

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, autoprottilátky)
 - Neimunitní (příčiny fyzikální, chemické, MAHA)

Hemolytické anemie - definice

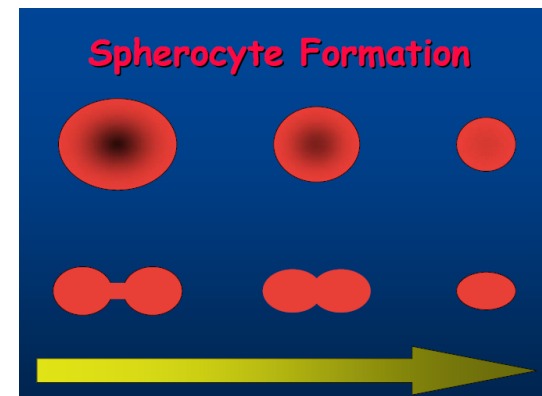
Skupina onemocnění charakterizovaná **zkráceným přežíváním erytrocytů**

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



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)

Patogeneze autoimunitní hemolytické anemie

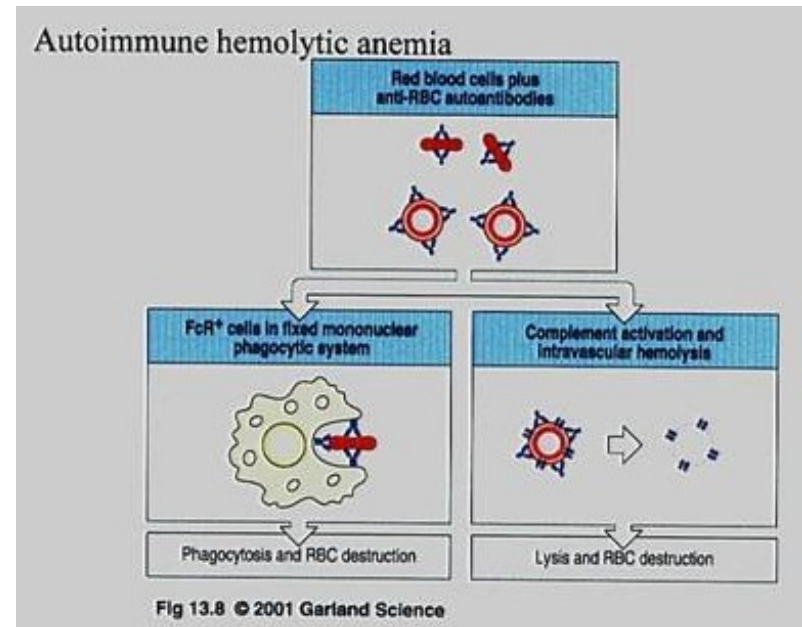
Vznik IgG protilátek proti autoantigenům erytrocytů
Pomáhá tomu patologická subpopulace T_h lymfocytů
a dysregulace proliferujících T_{reg}

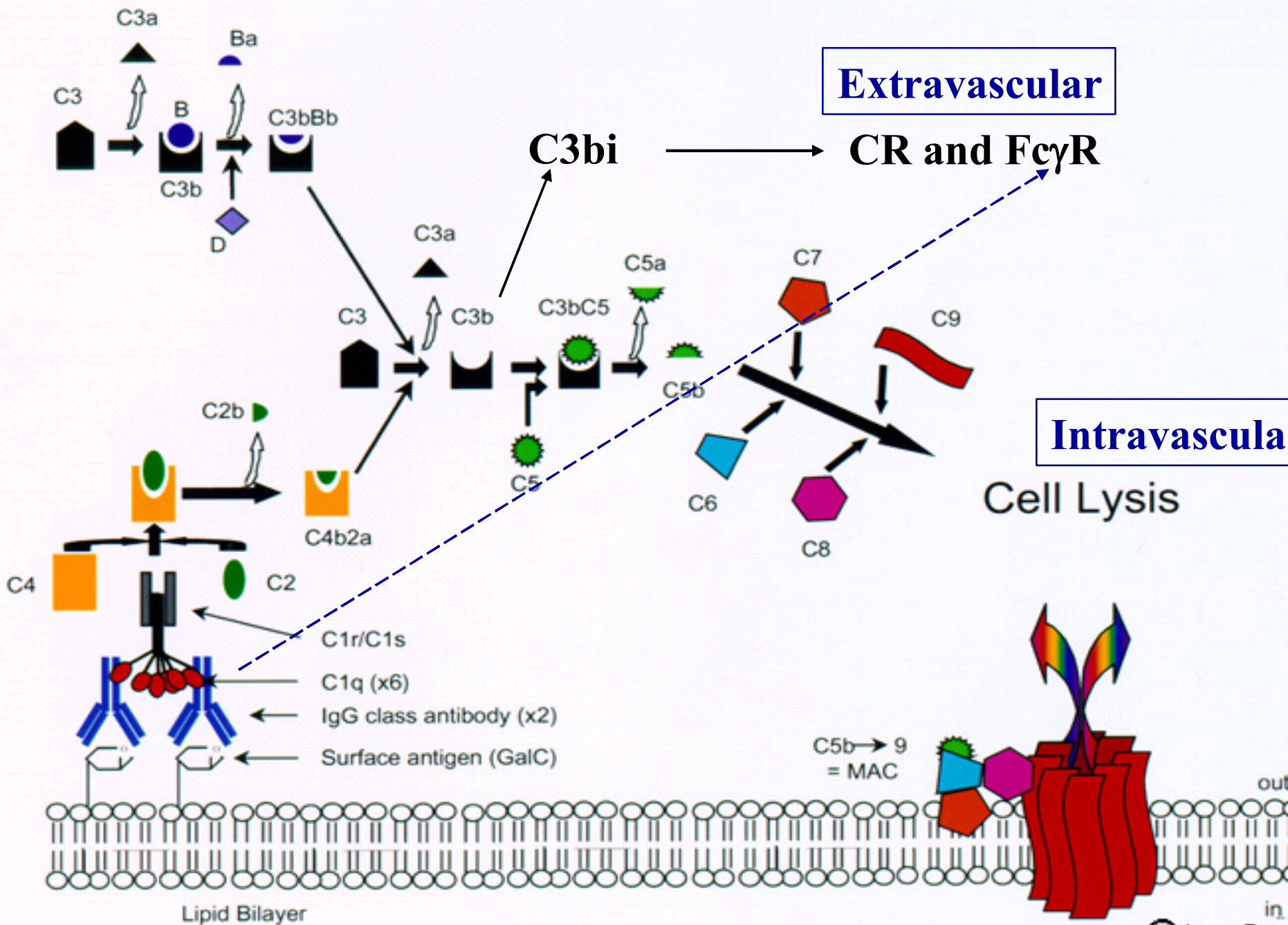
- „Spící“ autoreaktivní T_h lymfocyty mohou být aktivované cross-reaktivními alloantigeny, autoantigeny, mikrobiálními superantigeny, změnami v procesu prezentace a zpracování antigenu

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





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

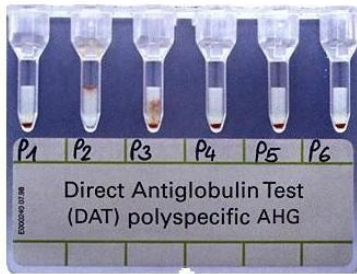
Také

- 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 autoprotiátky (podtřídy IgG1-IgG4, množství protilátky)

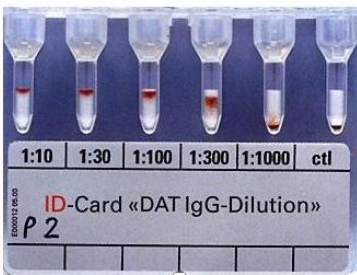
- Zásadní je interpretace výsledků v kontextu klinických a ostatních laboratorních vyšetření:
 - **PAT+** mimo souvislost s IHA
 - **PAT+** při imunní příčině, avšak bez HA



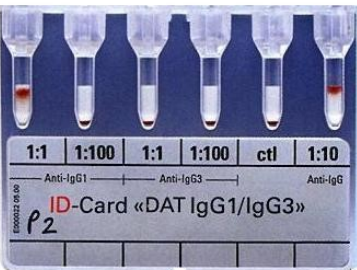
Negative	Negative
< 2+	Very weak positive
≥ 2+	Monospecific DAT card is recommended



Negative	Negative
< 2+ (IgG)	Weak positive (IgG) (not titrated)
≥ 2+ (IgG)	IgG-Dilution (titration) card is recommended



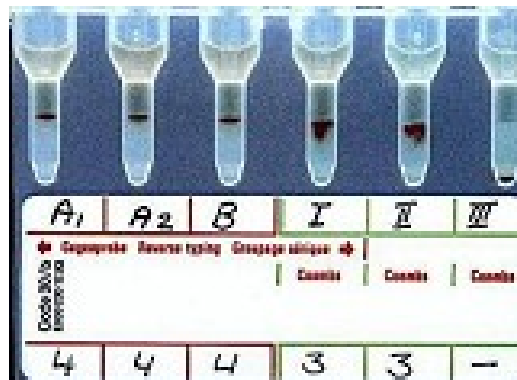
Negative	Negative
< = 1:30	Weak positive (IgG) Low risk of haemolysis
> 1:30	Strong positive (IgG) High risk of haemolysis



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 aloprotilátkách (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 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 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

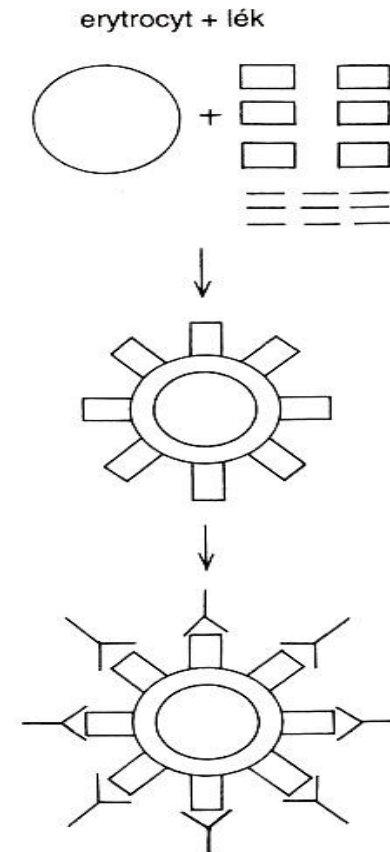
DIHA


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
l • proti němu Ab

e • imunní komplex imunogen + protilátka

x • nespecifická adsorpce na ery

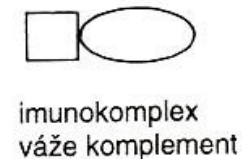
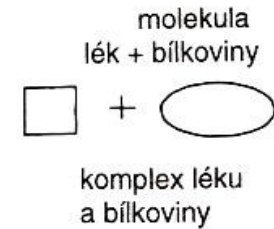
y

- může se aktivovat komplement

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

- IgM (IgG), C3

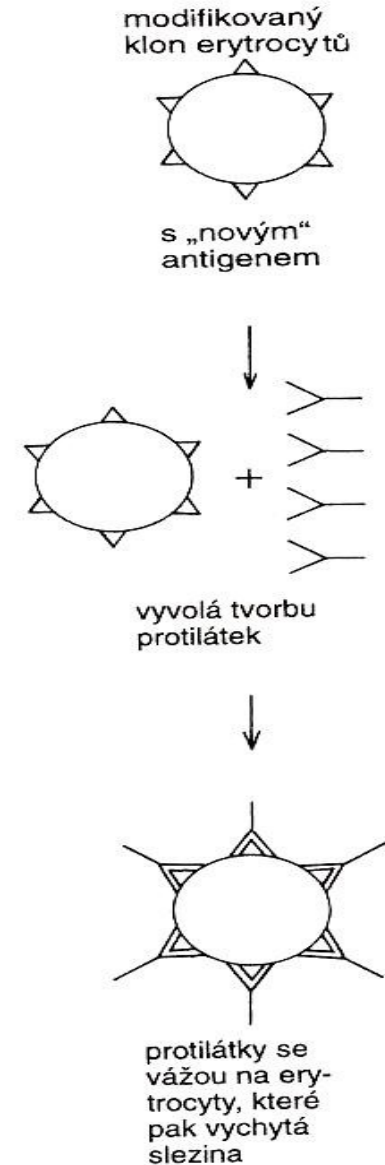
- i.v. i extr.v. hemolýza



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

Sofistikovanější paradigma: 2 kategorie DIIHA

- Adsorpce léku (haptenu)- tzv. **penicilinový typ**
- Imunní komplexy - tzv. **jiný než penicilinový typ**

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria - PNH

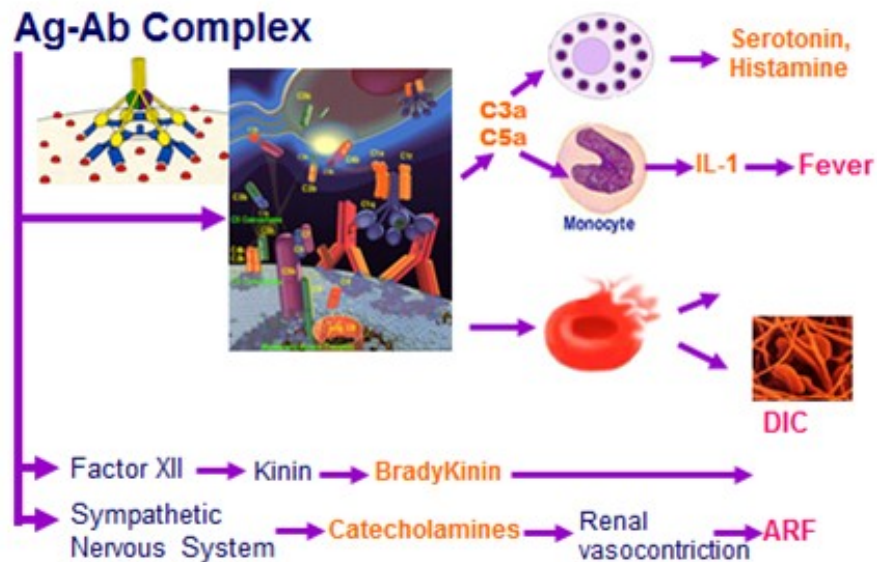
- vzácná forma získané HA
- postižena kmenová buňka—abnormálně expandující klon
- mutace PIG A genu/chybí připojení (GPI kotva) cca 20 proteinů na membránu různých bb.
- přechod do AA, AML
- zvýšená citlivost bb. na komplement (při acidifikaci)
- Hamův test s okyselením séra (semi-kvantitativní)
- FCM 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 ABO protilátkách - rychlý průběh reakce (pokles TK, DIK..)
- extr.v. hemolýza při IgG protilátkách – pozvolný průběh, někdy kompenzovaný stav



HA 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-

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.)

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

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 heb. „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 Rhlg 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