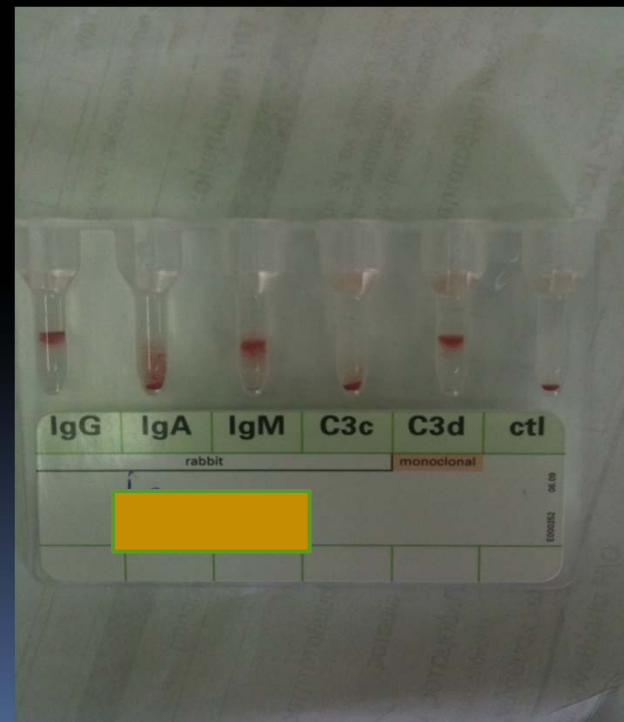


ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΙΜΙΑΣ

- Μαρία Γκανίδου
- Νοσοκομειακή Υπηρεσία Αιμοδοσίας
- ΓΝΘ 'Γ.Παπανικολάου'



Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία (ΑΑΑ)

1. Αυξημένη καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων προκαλούμενη από προϊόν ανοσιακής απάντησης

2. Διαγνωστικά εργαλεία

- ❖ Μορφολογία ερυθρών, αριθμός λευκών, αιμοπεταλίων
- ❖ Βιοχημικοί δείκτες αιμόλυσης
- ❖ Ανοσοαιματολογικά ευρήματα: DAT, IAT, έκλυση, προσρόφηση

3. *Μη ειδικά εργαστηριακά ευρήματα*

Πιθανοί μηχανισμοί

- ✓ Ο ρόλος των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων: διασταυρούμενες αντιδράσεις με περιβαλλοντικούς παράγοντες
- ✓ Ο ρόλος του συμπληρώματος: διαταραγμένη έκφραση του CR1
- ✓ Διαταραχή παρουσίασης των αυτοαντιγόνων: οδηγεί σε παραγωγή T δραστικών κυττάρων
- ✓ Πολυκλωνική διέγερση B λεμφοκυττάρων: ιοί, παράσιτα, HIV, kala-azar, χρόνιο GVHD
- ✓ Λειτουργικές ανωμαλίες T λεμφοκυττάρων: κυτταροκίνες, Th1, Th2, Treg

Ανοσοαυματολογικές μέθοδοι διερεύνησης ΑΑΑ

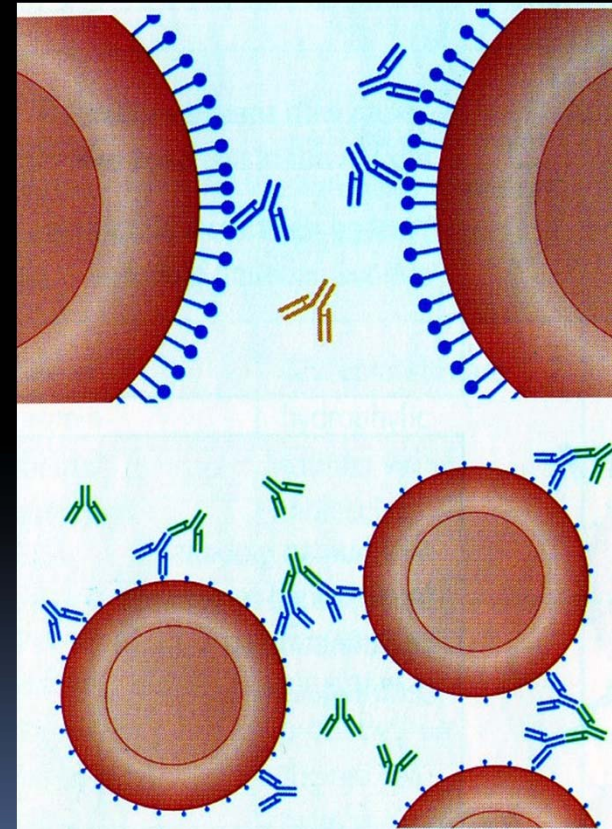
- Άμεσος Coombs: ανοσοσφαιρίνη, συμπλήρωμα
- Έμμεσος Coombs: ανεύρεση αντισώματος στον ορό, ειδικότητα αντισώματος
- Θερμικό εύρος: 37°C, 30°C, θερμοκρασία δωματίου και 4°C
- Εξετάσεις έκλυσης και προσρόφησης αντισώματος
- Κυτταρομετρία ροής
- Οπτική αξιολόγηση του δείγματος

Ενδαγγειακή vs Εξαγγειακή αιμόλυση

1. Ενδαγγειακή αιμόλυση: ενεργοποίηση συμπληρώματος, αιμοσφαιρινουρία και αιμοσφαιριναιμία
2. Εξαγγειακή αιμόλυση: φαγοκυττάρωση των ερυθρών από τα κύτταρα του ΔΕΣ, χολερυθρίνη ορού. Αιμοσφαιριναιμία

Άμεση Coombs (DAT)

- Fab τμήματα αντισφαιρίνης-Fc αντισώματος
- Εκτέλεση άμεσα μετά τη συλλογή
- EDTA:αποτρέπει την *in vitro* προσκόλληση του συμπληρώματος
- Χρήση anti-IgG, anti-C3d
- Χρήση μονοκλωνικών anti-IgM, anti-IgA

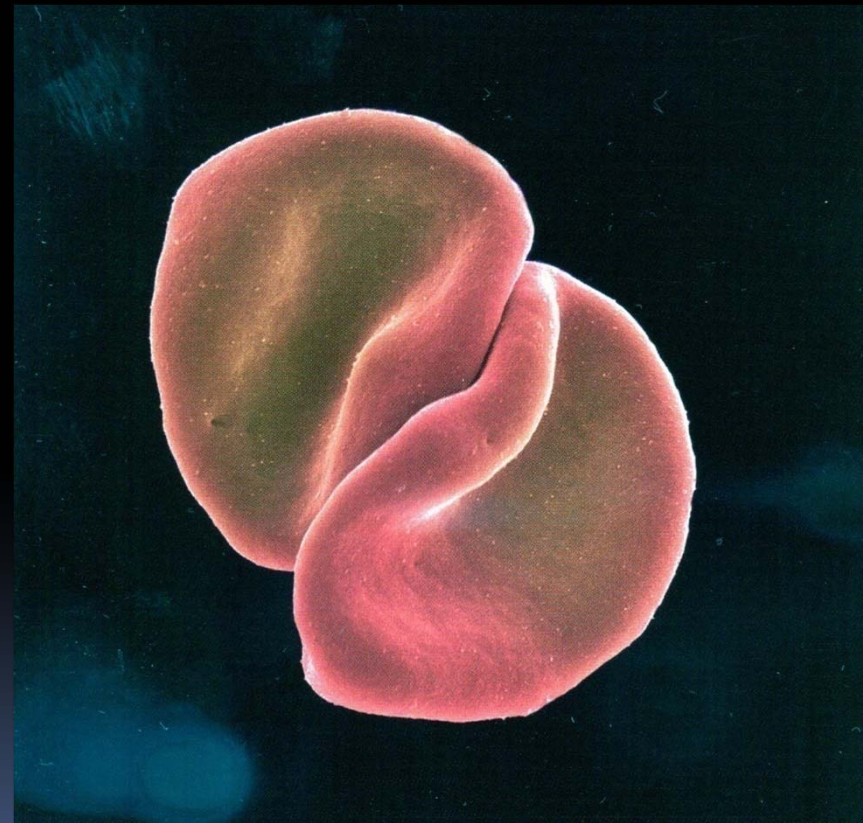


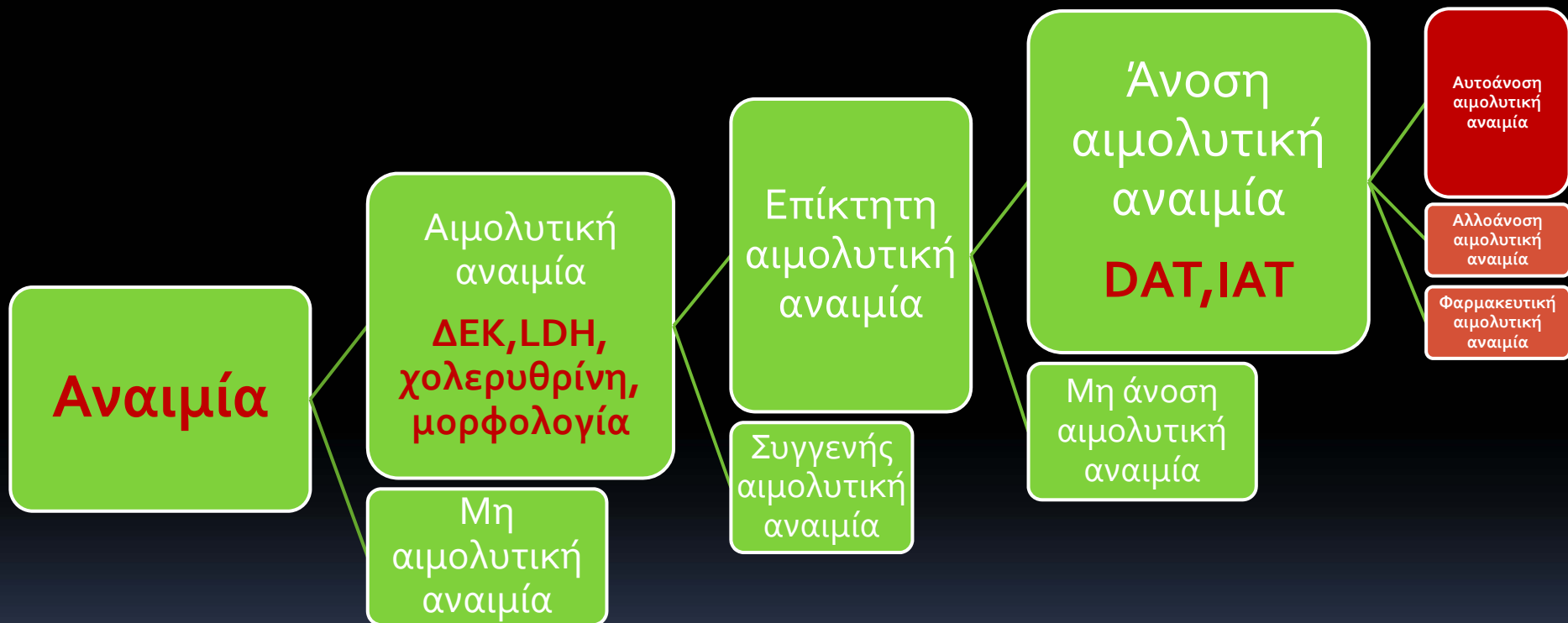
Ειδικότητα και ευαισθησία DAT

- Ασθενείς με αιμόλυση: 83% θετική
- Ασθενείς χωρίς αιμόλυση: 1,4% θετική
- Υγιείς: 5-90 IgG , 5-40 C3d μόρια/ερυθρό
- Δυνατότητα ανίχνευσης 100-500 IgG, 400-1100 C3d μόρια/ερυθρό
- Αιμοδότες: 1/1000-1/14.000 θετική
- Ασθενείς DAT+ χωρίς αιμόλυση:
δρεπανοκυτταρική νόσος, μεσογειακή,
νεφρική, πολλαπλούν μυέλωμα, αυτοάνοσα
νοσήματα, AIDS

Η εξέταση DAT μόνη της δεν είναι διαγνωστική

- Διάγνωση ασθενούς
- Πρόσφατη μετάγγιση, εγκυμοσύνη, φάρμακα
- Χορήγηση IVIG, anti-D
- Μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, συμπαγών οργάνων





Αυτοάνοση Αιμολυτική Αναιμία

Ταξινόμηση

1. Θερμού τύπου ΑΑΑ
2. Σύνδρομο Ψυχροσυγκολλητινών
3. Μικτού Τύπου ΑΑΑ
4. Παροξυσμική κρυοαιμοσφαιρινουρία
5. Άμεσος Coombs-αρνητική ΑΑΑ

IgG+c
διφασικό

IgM
 $\Theta < 30^{\circ}\text{C}$

IgG+IgM
 $4^{\circ}, 30^{\circ}, 37^{\circ}\text{C}$

IgG+c=67%
IgG=20%
C=13%
 37°C
IgM IgA

DAT-

Θερμού τύπου ΑΑΑ

- **Πρωτοπαθής ή ιδιοπαθής:** 50% των περιπτώσεων, χωρίς να αναγνωρίζεται υποκείμενο νόσημα
- **Δευτεροπαθής :** 20% λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα, 20% νοσήματα συνδετικού ιστού, συμπαγείς όγκοι, λοιμώξεις, φάρμακα

Θερμού τύπου ΑΑΑ ορολογικά χαρακτηριστικά

- ✓ IgG και συμπλήρωμα 67%
- ✓ IgG μόνο 20%
- ✓ Δραστικότητα : IgG₃ > IgG₁ > IgG₂ > IgG₄
- ✓ Συμπλήρωμα μόνο: 13%
- ✓ ΙΑΤ έντονα θετική παρουσία ενζύμου
- ✓ ΙΑΤ αρνητική σε in vivo πλήρη προσρόφηση
- ✓ Παρουσία και μη παθολογικής IgM ψυχροσυγκολλητίνης (30%)

Θερμού τύπου IgM AAA

- Ο ορός δίνει συγκολλήσεις σε 37°C
- Βέλτιστη συγκόλληση σε 30- 37°C
- Ο τίτλος 4°C <64
- DAT συνήθως είναι C3+ , συχνά IgM, μερικές φορές συνυπάρχει IgG ή DAT-
- Συνήθως αυτόματες συγκολλήσεις ερυθρών
- Ειδικότητα αντιγόνου σε 30% :I, c, e, N, Pr, Wr
- Μεγάλη αιμόλυση και κακή πρόγνωση

Θερμού τύπου ΑΑΑ ορολογικά προβλήματα

1. Αυτόματες συγκολλήσεις ερυθρών και ομάδα αίματος

- ✓ Κατεργασία με φυσιολογικό ορό ή χλωροκίνη, DDT ή 2-ME
- ✓ Χρήση μονοκλωνικών αντιορών

2. Συνύπαρξη αλλοαντισωμάτων: 30%

- ✓ Πιθανή διαφορετική εικόνα στην IAT
- ✓ Λευκωματίνη ή LISS
- ✓ Απομάκρυνση ή ελάττωση του αυτοαντισώματος

Θερμού τύπου AAA

προσρόφηση και έκλουση

- Αυτόλογη προσρόφηση: απομάκρυνση του αυτοαντισώματος
- Αλλογενής προσρόφηση: απομάκρυνση μόνο του αυτοαντισώματος με κατάλληλα ερυθρά (O, DCCee, DccEE, ccee, K, Jk, Fy, S, s) ή σύμφωνα με το φαινότυπο του ασθενή
- Έκλουση : επιβεβαίωση του αποτελέσματος της προσρόφησης
- Απαιτούνται πολλαπλές επαναλήψεις των εξετάσεων

Θερμού τύπου ΑΑΑ αντισώματα

- ✓ Ειδικότητα αυτοαντισώματος: συνήθως δεν διαπιστώνεται, Rh, LW, K, Jk, Fy, De
- ✓ Επιλογή ερυθρών προς μετάγγιση: προσοχή σε αλλοαντισώματα πρίν και μετά το αυτοαντίσωμα
- ✓ Εκτεταμένος φαινότυπος
- ✓ Μοριακή τυποποίηση των κλινικά σημαντικών αντιγόνων

Σύνδρομο Ψυχροσυγκολλητινών

- ✓ Οξεία μορφή: λέμφωμα, μυκόπλασμα πνευμονίας
- ✓ Χρόνια μορφή: λέμφωμα, ΧΛΛ, Waldenstrom
- ✓ Ιδιοπαθής
- ✓ IgM ψυχρό αντίσωμα, τίτλος >1000 σε 4°C , θερμικό εύρος $20-37^{\circ}\text{C}$, ενισχύεται με αλβουμίνη
- ✓ Ενεργοποιείται και αιμολύει σε χαμηλή θερμοκρασία
- ✓ Ανιχνεύεται μόνο το συμπλήρωμα στη DAT
- ✓ Αποφυγή in vitro ενεργοποίησης

Σύνδρομο Ψυχροσυγκολλητινών ορολογικά προβλήματα

1. Αυτόματες συγκολλήσεις ερυθρών

- ✓ Διατήρηση ή θέρμανση του δείγματος σε 37°C
- ✓ Κατεργασία με DTT ή 2-ME

2. Συνύπαρξη αλλοαντισώματος στον ορό

- ✓ Συνήθως δεν αποτελεί πρόβλημα
- ✓ Αποφυγή των ενισχυτικών (πχ αλβουμίνη)
- ✓ Ψυχρή προσρόφηση

Σύνδρομο Ψυχροσυγκολλητινών αντίσωμα

- ✓ Ειδικότητα αντι-I ή αντι-i, συνήθως στη λοιμώδη μονοκυρήνωση
- ✓ Δεν είναι διαγνωστικό σε CAS
- ✓ Ανιχνεύεται και σε υγιείς
- ✓ Τιτλοποιείται με χρήση I+ και i+ ερυθρών
- ✓ Μετάγγιση αίματος με θερμοκρασία 37°C

Μικτού Τύπου ΑΑΑ

- ✓ IgG θερμό αυτοαντίσωμα
- ✓ IgM ψυχρό αυτοαντίσωμα
- ✓ Αιμόλυση και πολύπλοκα εργαστηριακά ευρήματα σε όλες τις φάσεις των εξετάσεων
- ✓ DAT: IgG +C₃, C₃, IgG, IgA
- ✓ IAT: πανσυγκολλήσεις μεγάλου θερμοικού εύρους
- ✓ Ειδικότητα αντισώματος: συνήθως όχι

Παροξυσμική κρυοαιμοσφαιρινουρία

- ✓ Η σπανιότερη μορφή AAA
- ✓ Συνοδεύει ιογενείς λοιμώξεις των παιδιών
- ✓ Σπανιότατα ιδιοπαθής σε ηλικιωμένους ασθενείς
- ✓ Αιμοσφαιρινουρία, αιμοσφαιριναιμία, DAT- και IAT-
- ✓ IgG+συμπλήρωμα, διφασικό αντίσωμα, αιμολυσίνη
- ✓ DAT: συμπλήρωμα και πιθανώς αντίσωμα μετά ψύξη του δείγματος

Παροξυσμική κρυοαιμοσφαιρινουρία αντίσωμα

- ✓ Δοκιμασία Donath-Landsteiner: παρατηρείται αιμόλυση κατά την θέρμανση των ψυχθέντων δειγμάτων
- ✓ Συνήθως παρουσιάζει ειδικότητα P και σπάνια p ή pk
- ✓ Μετάγγιση σπάνια απαιτείται. Προτιμώνται P-ερυθρά

Άμεσος Coombs-αρνητική ΑΑΑ

- ✓ «Εργαστηριακός τύπος ΑΑΑ»
- ✓ Αδυναμία ανίχνευσης του αντισώματος λόγω μικρού αριθμού προσκολλημένων μορίων
- ✓ Η χρήση αντι-IgG, αντι-C3 σε εξετάσεις ρουτίνας
- ✓ Θερμού τύπου IgM ΑΑΑ
- ✓ Ακατάλληλο δείγμα
- ✓ Μικροστήλες, στερεάς φάσης, PEG, χρήση ενζύμων, κυτταρομετρία ροής

Διαφορτική διάγνωση σε ΑΑΑ

1. Αλλοάνοση αιμολυτική αναιμία
2. Φαρμακευτική αιμολυτική αναιμία
 - ✓ Αντίσωμα εξαρτώμενο από το φάρμακο (πενικιλίνη)
 - ✓ Ανοσοσυμπλέγματα/ Αντίσωμα εξαρτώμενο από το φάρμακο (ημισυνθετικές πενικιλίνες)
 - ✓ Αντίσωμα ανεξάρτητο του φαρμάκου (μεθυλντόπα, φλουνταραμπίνη)
 - ✓ Μη ανοσολογική προσρόφηση (πλατίνα)

Αλλοάνοση αιμολυτική ανατιμία

- ✓ Επιβραδυνόμενη αιμολυτική αντίδραση
- ✓ Αλλοανοσοποίηση έναντι αντιγόνων μεγάλης συχνότητας και πρόσφατη μετάγγιση
- ✓ Πολλαπλά αλλοαντισώματα

Φαρμακευτική αιμολυτική αναιμία-1

Αντισώματα που ανιχνεύονται παρουσία
κατεργασμένων με φάρμακο ερυθρών

- ✓ DAT έντονα θετική, IgG και συνήθως συμπλήρωμα
- ✓ ΙΑΤ και έκλουμα είναι θετικά μόνο με κατεργασμένα ερυθρά
- ✓ Ήπια αιμόλυση, απαιτούνται μεγάλες δόσεις φαρμάκου

Φαρμακευτική αιμολυτική ανατιμία-2

Αντισώματα που ανιχνεύονται μετά την προσθήκη φαρμάκου στον ορό ή το έκλουμα

- ✓ DAT θετική στο συμπλήρωμα, ίσως IgG
- ✓ IAT και έκλουμα είναι θετικά μόνο παρουσία του φαρμάκου
- ✓ Αντισώματα ορού: IgG, IgM, συνδιασμός
- ✓ Μικρή δόση επαναχορήγησης του φαρμάκου προκαλεί αιμόλυση
- ✓ Ενδαγγειακή αιμόλυση, αιμοσφαιριναιμία, αιμοσφαιρινουρία, νεφρική ανεπάρκεια

Φαρμακευτική αιμολυτική ανατιμία-3

Αντισώματα που ανιχνεύονται ανεξάρτητα του
φαρμάκου

- ✓ Κλασσική εργαστηριακή εικόνα θερμού τύπου
AAA
- ✓ DAT θετική σε IgG

Φαρμακευτική αιμολυτική ανατιμία-4

Μη ανοσολογική προσρόφηση πρωτεϊνών

- ✓ Τροποποίηση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης από το φάρμακο
- ✓ DAT θετική σε IgA, IgG, IgM, C₃
- ✓ IAT: θετική με ερυθρά κατεργασμένα με φάρμακο
- ✓ Έκλουμα αρνητικό με κατεργασμένα ερυθρά

Προβλήματα

- ❖ Άγνωστος παθογενετικός μηχανισμός
 - ❖ Μη ειδικά εργαστηριακά ευρήματα
 - ❖ Παρόμοια κλινική εικόνα
 - ❖ Σχετίζεται με ποικίλα νοσήματα
-
- **Μάλλον ανεπιτυχής διαγνωστική προσπάθεια...**

Μετάγγιση και AAA

1. Αιμοδοσία

- ✓ Αυτόματες συγκολλήσεις ερυθρών
- ✓ DAT θετική
- ✓ IAT πανσυγκολλήσεις

2. Κλινικό τμήμα

- ✓ Αναιμία, αιμόλυση, μορφολογία ερυθρών, ΔΕΚ, LDH, χολερυθρίνη, απτοσφαιρίνη
- ✓ Ανάγκη μετάγγισης
- ✓ Ιστορικό μεταγγίσεων, αντιδράσεις
- ✓ Φάρμακα

Μετάγγιση και ΑΑΑ

3. Αιμοδοσία

- Διαφορική διάγνωση ΑΑΑ: θεραπεία και μετάγγιση
- Εκτεταμένος φαινότυπος
- Ανίχνευση πιθανού αλλοαντισώματος
- «τα λιγώτερο ασύμβατα ερυθρά»
- Λευκαφαιρεμένα ερυθρά

4. Κλινικό τμήμα

- Επίβλεψη της μετάγγισης
- Παρακολούθηση δεικτών αιμόλυσης

Μετάγγιση και AAA

- Αποφυγή της μετάγγισης: η αύξηση της μάζας ερυθρών επιταχύνει την καταστροφή
- Μετάγγιση στηριζόμενη σε κλινικές ενδείξεις
- Οι χρονοβόρες διαδικασίες τυποποίησης και η έλλειψη υποδομών δεν πρέπει να καθυστερούν τη μετάγγιση

