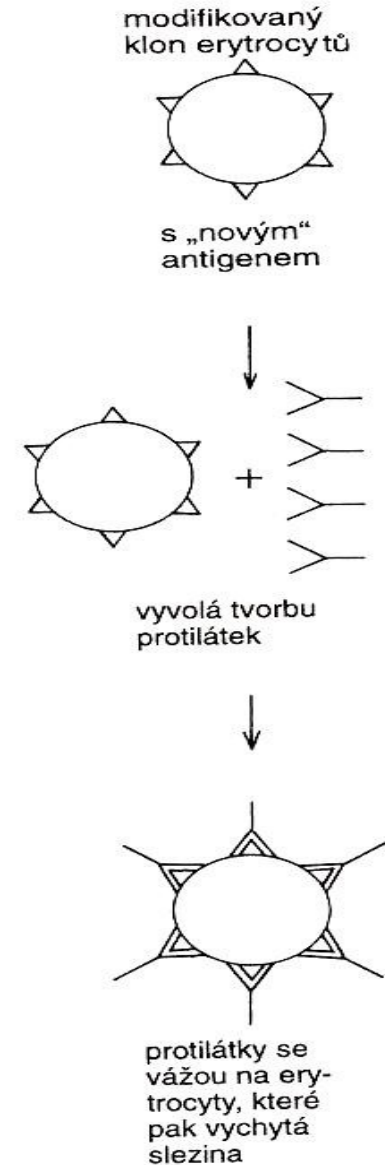


komplement se
aktivuje a vyvolá
hemolýzu

Indukce AIHA

= vznik autoprotilátek proti vlastním antigenům

- methyldopa
- porucha supresorové funkce T bb.
- nelze odlišit od WAIHA
- protilátky proti Rh antigenům
- IgG dlouhodobě i několik let
- extr.v. hemolýza



Non-imunogenní modifikace membrány

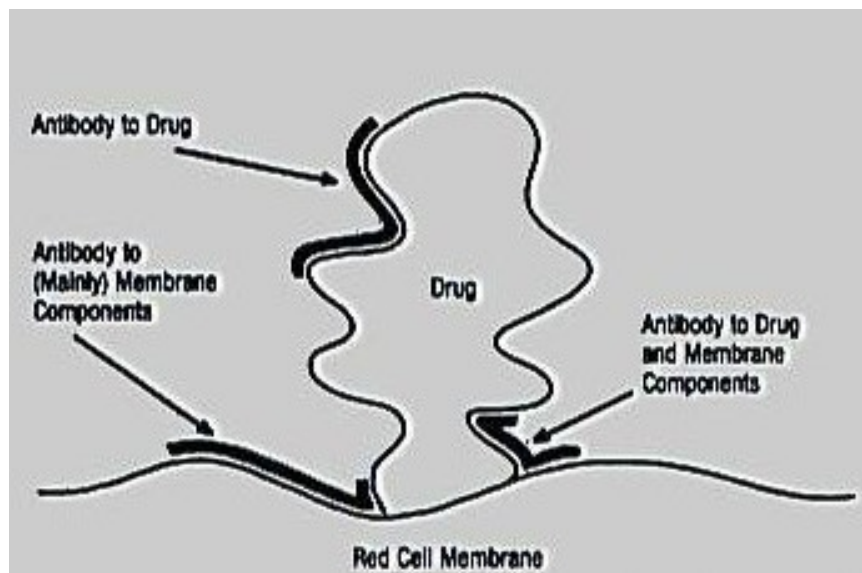
= pasivní navázání plazmatických proteinů na ery

- CFS
- nejedná se o reakci Ag+Ab
- IgG,IgM,IgA,komplement, globuliny
- nebývá hemolýza

DIIHA

adsorpce

autoprotiřátky



imunní komplex

- Dneřní **sofistikovanějš** paradigma: 2 kategorie DIIHA
 - Adsorpce léku (haptenu)- tzv. **penicilinový typ**
 - Imunní komplexy - tzv. **jiný než penicilinový typ**

SEROLOGIC CHARACTERISTIC OF AIHA

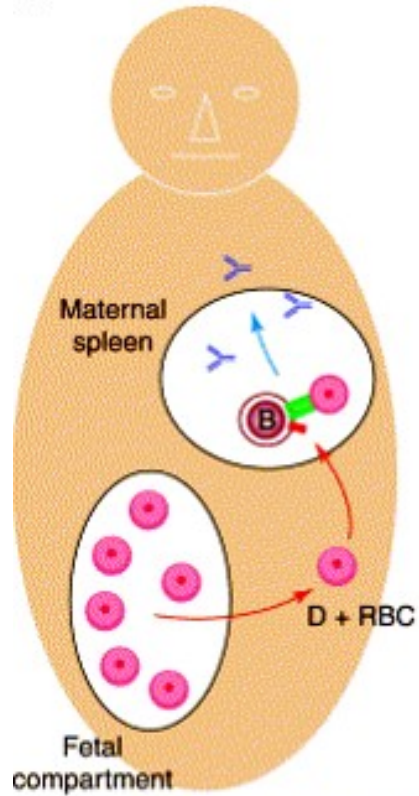
	Ig type	DAT	Rbc eluate	Specificity
Warm	Ig G (+A/M)	Ig G+/M	Ig G	Panreactive
CAS	Ig M	C3	NR	I>i>>Pr
PCH	Ig G	C3	NR	P
Mixed	Ig G,M	Ig G = C3	Ig G	Panreactive
Drug	Ig G	Ig +/C3	Ig G	Often Rh related

Hemolytické onemocnění novorozence

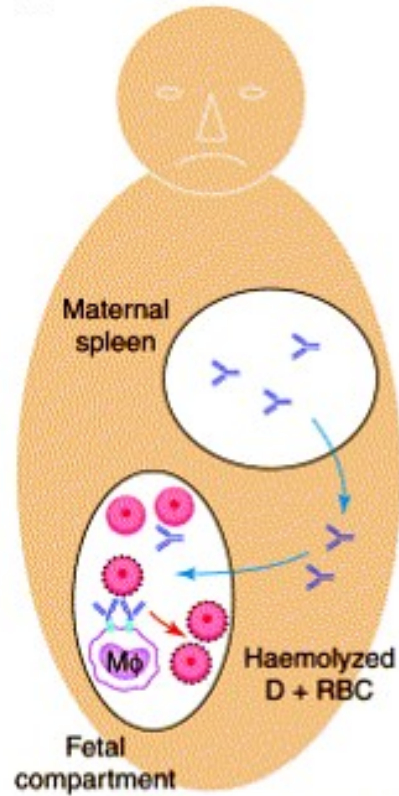
Hemolytické onemocnění novorozence HON






- hemolýza erytrocytů fetu/novorozence způsobená mateřskými protilátkami
- protilátky proti paternálním antigenům plodu
- nejčastější v AB0 skupině (matka 0, dítě A nebo B)
v RhD (matka D-, dítě D+)
- IgG jsou ve fetálním oběhu cca od 12. týdne
- jsou aktivně vychytávané FcRs placenty
- různá závažnost onemocnění

(a) Immunization of mother



(b) Haemolysis of fetal RBC



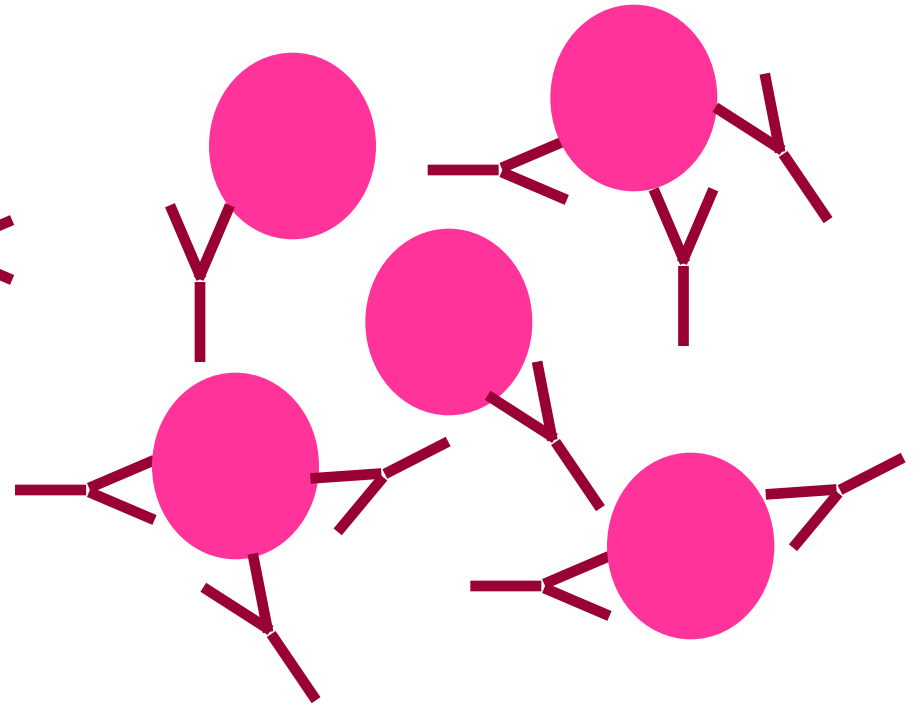
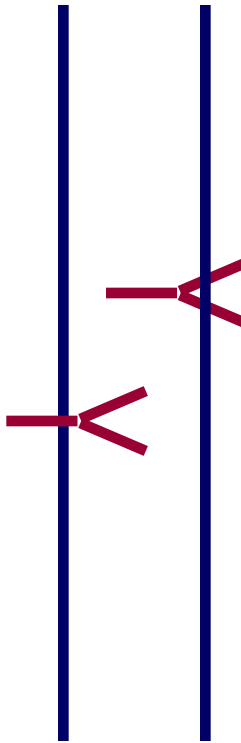
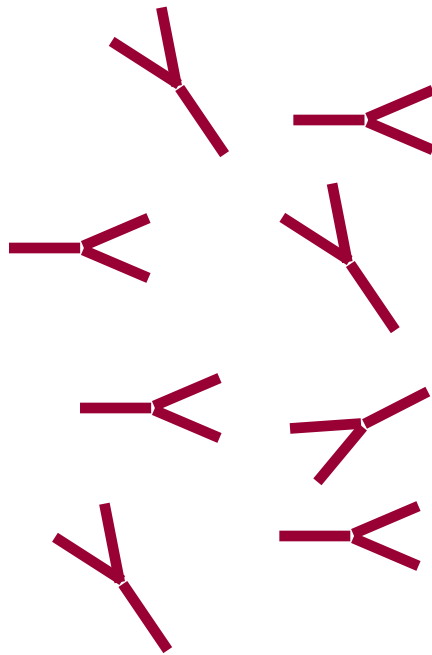
-  Anti-D (maternal)
-  Anti-D (passive, prophylactic)
-  BCR, membrane Ig
-  Fc γ RIIb
-  Fc γ RI and Fc γ RIIIa

HON

Pos NAT

placenta

Pos PAT



matka

fetus

Riziko fetální anemie

souvislost s typem mateřské protilátky

1 Vysoké riziko	Rh(D)	Rh(c)	K				
2 Střední nebo nízké riziko	Rh(C)	Rh(E)	Fy ^a	Kp ^b	JK ^a	C ^w	S
3 Bez rizika	M	Le ^a					

Anti-K: suprese erythropoezy – málo progenitorů = anemie, navíc hemolýza. Nepřevažuje ikterus.

Aloimmunizace v těhotenství

Fetomaternální krvácení (FMH)

Spontánní u 3% žen během těhotenství

Při porodu

> 50% porodů FMH do 0.2ml

<1% porodů FMH > 2.5mL

- obvykle množství FMH menší než 0,1ml erytrocytů nevede k aloimunizaci matky
- 0,1ml fetálních erys může sensibilizovat 30% primigravidit
- imunitní odpověď matek se výrazně liší

- v sekundární imunitní odpovědi u další gravidity je vyšší riziko HON
- riziko postižení/anemie novorozence u dalších Rh inkompatibilních gravidit až 70%
- predikce postižení chybí u AB0 neshodných gravidit
- fetální anemie, hyperbilirubinemie, extramedulární erythropoesa, hepatosplenomegalie, portální hypertenze
- laboratorní testy pouze potvrdí neshodu/ klinický nález

Jiné imunitní cytopenie

- Aloimunní fetální/novorozenecká trombocytopenie
 - Nejčastěji protilátky proti HPA-1a, HPA-5b
 - Poporodní klinické projevy v 1. graviditě
 - Vyšetření celé rodiny: Abs u matky, C-M, HPA genotypy
- Aloimunní fetální/novorozenecká neutropenie
- Obě kategorie rizikové pro plod/novorozence – cerebrální krvácení, těžké infekty

Antenatální laboratorní vyšetření těhotných žen - cíl

AB0 a D typizace:

identifikovat RhD negativní ženy, které
vyžadují anti-D profylaxi

Skríning a identifikace protilátek proti erys:

1. detekovat klinicky významné Abs, které
mohou vést k postižení fetu/novorozence
2. předejít možným problémům při
předtransfuzním vyšetření

Laboratorní vyšetření

Těhotné ženy

- AB0 RhD a screening protilátek 2x během gestace (12. a 28. týden)
- RhD negativní ve 28.týdnu anti-D profylaxe
- při nálezu protilátky specifikovat a stanovit význam, určit množství - titrace, sledovat v pravidelných intervalech á 4 týdny
- monitorování plodu – antenatální UZV, amniocentéza, periumbilikální punkce, antenatální genotypizace

Jiné možnosti imunohematologického vyšetření při HON

- Vyšetření antigenů/krevních skupin u otce/stanovení erytrocytárního genotypu otce
- Stanovení genotypu plodu (jen některé alely, lze i neinvazivně z fetální DNA v periferní krvi matky)
- Vyšetření ze vzorků získaných při amniocentéze a kordocentéze

Laboratorní vyšetření

Novorozenci / umbilikální krev

děti matek RhD negativních

děti matek krevní skupiny 0

novorozenci s klinickými symptomy nemoci

- Krevní skupina AB0 RhD
- PAT
- Imunní anti-A, anti-B
- Při pozitivním PAT nepravidelné protilátky proti erytrocytům (lze ze vzorku matky)
- Odlišné strategie jednotlivých pracovišť

Terapeutická intervence u HON

Matka

- IVIG /blokáda FcRs placenty a RES fetu
- ????? plazmaferéza

Plod/novorozenecek (korekce anemie)

- intrauterinní transfuze
- fototerapie
- výměnná (exsanguinační) transfuze
- IVIG
- substituční transfuze

Například

AB0 typ HON

- nejčastěji matka 0 x dítě A
- screening protilátek negativní
- v séru novorozence imunní anti-A (-B)
- PAT novorozence negativní nebo pozitivní
- transfuze erytrocytů kompatibilních pro matku i dítě v AB0 antigenech

Například

RhD HON (při anti-D)

- Matka RhD negativní x dítě RhD pozitivní
- Protilátka anti-D (v séru dítěte i matky)
- PAT novorozence pozitivní
- Transfuze RhD negativních erytrocytů

Například

HON při jiných známých protilátkách (anti-K,-Fy,-S)

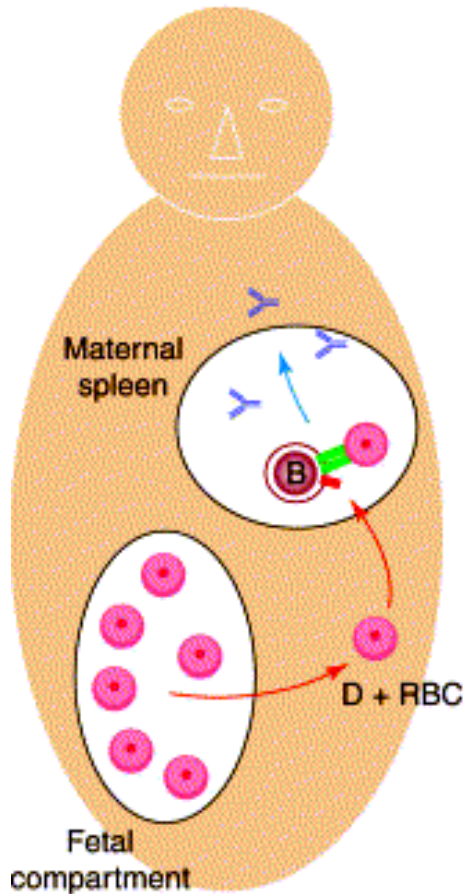
- Odlišné krevní skupiny matky a novorozence (K,Fy,S)
- Příslušná protilátka v séru matky i dítěte
- PAT pozitivní
- Transfuze erytrocytů bez odpovídajících antigenů

Management HON - prevence

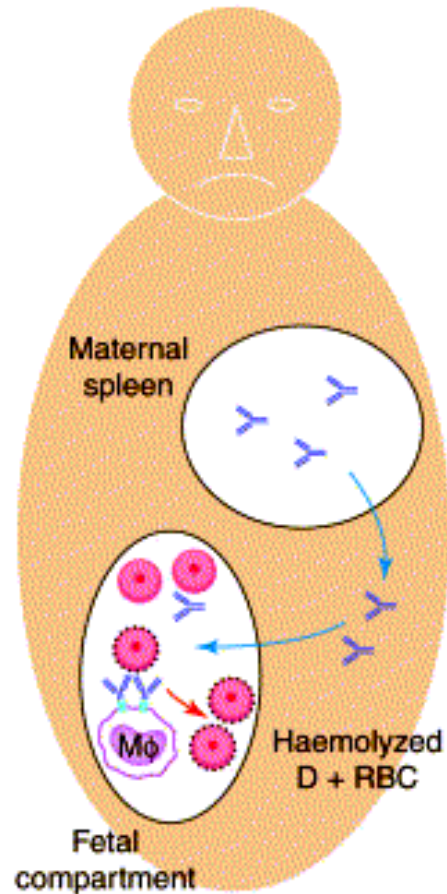
1. RhD negativní ženy = RhD negativní transfuze
2. anti-D profylaxe RhD negativních žen během gravidity, po porodu RhD+ dítěte, při invazivních výkonech v průběhu gravidity: 20ug anti-D i.m./1ml ery
 - dávka 100 ug (tj. 500 IU) anti-D potlačí imunizaci 4-5ml RhD+ ery /nebo 10ml RhD+ plné krve
 - vynikající efekt profylaxe, ne zcela jasný mechanismus působení

RhD immunization and prophylaxis

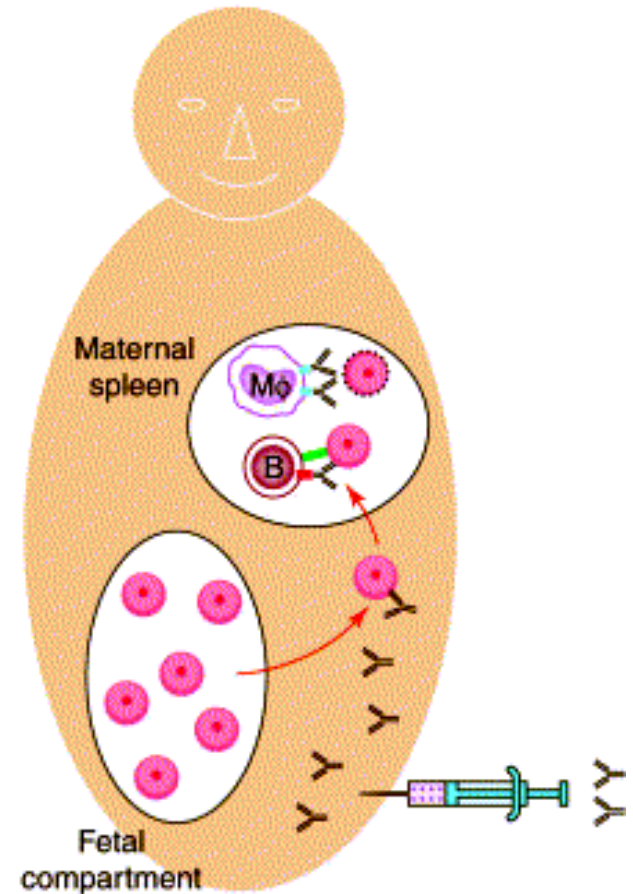
(a) Immunization of mother



(b) Haemolysis of fetal RBC



(c) Prevention of immunization



- Anti-D (maternal)
- Anti-D (passive, prophylactic)
- BCR, membrane Ig
- FcγRIIb
- FcγRI and FcγRIIIa

- Movement of RBC
- Movement of anti-D