

AIHA
Postup při vyšetřování v NRL ÚHKT
Praha

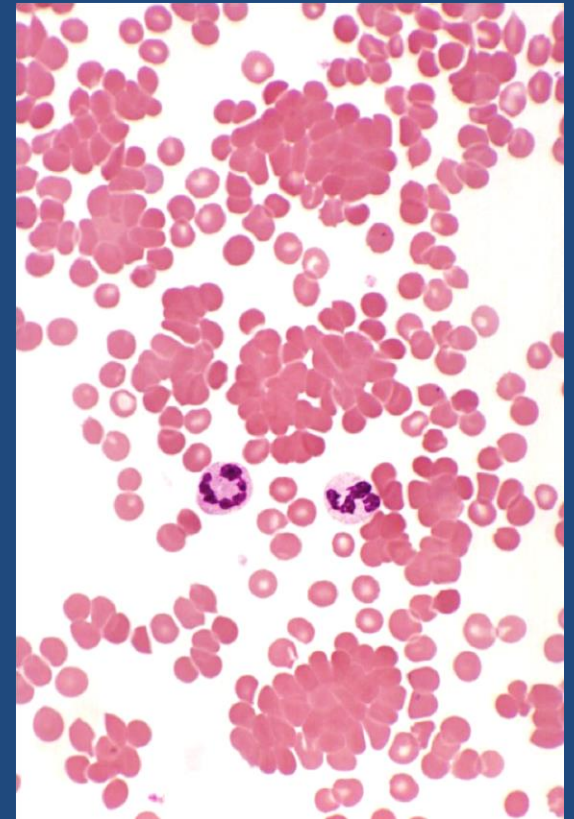
5. Hradecká imunohepatologická
konference

Hradec Králové 2015

M.Králová, Š.Šindlerová

AIHA

- Autoimunní hemolytická anemie
- Nález:
 - pozitivita SCR, PAT, autokontrola
- Zaléčená:
 - SCR negativní
 - pozitivní PAT a autokontrola



Laboratorní nález

- Pozitivní screening protilátek
 - Pozitivní testy compatibility
 - Pozitivní PAT a autokontrola
-
- Nemusí jít vždy o diagnózu AIHA (např. gravidita)

Pozitivní screening

Průběh: K3 Jméno: HOLEVOVSKÝ JANA

		NaCl		Enzymy		AGH	
		4°		Br			
	DIANA 2						
1		—					
2		—					
	VL. ERY	—					
	PUP	—					
	DIANA 4			PAP BR		NAT	
1						+	
2						+	
3						+	
4						+	
	VL. ERY					+	

Pozitivní PAT

Přímý antiglob. test:		<table border="1"> <tr> <td>###</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>							###													
###																						
Anti-IgG	###	<table border="1"> <tr> <td>PAT</td> <td>IgG1 1:1</td> <td>IgG1 1:100</td> <td>IgG3 1:1</td> <td>IgG3 1:100</td> <td>ctl</td> <td>1:10</td> </tr> <tr> <td></td> <td>##</td> <td>—</td> <td>—</td> <td>—</td> <td>—</td> <td>##</td> </tr> </table>							PAT	IgG1 1:1	IgG1 1:100	IgG3 1:1	IgG3 1:100	ctl	1:10		##	—	—	—	—	##
PAT	IgG1 1:1	IgG1 1:100	IgG3 1:1	IgG3 1:100	ctl	1:10																
	##	—	—	—	—	##																
Anti-IgA	—																					
Anti-IgM	—																					
Anti-C3c	—	<table border="1"> <tr> <td>IgG</td> <td>1:10</td> <td>1:30</td> <td>1:100</td> <td>1:300</td> <td>1:1000</td> <td>ctl</td> </tr> <tr> <td></td> <td>##</td> <td>##</td> <td>+</td> <td>—</td> <td>—</td> <td>—</td> </tr> </table>							IgG	1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000	ctl		##	##	+	—	—	—
IgG	1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000	ctl																
	##	##	+	—	—	—																
Anti-C3d	—																					
ctl	—																					
-A	-B	-AB	AB	0	A ₁	A ₂	B	A ₁ B	A ₂ B	-A ₁	-H											

Nahřáté karty

		NaCl		Enzymy		AGH	
		4°		Br			
DIANA 2							
1							
2							
	VL.ERY	#					
	PUP						
DIANA 4							
1				PAP BR		NAT	
2				###		#	
3				###		#	
4				###		#	
	VL.ERY			###		#	
DIANA 4 glyc. d. S. JOSZ							
1							
2							
3							
4							

Nahřáté karty

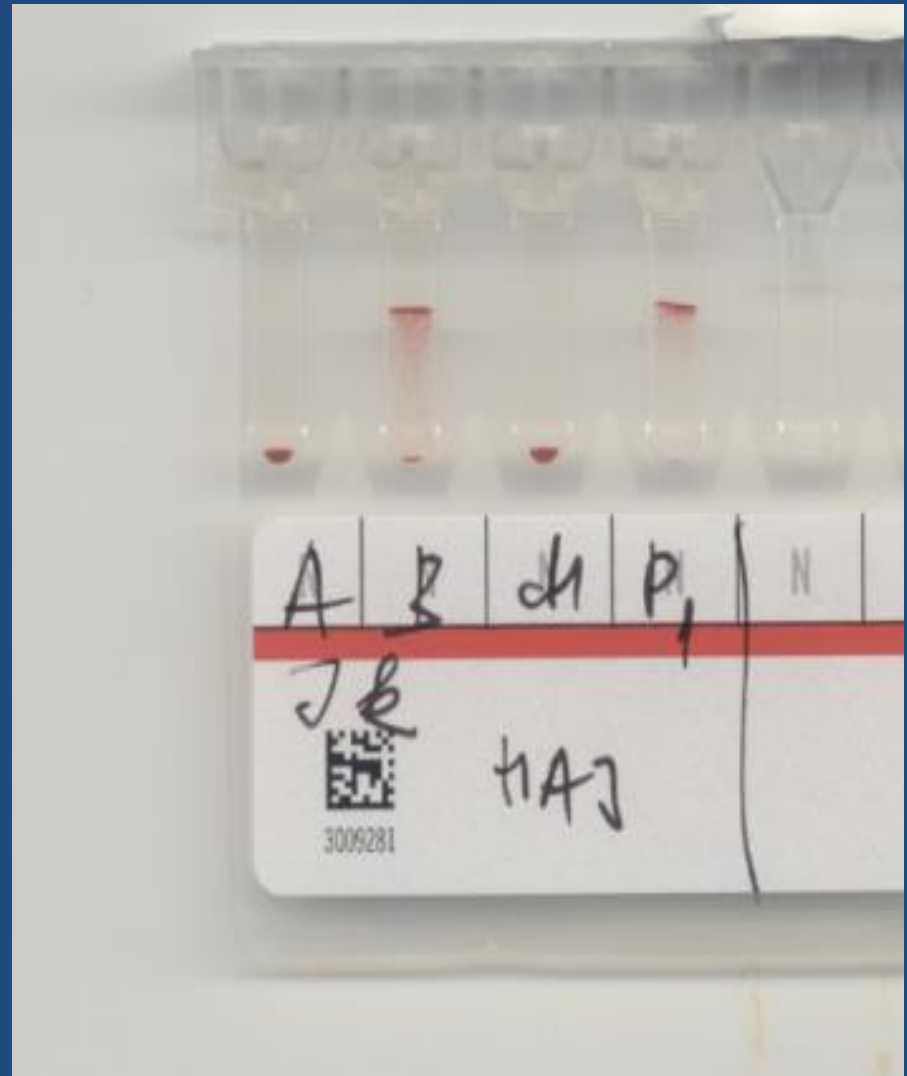
Přímý antiglob. test:																		
Anti-IgG																		
Anti-IgA		-																
Anti-IgM		+																
Anti-C3c		-																
Anti-C3d																		
ctel	+	-																
Lektiny:																		
1	Arachis hyp.																	
2	Salvia sclarea																	
3	Salvia hominum																	
4	Glycine soja																	
-A	-B	-AB	AB	0	A ₁	A ₂	B	A ₁ B	A ₂ B	-A ₁	-H					-Tn	-T	
-A	-B	D	D ^u	C	c	C ^w	E	e	P ₁	M	N	S	s					
		-		-		-	-											
K	k	Kp ^a	Kp ^b	Le ^a	Le ^b	Lu ^a	Lu ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	ctel	1:16	1:16	1:16	1:16		
-												+	+	-	-			
Titrace		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096					
		1:1	1:100	1:1	1:100	ctel	1:10											
			+		(+)	-												
		1:10	1:30	1:100	1:300	1:1000	ctel											
					+	-	-											

Nahřáté karty

Typování Rh, Kell, Kidd

- U PAT pozitivních erytrocytů-vždy použít monoklonální diagnostika :
 - Pro zkumavkové testy
 - Pro gelové testy
- Nové možnosti – časově náročné – genetika:
 - ID Core
 - Bloodchip

Monoklonální x Polyklonální



Pacienti po transfuzích

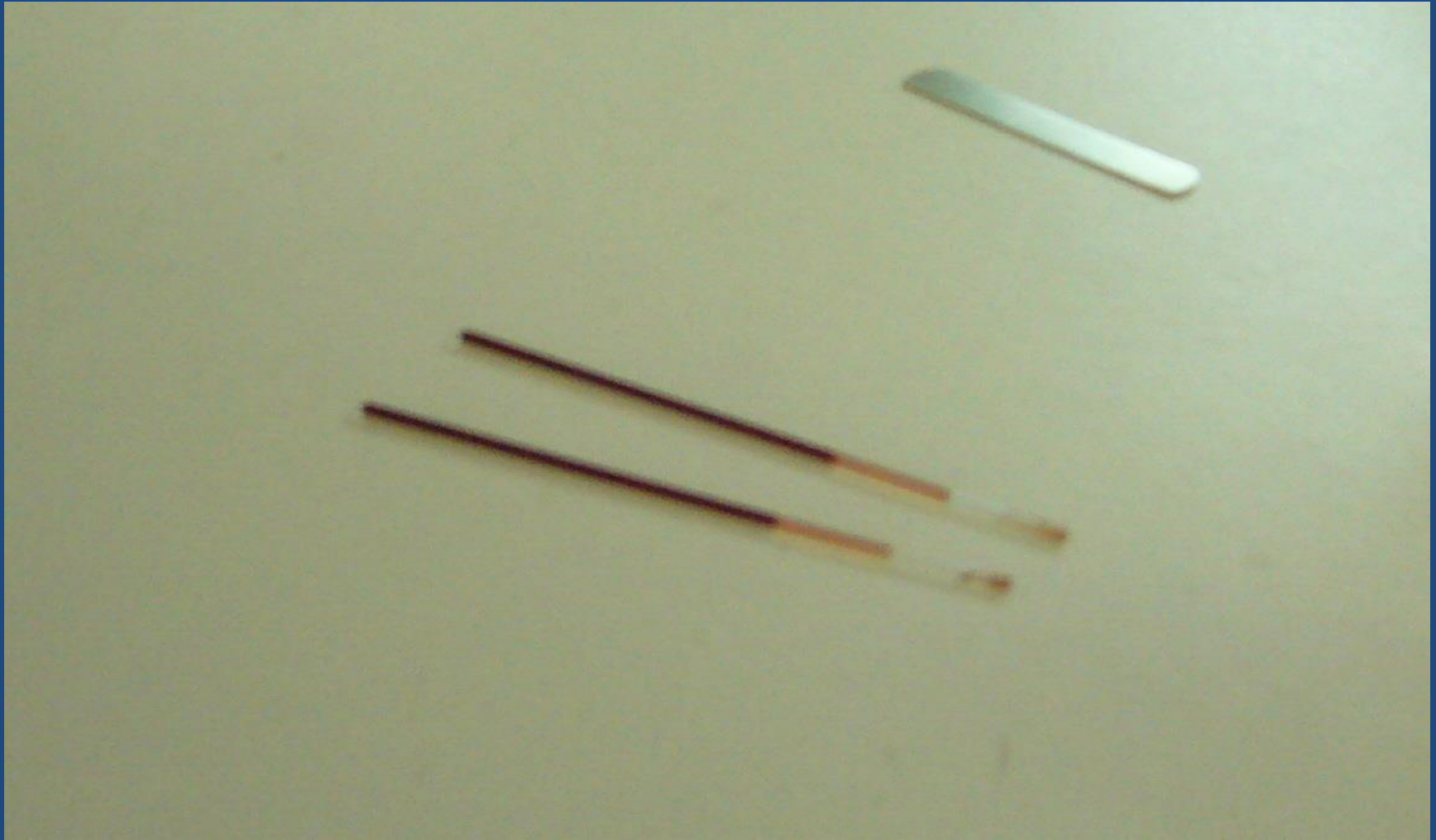
- Pokud nejsou známy antigeny před podáním transfuze
- Při typování zjištěna dvojí populace
- Separace v kapilárách k rozlišení vlastních a natransfundovaných erytrocytů

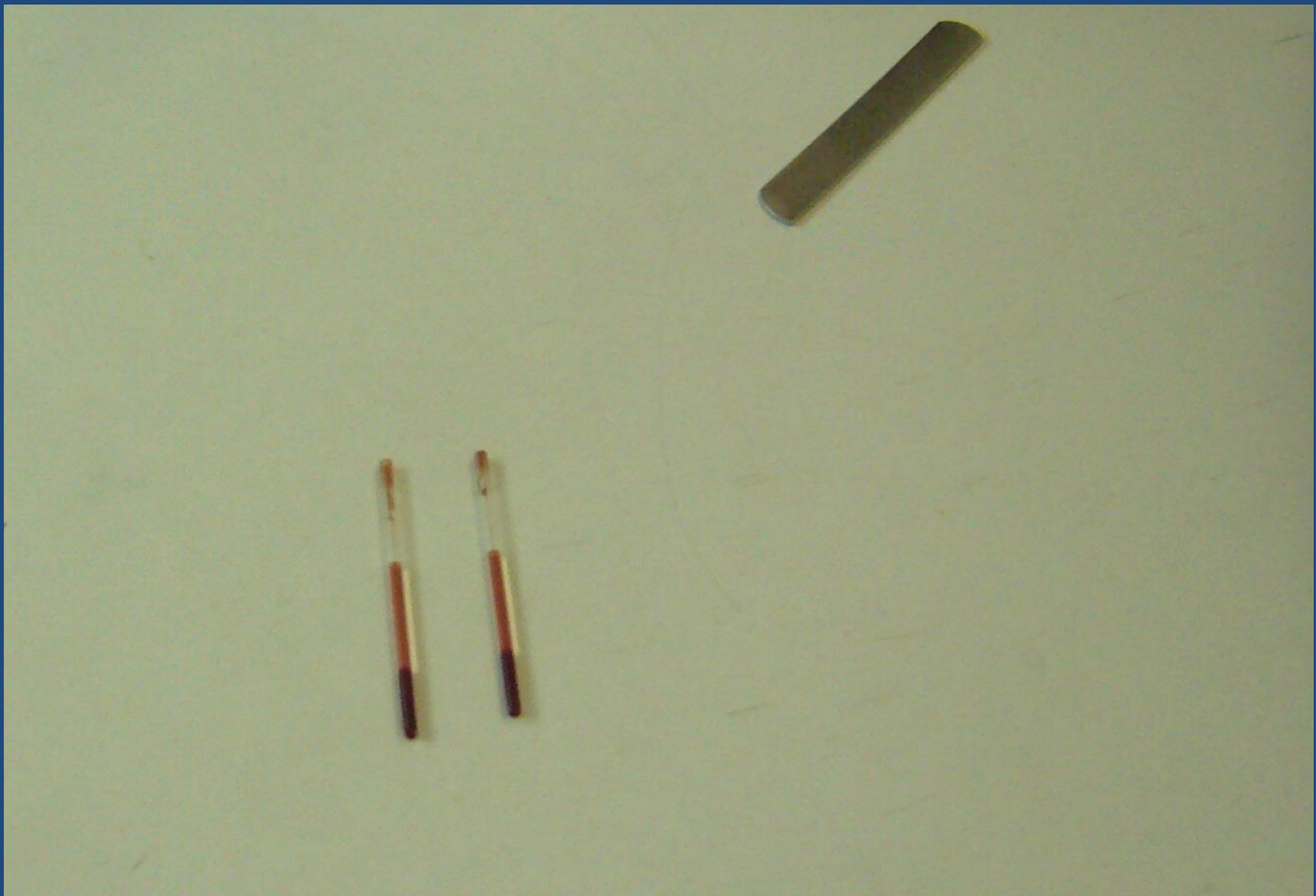
Separace v kapilárách













KAPILÁRY

PLNÁ KREV

Správná žádanka

Druh primárního vzorku krev		Datum odběru: 01.12.2014	Čas odběru: 08:35
Požadováno pro			
☒ komplikace při identifikaci protilátek (+ vyšetření HLA protilátek v případě potřeby)	☒ komplikace při zkoušce kompatibility (+ vyšetření HLA protilátek v případě potřeby)		
☐ komplikace při určování skupiny ABO	☐ komplikace při určování Rh(D)		
☐ komplikace při určování dalších antigenů	☐ potransfuzní reakce		
☐ hemolytické onemocnění novorozence	☒ jiné důvody		
☐ Donath-Landsteiner test (PO OBJEDNÁNÍ)	☐		
Výsledky vašich vyšetření			
ABO A RhD pozitivní		Reakce nepravidelných protilátek (prostředí, síla, titr aj.) - přiložte kopie vašich výsledků	
Rh fenotyp ccD.ee kk Cw neg.		anamnesticky aloprotilátka anti-C (květen 2013)	
Další antigeny Jk(a+b+)		vyš. 4.11.2014 PAT 4+, autoprotilátky NAT 2+, ET 4+, panel pozitivní s všemi dg. ery v NAT 2+, ET 4+, provedeno vysycení séra 9x, po vysycení neprokázána specifická aloprotilátka, nyní opět velmi anemický, prosíme o vysycení séra	
Imunohematologická anamnéza			
labor.imunohem. nálezy v anamnéze		medikace	
Pac. s dg. sekundární AIHA, byl vyšetřen v Motole v květnu 2013, kdy zjištěna aloprotilátka anti-C.			
		těhotenství (počet,HON),týden současného těhotenství	
transfuze (počet, data posledních)			
4.11.2014 1 TU, 5.11.2014 1 TU ERD, 14.11.2014 2TU ERD, 26.11.2014 2TU ERD, 1.12. 1 TU ERD			
Identifikace zadavatele		Požadované vzorky	
Vyšetření účtovat na		viz laboratorní příručka	
IČP 05002320	Odbornost 1F1	10-20 ml srážlivé krve	

Absorpce

- Navázání protilátek na vlastní nebo dárcovské erytrocyty
- Odlišení auto a aloprotilátek
- Identifikace ze směsi protilátek
- Vyloučení specifických klinicky závažných protilátek
- Zajištění vhodných transfuzních přípravků

Opakovaná absorpce = vysycování

- Nespecifické autoprottilátky se naváží na vlastní nebo dárcovské erytrocyty shodné v Rh, Kell, Kidd

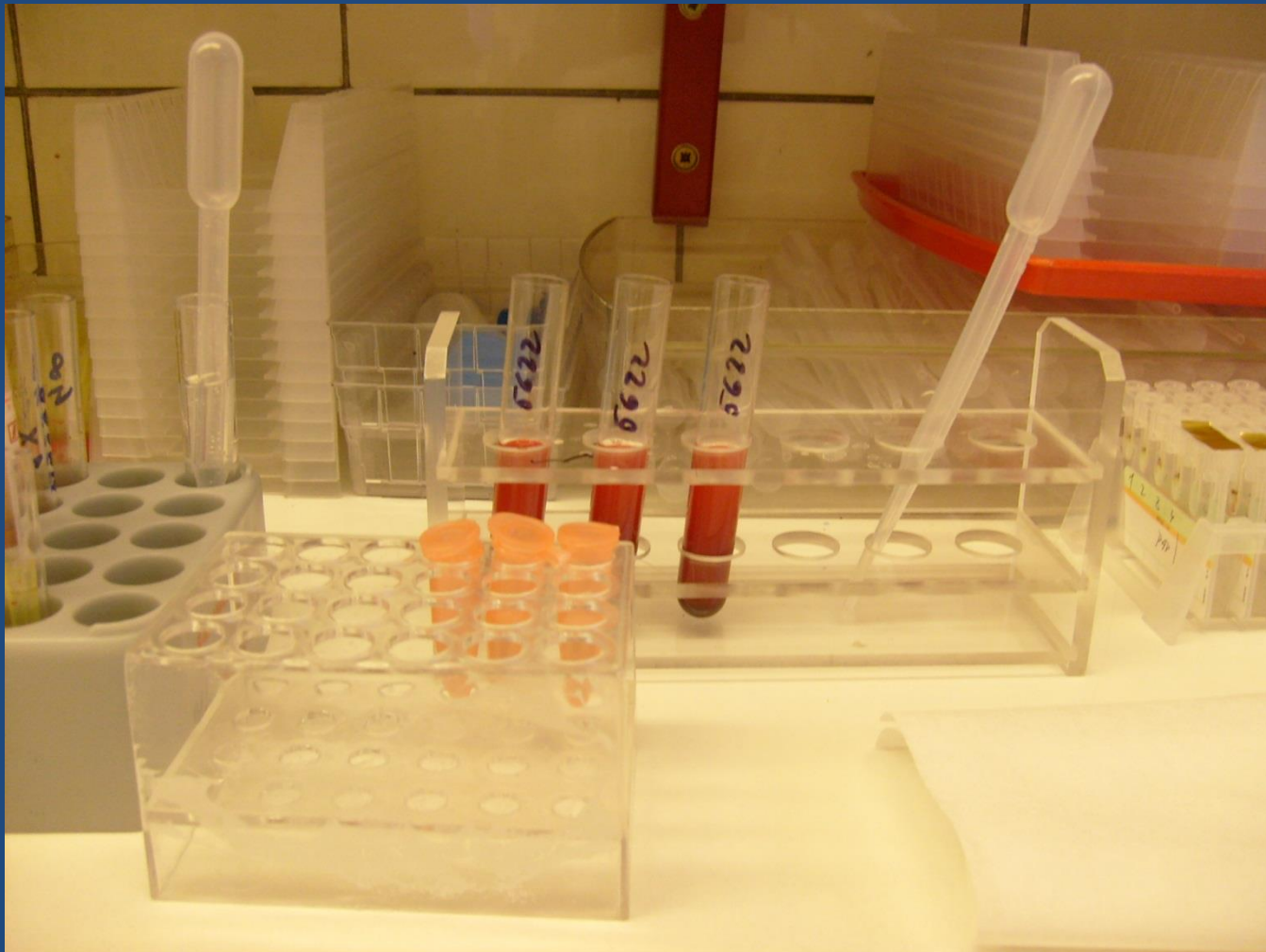
Vysycování

- Vlastními erytrocyty pokud:
 - Nebyly podány transfuze v posledních 2 měsících
 - Pacient má dobrý KO
- Např. před plánovanou operací
- Dárcovskými erytrocyty shodnými v Rh, Kell, Kidd systémech

Příprava ery

- 3x promyté erythrocyty – vlastní / dárcovské
- 0,5 ml suchých ery
- 4 ml fyz.roztoku
- 0,5 ml ficinu
- Inkubovat 15 minut při 37°C
- Potom opět promýt fyz. roztokem
- Zcentrifugovat do sucha

Příprava ery



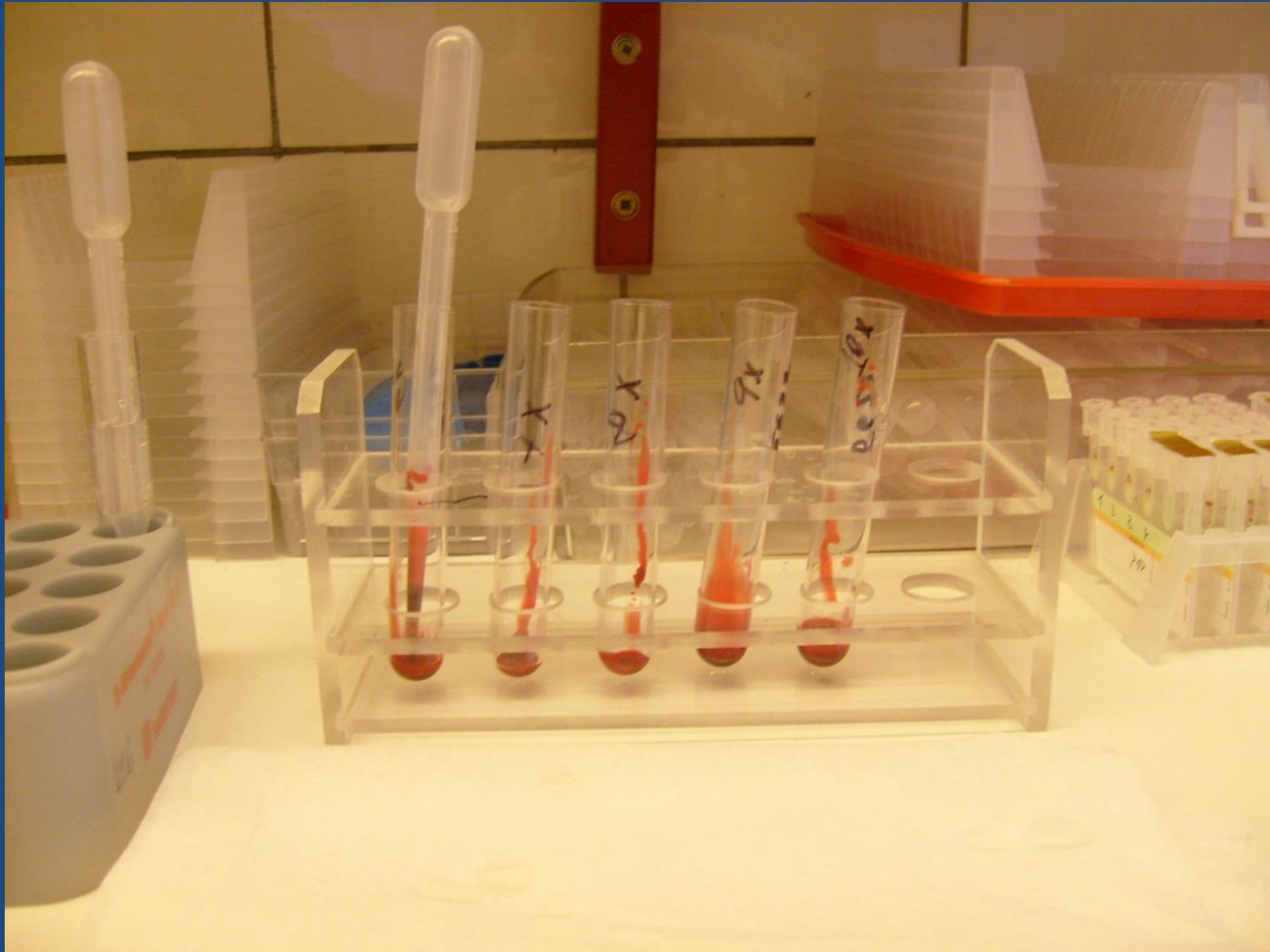
Správný odběr

- Na žádance máme uvedeno:
 - 5-10ml nesražené krve
 - 5-10ml sražené krve
- Na vysycování je potřeba SÉRUM !!!

Vysycování - postup

- 1. Do suché zkumavky 12-14 kapek séra
 - 2. Přidat 6-7 kapek suchých ficinovaných ery
 - 3. Přidat 12-14 kapek PEGu – stejný počet kapek jako séra
-
- Dodržet toto pořadí!!!
 - Promíchat a inkubovat

Naficinované ery

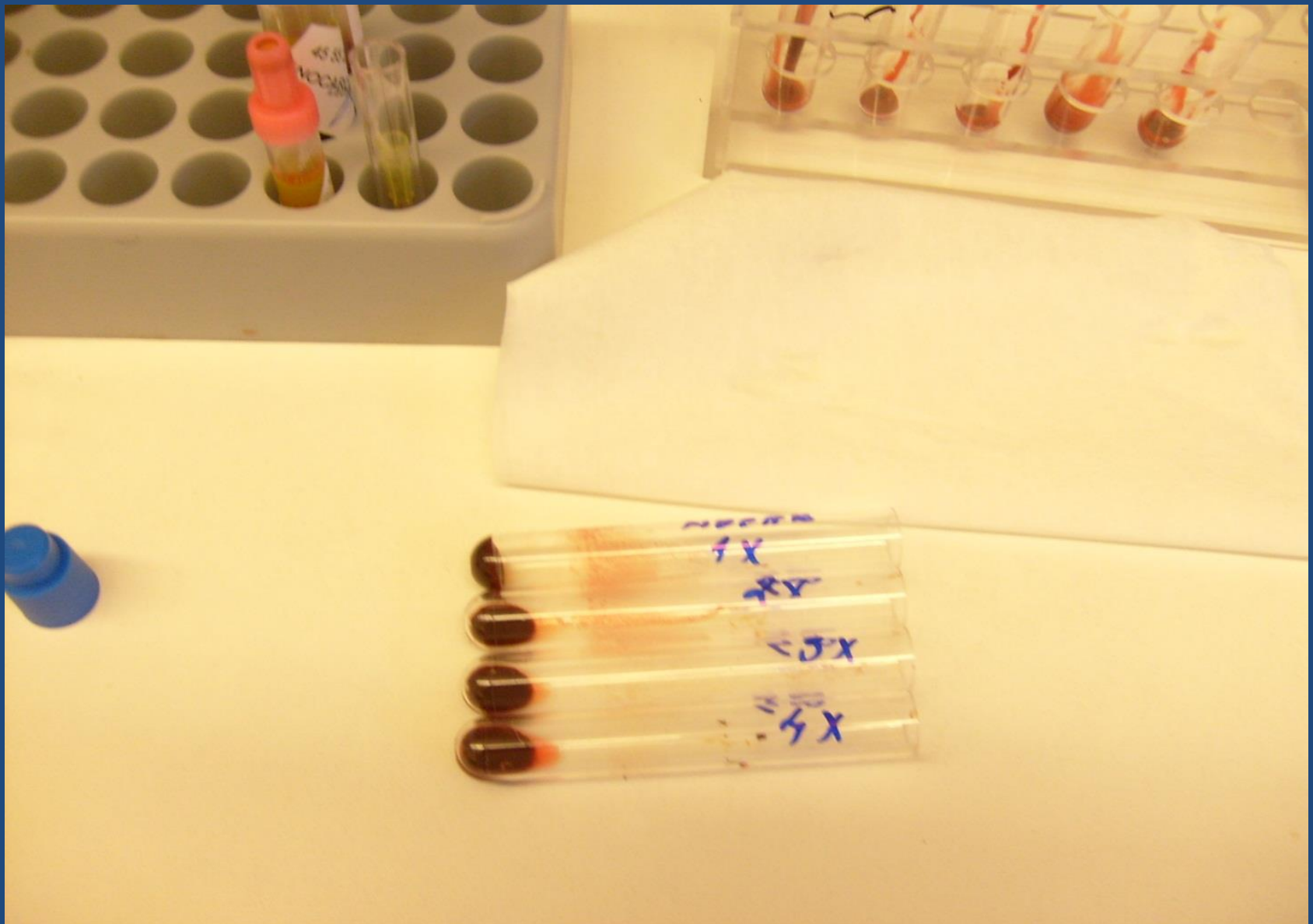


Vysycování

- Podle specificity PAT – zda jde o senzibilizaci:
 - Anti-IgG: provádíme další kroky při 37°C
 - Anti-IgG,-IgM,-C3d,-C3c: střídáme prostředí inkubace 4°C a 37°C
- Pomůcka - lichá je lednice !

Vysycování

- Po 15 minutách inkubace – centrifugace:
 - 2 minuty
 - 3500 – 3700 ot./min
- Do zkumavek s předkapaným počtem ery přidáváme supernatant
- Protřepeme a inkubujeme opět 15 minut
- Nepřidává se PEG !



Vysycování

- Po 5. – 6. kroku → screening protilátek
- Pokud jsou reakce negativní – mohou se provést testy compatibility
- Pokud jsou reakce pozitivní i negativní=
= jde o směs auto a aloprotilátek
- Nutné provést identifikaci

Vysycování

- Reakce zeslabené, ale pozitivní -> pokračovat v dalším vysycování
- U některých pacientů zůstává enzym pozitivní i po 12. vysycení, NAT negativní

Auto + aloprotilátka

	DIANA 4		PAP BR		NAT	
1			///		#	
2			///		#	
3			///		#	
4			///		#	
	VL. ER5		///		///	
Serum kys. dohr. evy ccddee Kk + FIC + PEG ^{6/34} P/W NAT						
1	biond 4				#	1
2					#	1
3	ccddee Kk			8x	#	#
4					#	1
						5x

Časový přehled – neznámý pacient

- 9:00 - příjem vzorku
- Proprání ery, SCR, PAT, typování antigenů
– 10:00
- Separace v kapilárách – opakované typování
– 11:00
- 11:00 - příprava vybraných dárcovských erytrocytů – proprání, ficin, proprání
- 12:00 - začátek vysycování – většinou pokračování další den

Časový přehled – známý pacient

- 9:00 - příjem vzorku, současně proprání ery pacienta i dárcovských ery, SCR, PAT
- 10:00 - začátek vysycování
- 12-13:00 - SCR po 5.- 6. vysycení
- 14:00 - vysycené sérum připravené k expedici

1 den v NRL

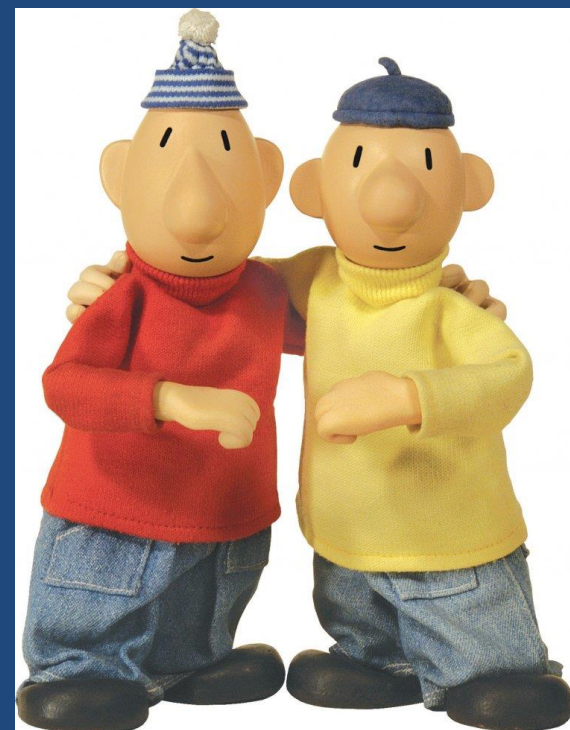
- 4 laborantky + 1 částečný úvazek
- Přehled jednoho dne v referenční laboratoři:
 - 22 pacientů
 - 6 vysycování

6.1.2015

- 22 pacientů, 6x vysycování
- 7:30 Bulovka – KS
- 8:00 Čáslav – 2 pacienti na vysyc
- 8:40 ÚVN – 1 vysyc
- 9:00 VFN – 1 vysyc + 2x ID
- 9:30 6 pac ÚHKT – chim, tdk, ID, titrace + 1 vysyc
- 11:00 Motol – 3 chim, titrace
- 12:30 ÚVN – 1 vysyc
- 13:00 – další 4 ID

Závěr dne

- U všech stačilo 4x – 6x vysycení
- Nemusely jsme typovat z kapilár
- Většina byla otypovaná a známá



- Vysycená séra všech pacientů připravena do 16 hod k odeslání

Statistika NRL za rok 2014

- 3000 pacientů
- 430 negativních
- 550 chimerismů po TDK
- 270 vyšetření před TDK
- 365 vysycování
- 838 identifikací
- 10 HFA

Děkuji za pozornost



- Těším se na další spolupráci
- Nebojte se nám zavolat ☺