

# OBILJEŽJA, AUTOPROTUTIJELA I LIJEČENJE BOLESNIKA S AUTOIMUNOSNOM HEMOLITIČKOM ANEMIJOM

MIRELA RAOS<sup>1</sup>, DRAŽEN PULANIĆ<sup>2</sup>, SANJA MALJKOVIĆ<sup>3</sup>, BRANKA GOLUBIĆ ČEPULIĆ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb, Hrvatska; <sup>2</sup>Zdravstveno veleučilište Zagreb, Zagreb, Hrvatska; <sup>3</sup>Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska; <sup>4</sup>Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb, Hrvatska; <sup>5</sup>Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska

**Uvod:** Autoimunosna hemolitička anemija (AIHA) je vrlo rijetka autoimunosna bolest uzrokovana autoprotutijelima usmjerenima na bolesnikove eritrocite koja se dokazuje kliničkom slikom, biokemijskim pokazateljima hemolize uz isključenje ostalih uzroka hemolize i pozitivnim direktnim antiglobulinskim testom (DAT), osim kod DAT negativnih AIHA. Pozitivan DAT mogu imati i zdrave osobe i bolesnici bez AIHA-e. Liječenje ovisi o vrsti AIHA-e i osnovnoj bolesti, a sastoji se od više linija terapije. Transfuzijsko liječenje je rizik zbog moguće prisutnih aloprotutijela prikrivenih autoprotutijelima koja mogu uzrokovati hemolitičku transfuzijsku reakciju (HTR). *Cilj* rada bio je istražiti obilježja bolesnika, serološka obilježja autoprotutijela, hematološke pokazatelje anemije, biokemijske pokazatelje hemolize i liječenje bolesnika s AIHA-om. *Postupci:* U ovo retrospektivno istraživanje uključeno je 27 bolesnika kojima je od 1.siječnja 2018. do 31.prosinca 2020. godine dijagnosticirana AIHA u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Za dijagnostiku su provedena imunohematološka ispitivanja i laboratorijski pokazatelji hemolize. Učinkovitost transfuzijskog liječenja definirana je kao porast vrijednosti hemoglobina (Hb)  $\geq 5$  g/L po dozi koncentrata eritrocita. *Rezultati:* Najviše je bolesnika dijagnosticirano s toplom AIHA-om (70,4 %), zatim s bolesti hladnih aglutinina (14,8 %) i miješanom AIHA-om (7,4 %), a najmanje s paroksizmalnom hladnom hemoglobinurijom (PCH, engl. *Paroxysmal cold hemoglobinuria*) i DAT-negativnom AIHA-om (po 3,7 % svaka). Prva linija terapije sastojala se od primjene kortikosteroida, a u drugoj i trećoj liniji 37 % bolesnika je primilo rituksimab. U 7,4 % bolesnika otkrivena su aloprotutijela. Transfuzijsko liječenje primilo je 81,5 % bolesnika, bez prijavljene transfuzijske reakcije. Učinkovitost transfuzijskog liječenja zabilježena je u 76,8 % slučajeva, s medijanom porasta Hb od 7,5 g/L po dozi krvi. *Zaključak:* Najviše je bilo dijagnosticirano toplih AIHA, a najmanje PCH i DAT-negativnih AIHA. U prvoj liniji terapije primjenjivani su kortikosteroidi, dok je u drugoj i trećoj liniji terapije najčešće primijenjen rituksimab uz imunosupresivnu terapiju. Transfuzijsko liječenje bilo je uspješno u većine bolesnika, bez prijavljenih transfuzijskih reakcija.

**Ključne riječi:** autoimunosna hemolitička anemija, autoprotutijela, aloprotutijela, liječenje, transfuzijsko liječenje

**Adresa za dopisivanje:** Mirela Raos  
Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju  
KBC Zagreb  
Kišpatićeva ul. 12  
10000 Zagreb, Hrvatska  
E-pošta: mirela.raos@kbc-zagreb.hr

## UVOD

Autoimunosna hemolitička anemija (AIHA) je stečena autoimunosna bolest obilježena stvaranjem autoprotutijela imunoglobulina (Ig) G, IgM i/ili IgA usmjerenih na antigene koji se nalaze na površini vlastitih eritrocita, uz aktivaciju ili bez aktivacije komponenata komplementa, što uzrokuje hemolizu i anemiju (1). AIHA je relativno rijetka bolest za koju se procjenjuje da se javlja u 1 do 3 slučaja na 100 000 stanovnika godišnje (2). Zahvaća sve uzraste, s time da se u više od

70 % slučajeva javlja u bolesnika starijih od 40 godina, s najvećom incidencijom između 60 i 70 godina (3). AIHA se pojavljuje češće u žena nego u muškaraca, s omjerom 6:4 (3). Klinički se AIHA dijeli na primarnu i sekundarnu, ovisno o tome je li AIHA osnovna bolest, ili se nalazi uz neku drugu osnovnu bolest, najčešće autoimunosnu bolest (26 %), limfoproliferativnu bolest (24 %), imunodefijenciju, tumor i infekciju (4).

Dijagnoza bolesti se postavlja na temelju kliničke slike i laboratorijskih pokazatelja anemije i hemolize, te

testova koji ukazuju na prisutnost autoprotutijela i/ili aktiviranih komponenti komplemента vezanih za eritrocite bolesnika. Laboratorijski pokazatelji anemije su smanjena serumska koncentracija hemoglobina i vrijednost hematokrita, a hemolize povećana serumska koncentracija bilirubina (posebice nekonjugirano-ga) i enzima laktat dehidrogenaze (LDH) te smanjena vrijednost haptoglobina. Kao posljedica kompenzacijskog mehanizma koštane srži na anemiju, broj retikulocita u krvi je povećan (5). Osnovni dijagnostički test je direktni antiglobulinski test (DAT). Polispecifičnim DAT-om se dokazuju anti-IgG autoprotutijela i/ili komponente komplemента vezane za eritrocite bolesnika. Monospecifičnim DAT-om se dokazuju specifična autoprotutijela IgG, IgA, IgM te komponente komplemента C3c i C3d. Prije postavljanja dijagnoze potrebno je isključiti ostale bolesti ili stanja povezana s hemolizom, npr. nasljedne te stečene imunone (uzrokovane aloprotutijelima, lijekovima ili transplantacijom krvotvornih matičnih stanica i organa) i neimunone hemolitičke anemije (6).

Prema serološkim obilježjima autoprotutijela, AIHA-e se dijele na tople (60-70 %), hladne (20 – 25 %) i miješane (5 – 10 %) (7). Najčešće hladne AIHA-e su bolest hladnih aglutinina (CAD, od engl. *cold agglutinin disease*), ili ako je prisutna i osnovna bolest, sindrom hladnih aglutinina (CAS, od engl. *cold agglutinin syndrome*) (8), a vrlo rijetko se radi o paroksizmalnoj hladnoj hemoglobinuriji (PCH, od engl. *paroxysmal cold hemoglobinuria*). Topla AIHA obilježena je autoprotutijelima IgG (rjeđe IgA ili IgM), optimalno reaktivnima na 37° C. Kod hladnih AIHA, CAD je uzrokovan autoprotutijelima IgM, optimalno reaktivnima na 4° C, u titru  $\geq 64$ , a PCH bifazičnim autoprotutijelima IgG. U miješanoj AIHA-i prisutna su topla autoprotutijela IgG i hladna IgM, širokog temperaturnog raspona djelovanja  $\geq 30^\circ$  C (9). U rijetkim slučajevima bolesti DAT može biti negativan. DAT-negativna AIHA uzrokovana je autoprotutijelima IgG ispod praga osjetljivosti testa ili rjeđe autoprotutijelima IgM ili IgA koja se ne otkrivaju rutinskim testiranjem (10).

Liječenje ovisi o vrsti AIHA-e i osnovnoj bolesti. Tople AIHA-e liječe se kortikosteroidima, a u težim slučajevima i rituksimabom. Poseban izazov u liječenju predstavljaju bolesnici s Evansovim sindromom koji je obilježen istodobnom pojavom AIHA-e i imunone trombocitopenije (ITP), bez poznate etiologije. Radi se o bolesnicima s nepredvidljivim tijekom bolesti, praćenim razdobljima remisije i egzacerbacije u kojih se odgovor na terapiju i trajna remisija bolesti postiže primjenom rituksimaba (11). U kasnijim linijama terapije moguće je primijeniti imunosupresivne lijekove, kao npr. azatioprin, ciklosporin, mikofenolat, ili splenektomiju. Liječenje kod CAD-a je potrebno samo u težim slučajevima, a sastoji se od primjene

rituksimaba, uz primjenu ili bez primjene bendamustina, dok je kod PCH rijetko potrebno. Obvezno je utopljanje bolesnika i izbjegavanje hladnoće. U liječenju bolesnika s miješanom AIHA-om preporučuje se primjena kortikosteroida u kombinaciji s rituksimabom. U životno ugroženih bolesnika može se kao pomoćna terapija primijeniti intravenski imunoglobulin (IVIG) i provesti izmjena plazme postupcima plazmafereze (4). Bolesnici sa simptomatskom anemijom, najčešće umorom, vrtoglavicom, zaduhom i tahikardijom, primaju potporno transfuzijsko liječenje eritrocitnim pripravcima. Aloprotutijela prikrivena autoprotutijelima mogu uzorkovati HTR nakon transfuzije nepodudarnih eritrocitnih pripravaka i dodatno pogoršati stanje bolesnika (12).

## CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je istražiti obilježja bolesnika, serološka obilježja autoprotutijela, hematološke pokazatelje anemije, biokemijske pokazatelje hemolize i liječenje bolesnika s AIHA-om.

## POSTUPCI

Ovo jednocentrično retrospektivno istraživanje provedeno je u razdoblju od 1.1.2018. do 31.12.2020. godine u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC-a Zagreb i provedeno je u skladu s etičkim standardima Helsinške deklaracije iz 1975. godine, revidirane 2000. godine.

Dijagnoza AIHA-e je postavljena ako je u bolesnika s anemijom bio pozitivan DAT, uz prisutan barem jedan pokazatelj hemolize (serumska koncentracija bilirubina i laktatdehidrogenaze - LDH, povećana haptoglobina smanjena), a prethodno su isključeni ostali uzroci hemolize. Transfuzijsko liječenje definirano je kao transfuzijski događaj u kojemu su bolesnici primili određen broj doza koncentrata eritrocita (KE). Učinkovitost transfuzijskog liječenja zabilježena je ako je vrijednost hemoglobina (Hb) porasla za  $\geq 5$  g/l po dozi KE.

Eritrocitni antigeni bolesnika, barem antigeni D, C, c, E, e, K, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, određeni su primjenom monoklonskih reagensa (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ, USA) prema uputi proizvođača. U slučaju prethodnog transfuzijskog liječenja (<3 mjeseca) ili ako nije bilo moguće određivanje eritrocitnih antigena reagensima kojima se testiranje izvodi u indirektnom antiglobulinskom testu (IAT) zbog autoreaktivnosti

nakon dodavanja antihumanog globulina, učinjena je genotipizacija. Genotip je određen postupkom reakcije lančane polimeraze u stvarnom vremenu, s pomoćkompleta RBC-Fluogene vERYfy eXtend (Inno-Tra- in Diagnostik GmbH, Kronberg, Njemačka).

Polispecifični DAT rađen je u mikrokartici Polyspecific anti-IgG, anti-C3d (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA), a monospecifični DAT u mikrokartici Monospecific anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-C3c i anti-C3d (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) prema uputama proizvođača. U slučaju otkrivanja za eritrocite vezanih autoprotiljela razreda IgG rađena je kemijska elucija pomoću kompleta za eluciju DiaCidel (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) prema uputi proizvođača. Za pretraživanje iregularnih antieritrocitnih autoprotiljela korištene su polispecifične mikrokartice Ortho BioVue Poly mikrokartica (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ, USA) i komercijalni 0,8%-tni trostanični panel test eritrocita Surgiscreen (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ, USA). U slučaju pozitivnog rezultata IAT-a određena je specifičnost protutijela u polispecifičnim mikrokarticama polyspecific anti-IgG, anti-C3d (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ, USA) i mikrokarticama neutral (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ, USA) s komercijalnim 0,8 %-tnim jedanaeststaničnim panelom test eritrocita obrađenih i neobrađenih enzimom Panel C (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ, USA). U svrhu otkrivanja prisutnih alopotutijela korišteni su postupci adsorpcije za uklanjanje autopotutijela iz plazme bolesnika. Ukoliko bolesnik prethodno nije transfuzijski liječen, primjenjivani su eritrociti bolesnika za autolognu adsorpciju koji su prethodno obrađeni reagensom ZZAP. Reagens ZZAP je mješavina papaina i 0,2 M ditioteritola (DTT) koja služi za uklanjanje autoprotiljela vezanih na eritrocite bolesnika. Ako je bolesnik prethodno transfuzijski liječen (<3 mjeseca), za adsorpciju su primijenjeni alogeni eritrociti u kombinacijama tri različita Rhesus fenotipa krvne skupine O (R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>, rr), od čega su barem jedni bili Jk<sup>a</sup>, a drugi Jk<sup>b</sup> negativni.

Titar hladnih autoprotiljela rađen je uz primjenu mješavine odraslih eritrocita, eritrocita novorođenčeta i vlastitih eritrocita na 4°C. Kao rezultat titra uzet je pozitivan rezultat s najvećim razrjeđenjem seruma. Temperaturni raspon rađen je iz serumskog razrjeđenja na temperaturama 4°C, 20°C, 30°C i 37°C. Na svakoj temperaturi koristio se novi set epruveta kako bi se izbjeglo prenošenje aglutinata. Za test je korištena mješavina odraslih eritrocita krvne skupine O. Donath-Landsteinerov test rađen je inkubacijom plazme bolesnika s P<sub>1</sub> eritrocitima krvne skupine O na 0°C, pa potom na 37°C. Kao izvor komplementa korišten je svježi serum darovatelja. Rezultat je bio pozitivan ako je nakon inkubacije na 37°C opažena hemoliza.

Podaci o dijagnostici i liječenju bolesnika dobiveni su iz transfuzijskog informacijskog sustava i bolničkog informacijskog sustava. Za analizu podataka korišteni su postupci deskriptivne statistike.

## REZULTATI

### Osnovna obilježja bolesnika s AIHA-om

U istraživanom razdoblju AIHA je dijagnosticirana u 27 bolesnika (medijan dobi 64 godine, od 24 do 90). Ukupno je 23 (85,2 %) bolesnika bilo starije od 40 godina. Bolesnici su najčešće bile žene (66,7%). Manje od polovice bolesnika imalo je primarnu AIHA-u. Od sekundarnih AIHA, najviše bolesnika bolovalo je od zloćudnih bolesti, najčešće limfoproliferativnih bolesti, a manje od stanja nakon alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica, imunskih bolesti i infekcija (Tablica 1).

Tablica 1. Osnovna obilježja bolesnika s autoimunom hemolitičkom anemijom (N=27)

Obilježja bolesnika	N (%)
Spol (ženski:muški)	18:9 (66,7:33,3)
Dob godine (medijan, raspon)	65 (24-90)
<40 godina	4 (14,8)
40 do 60 godina	8 (29,6)
>60 godina	15 (55,6)
<b>Klinička podjela AIHA-e</b>	
Primarna	11 (40,7)
Sekundarna	16 (59,3)
<b>Osnovna bolest</b>	
Zloćudne bolesti	12 (44,4)
Stanje nakon alogenične transplantacije krvotvornih matičnih stanica	2 (7,4)
Imunosne bolesti	1 (3,7)
Infekcije	1 (3,7)
<b>Serološka podjela AIHA-e</b>	
Topla AIHA	19 (70,4)
CAD	4 (14,8)
Miješana AIHA	2 (7,4)
PCH	1 (3,7)
DAT-negativna AIHA	1 (3,7)

AIHA, autoimunska hemolitička anemija; CAD, bolest hladnih aglutinina; DAT, direktni antiglobulinski test; PCH, paroksizmalna hladna hemoglobinurija

Prema serološkim obilježjima autoprotutijela većina bolesnika imala je toplu AIHA-u (70,4 %), zatim CAD (14,8%) i potom miješanu AIHA-u (7,4 %), a po jedan bolesnik PCH i DAT-negativnu AIHA-u (3,7 %) (Tablica 1). Uz prisutna slobodna autoprotutijela u 2 (7,4 %) bolesnika otkrivena su i aloprotutijela specifičnosti anti-k, odnosno anti-S.

### Laboratorijski pokazatelji anemije i hemolize

Laboratorijski pokazatelji anemije i hemolize pri dijagnostičkoj obradi bolesnika prikazani su u tablici 2 (broj učinjenih laboratorijskih pokazatelja prikazan je u legendi tablice). Svi bolesnici imali su smanjenu serumsku koncentraciju Hb. Više od polovice bolesnika, 15 (55,6 %), imalo je početni Hb niži od 60 g/l. Broj retikulocita u krvi bio je snižen u 5 %, a povišen u 75 % slučajeva. Svi bolesnici imali su povećanu serumsku koncentraciju LDH, 88 % bolesnika imalo je povećanu serumsku koncentraciju ukupnog bilirubina, 93,8 % konjugiranog bilirubina, a 76,5 % smanjenu serumsku koncentraciju haptoglobina.

Tablica 2. Laboratorijski krvni pokazatelji anemije i hemolize (N=27)\*

Laboratorijski pokazatelji (mjerne jedinice)	Medijan (minimum - maksimum)	Referentne vrijednosti
Hb (g/l)	55,0 (37 - 86)	M 138 - 175; Ž 119 - 157
Htc (l/l)	0,159 (0,114 - 0,244)	M 0,415 - 0,530; Ž 0,356 - 0,470
Rtc (/1000)	103,9 (4,8 - 452,9)	22 - 97
Rtc (x10 <sup>9</sup> )	202 (10 - 667)	5 - 21,6
T-Bil (μmol/l)	40 (9 - 169)	3 - 20
D-Bil (μmol/l)	11 (6 - 37)	< 5
LDH (U/l)	461 (261 - 1596)	< 241
HP (g/l)	0,1 (0,08 - 4,13)	0,3 - 2

Hb, hemoglobin; Htc, hematokrit; Rtc, retikulociti; T-Bil, ukupni (T od engl. total) bilirubin; D-Bil, konjugirani (D od direktni) bilirubin; LDH, laktat dehidrogenaza; HP, haptoglobin

\*Dostupni su podaci za sve bolesnike za Hb i Htc, N=27; za Rtc N=20; za T-Bil N=25; za D-Bil N=16; za LDH N=26, za HP N=17

### Liječenje AIHA-e

Bolesnici su liječeni s tri linije terapije. Prvu liniju terapije primilo je 26 (96,3 %) bolesnika, drugu liniju 9 (33,3 %), a treću 2 (7,4 %) bolesnika. Prva linija terapije sastojala se od primjene kortikosteroida. Uz kortikosteroide u životno ugroženih bolesnika u prvoj liniji terapije primijenje nisu IVIG u 11 (40,7 %) slučajeva ili je učinjen postupak plazmafereze u 2 (7,4 %) slučajeva. U jednog bolesnika liječenog kortikosteroidima i IVIG-om liječenje kortikosteroidima je prekinuto zbog komplikacija liječenja, a bolesnik je u nastavku

liječen azatioprinom. Druga linija terapije sastojala se od primjene rituksimaba, samostalno u 3 (11,1 %), ili u sklopu citostatičke terapije u 5 (18,5 %) bolesnika. U jednom slučaju bolesnik je u drugoj liniji terapije bio liječen splenektomijom. Treća linija terapije sastojala se od primjene rituksimaba u 2 (7,4 %) bolesnika, od kojih se u jednom slučaju radilo o bolesniku koji je prethodno splenektomiran izvan naše ustanove.

Tablica 3. Liječenje autoimunomne hemolitičke anemije (N=27)

Linija terapije	Terapija	N (%)
Prva linija	Kortikosteroidi	13 (48,1)
	Kortikosteroidi uz intravenske imunoglobuline	11 (40,7)
	Kortikosteroidi uz plazmaferezu	2 (7,4)
	Nije primijenjena prva linija terapije*	1 (3,7)
	<b>Ukupno</b>	<b>27 (100)</b>
Druga linija	Rituksimab	3 (11,1)
	Rituksimab u sklopu citostatičke terapije	5 (18,5)
	Splenektomija	1 (3,7)
	<b>Ukupno</b>	<b>9 (33,3)</b>
Treća linija	Rituksimab	2 (7,4)
	<b>Ukupno</b>	<b>2 (7,4)</b>

\*za jednog bolesnika s bolešću hladnih aglutinina nije primijenjeno liječenje

### Transfuzijsko liječenje eritrocitnim pripravcima

Od ukupno 27 bolesnika, transfuzijsko liječenje eritrocitnim pripravcima primila su 22 (81,5 %) bolesnika. Dva (7,4 %) bolesnika su uz autoprotutijela razvila aloprotutijela specifičnosti anti-k, odnosno anti-S, te su im za transfuzijsko liječenje primijenjeni specifični antigen negativni eritrocitni pripravci.

Bolesnici su primili ukupno 98 (1-21) doza KE tijekom 65 transfuzijskih događaja, što je činilo 1,5 doza po bolesniku u svakoj transfuziji. Od 59 transfuzijskih događaja za koje su bili poznati podaci za Hb i poslije transfuzijskog liječenja, bilo je 46 (78 %) učinkovitih transfuzija (porast Hb  $\geq 5$  g/l). Nakon transfuzijskog liječenja nije zabilježena niti jedna transfuzijska reakcija, a medijan porasta Hb iznosio je 7,5 g/l po dozi krvi.

### RASPRAVA

U ovom radu najviše bolesnika imalo je toplu AIHA-u, zatim CAD, potom miješanu, a najmanje PCH i DAT-negativnu AIHA-u. Od svih vrsta AIHA, jedino je CAD s udjelom od 14,8 % bio nešto niži od 20 - 25 % prijavljenih u literaturi (7,13), što se može protuma-



čiti teškom kliničkom slikom bolesnika s AIHA-om liječenih u KBC-u Zagreb. Obilježja analiziranih bolesnika s AIHA-om odgovarala su podacima iz literature (2). Prema spolu, najčešće su bile zastupljene žene, a s obzirom na dob, bolesnici stariji od 40 godina. Više od polovice bolesnika imalo je sekundarnu AIHA-u, najčešće uz zloćudnu bolest.

Udio bolesnika s teškom anemijom, gdje je Hb bio manji od 60 g/l imalo preko polovice bolesnika tijekom dijagnostičke obrade. U 75 % bolesnika s retikulocitozom postignut je dobar kompenzacijski odgovor na anemiju, iako je više od polovice bolesnika u podlozi AIHA-e imalo neku drugu osnovnu bolest. Retikulocitopenija je rijetka pojava u AIHA-i, a posljedica je nedovoljne proizvodnje eritrocita u koštanoj srži, npr. zbog infiltracije koštane srži, nedostatka željeza, vitamina, infekcija ili autoimunosne reakcije usmjerene na eritroidne prekursorske stanice (14). U ovom radu retikulocitopenija je zabilježena samo u jednom slučaju bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom (KLL) i sekundarnom toplom AIHA-om koji prethodno nije primao terapiju za KLL. Bolesnik je liječen kortikosteroidima nakon čega je postignuta parcijalna remisija, a potom je započeto liječenje KLL-a prema protokolu bendamustin-rituksimab.

Gotovo svi bolesnici primili su prvu liniju terapije koja se sastojala od kortikosteroida, osim bolesnika s CAD-om koji nije primio nikakvu terapiju jer je imao blaži tijek bolesti. U jednom slučaju liječenje kortikosteroidom je prekinuto zbog komplikacija te je nastavljeno azatioprinom. Uz kortikosteroide 40,7 % životno ugroženih bolesnika primilo je IVIG, a dvoje ih je bilo podvrgnuto postupcima plazmafereze, što također ide u prilog teškoj kliničkoj slici bolesnika liječenih u KBC-u Zagreb.

Rituksimab je primijenjen u 37 % bolesnika, u drugoj (28,3 %), odnosno trećoj liniji terapije (7,7 %). U jednom slučaju kirurški je odstranjena slezena u drugoj liniji terapije, u bolesnika koji je u to vrijeme liječen izvan naše ustanove. U svom istraživanju Roumier i sur. su imali veći udio bolesnika liječenih rituksimabom (45 %) i splenektomijom (15 %), dok je udio sekundarnih AIHA bio neznatno veći (65 %) nego u našem radu (15). Barcellini i sur. su na istraživanju bolesnika samo s primarnim AIHA-ma prikazali primjenu rituksimaba u 25 % slučajeva pretežito u drugoj liniji terapije, s boljim odgovorom na niske doze, nego na standardne doze terapije kod tople AIHA-e, osim u slučajevima CAD-a gdje se boljom pokazala primjena standardne doze terapije (16). Sukladno smjernicama (4,17) u ovom radu u liječenju teških bolesnika primijenjen je najčešće rituksimab, dok se splenektomija izbjegavala zbog komplikacija, posebno u bolesnika s AIHA-om u kombinaciji s drugim autoimunim bolestima.

Većina bolesnika je primila transfuziju eritrocitnih pripravaka, a liječenje je bilo učinkovito u 76,8 % bolesnika. Nakon transfuzijskog liječenja zabilježen je medijan porasta Hb od 7,5 g/l po dozi KE. Prema smjernicama za transfuzijsko liječenje, očekivani porast Hb nakon primijenjene jedne doze KEu odraslog klinički stabilnog bolesnika (bez krvarenja u tijeku) bez AIHA-e, iznosi otprilike 10 g/l (18). Das i sur. su u bolesnika s AIHA-om nakon transfuzijskog liječenja prijavili medijan porasta vrijednosti Hb od 8,8 g/l (19).

Ako tijekom prijetransfuzijskog ispitivanja aloprotutijela ostanu neotkrivena zbog prisutnih polispecifičnih autoprotilutijela u krvi bolesnika, ona mogu uzrokovati HTR (20). Stoga je za njihovo otkrivanje potrebno primijeniti specifične postupke koji uključuju adsorpciju autoprotilutijela. Prema svjetskoj literaturi, aloprotutijela su prisutna u otprilike jedne trećine bolesnika s AIHA-om (21). Učestalost aloprotutijela u ovom radu iznosila je 7,4 %, što je manje od 11,1 % koji su prijavili Barros i sur (22). Za razliku od često prijavljenih aloprotutijela uslučajevima samo serološki dokazanih autoprotilutijela, u njihovom radu aloprotutijela su utvrđena na klinički potvrđenim slučajevima AIHA-e (22), što je također bio slučaj i u ovom radu. Manji udio aloprotutijela u ovom radu, može se također tumačiti i manjom stopom aloimunizacije zbog preventivnog transfuzijskog liječenja antigen podudarnim eritrocitnim krvnim pripravcima po Rhesus, Kell i Kidd sustavima krvnih skupina svih bolesnika s AIHA-om.

Chen i sur. su analizirali transfuzijsko liječenje u 269 od 450 hospitaliziranih bolesnika s AIHA-om u 885 transfuzijskih događaja za koje su podaci bili dostupni i prijavili su učestalost transfuzijskih reakcija u 14 (1,6%) bolesnika: 13 febrilnih nehemolitičkih transfuzijskih reakcija, jedna alergijska reakcija i jedna nespecifična reakcija obilježena glavoboljom i povišenim krvnim tlakom, bez prijavljenog HTR-a (23). Yürek S i sur. nisu opazili transfuzijske reakcije uzrokovane auto- i/ili aloprotutijelima u 32 bolesnika s AIHA-om koja su transfuzijski liječena (12). U ovom radu nije bilo prijavljenih transfuzijskih reakcija, dok su svi bolesnici prije transfuzijskog liječenja primili premedikaciju. Rezultati prethodnog istraživanja nisu pokazali razliku u transfuzijskim reakcijama s obzirom na primijenjenu medikaciju (12).

## ZAKLJUČAK

Najviše bolesnika imalo je toplu AIHA-u, zatim CAD i miješanu AIHA-u, a najmanje PCH i DAT-negativnu AIHA-u. Gotovo svi bolesnici primili su prvu liniju terapije kortikosteroidima, dok je u drugoj i trećoj liniji terapije najčešće primijenjen rituksimab, sili bez primjene imunosupresivne terapije. Splenektomija je

izvedena samo u jednom slučaju. Transfuzijsko liječenje je bilo uspješno u većine bolesnika, bez prijavljenih transfuzijskih reakcija, te se sa sigurnošću može primijeniti u bolesnika s AIHA-om. Ograničenje ovog istraživanja bio je mali broj bolesnika s AIHA-om.

## ZAHVALA

Zahvala svim liječnicima Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju i Zavoda za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Zagreb koji su sudjelovali u dijagnostici i liječenju bolesnika s autoimunom hemolitičkom anemijom.

## L I T E R A T U R A

1. Grgičević D, Jakšić B. Autoimunsna hemolitička anemija (AIHA). U: Grgičević D, ur. Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada, 2006, 349-358.
2. Petz LD, Garratty G. Immune hemolytic anemias. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2004.
3. Chaudhary RK, Das SS. Autoimmune hemolytic anemia: From lab to bedside. *Asian J Transfus Sci* 2014;8(1):5-12.
4. Jäger U, Barcellini W, Broome CM i sur. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults: Recommendations from the First International Consensus Meeting. *Blood Rev*. [Internet]. 2020;41:100648. [cited 2019 Dec 5]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0268960X19301626?via%3Dihub>.
5. Barcellini W, Fattizzo B. Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. *Dis Markers*. [Internet]. 2015;2015:635670. [cited 2015 Dec 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4706896/>.
6. Hill A, Hill QA. Autoimmune hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. [Internet]. 2018(1):382-389. [cited 2018 Nov 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6246027/>.
7. Barcellini W, Zaninoni A, Giannotta JA, Fattizzo B. New Insights in Autoimmune Hemolytic Anemia: From Pathogenesis to Therapy Stage 1. *J Clin Med*. [Internet]. 2020 9(12):3859. [cited 2020 Nov 27]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7759854/>.
8. Berentsen S, Tjønnfjord GE. Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia. *Blood Rev* 2012;26(3):107-15.
9. Raos M, Lukic M, Pulanic D, Vodanovic M, Golubic Ćepulic B. The role of serological and molecular testing in the diagnostics and transfusion treatment of autoimmune haemolytic anaemia. *Blood Transfus* 2022;20:319-28.
10. Barcellini W. Pitfalls in the diagnosis of autoimmune haemolytic anaemia. *Blood Transfus*. 2015;13(1):3-5.
11. Malić Tudor K, Čulić S, Armanda V, Kuljiš D. Uspješna primjena rituksimaba u dječaka s Evansovim sindromom. *Paediatr Croat* 2017;61:187-91.
12. Yürek S, Mayer B, Almhallawi M, Pruss A, Salama A. Precautions surrounding blood transfusion in autoimmune haemolytic anaemias are overestimated. *Blood Transfus* 2015;13(4): 616-21.
13. Liebman HA, Weitz IC. Autoimmune Hemolytic Anemia. *Med Clin North Am* 2017;101(2):351-9.
14. Aveiro M, Ferreira G, Matias C, Oliveira A, Rodrigues T. Hard-To-Treat Idiopathic Refractory Autoimmune Haemolytic Anaemia with Reticulocytopenia. *Eur J Case Rep Intern Med* 2020; 7 (12):002112.
15. Roumier M, Loustau V, Guillaud C i sur. Characteristics and outcome of warm autoimmune hemolytic anemia in adults: New insights based on a single-center experience with 60 patients. *Am J Hematol* 2014; 89(9):150-5.
16. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A i sur. Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: a GIMEMA study of 308 patients. *Blood* 2014; 124(19): 2930-5.
17. Hill QA, Stamps R, Massey E i sur. The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anemia. *Br J Haematol* 2017;176(3):395-411.
18. Robinson S, Harris A, Atkinson S i sur. The administration of blood components: a British Society for Haematology Guideline. *Transfus Med* 2018;28(1):3-21.
19. Das SS, Zaman RU, Safi M. Incompatible blood transfusion: Challenging yet lifesaving in the management of acute severe autoimmune hemolytic anemia. *Asian J Transfus Sci*. 2014;8(2):105-8.
20. Petz L.D. A physician's guide to transfusion in autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2004;124:712-16.
21. Barcellini W, Fattizzo B. The Changing Landscape of Autoimmune Hemolytic Anemia. *Front Immunol* 2020;3;11:946.
22. Barros MM, Langhi Jr DM, Bordin JO. Autoimmune hemolytic anemia: transfusion challenges and solutions. *Int J Clin Transfus Med* 2017;5:9-18.
23. Chen C, Wang L, Han B, Qin L, Ying B. Autoimmune hemolytic anemia in hospitalized patients: 450 patients and their red blood cell transfusions. *Medicine*. [Internet] 2020;99(2):e18739. [cited 2020 Jan 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6959959/>.

## SUMMARY

### CHARACTERISTICS, AUTOANTIBODIES AND TREATMENT OF PATIENTS WITH AUTOIMMUNE HAEMOLYTIC ANAEMIA

M. RAOS<sup>1,2,3</sup>, D. PULANIĆ<sup>3,4</sup>, S. MALJKOVIĆ<sup>1,2,3</sup>, B. GOLUBIĆ ČEPULIĆ<sup>1,2,3,5</sup>

<sup>1</sup>Clinical Department for Transfusion Medicine and Transplantation Biology, Clinical Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia; <sup>2</sup>University of Applied Health Sciences, Zagreb, Croatia; <sup>3</sup>University of Zagreb School of Medicine, Zagreb, Croatia; <sup>4</sup>Division of Haematology, Department for Internal Diseases, Clinical Hospital Center Zagreb, Zagreb, Croatia; <sup>5</sup>University of Split, Department of Health Studies, Split, Croatia

**Introduction:** Autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) is a very rare autoimmune disease caused by autoantibodies directed at patient's red blood cells as evidenced by a clinical picture, biochemical indicators of hemolysis, excluding other causes of hemolysis, and a positive direct antiglobulin test (DAT), except for DAT-negative AIHA. Both healthy people and patients without AIHA can have a positive DAT. Treatment depends on the type of AIHA and the underlying disease, and consists of multiple lines of therapy. Blood transfusion poses a risk due to the possible presence of alloantibodies masked by autoantibodies, that may cause a haemolytic transfusion reaction (HTR). **The aim:** To analyse patient's characteristics, serological characteristics of autoantibodies, laboratory parameters for anaemia, biochemical parameters for haemolysis and treatment of patients with AIHA. **Methods:** This retrospective study included 27 patients who were diagnosed with AIHA from 1 January 2018 to 31 December 2020 in Clinical Hospital Centre Zagreb. For diagnosis, immunohematological tests and laboratory parameters of haemolysis were performed. The efficacy of transfusion was defined as haemoglobin (Hb) value increase of  $\geq 5$ g/L per unit of blood. **Results:** Most patients were diagnosed with warm AIHA (70.4%), then with cold agglutinin disease (14.8%) and mixed AIHA (7.4%), and the least number of patients with paroxysmal cold haemoglobinuria (PCH) and DAT-negative AIHA (3.7% each). The first line of therapy consisted of corticosteroids, and in the second and third lines 37% of patients received rituximab. In 7.4% of patients alloantibodies were detected. Transfusion was administered in 81.5% of patients, with no reactions reported. Efficacy of transfusion was noted in 76.8% of the cases, with median increase of Hb of 7.5 g/L per unit of blood. **Conclusion:** Warm AIHA was diagnosed the most and PCH and DAT-negative AIHA the least frequently. Corticosteroids were used in the first line of therapy, while rituximab was the most commonly used in combination with immunosuppressive therapy in the second and third lines of therapy. Transfusion was successful in most patients, with no transfusion reactions reported.

**Key words:** autoimmune haemolytic anaemia, autoantibodies, alloantibodies, treatment, blood transfusion