

Autoimunitní hemolytické anemie

Anemie

Vznikají

- Akutně posthemoragicky
- Z poruchy tvorby erytrocytů (syntéza Hb, DNA, aplastické)
- Ze zvýšené ztráty erytrocytů
 - Extravaskulární
 - Intravaskulární

Dle příčiny

- Korpuskulární (porucha membrány, metabolismu, struktury Hg)
- Extrakorpuskulární
 - Imunitní (aloprotilátky, autoprotilátky)
 - Neimunitní (příčiny fyzikální, chemické, MAHA)

Hemolytické anemie - definice

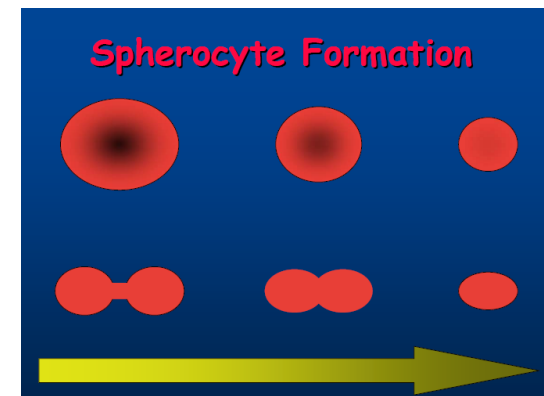
Skupina onemocnění charakterizovaná
zkráceným přežíváním erytrocytů

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



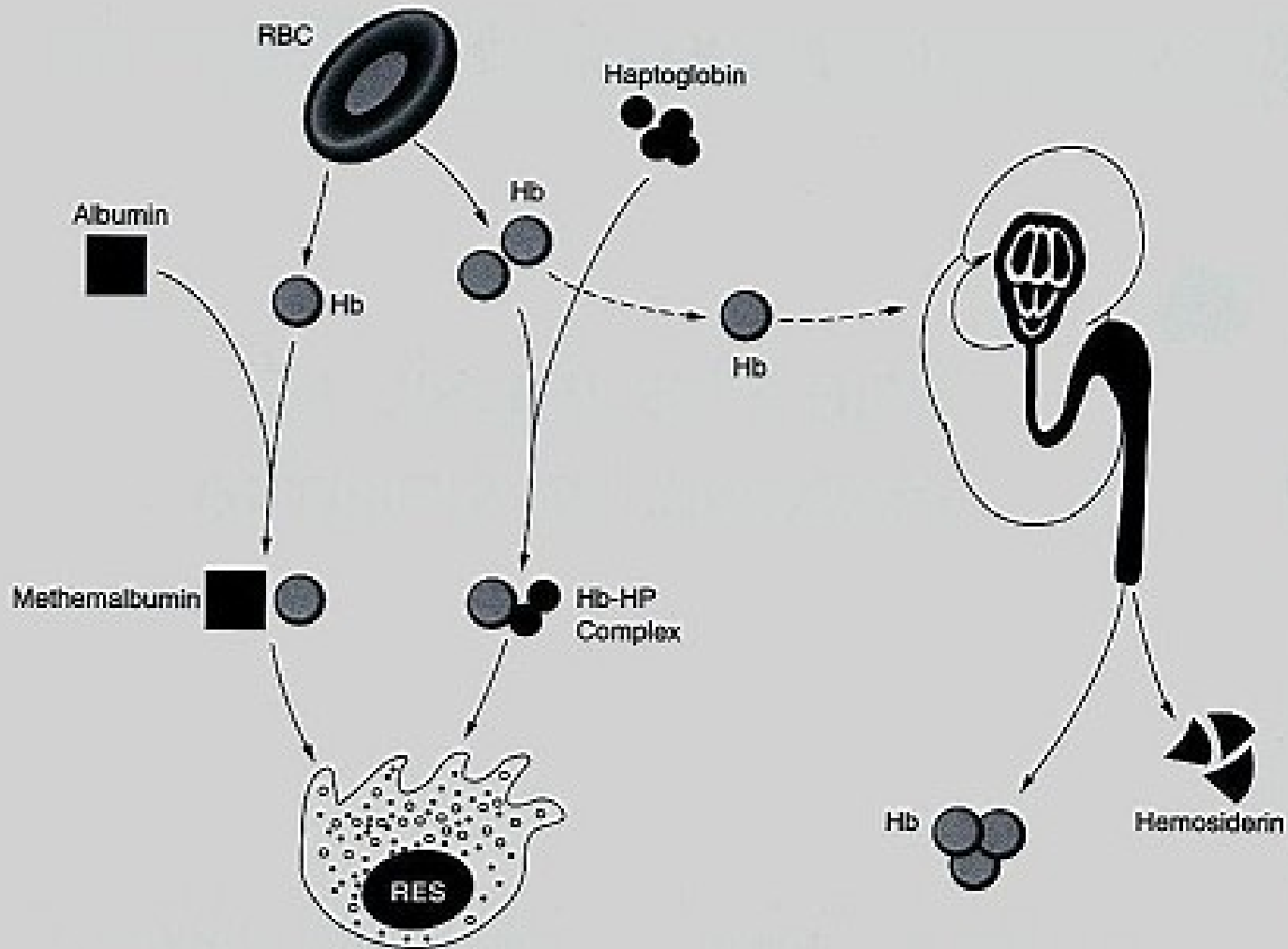


FIGURE 2-1. The destruction of red blood cells (RBCs) intravascularly results in the liberation of hemoglobin (Hb) from the RBC. The Hb combines with haptoglobin (HP), and the HP-Hb complexes are rapidly catabolized in the reticuloendothelial system (RES), resulting in low levels of serum Hp. Also, when 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.

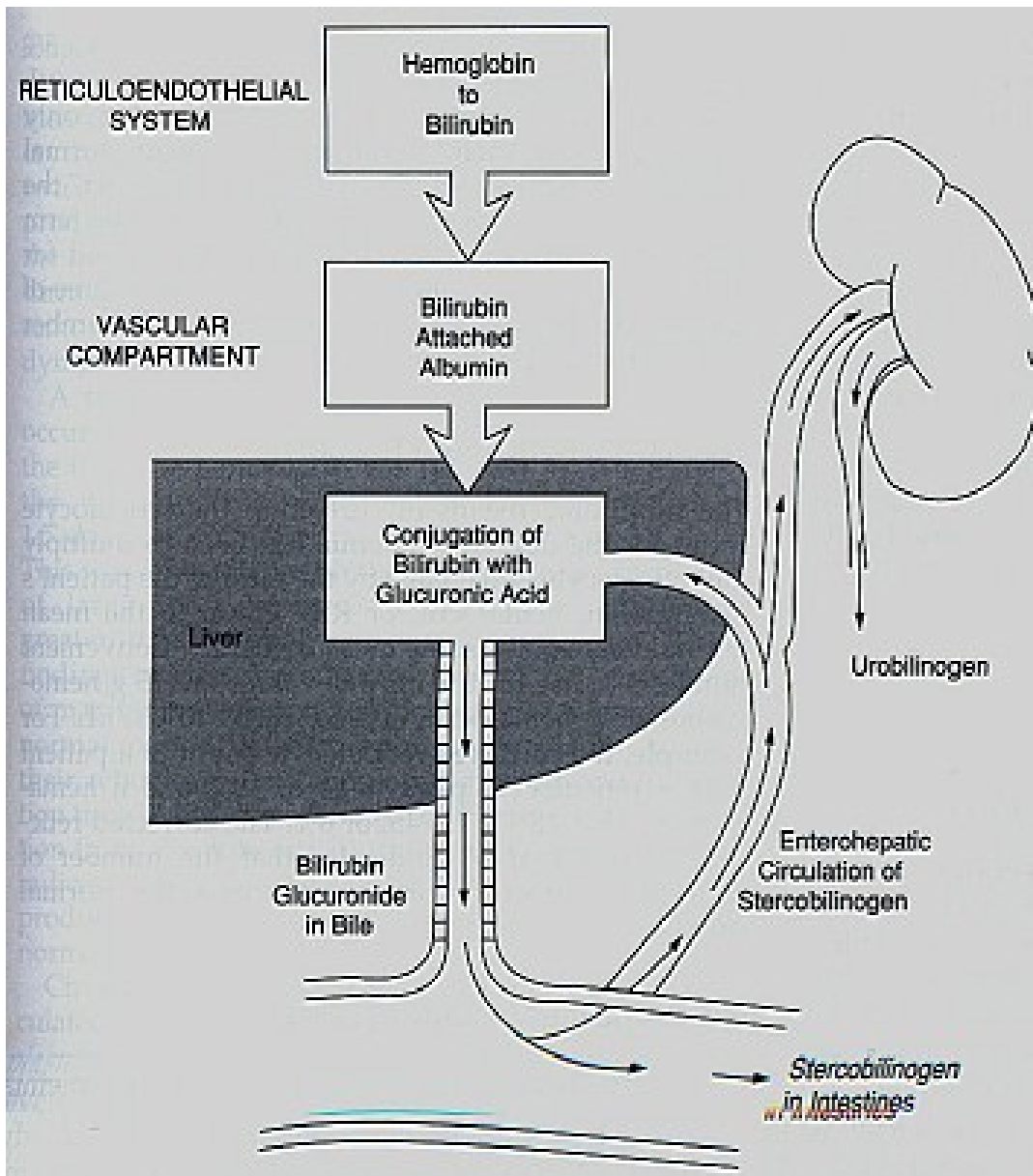


FIGURE 2-2. The destruction of RBCs extravascularly within the cells of the reticuloendothelial system results in the degradation of hemoglobin and the production of bilirubin. The bilirubin passes into the plasma, forms a loose complex with albumin, and is taken up by the liver, where it is conjugated 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.

Hemolýza při autoimunitě

Normální situace: Vybalancovaný stav imunitního systému, je zajištěna ochrana proti autoreaktivním lymfocytům.

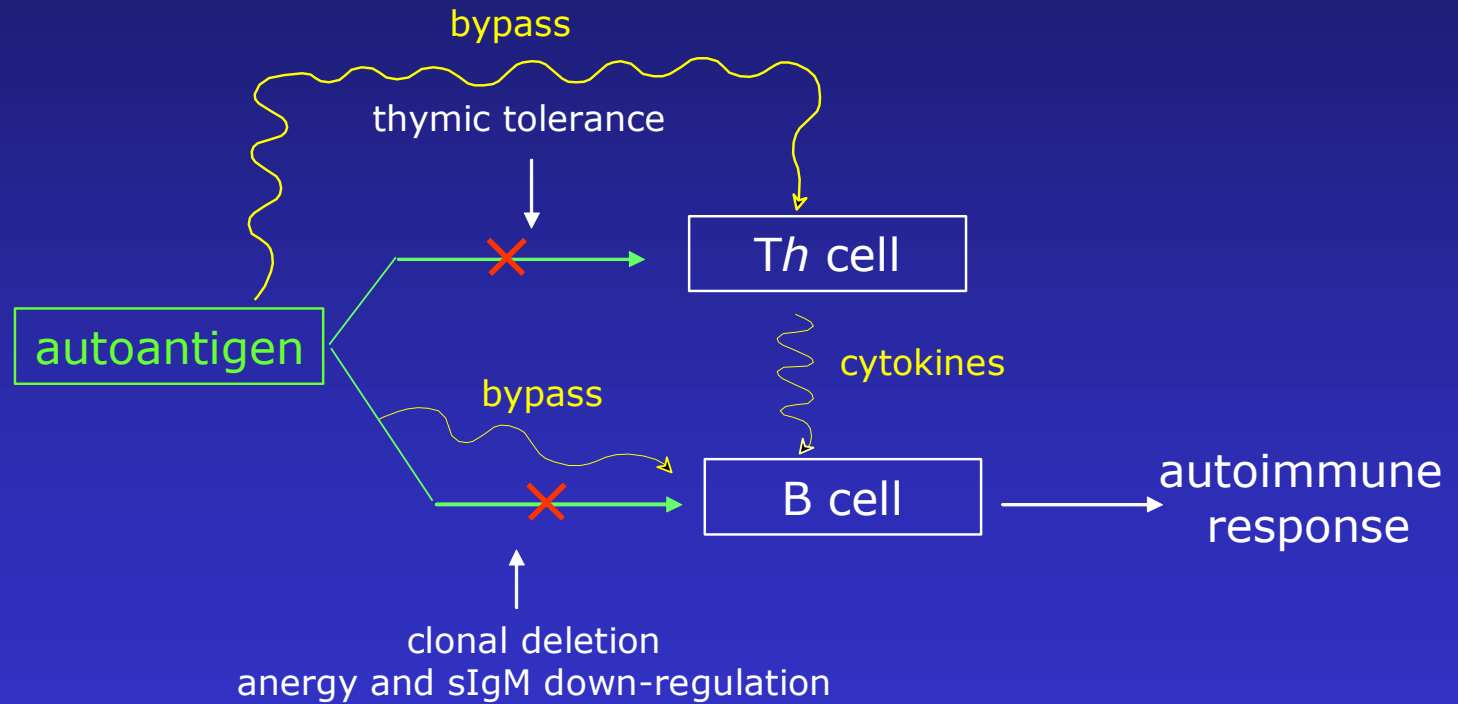
Mechanismy udržení této rovnováhy:

Eliminace/delece klonů , ignorance pro autoAg v podprahovém množství nebo kryptantigeny, anergizace při chybějící kostimulaci, Bbb. cytokinová pomoc, Th profesinální APC, aktivní působení T_{REG}

Imunologická tolerance zajišťuje, že organizmus nereaguje na autoantigeny.

Porucha autoimunity nastává při „úniku“ buněčného klonu z toleranční kontroly = vznik **autoprotilátek**= rozvoj autoimunitních onemocnění (AIHA)

Autoimmunity arises through bypass of the control of auto-reactivity



Patogeneze autoimunitní hemolytické anemie

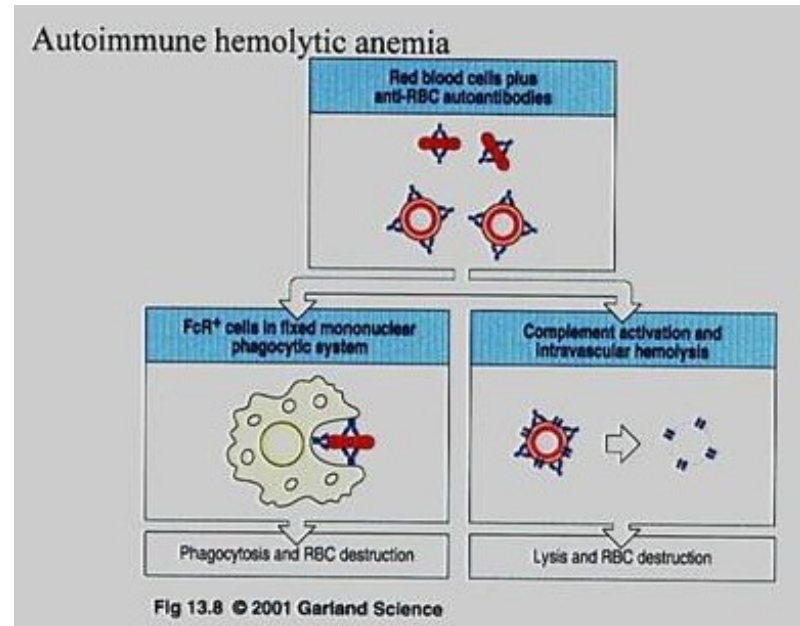
Vznik IgG protilátek proti autoantigenům erytrocytů
Pomáhá tomu patologická subpopulace T_h lymfocytů
a dysregulace prolifерujících T_{reg}

- „Spící“ autoreaktivní T_h lymfocyty mohou být aktivované cross-reaktivními alloantigeny, autoantigeny, mikrobiálními superantigeny, změnami v procesu prezentace a zpracování antigenu

AIHA patogeneze

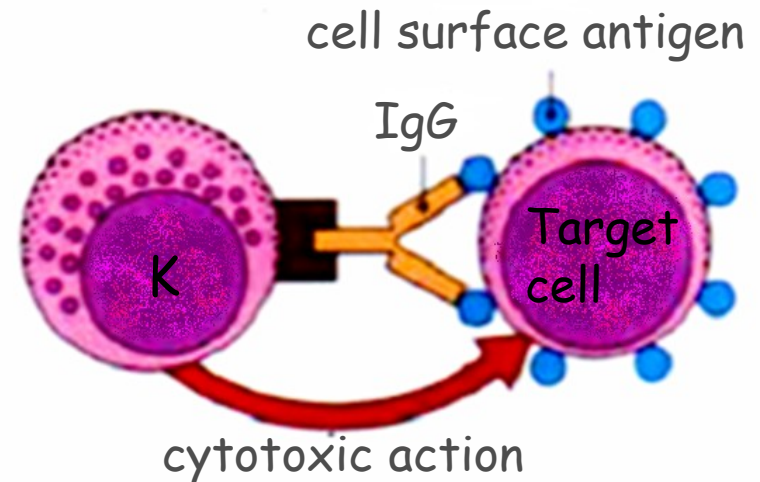
Autoprotilátky proti erys: IgG nebo IgM včetně C3

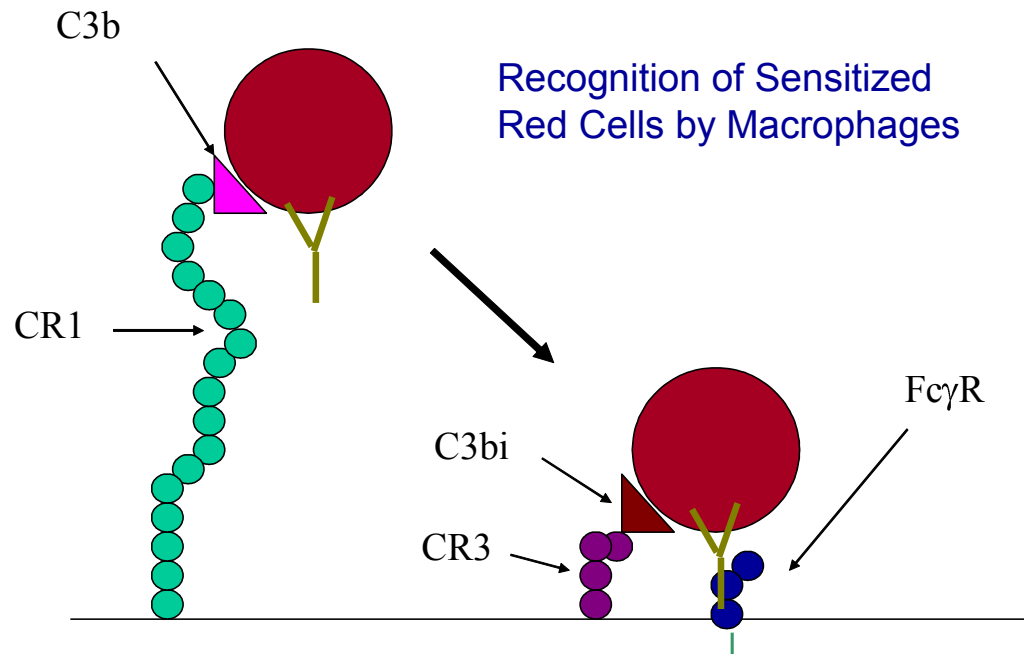
- Erys + **IgG** reagují s FcγRs makrofágů v RES fagocytozou – sferocyty – extravaskulární lýza
- Erys + **C3** reagují s CRs makrofágů fagocytozou – extravaskulární nebo také intravaskulární lýza



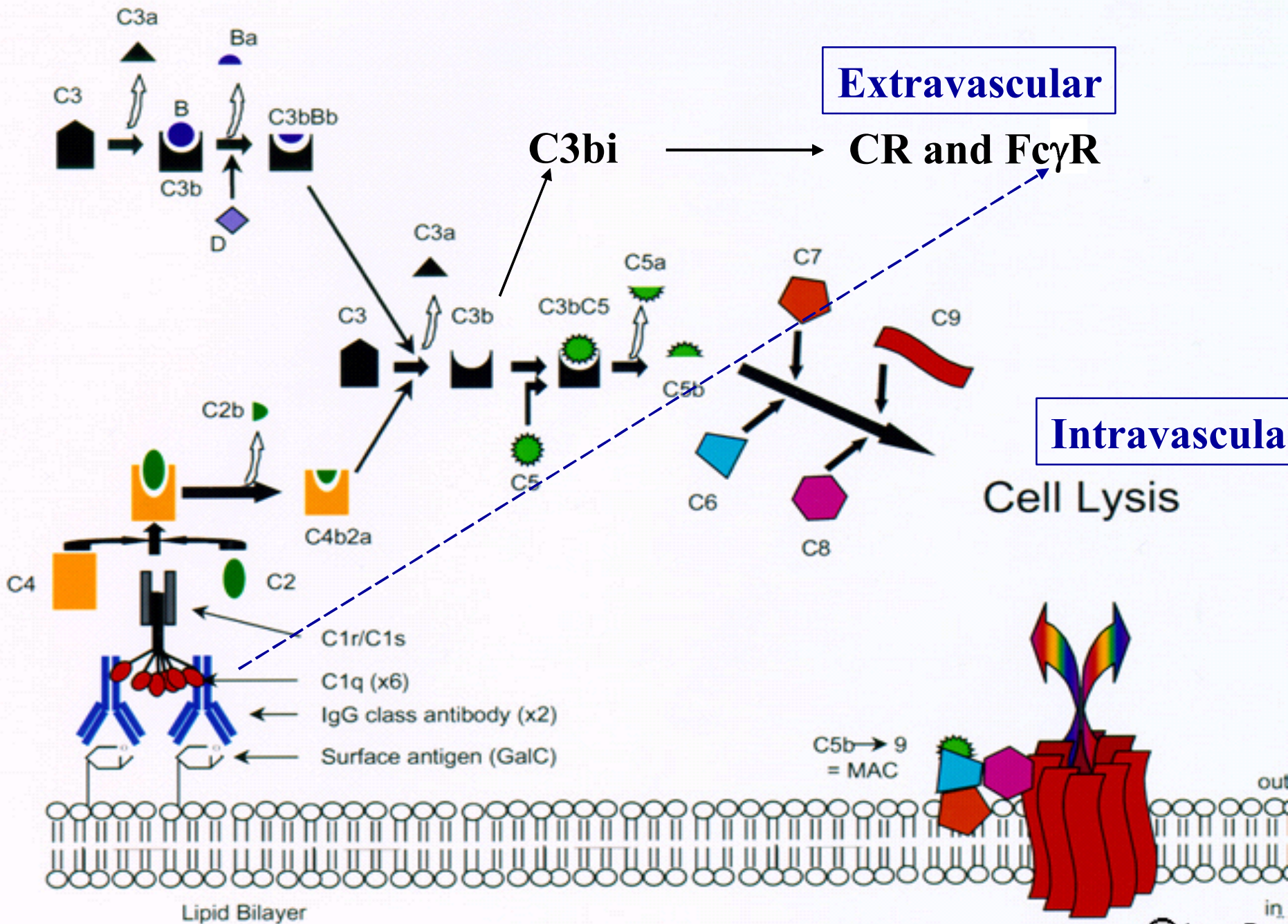
AIHA patogeneze

2. Současně (nebo také samostatně) působí mechanismy přímé buněčné cytotoxické odpovědi makrofágů (K bb.)
3. Jiné mechanismy (NK bb., neutrofily, bystander hemolýza)





- Z hlediska fagocytozy mají oba opsoniny (Ig a C) synergický účinek:
1. vazba s C umožňuje lepší přichycení a rozpoznání antigenu
 2. vazba s Ab umožňuje lepší pohlcení (fagocytoza)



Imunní hemolýza

- intravaskulární hemolýza

- Když protilátka aktivuje komplement až po C9
- klasická cesta aktivace C - „killer“ molekula - ruptura ery + uvolnění Hb do plazmy
- je přítomna hemoglobinemie a hemoglobinurie
- Ab **IgM** (málo často IgG1)

Imunní hemolýza

-extravaskulární hemolýza

- když **IgG** neaktivují komplement
- **nebo** pokud neproběhne kompletní aktivace až k lýze ery (u **IgM aktivace jen do C3**)
- ery je „jen“ rozpoznán a fagocytován v RES, nenastává ruptura erys
- fagocytoza v Kupfer.bb. jater, červené pulpě sleziny

Imunní hemolytická anemie - klasifikace

Dělení podle příčiny:

- způsobené autoprotilátkami
- způsobené aloprotilátkami
- způsobené léky

Co ovlivní hemolýzu?

Vlastnosti protilátky

- teplotní amplituda
- titer 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 imunní hemolýzy: PAT + NAT

Existují další klinické a laboratorní souvislosti, suspektní pro autohemolýzu:

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

1. Laboratorní vyšetření při autoprotilátkách: Pozitivní PAT

- pravé autoAbs proti autoantigenům erytrocytů
- Abs proti léku navázaném na erytrocyty

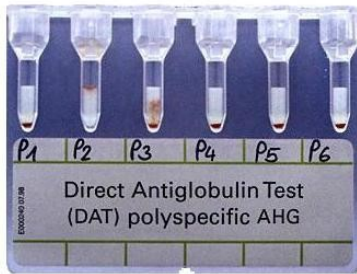
Také

- Abs dárce krve transfundované plazmou
- Abs u příjemce transfuze nebo transplantátu
- mateřské Abs proti erys fetu (cross placentou)

Určení PAT

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

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



Negative

Negative

< 2+

Very weak positive

≥ 2+

Monospecific DAT card is recommended



Negative

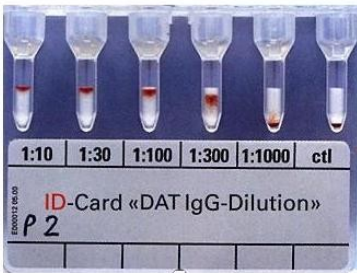
Negative

< 2+ (IgG)

Weak positive (IgG) (not titrated)

≥ 2+ (IgG)

IgG-Dilution (titration) card is recommended



Negative

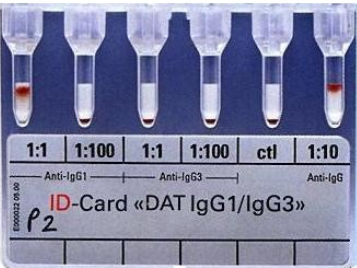
Negative

< = 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

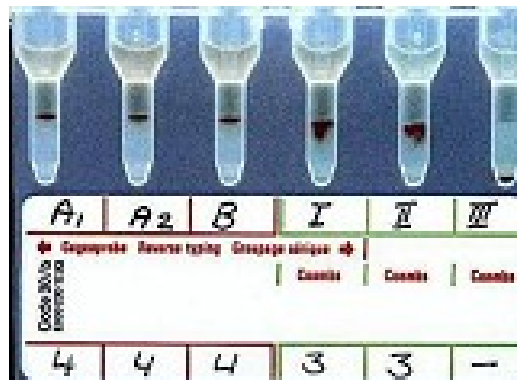
Positive 1:100 – high risk of haemolysis

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

2. Laboratorní vyšetření u AIHA:

NAT

- rutinní vyšetření séra pacienta proti dg. erys 0 (screeningové erys)
- vyšetření při 37°C a 20°C
- došetření teplotní amplitudy a titru aglutininů při pozitivitě v testu při 20°C
- detekce hemolýzy, aglutinace, senzibilizace erys/AGH



Screening spolu s PAT pomůže rozdělit AIHA na typy:

- AIHA s tepelnými protilátkami
- Nemoc chladových aglutininů
- Kombinovaná AIHA
- Paroxysmální chladová hemoglobinurie
- Atypická AIHA
- Poléková AIHA
- AIHA při aloproulátkách (HTR, HDN, transplantace)

WAIHA

Warm-antibody AIHA

- obvykle IgG, ale i IgM nebo IgA autoprotiátky
- 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
- přidání komplementu zvyšuje účinek hemolýzy
- IgM přirozené (nepatologické) chladové aglutininy jako boost-efekt při autoimunitní odpovědi u 1/3 pacientů WAIHA

Charakteristika WAIHA: Klinicky HA. PAT+. Abs v séru 37° +.

Obvykle reakce Abs se všemi typy erys (nespecifické, proti autoAg)

WAIHA

- idiopatická vs. sekundární forma
- všechny věkové skupiny/ženy
- extravaskulární hemolýza – hepatosplenomegalie
- transfuzní praxe: vyloučit aloprotilátky, zvážit klinický význam autoprotilátek
- krev pro antigeny Rh a K pokud možno identická
- problémy v testech 37° a při zkoušce kompatibility
- léčba (kortikoster., IVIG, imunosuprese, splenektomie)

CAD

Cold agglutinin disease

- přítomny **patologické IgM** chladové protilátky
- PAT+ pro C3
- přítomnost aglutininů 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 autoproti látky 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 předeřít 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 bifazický hemolyzin (Donath-Landsteinerův)
- IgG protilátka, obtížně detekovatelná v NAT (teplota ledu)
- v chladu 0°C senzibilizuje erys, při 37°C je hemolyzuje – cirkuluje v krvi
- specifický D-L test: inkubace erys se sérem pacienta při 0°C s další inkubací při 37°C vede k hemolýze
- specifická anti-P
- bývá u dětských pacientů/chřipka
- známky akutní těžké i.v.hemolýzy

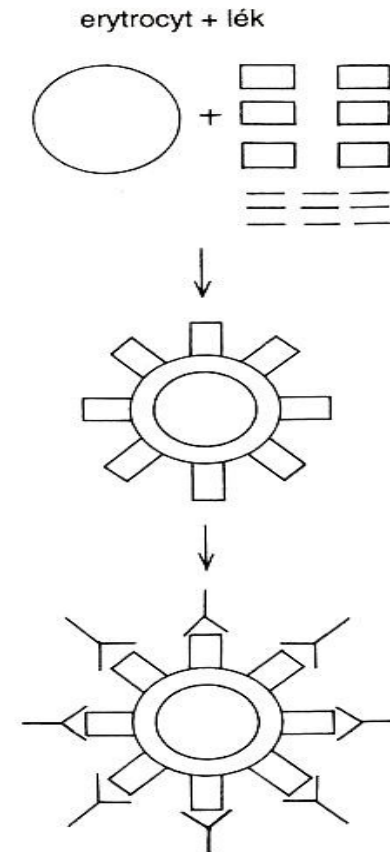
DIHA


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, při vzniku IK akutní a dramatický
- 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 + plasmatické proteiny
n

o
k
o

- chinidin

m • lék + proteiny plazmy = imunogen

p • proti němu Ab
l

e • imunní komplex imunogen + protilátka

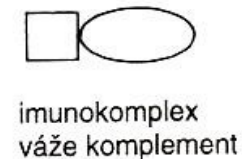
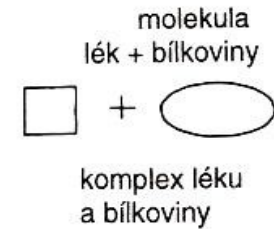
x • nespecifická adsorpce na ery
y

- může se aktivovat komplement

- nově: lék + membrána = neoantigen,
proti němu vzniká Ab

- IgM (IgG), C3

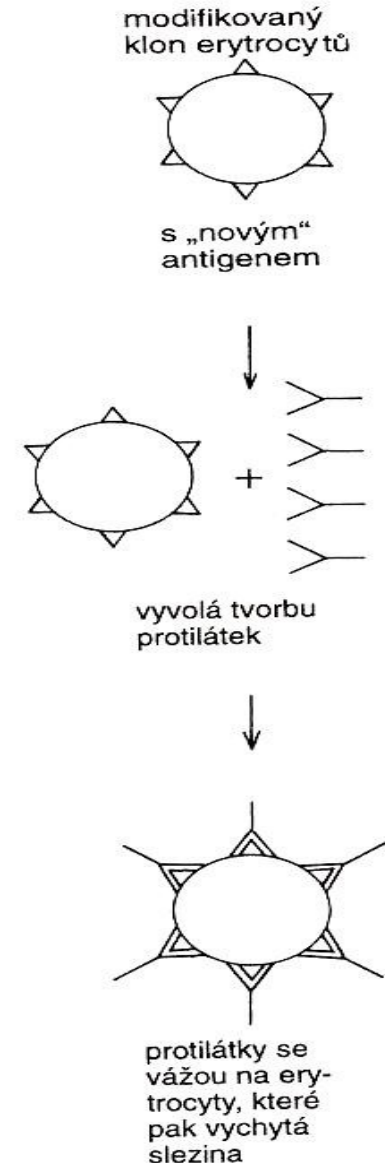
- i.v. i extr.v. hemolýza



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

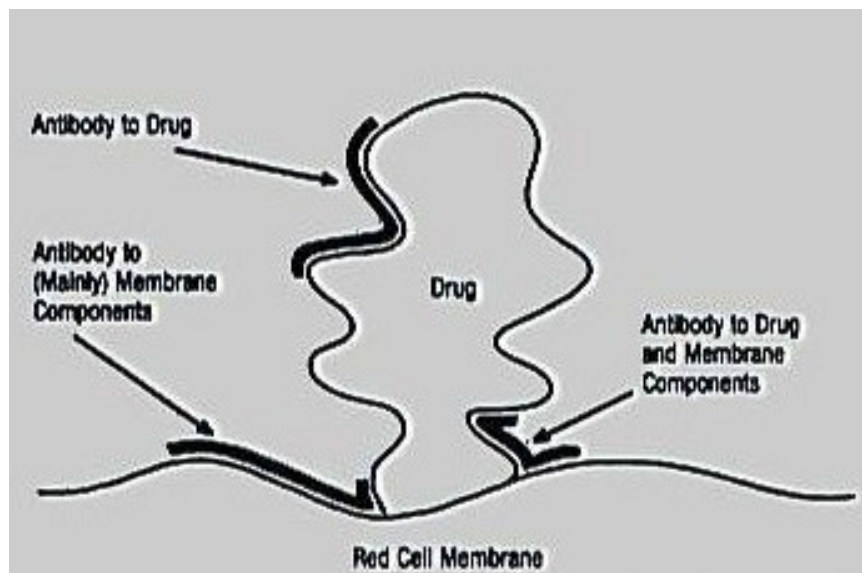
= pasivní navázání plazmatických proteinů na ery

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

DIIHA

adsorpce

autoprotilátky



imunní komplex

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

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria - PNH

- vzácná forma získané HA
- postižena kmenová buňka–abnormálně expandující klon
- mutace PIG A genu/chybí připojení (GPI kotva) cca 20 proteinů na membránu různých bb.
- přechod do AA, AML
- zvýšená citlivost bb. na komplement (při acidifikaci)
- Hamův test s okyselením séra (semi-kvantitativní)
- FCM pro detekci CD55 a CD59
- i.v.hemolýza, trombotické komplikace
- léčba imunosupresivy, transplantace

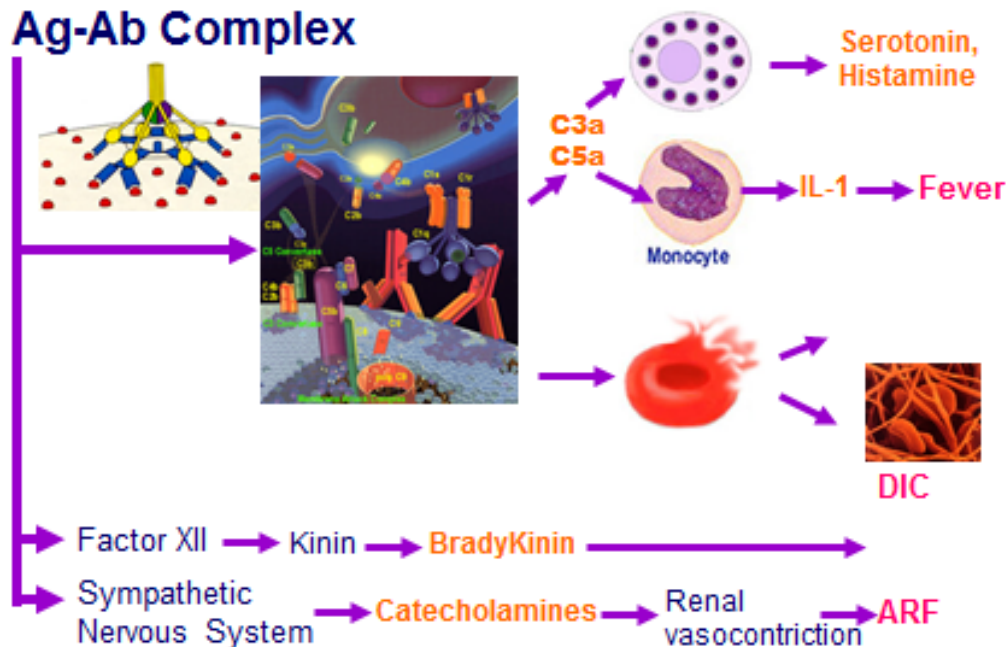
HTR

Hemolytic Transfusion Reaction

- Immunologické riziko spojené s podáním transfuze
- následek stimulace (restimulace) imunitní odpovědi (opakovaný kontakt se stejným Ag)
- vznik ihned nebo 3-14 dní po transfuzi
- PAT+, NAT+, známky HA
- obtížné odlišení od pravé AIHA

- hemolýza intra nebo extra vaskulární
- i.v. hemolýza obvykle při AB0 protilátkách - rychlý průběh reakce (pokles TK, DIK..)
- extr.v. hemolýza při IgG protilátkách – pozvolný průběh, někdy kompenzovaný stav

Pathophysiology of Intravascular Hemolysis



IHA a transplantace

- Asociace s transplantací solidních orgánů i hematopoetických kmenových buněk
- Nezávislá dědičnost KS na HLA genech = odlišné fenotypy KS i při HLA shodě
- Význam hlavně AB0 miss-match
- Jiné typy protilátek
 - často proti Ags Rh, Jk, vzestupný titr až do D70
 - primární i sekundární typ imunitní odpovědi obvykle dárcovských lymfocytů
- 3 typy: „major, minor, bidirectional“

Univerzální schema

Neshoda	dárce	příjemce	erytrocyty	plazma a trombocyty
Malá	0	A	0	A nebo AB
	0	B	0	B nebo AB
	A	AB	A nebo 0	AB
	B	AB	B nebo 0	AB
Velká	A	0	0	A nebo AB
	B	0	0	B nebo AB
	AB	0	0	AB
	AB	A	A nebo 0	AB
	AB	B	B nebo 0	AB
Kombinovaná	A	B	0	AB
	B	A	0	AB

Rh faktor	Rh+	Rh-	Rh+nebo Rh-	Rh+nebo Rh-
	Rh-	Rh+	Rh-	Rh-

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

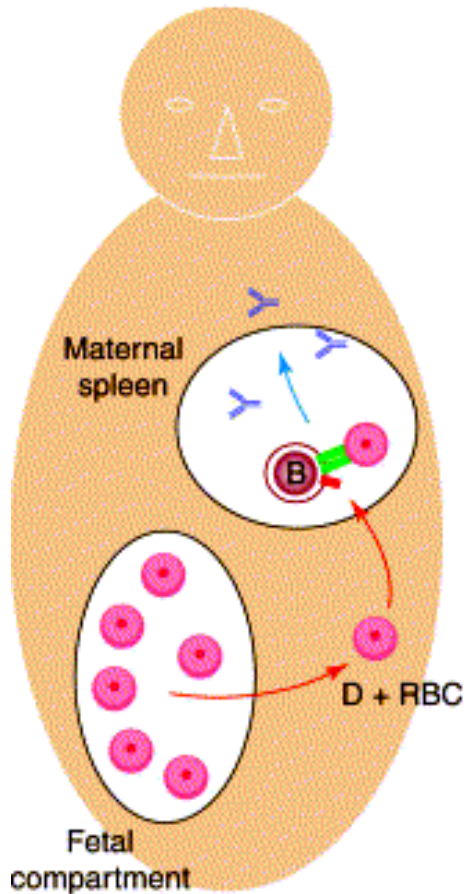
Hemolytické onemocnění novorozence

HON

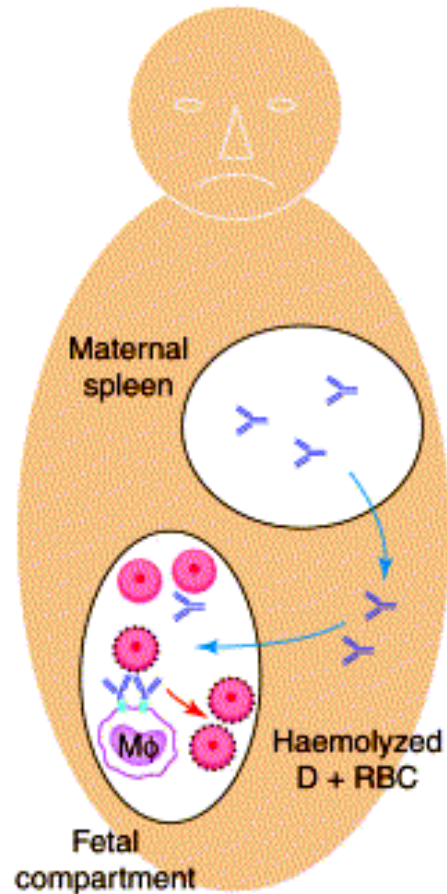
- hemolýza erytrocytů plodu způsobená mateřskými protilátkami
- protilátky namířené proti paternálním antigenům na erys plodu (při neshodě se skupinou matky)
- nejčastější AB0 a Rh(D)
- IgG jsou ve fetálním oběhu cca od 12. týdne, jsou aktivně vychytávané FcRs placenty
- v době termínu porodu bývá množství Abs v krvi fetu vyšší než v krvi matky
- různá závažnost onemocnění těžké-střední-lehké (podle specifity, množství a vlastností Ig, aktivity RES fetu aj.)

RhD immunization and prophylaxis

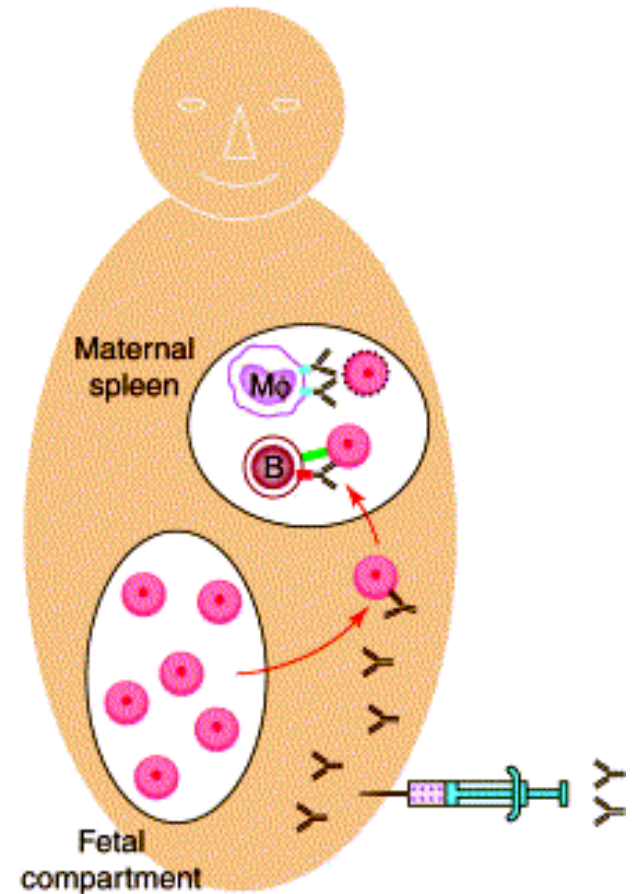
(a) Immunization of mother



(b) Haemolysis of fetal RBC



(c) Prevention of immunization



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

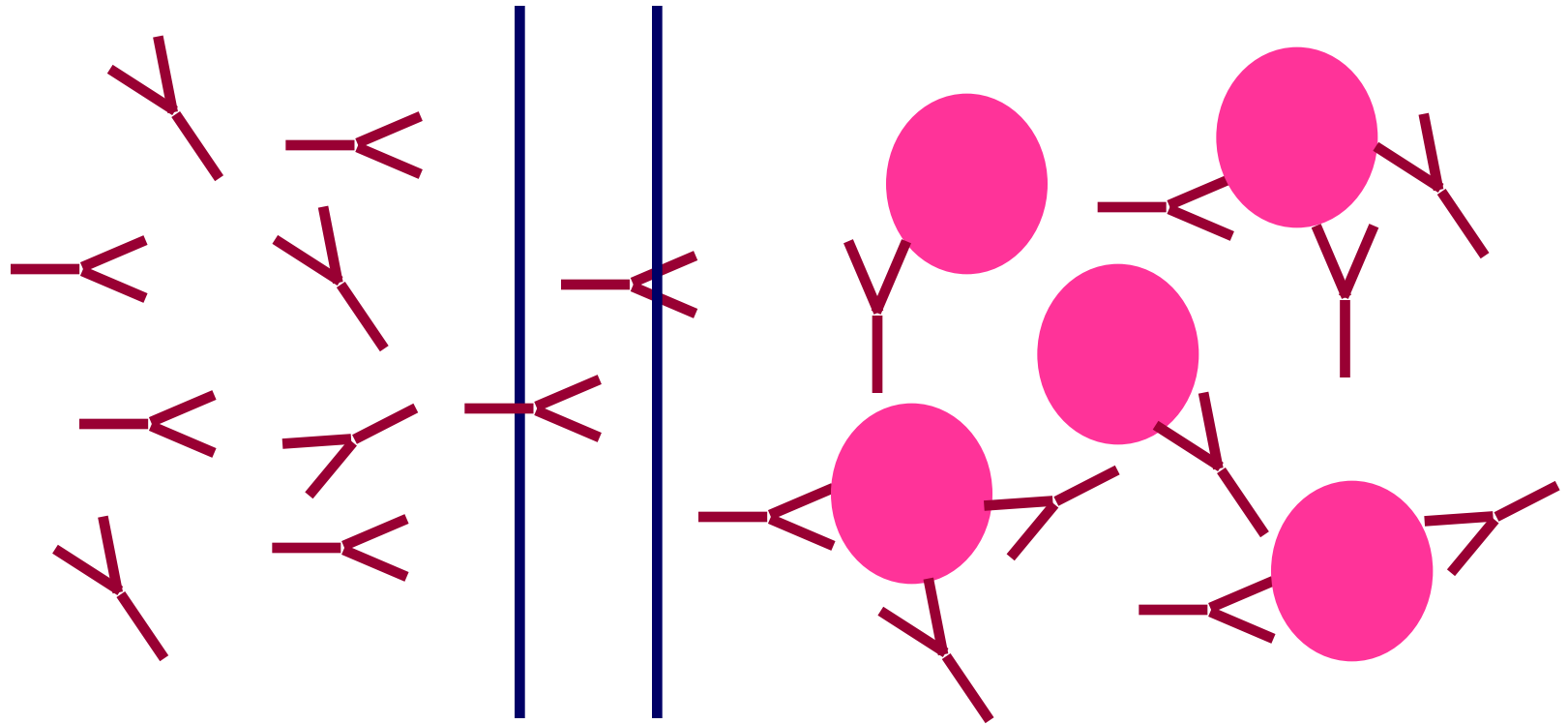
- Movement of RBC
- Movement of anti-D

Mechanism of HDN

Pos IAT

placenta

Pos DAT

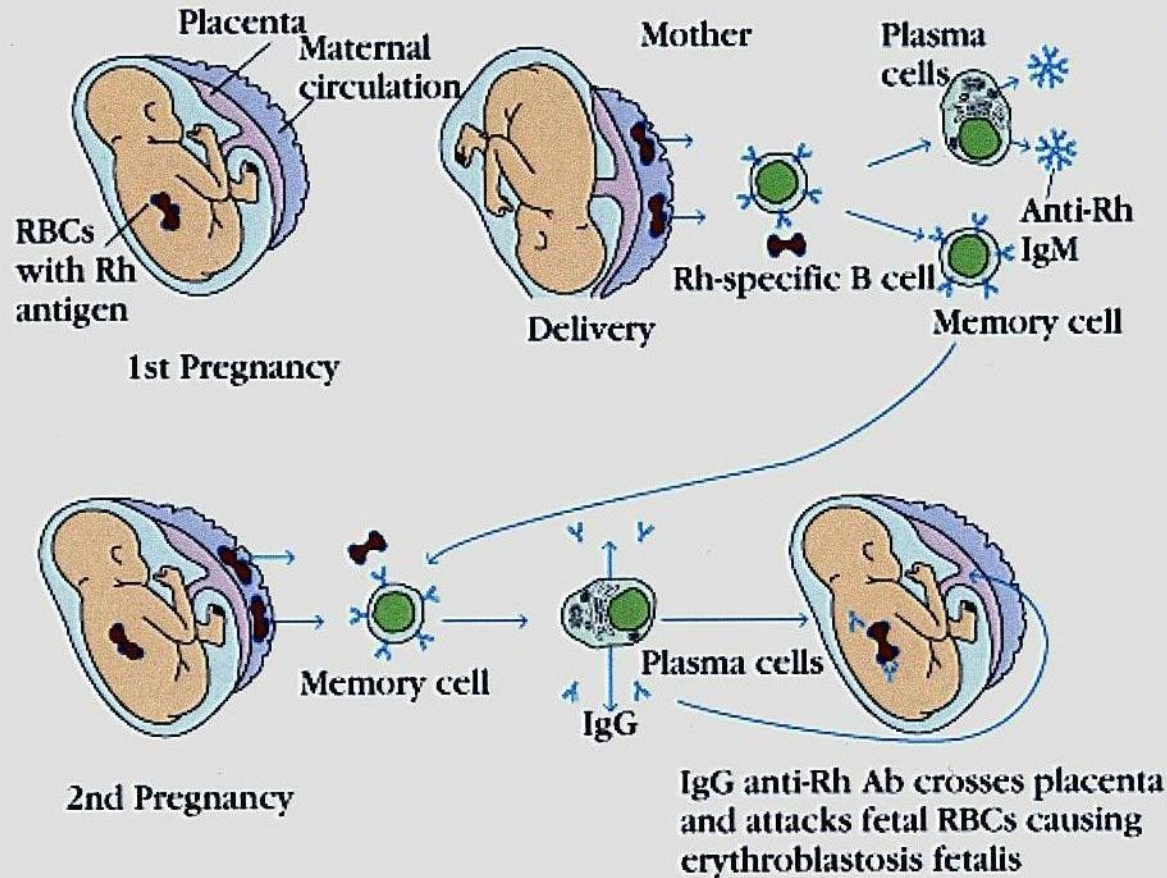


mother

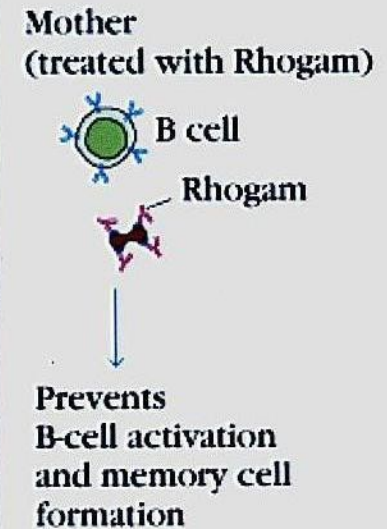
fetus

Hemolytic disease of the newborn p. 380

DEVELOPMENT OF ERYTHROBLASTOSIS FETALIS (WITHOUT RHOGAM)



PREVENTION (WITH RHOGAM)



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 – je málo progenitorů = anemie, kromě toho hemolýza. Nepřevažuje ikterus.

Anti-D aloimmunizace - příčina

Fetomaternální krvácení

Spontánní u 3% žen během těhotenství

Při porodu

> 50% porodů FMH do 0.2ml

<1% porodů > 2.5mL FMH

- obvyklé množství FMH menší než 0,1ml ery nevede k aloimunizaci matky
- 0.1 ml fetálních erys může sensibilizovat 30% primigravidních žen

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

Anti-D alloimmunization

Epidemiology

Rh-system is complex

52 different antigens

Rh(D) is highly immunogenic

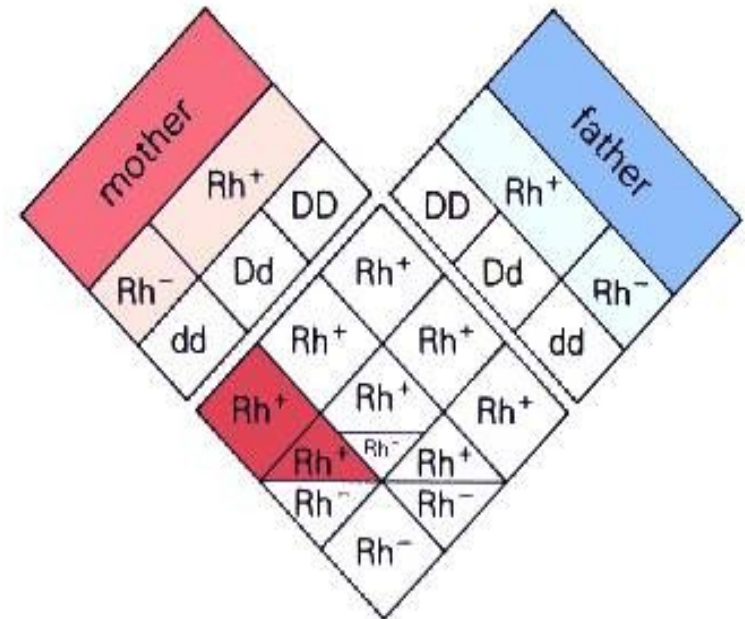
85% Rh(D)+

Homozygote DD (~42%)

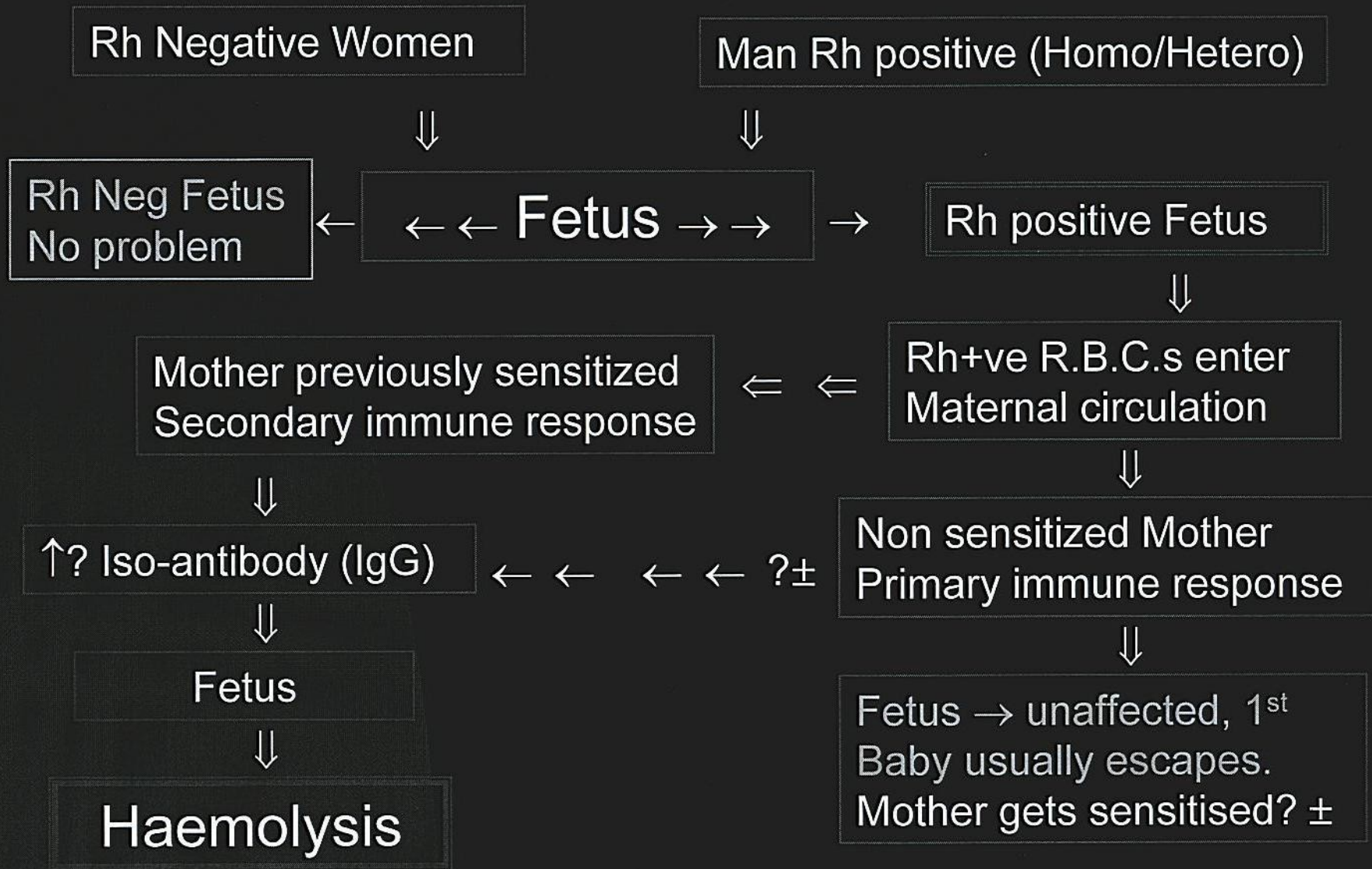
Heterozygote Dd (~43%)

15% Rh(D)-

Homozygote dd



Pathogenesis Of Rh Iso-immunisation



Jiné imunní cytopenie kromě hemolýzy

- Aloimunní fetální/novorozenecká trombocytopenie
- 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

Všechny gravidní ženy

- AB0 RhD a skríníng Abs proti erys 2x během gestace (12. a 28. týden)
- RhD- ženy ve 28 hebdom. „očkování“ anti-D prevence
- při nálezu Abs: specifikovat a stanovit význam pro HON, určit množství - titrace, typ Ig, sledovat v pravidelných intervalech á 4 týdny
- monitorování plodu – antenatální UZV, amniocentéza, periumbilikální punkce, antenatální genotypizace z periferní krve matky
- kvantifikování FMH /FCM, RIA, ELISA

Jiné možnosti imunohematologického vyšetření při HON

- Vyšetření antigenů/krevních skupin na erytrocytech otce
- Stanovení 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 skupiny 0 a novorozenci klinicky riziková:

- AB0 RhD
- PAT
- Při pozitivním PAT došetřit protilátky (sérum matky, eluát)
- Odlišné strategie jednotlivých pracovišť

Terapeutická intervence u HON

Matka

- IVIG /blokáda FcRs placenty a RES fetu
- Léčebná plazmaferenze

Plod/novorozeneček

- intrauterinní transfuze (i mateřská krev)
- fototerapie
- výměnná (ET) transfuze
- IVIG
- substituční transfuze

Například

AB0 HON

- nejčastěji matka 0 x dítě A
- screening Abs negativní
- PAT negativní nebo slabě pozitivní
- v séru imunní anti-A,-B
- již při první graviditě u neimunizovaných žen

Například

Rh HON (anti-D, -C,-c, -E, -Cw)

- Protilátka v séru matky i dítěte
- PAT pozitivní
- nebývá při první graviditě
- i závažné formy HON
- imunizace matky závisí na dávce Ag a na její imunizační pohotovosti (responder x hyperresp.)

Například

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

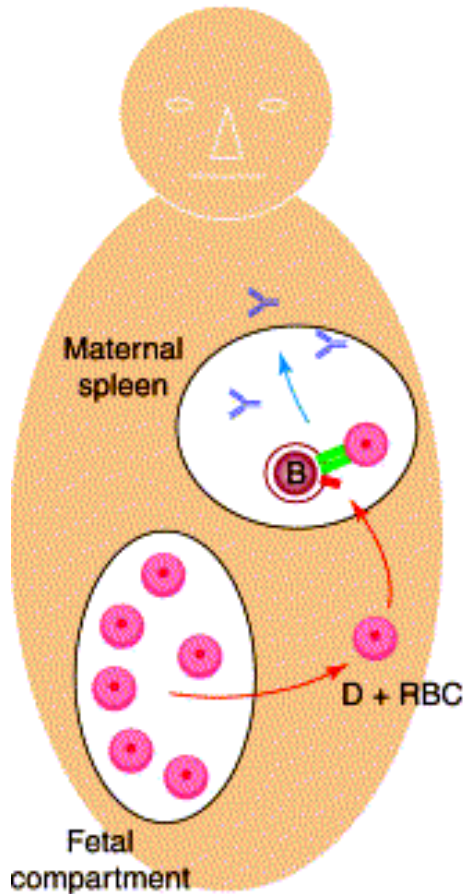
- Protilátka v séru matky i dítěte
- PAT pozitivní
- mírnější formy HON

Management HON - prevence

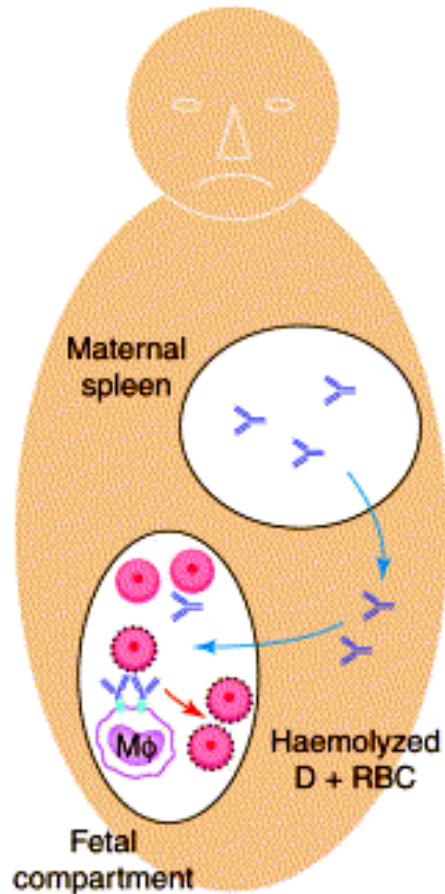
1. RhD- ženy musí dostat transfuze RhD-
2. pasivní imunizace RhIg RhD- žen během gravidity, po porodu RhD+ dítěte, při invazivních výkonech v průběhu gravidity
 - 100mcg (tj. 500 iu) Ig i.m. potlačí imunizaci 4-5ml RhD+ ery /nebo 10ml RhD+ plné krve
 - Standardní dávka 250-300mcg (stačí na 30ml FMH, při větším FNH zvýšit dávku)
 - vynikající efekt profylaxe, ne zcela jasný mechanismus působení

RhD immunization and prophylaxis

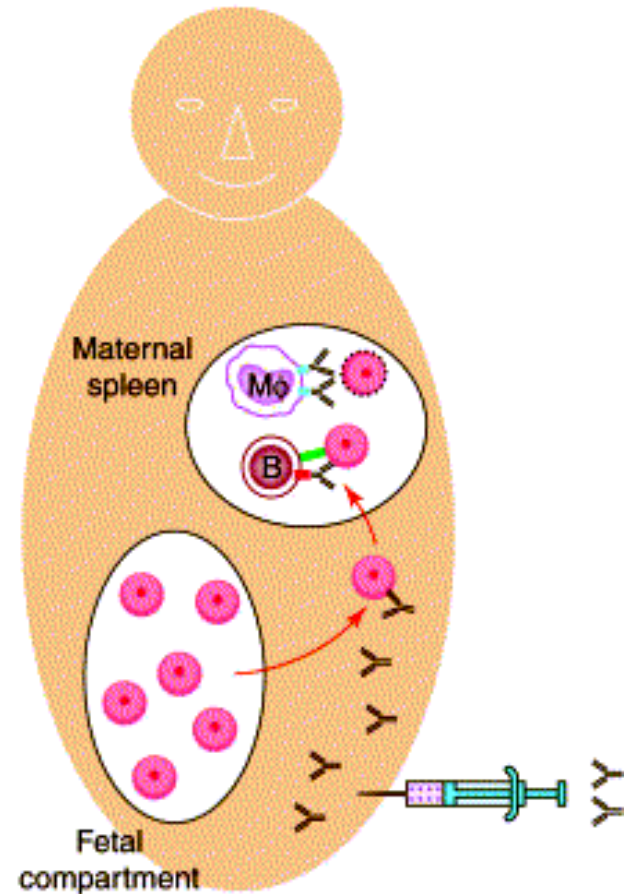
(a) Immunization of mother



(b) Haemolysis of fetal RBC



(c) Prevention of immunization



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

- Movement of RBC
- Movement of anti-D



Děkuji za pozornost

