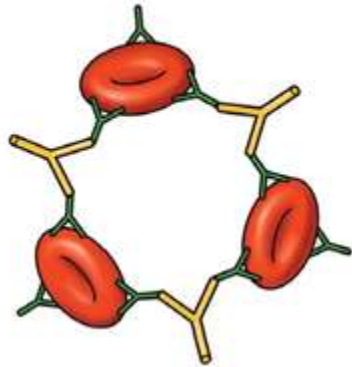


ΑΝΟΣΗ ΑΙΜΟΛΥΤΙΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΦΑΡΜΑΚΑ

Παπαδογιαννάκη Μαρίνα
Παθολόγος
Ν.Υ. Αιμοδοσία ΠΑ.Γ.Ν.Η.
21/3/2022



Αιμολυτική Αναιμία

Αιμολυτική αναιμία είναι μια ετερογενής ομάδα αναιμιών που χαρακτηρίζονται από φυσιολογική παραγωγή ερυθρών στο μυελό των οστών, αλλά μειωμένη επιβίωση τους στην περιφέρεια.

Αιτία

- Κληρονομική
- Επίκτητη

Θέση καταστροφής ερυθρών

- Ενδοαγγειακή
- Εξωαγγειακή

Θέση βλάβης

- Ενδοερυθροκυτταρική
- Εξωερυθροκυτταρική

Αιμολυτική Αναιμία

Ενδοερυθροκυτταρική

- Μεμβρανική βλάβη
- Αιμοσφαιρινοπάθειες (ποσοτικές ή ποιοτικές διαταραχές)
- Ενζυμοπάθειες γλυκολυτικού συστήματος

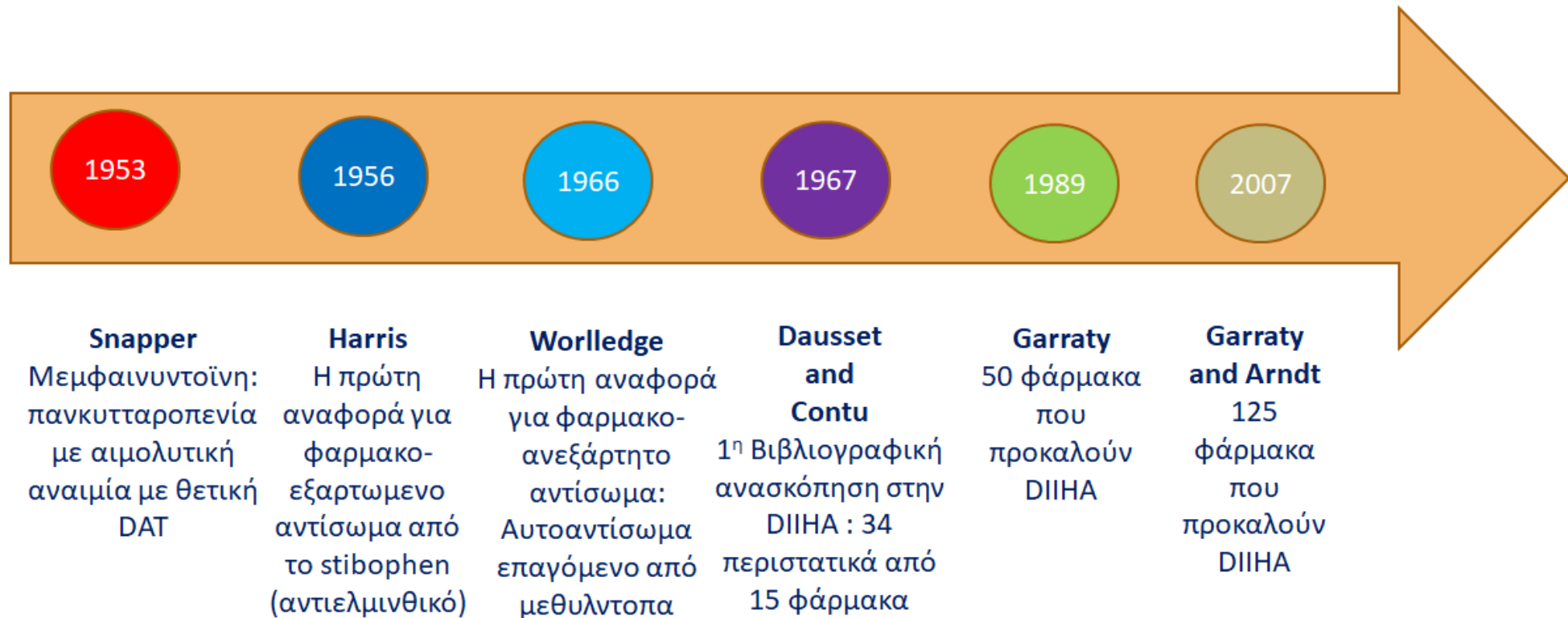
Εξωερυθροκυτταρική

- Ανοσολογικού τύπου
- Φάρμακα
- Χημικά προϊόντα
- Βακτήρια, παράσιτα
- Μηχανικά αίτια (προσθετικές βαλβίδες, μικροαγγειοπαθητικού τύπου αναιμία)

Εισαγωγή

- Η φαρμακοεπαγόμενη αιμολυτική αναιμία (**D**rug **I**nduced **I**mmune **H**aemolytic **A**naemia, **DIHA**) είναι μία κατάσταση που προκύπτει από αντισώματα των οποίων η παραγωγή επάγεται από φάρμακα.
- Σπάνια αλλά δυνητικά απειλητική για τη ζωή νόσος
- Άγνωστη επίπτωση $\approx 1:1.000.000$
- Οι ορολογικές εξετάσεις μπορεί να μιμούνται αυτές στην αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία ή στις αιμολυτικές αντιδράσεις μετά από μετάγγιση και γι' αυτό πολλές φορές υποδιαγιγνώσκεται.

Μια φορά κι έναν καιρό.....



Την τελευταία 30ετία...

Table 1. Drugs associated with cases of HIA or positive DAT, or both, in which drug-dependent antibodies were detected

Drug (informative name)	Number of references (single [only] in multicenter list = 18)	Enzyme-inhibiting screen activity				Effective without drug added
		Positive	Drug- control	Isolate + drug	Neg	

Table 1. Drugs associated with cases of IHA or positive DAT, or both, in which drug-dependent antibodies were detected* (continued)

[illegible][illegible]

Table 1. Drugs associated with cases of HAA or positive DNT, or both, in which drug-dependent antibodies were detected* (continued)

Drug (active/inactive name)	Reference	Therapeutic category	Number of reference drugs (used in multiple I's, n = 12)	Method detecting cross-sensitivity					Positive n (%)	Negative n (%)	Reactive without drug added n (%)
				SS	SS + SSs	SS + SSs + SSs	SS reported	SS reported			
Nonsteroidal	98	Anti-inflammatory	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Nonsteroidal	99	Anti-inflammatory	Single (1000)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Oral/parenteral	100, 101	Anti-inflammatory	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
p-Aminosalicylic acid (PAA) (para-aminosalicylic acid)	122	Antitubercular	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Penicillin	103	Antibiotic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Penicillin G	104, 105	Antibiotic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenacetin (acetaminophen)	106	NSAID	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin (Phenoin)	107	Anticonvulsant, antiepileptic	Single (2000)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	108	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	109	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	110	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	111	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	112	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	113	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	114	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	115	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	116	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	117	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	118	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	119	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	120	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	121	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	122	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	123	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	124	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	125	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	126	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	127	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	128	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	129	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	130	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	131	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	132	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	133	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Phenytoin	134	Anticonvulsant, antiepileptic	Multiple (n=10)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Table 2. Drugs associated with cases of IHA or positive DAT or both in which only drug-independent antibodies (autoantibodies) were detected

Drug (alternative name)	Reference	Therapeutic category	Number of references (single [year] vs. multiple [<5, <10, or <10])	RA	Positive DAT	More evidence needed
Alemtuzumab	138	Antineoplastic; immunosuppressant	Multiple (<5)	✓	✓	✓
Bendamustine	139	Antineoplastic	Multiple (<5)	✓	✓	✓
Captopril	140	Antihypertensive	Multiple (<5)	✓	✓	✓
Chaparral	141	Herbal	Single (1980)	✓	✓	✓
Cimetidine			<(10)	✓	✓	✓
Cladribine (2-chloro-deoxyadenosine)			<(10)	✓	✓	✓
Fenfluramine			97(3)	✓	✓	✓
Fludarabine*			>(10)	✓	✓	✓
Interferon			>(10)	✓	✓	✓
Interleukin-2			<(5)	✓	✓	✓
Ketoconazole			98(7)	✓	✓	✓
Lenalidomide			>(10)	✓	✓	✓
Levodopa (L-dopa)			>(10)	✓	✓	✓
Mefenamic acid			>(10)	✓	✓	✓
Mesantoin (Mephentyoin)			95(3)	✓	✓	✓
Methylodopa*			>(10)	✓	✓	✓
Nalidixic acid			<(10)	✓	✓	✓
Procainamide*			<(10)	✓	✓	✓
Rituximab			30(3)	✓	✓	✓
Tacrolimus			<(10)	✓	✓	✓
Weidean	160	Chinese herbs	Single (2009)	✓	✓	✓

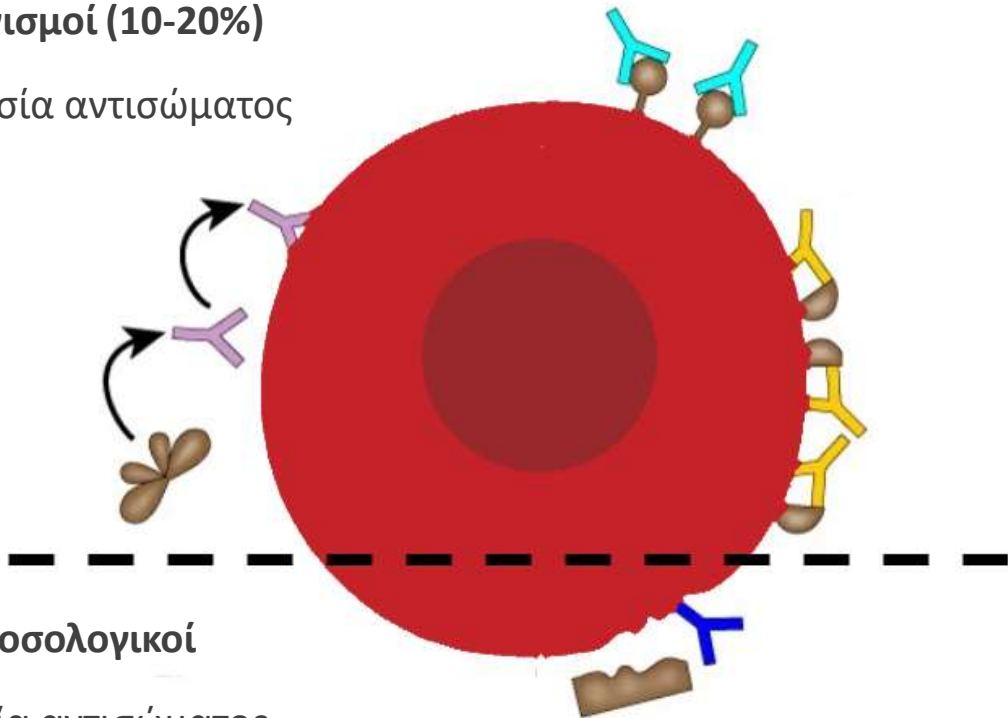
Table 3. Drugs associated with the detection of nonimmunologic protein adsorption onto RBCs

Drug (alternative name)	Reference	Therapeutic category	Number of references (single [year] vs. multiple [<5, <10, ≥20])	HA	Positive BAT	Drug-dependent antibody/also detect
Cefotetan*	35,36	Antimicrobial	Multiple (≥20)	✓	✓	✓
Cephaloridine				✓	✓	✓
Cephalothin*				✓	✓	✓
Cisplatin				✓	✓	✓
Clavulanate potassium* (C)				✓	✓	✓
Diglycoaldehyde (INOX)				✓	✓	✓
Oxaliplatin*				✓	✓	✓
Subactam*	162,163	β-Lactamase inhibitor	Multiple (<5)	✓	✓	✓
Suramin	166	Anthelmintic, antiprotozoal	Single (1998)	✓	✓	✓
Tazobactam*	167,168	β-Lactamase inhibitor	Multiple (<5)	✓	✓	✓

Μηχανισμοί

Ανοσολογικοί
Μηχανισμοί (10-20%)

Παρουσία αντισώματος



Μη-ανοσολογικοί

Απουσία αντισώματος

ΔΙΙΗΑ

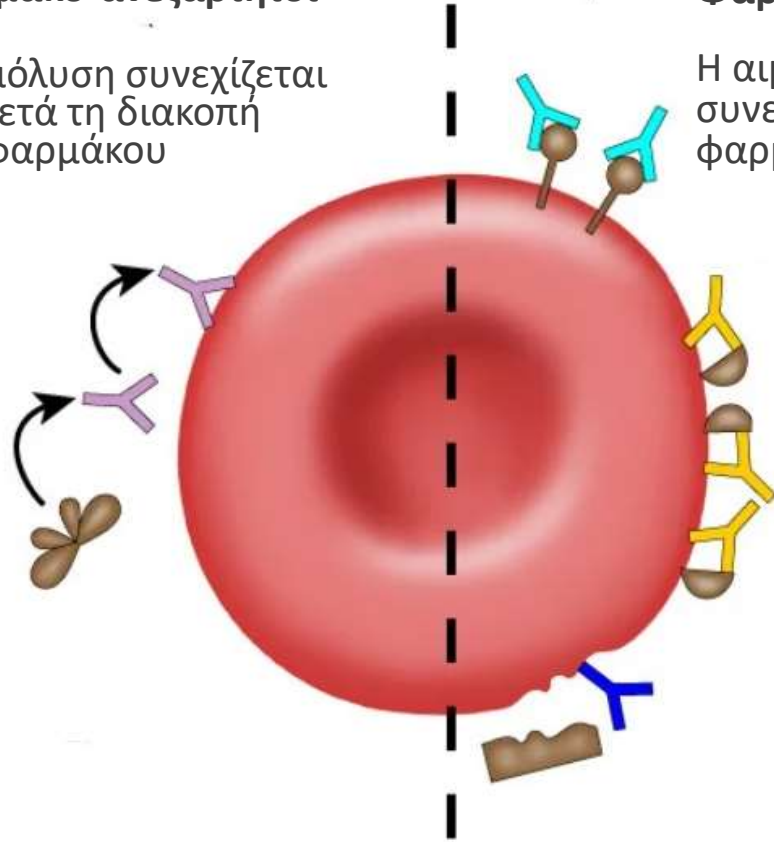
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

ΜΗ
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Μηχανισμοί

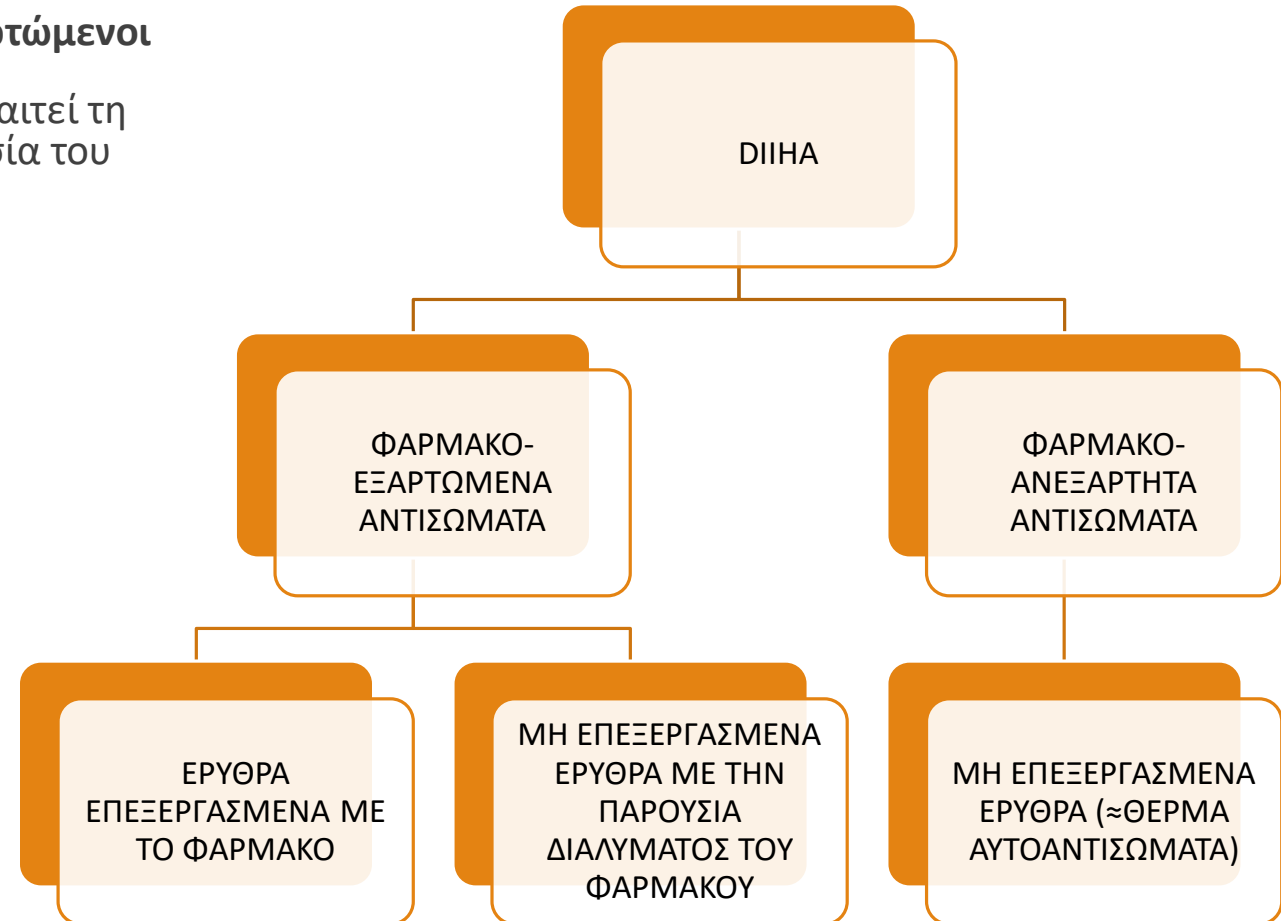
Φαρμακο-ανεξάρτητοι

Η αιμόλυση συνεχίζεται και μετά τη διακοπή του φαρμάκου



Φαρμακο-εξαρτώμενοι

Η αιμόλυση απαιτεί τη συνεχή παρουσία του φαρμάκου



Φαρμακο-ανεξάρτητοι

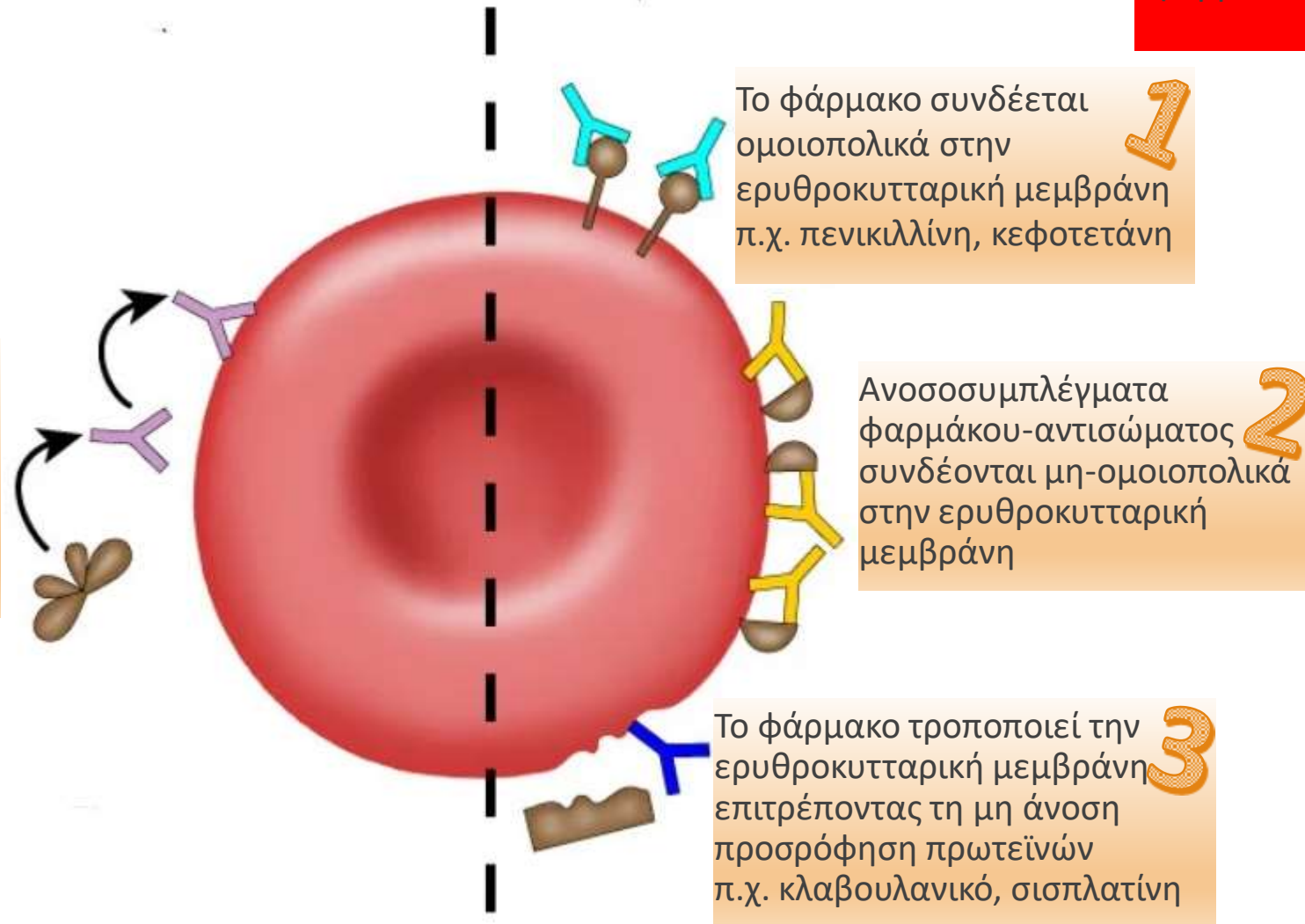
Η αιμόλυση συνεχίζεται και μετά τη διακοπή του φαρμάκου

Μηχανισμοί

Φαρμακο-εξαρτώμενοι

Η αιμόλυση απαιτεί τη συνεχή παρουσία του φαρμάκου

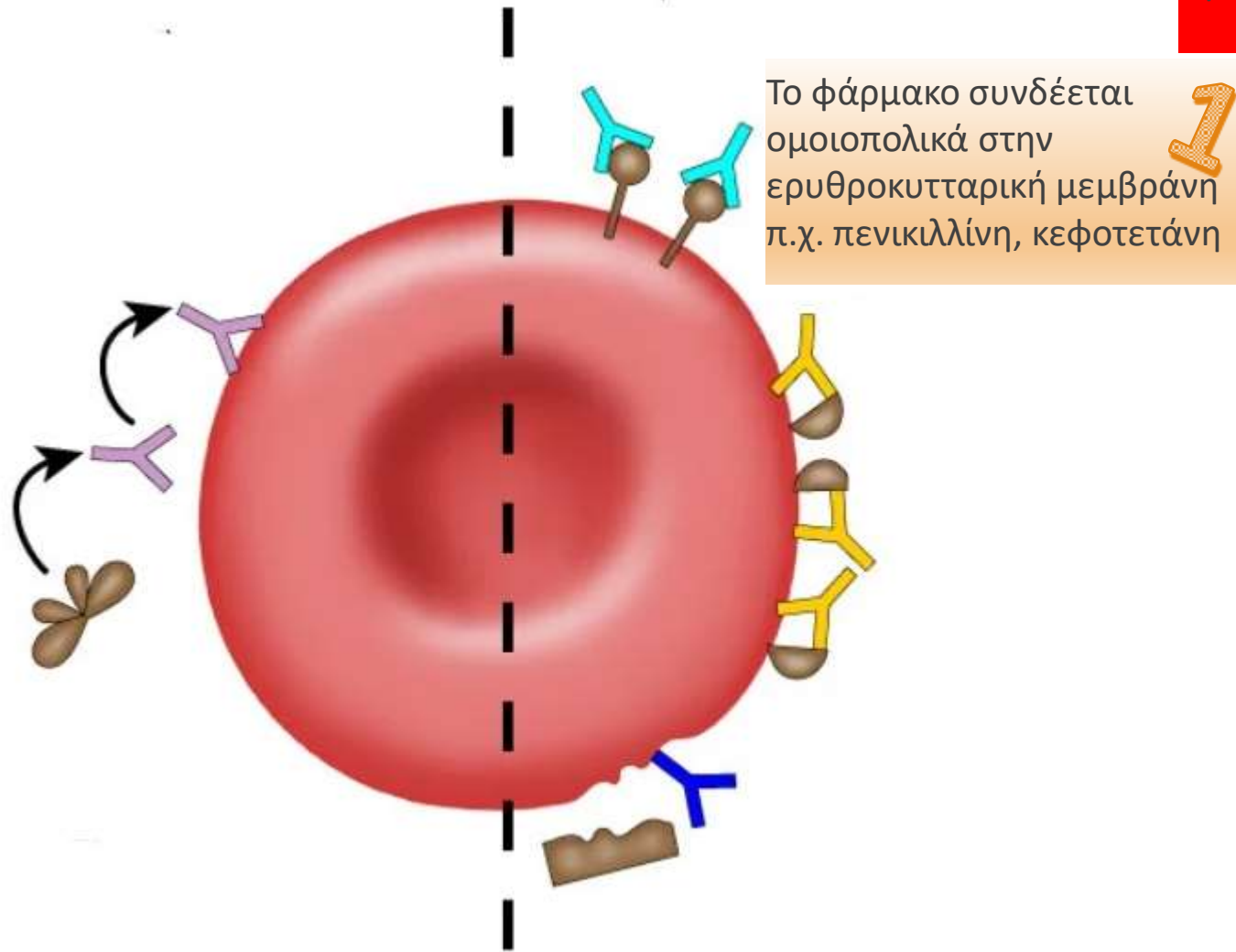
Το φάρμακο επάγει την παραγωγή αντι-ερυthroκυτταρικών αντισωμάτων π.χ. Μεθυλντόπα, Φλουνταραμπίνη



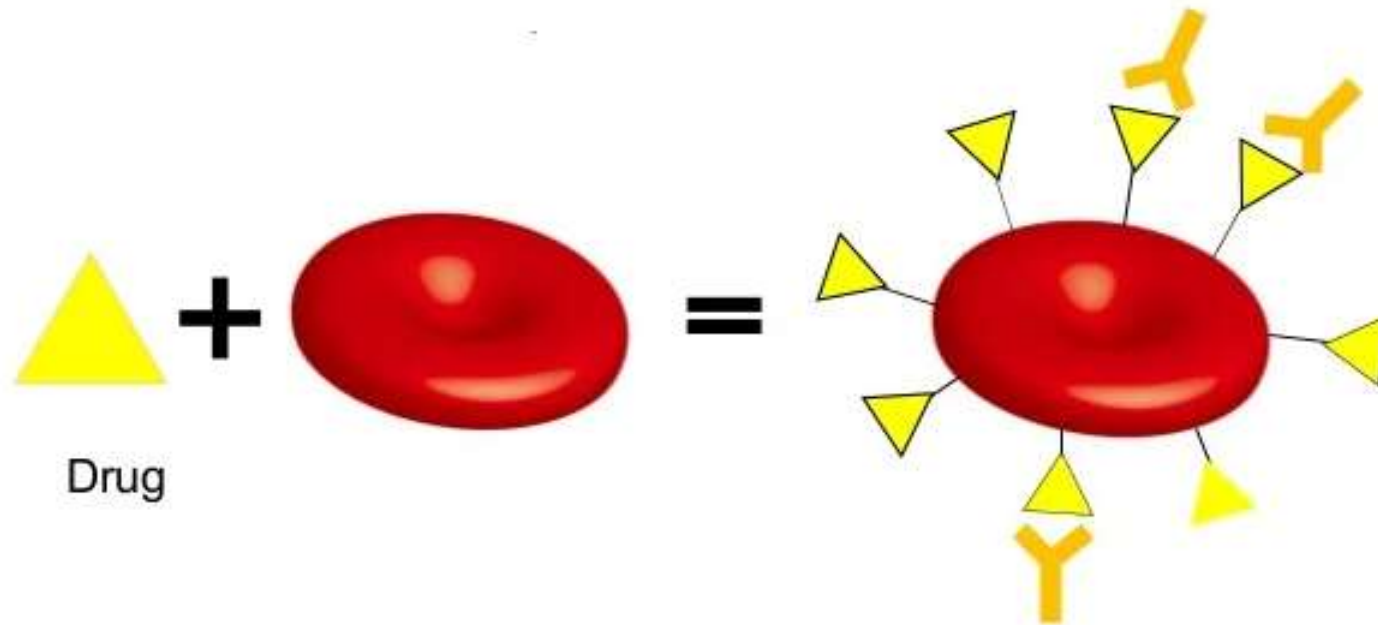
Φαρμακο-ανεξάρτητοι
Η αιμόλυση συνεχίζεται
και μετά τη διακοπή
του φαρμάκου

Μηχανισμοί

Φαρμακο-εξαρτώμενοι
Η αιμόλυση απαιτεί τη
συνεχή παρουσία του
φαρμάκου



1. Απορρόφηση φαρμάκου ή μηχανισμός απτίνης



- Πενικιλίνη
- Αμπικιλίνη
- Αμοξυκιλίνη
- Ναφκιλίνη
- Τικαρκιλίνη

Πενικιλίνη

Κλινικά χαρακτηριστικά

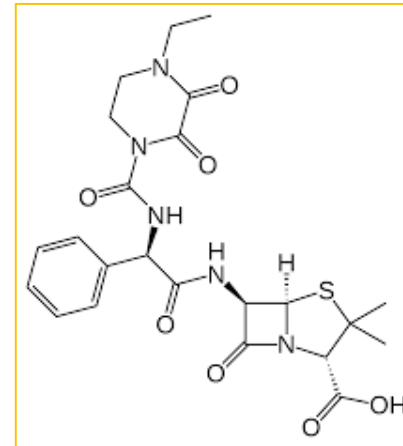
1. Εξωαγγειακή αιμόλυση
2. Υποκλινική αιμόλυση
3. Απαιτεί μεγάλες δόσεις φαρμάκου
4. ≥ 1 εβδομάδα χορήγηση φαρμάκου

Εργαστηριακά ευρήματα

1. DAT+, IgG $\pm$ C3
2. Anti-πενικιλίνης αντίσωμα στον ορό του ασθενούς που αντιδρά με επεξεργασμένα με πενικιλίνη ερυθρά (τίτλος >1000)
3. Επώαση του anti-πενικιλίνης αντισώματος με διάλυμα πενικιλίνης αναστέλλει την αντίδραση του αντισώματος με τα επεξεργασμένα με πενικιλίνη ερυθρά

Πιπερακιλλίνη

- Ημισυνθετική πενικιλίνη
- 1994: 1^η περίπτωση DIIHA
- Η συχνότερη αιτία DIIHA
- DAT+, IgG + C3
- Πιπερακιλλίνη-επεξεργασμένα ερυθρά και μη επεξεργασμένα ερυθρά αντιδρούν παρουσία του διαλύματος φαρμάκου (μηχανισμός ανοσοσυμπλέγματος)



Πενικιλίνη

Drug	Reference	Drug-treated RBCs	Serum + RBCs + drug	No in vitro drug
Penicillin	15	15/15	1/1	0/10
Ampicillin	4	4/4	0/1	0/4
Nafcillin	3	3/3	0/1	0/3
Ticarcillin	2	2/2	0/0	1/2
Amoxicillin	2	2/2	0/0	0/2
Piperacillin	18	4/5	17/17	11/15



Πιπερακιλλίνη

Table 5. Percentage of agglutinins reacting with drug-treated red blood cells found in our laboratory when screening blood donors' and random patients' sera*

Drug	Blood donors	Random patients
Penicillin (unpublished results)	5%	6%
Cephalothin ⁵⁹	39%	NT
Ticarcillin ⁶⁶	33%	NT
Cefotetan ⁵⁹ (and unpublished results)	80%	78%
Piperacillin ⁷²	91%	49%
Oxaliplatin ⁷³	16%	4%
Cisplatin ⁷³	7%	NT
Meropenem ⁷⁴	93%	60%

Η παρουσία αντισωμάτων κατά φαρμάκων καταδεικνύει πόσο σημαντική είναι η παρουσία controls στη μέθοδο με τα φαρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά.

Φαρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά

Υλικά

1. Φάρμακο
2. Κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, 0.1M sodium barbital buffer, potassium borate buffer)
3. Φυγόκεντρος, επωαστήρας 37°C, ψυγείο
4. Πλυμένα, ερυθρά ομάδας O με DAT(-) και <7 ημερών
5. Μείγμα ορού/ πλάσματος

Διαδικασία

1. Διάλυση φαρμάκου σε ρυθμιστικό διάλυμα
2. Προσθήκη 0,2ml συμπυκνωμένων ερυθρών (ΣΕ)
3. Σε άλλο σωληνάριο προσθήκη 0,2 ΣΕ σε ρυθμιστικό διάλυμα (control)
4. Επώαση στους 37 °C για 1-2 ώρες με περιοδική ανάμιξη
5. Πλύσιμο 4 φορές με PBS
6. Παρασκευάστε διάλυμα 3-5% με PBS

Φαρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά

Υλικά

1. Φάρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά
2. Μη Φάρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά
3. Πλάσμα υγιούς (αρνητικό control)
4. Ορός ή έκλουμα με αντίσωμα κατά του φαρμάκου, αν υπάρχει από προηγούμενη δοκιμασία (θετικό control)
5. Phosphate-buffered saline (PBS), pH:7.3
6. Μείγμα ερυθρών ομάδος O με και χωρίς ένζυμο
7. Πολυδύναμος αντισφαιρινικός ορός (controls)

Διαδικασία

1. 2 ομάδες σωληναρίων
 - 2 σταγόνες ορού ασθενούς
 - 2 σταγόνες εκλούματος ασθενούς
 - 2 σταγόνες PBS ή ορού/ πλάσματος υγιούς (αρνητικό control)
 - 2 σταγόνες ορού ή εκλούματος με αντίσωμα κατά του φαρμάκου, αν υπάρχει από προηγούμενη δοκιμασία(θετικό control)
2. Προσθήκη 2 σταγόνων φαρμακο-επεξεργασμένων ερυθρών ή 2 σταγόνων μη φαρμακο-επεξεργασμένων ερυθρών σε κάθε ομάδα σωληναρίων
3. Προσθήκη 1 σταγόνας ερυθρών 6-10% με ένζυμο και 1 σταγόνα ερυθρών 6-10% χωρίς ένζυμο στα δύο διαφορετικές κατηγορίες
4. Επώαση στους 37°C για 1 ώρα
5. Φυγοκέντρηση και έλεγχος αιμόλυσης/ συγκολλήσεων
6. Πλύσιμο των ερυθρών με PBS 4 φορές
7. Προσθήκη αντισφαιρινικού ορού
8. Φυγοκέντρηση και έλεγχος για συγκολλήσεις (όλα τα μακροσκοπικά αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να εξετάζονται μικροσκοπικά)
9. Προσθήκη αντισφαιρινικών κυττάρων-controls στα μη αντιδρώντα σωληνάκια, φυγοκέντρηση και έλεγχος για συγκολλήσεις

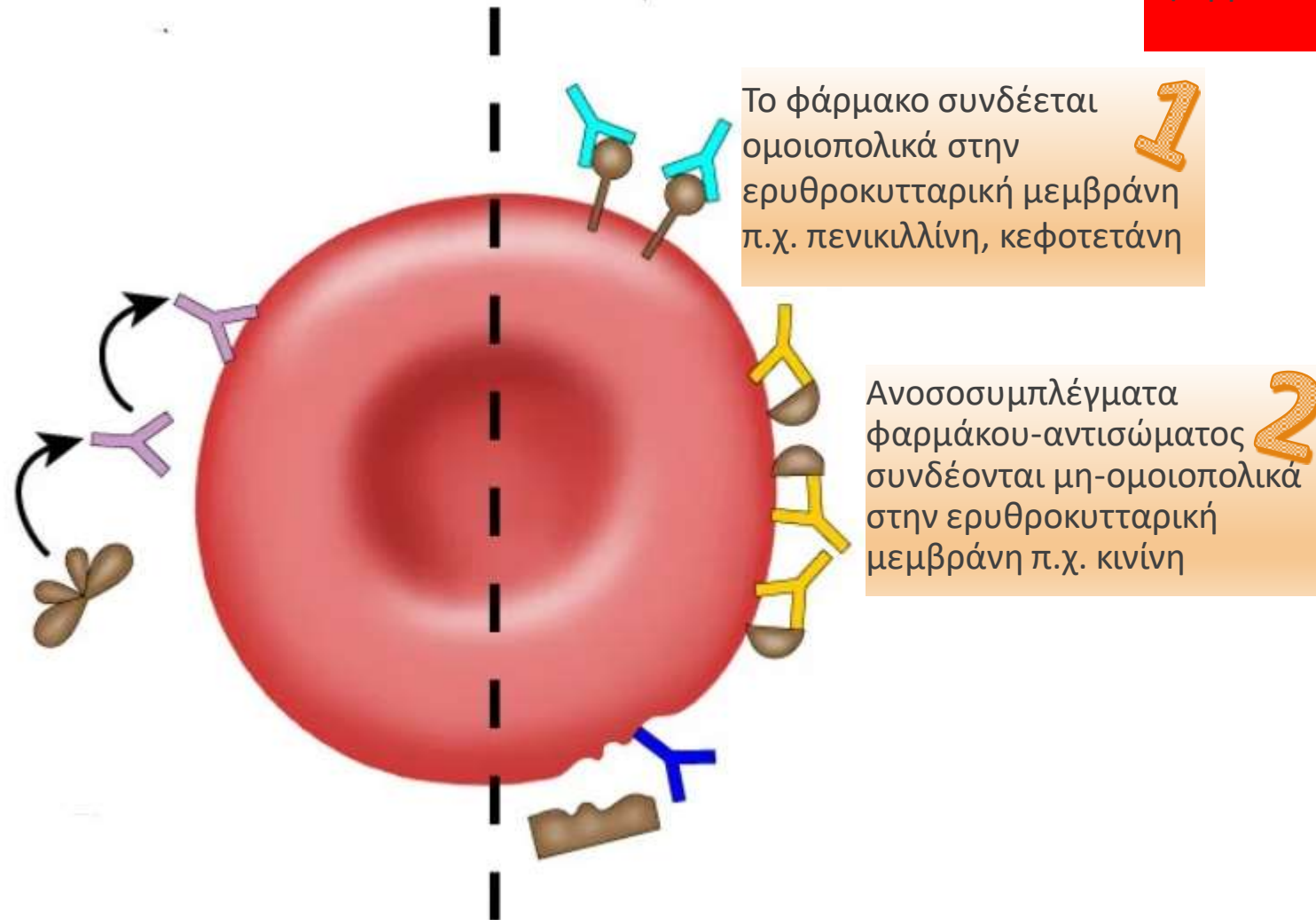
Φαρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά

	Ορός/ έκλουμα ασθενούς	37°C	IAT	Ορός/ πλάσμα υγιούς	37°C	IAT	Ερμηνεία
1	+ φάρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά	0	0	+ φάρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά	0	0	αρνητικό
	+ μη φαρμακο επεξεργασμένα ερυθρά	0	0	+ μη φαρμακο επεξεργασμένα ερυθρά	0	0	
2	+ φάρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά	0	2+	+ φάρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά	0	0	Θετικό
	+ μη φαρμακο επεξεργασμένα ερυθρά	0	0	+ μη φαρμακο επεξεργασμένα ερυθρά	0	0	
3	+ φάρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά	0	2+	+ φάρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά	0	2+	Μη ειδική προσρόφηση πρωτεϊνών
	+ μη φαρμακο επεξεργασμένα ερυθρά	0	0	+ μη φαρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά	0	0	

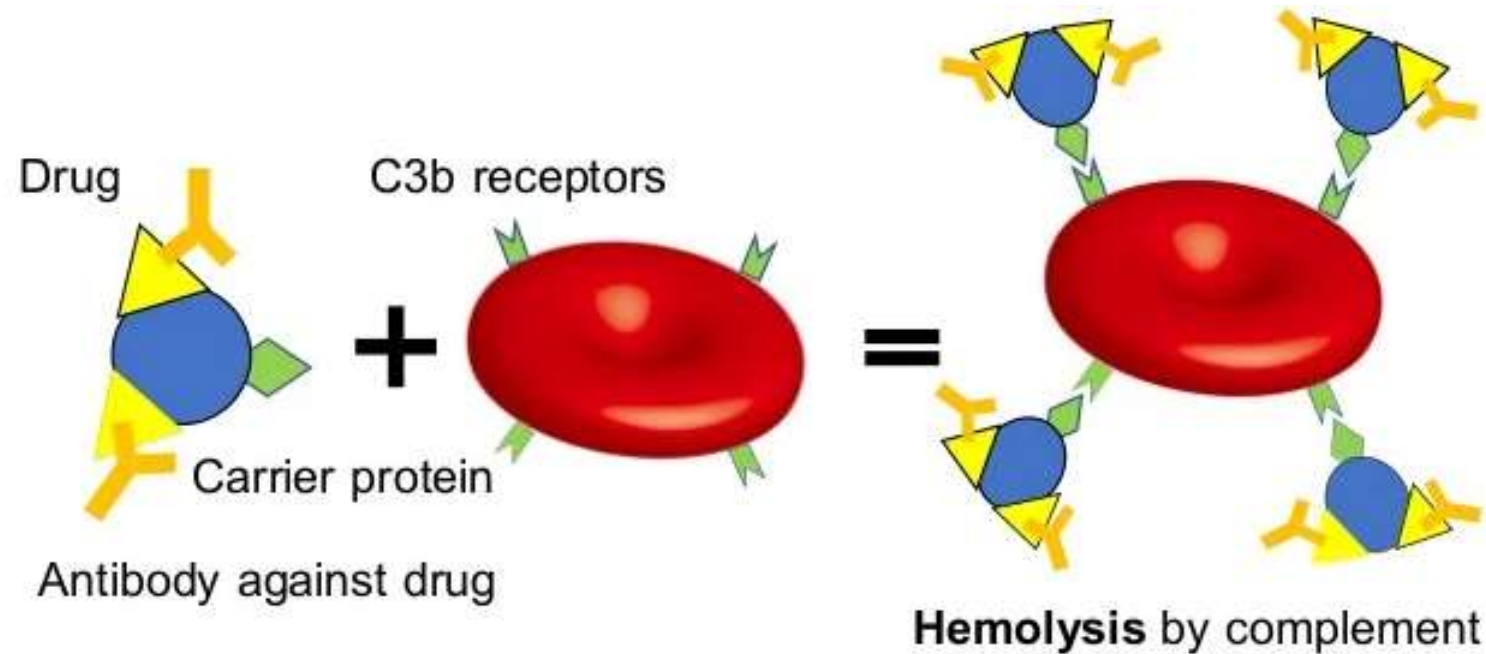
Φαρμακο-ανεξάρτητοι
Η αιμόλυση συνεχίζεται
και μετά τη διακοπή
του φαρμάκου

Μηχανισμοί

Φαρμακο-εξαρτώμενοι
Η αιμόλυση απαιτεί τη
συνεχή παρουσία του
φαρμάκου



2. Μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων



Συχνότερος μηχανισμός

- Κινιδίνη
- Φαινακετίνη

2. Μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων

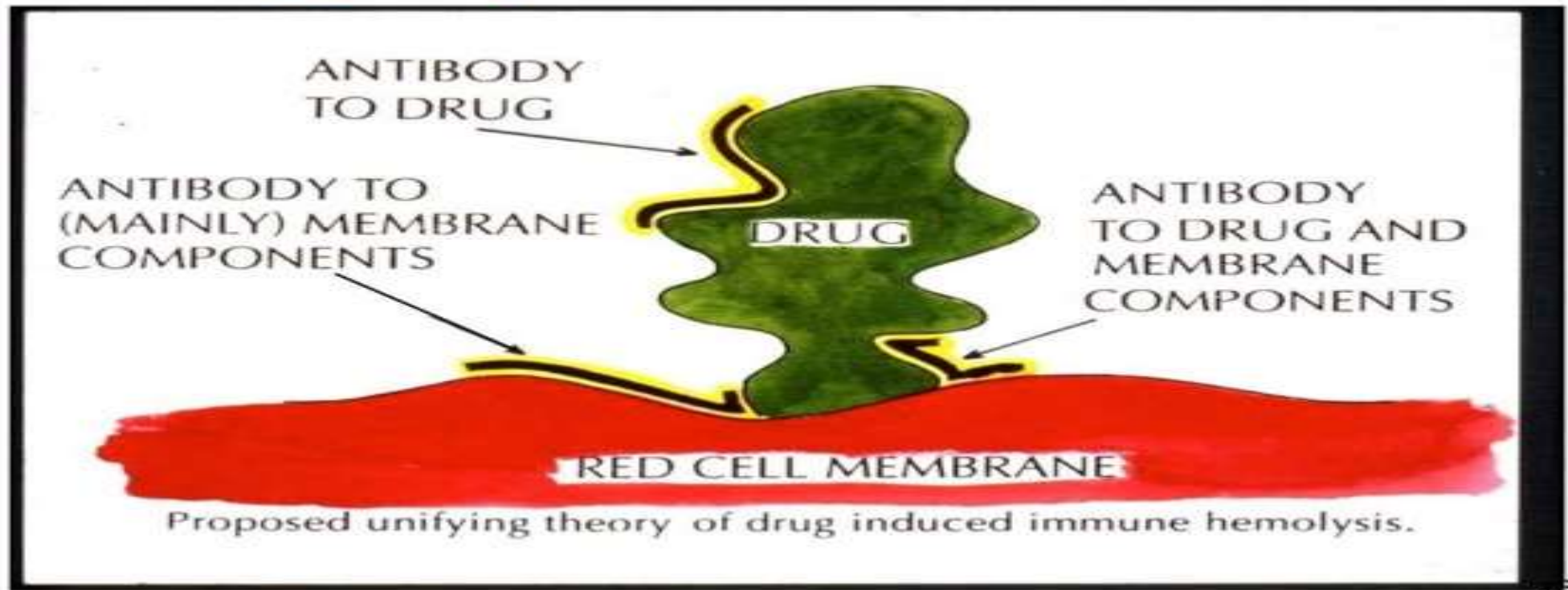
- 1950-60: φαρμακο-επαγόμενη θρομβοπενία
- 1970-80: έντονη αμφισβήτηση της θεωρίας του ανοσοσυμπλέγματος
- Habibi et al: η σύνδεση φαρμάκου αντισώματος εκκινεί μία ανοσολογική απάντηση
- Ackroyd et al: η θεωρία του «νέο-αντιγόνου» από τη σύνδεση φαρμάκου-κυττάρου και τις χημικές αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη
- Shulman et al: το φάρμακο τροποποιεί το αντίσωμα για να έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το μόριο-στόχο στην κυτταρική μεμβράνη

Table 1. Reported blood group specificities of drug antibodies; specificities varied from simple (e.g., anti-e) to broad (e.g., antibody reactive with all cells except null cells)

Blood group	Drugs (and earliest reference to note specificity)
Rh	catechins, ¹⁶ diclofenac, ¹⁷ glafenine, ¹⁶ hydrochlorothiazide, ¹⁸ ibuprofen, ¹⁹ moxalactam, ¹⁶ nomifensine, ²⁰ piperacillin, ²¹ quinine, ²² rifampin, ²³ streptomycin, ²⁴ sulindac, ²⁵ teicoplanin, ²⁶ tolmetin ²⁷
I	dexachlorpheniramine maleate, ²⁸ fluorouracil, ²⁹ metrizoic acid, ³⁰ nitrofurantoin, ²⁸ nomifensine, ³¹ rifampin, ²⁸ thiopental ³²
Lutheran	elliptinium, ¹⁶ rifampin, ¹⁶ piperacillin, ³³ sulfamethoxazole ³³
P	elliptinium, ¹⁶ meglumine iothalamate, ¹⁶ nomifensine ³¹
Kell	glafenine, ¹⁶ trimethoprim ³⁴
MNS	streptomycin, ²⁴ sulfamethoxazole ³³
Kidd	chlorpropamide ³⁵
H	sulfamethoxazole ³⁴

2. Μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων

Drug-dependent Antibodies



2. Μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων

Κλινικά χαρακτηριστικά

1. Σε ασθενείς με προηγούμενη έκθεση στο φάρμακο απαιτείται μία μικρή ποσότητα
2. Σοβαρή ενδοαγγειακή αιμόλυση
 - αναιμία
 - ίκτερος
 - Αιμοσφαιρινουρία
 - Νεφρική ανεπάρκεια

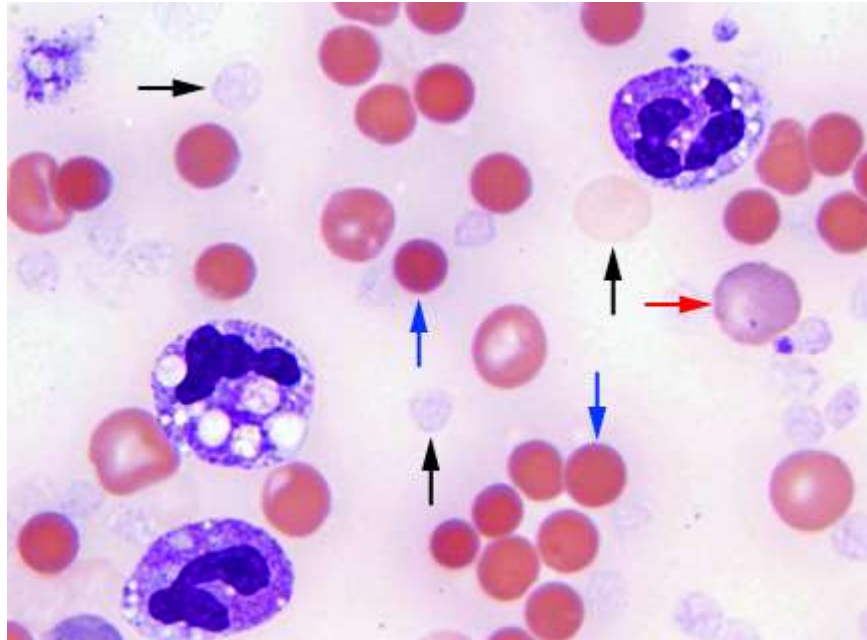


2. Μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων

Εργαστηριακά ευρήματα

Αυξημένη ρήξη ερυθροκυττάρων	Αυξημένη παραγωγή ερυθροκυττάρων	Κατεστραμμένα ερυθροκύτταρα
↑ εμ. χολερυθρίνης	↑ ΔΕΚ	↑ MCV (↓FA)
↑ LDH	πολυχρωματοφιλία	σφαιροκύτταρα
↓ απτοσφαιρίνης	Υπερπλασία της ερυθράς σειράς	σχιστοκύτταρα
αιμοσφαιρινουρία		

2. Μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων

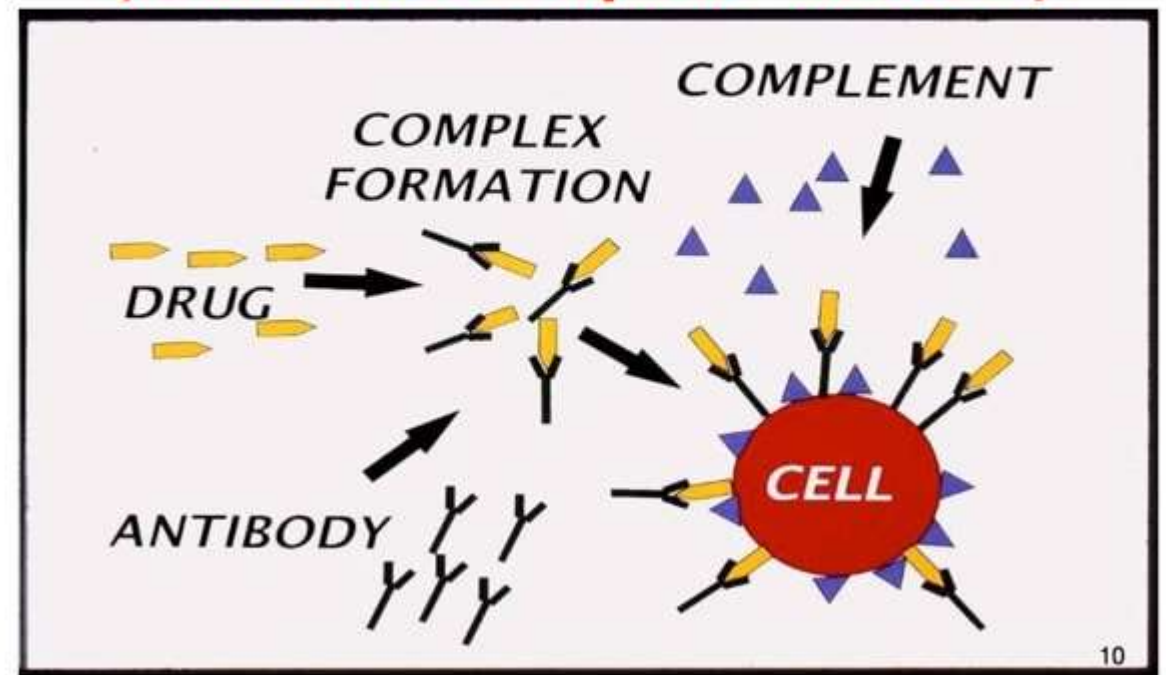


2. Μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων

Εργαστηριακά ευρήματα

1. θετική άμεση Coombs
2. IgG, IgM ή μόνο συμπλήρωμα
3. in vitro: μέθοδος ανοσοσυμπλέγματος= ορός ασθενούς + ερυθρά + διάλυμα φαρμάκου

Serum + RBCs + Drug ("Immune Complex" Method)



2. Μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων

Παρασκευή διαλύματος φαρμάκου

Υλικά

1. Φάρμακο σε μορφή σκόνης (tb, cap) ή διάλυμα
2. Phosphate-buffered saline (PBS), pH:7.3
3. 0.1 N HCL, NaOH
4. Πεχάμετρο
5. Επωαστήρας 37°C

Διαδικασία

1. Έλεγχος διαλυτότητας του φαρμάκου
 - Φάρμακο υδατοδιαλυτό: προσθήκη σε PBS
 - Φάρμακο μερικώς υδατοδιαλυτό: προσθήκη σε PBS, επώαση στους 37 °C και καλή ανάμιξη
 - Φάρμακο μη υδατοδιαλυτό: διάλυση σε άλλα υγρά(οινόπνευμα, αλβουμίνη, ακετόνη)
 - Διάλυμα φαρμάκου: προσθήκη σε PBS
2. Αν το φάρμακο δεν ενσωματώνεται πλήρως στο διάλυμα, φυγοκέντρηση και λήψη υπερκείμενου
3. Ρύθμιση pH: 7
 - pH>8: προσθήκη 0.1 N HCL
 - pH<5: προσθήκη NaOH

2. Μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων

Υλικά

1. Φάρμακο, 1mg/ml σε PBS
2. Phosphate-buffered saline (PBS), pH:7.3
3. Πλάσμα υγιούς (ως πηγή συμπληρώματος)
4. Μείγμα ερυθρών ομάδος O με και χωρίς ένζυμο
5. Πολυδύναμος αντισφαιρινικός ορός (controls)

Διαδικασία

1. 2 σετ 5 σωληναρίων
 - 2 σταγόνες ορού ασθενούς + 2 σταγόνες φαρμάκου,
 - 2 σταγόνες ορού ασθενούς + 2 σταγόνες PBS,
 - 2 σταγόνες ορού ασθενούς + 2 σταγόνες C + 2 σταγόνες PBS,
 - 2 σταγόνες C + 2 σταγόνες φαρμάκου,
 - 2 σταγόνες C + 2 σταγόνες PBS
2. 1 σταγόνα ερυθρών 6-10% με ένζυμο και 1 σταγόνα ερυθρών 6-10% χωρίς ένζυμο στα δύο διαφορετικές κατηγορίες
3. Επώαση στους 37°C για 1-2 ώρες με περιοδική ανάμιξη
4. Φυγοκέντρηση και έλεγχος για συγκολλήσεις
5. Πλύσιμο των ερυθρών με PBS 4 φορές
6. Προσθήκη αντισφαιρινικού ορού, φυγοκέντρηση και έλεγχος για συγκολλήσεις
7. Προσθήκη αντισφαιρινικών κυττάρων-controls στα μη αντιδρώντα σωληνάκια, φυγοκέντρηση και έλεγχος για συγκολλήσεις

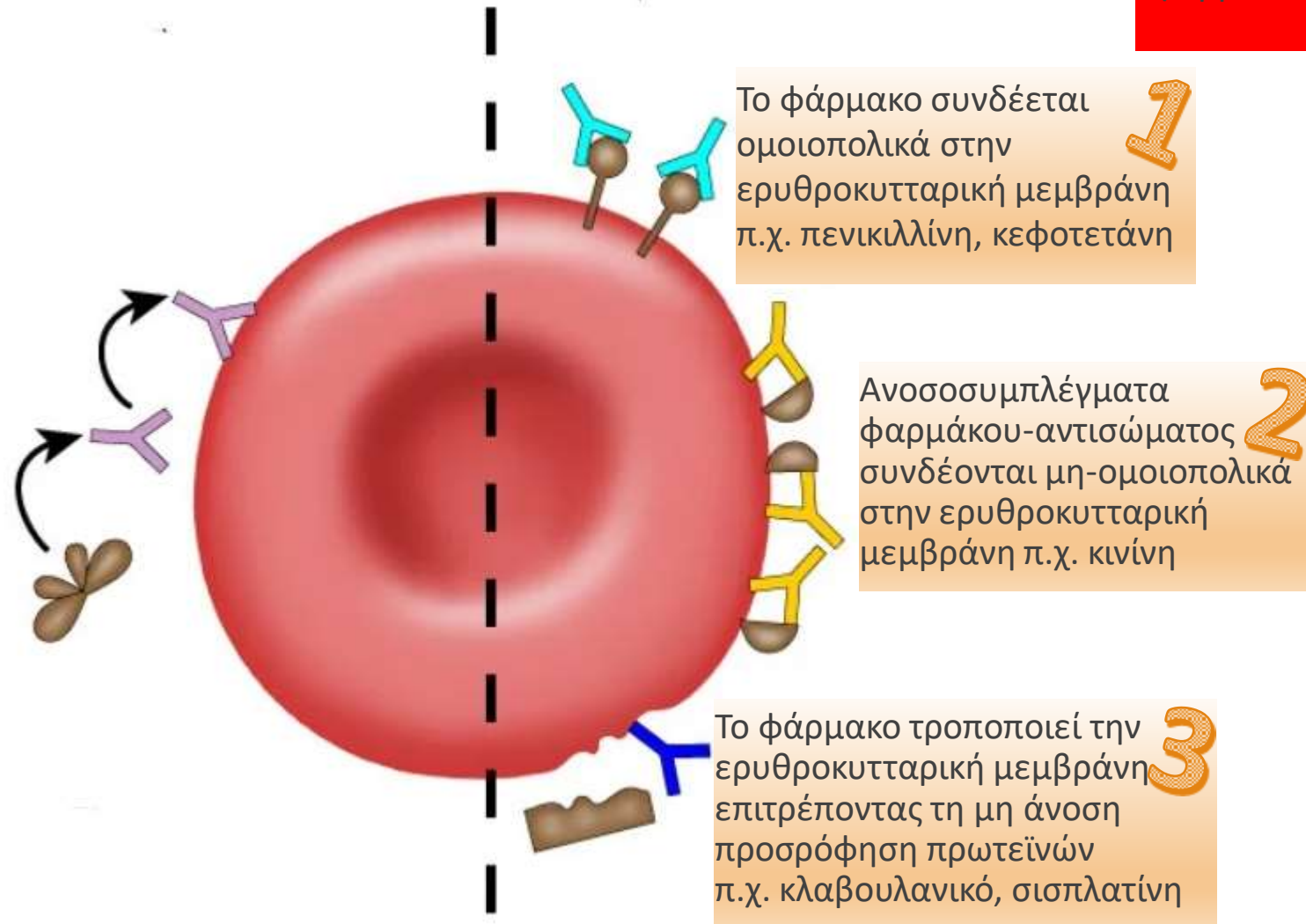
2. Μηχανισμός ανοσοσυμπλεγμάτων

	Ορός ± C	37°C	IAT	Ερμηνεία
1	+ φάρμακο	0	0	αρνητικό
	+ PBS	0	0	
2	+ φάρμακο	0	2+	Θετικό
	+ PBS	0	0	
3	+ φάρμακο	Αιμόλυση +/- συγκόλληση	1+	Θετικό, ασθενές αυτό- ή άλλο-αντίσωμα
4	+ PBS	0	1+	Αρνητικό, ασθενές αυτό- ή άλλο-αντίσωμα
	+ φάρμακο	0	1+	
5	+ φάρμακο	0	3+	Αδιευκρίνιστο (αυτό- ή άλλο-αντίσωμα, έλεγξε τα διαλύματα, τον προσροφημένο ορό, αρνητικά ερυθρά για αντιγόνα)
	+ PBS	0	3+	

Φαρμακο-ανεξάρτητοι
Η αιμόλυση συνεχίζεται
και μετά τη διακοπή
του φαρμάκου

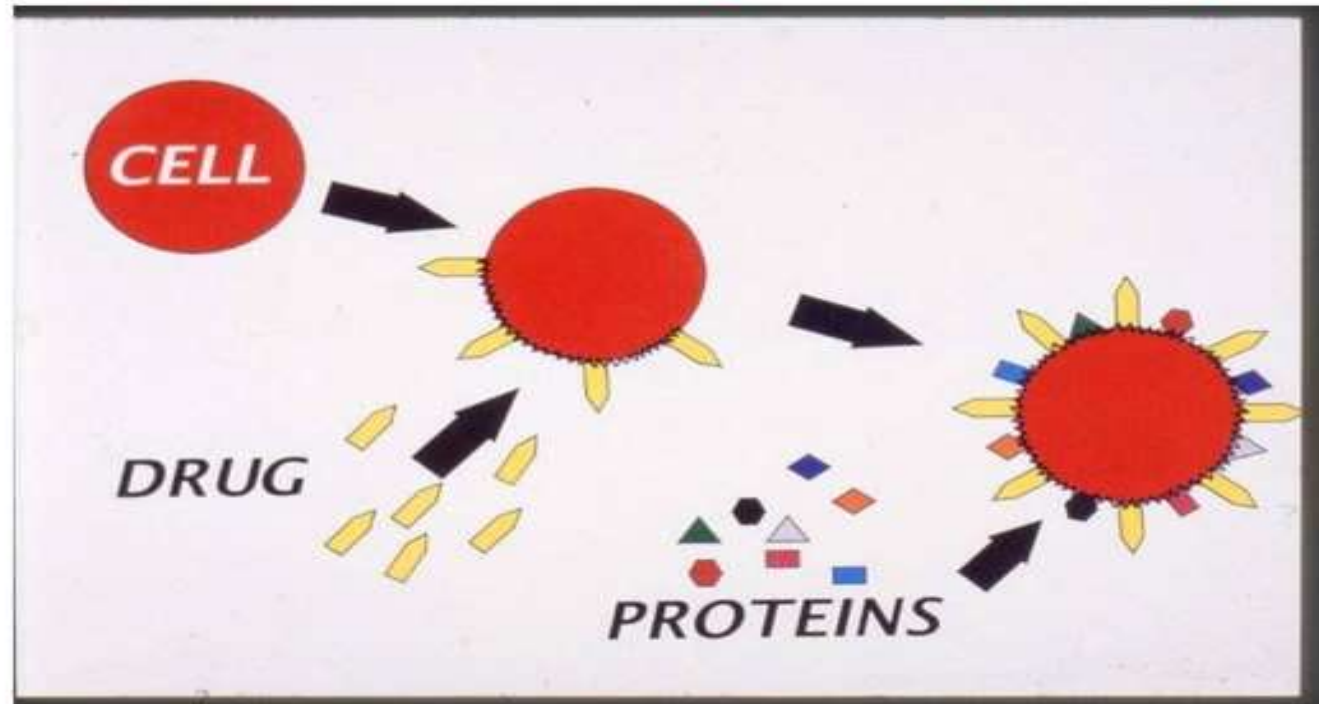
Μηχανισμοί

Φαρμακο-εξαρτώμενοι
Η αιμόλυση απαιτεί τη
συνεχή παρουσία του
φαρμάκου



3. Μη ανοσολογική προσρόφηση πρωτεϊνών

Nonimmunologic Protein Adsorption (NIPA)



17

- κλαβουλανικό
- ταζομπακτάμη
- σουλμπακτάμη
- οξαλιπλατίνη
- σισπλατίνη

3. Μη ανοσολογική προσρόφηση πρωτεϊνών

- 1967-1980: Αρχικά δεν σχετιζόταν με αιμολυτική αναιμία

- Κλαβουλανικό : 45% DAT + , χωρίς αιμολυτικά αναιμία

Williams et al, Antimicrob Agent Chemo 1985

- Unasyn (ampicillin+sulbactam): 39% DAT+ χωρίς αιμολυτική αναιμία

Lutz et al, Transfusion 1992

- Κλαβουλανικό, σουλμπακτάμη: εργαστηριακή τεκμηρίωση της NIPA

Garatty et al, Br J Haematol 1998

- 3 ασθενείς μετά τη λήψη Unasyn ή Timentin (ticarcillin + clavulanic) είχαν DAT + και αιμολυτική αναιμία, χωρίς φαρμακο-επαγόμενα αντισώματα

Garatty et al, Br J Haematol 1998

- Ταζομπακτάμη: αιμολυτική αναιμία μέσω NIPA

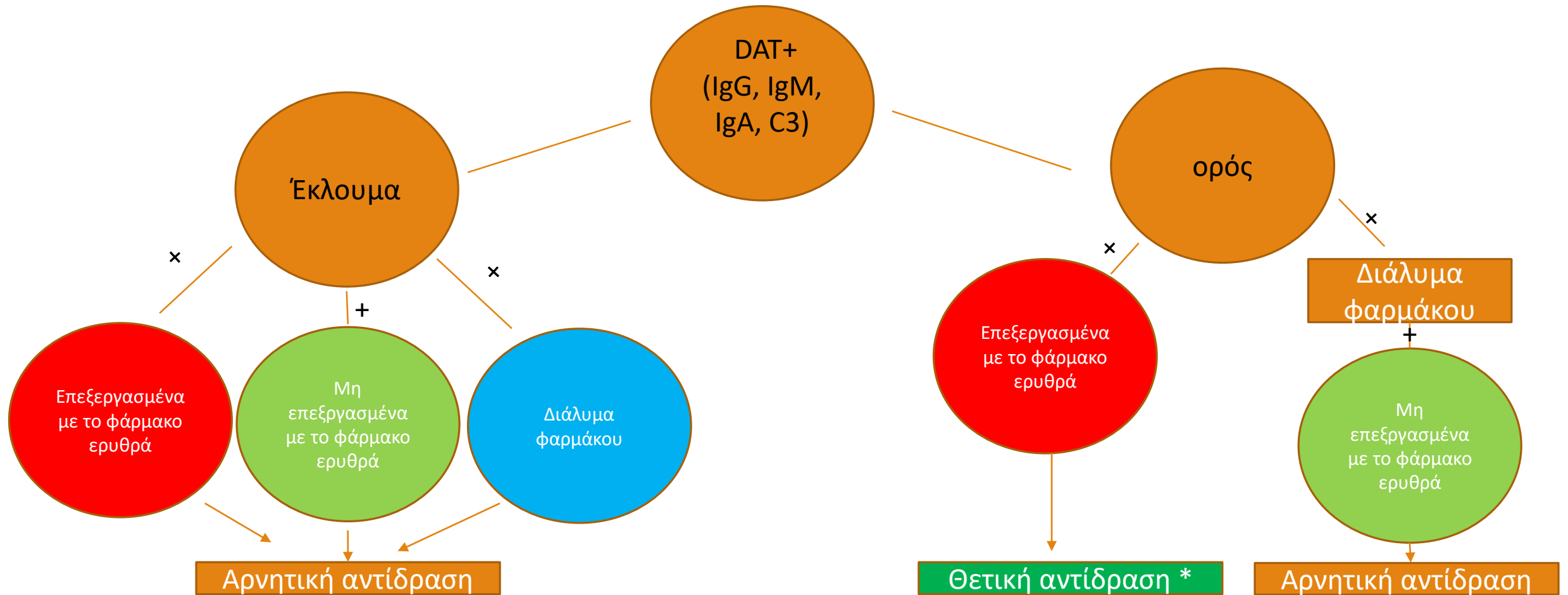
Broadberry et al, Transf Med 2004

3. Μη ανοσολογική προσρόφηση πρωτεϊνών

Table 3. Drugs associated with the detection of nonimmunologic protein adsorption onto RBCs

Drug (alternative name)	Reference	Therapeutic category	Number of references (single [year] vs. multiple [<5, <10, or ≥10])	HA	Positive DAT	Drug-dependent antibody(ies) also detected
Cefotetan*	35,36	Antimicrobial	Multiple (≥10)	✓	✓	✓
Cephaloridine	48	Antimicrobial	Multiple (<5)		✓	
Cephalothin*	47,48	Antimicrobial	Multiple (≥10)	✓	✓	✓
Cisplatin	58	Antineoplastic	Multiple (<10)	✓	✓	✓
Clavulanate potassium* (Clavulanic acid)	161,162	β-Lactamase inhibitor	Multiple (<5)		✓	
Diglycoaldehyde (INOX)	163,164	Antineoplastic	Multiple (<5)		✓	
Oxaliplatin*	101	Antineoplastic	Multiple (≥10)	✓	✓	✓
Sulbactam*	161,165	β-Lactamase inhibitor	Multiple (<5)	✓	✓	
Suramin	166	Antihelminthic, antiprotozoal	Single (1988)			
Tazobactam*	167,168	β-Lactamase inhibitor	Multiple (<5)	✓	✓	

3. Μη ανοσολογική προσρόφηση πρωτεϊνών



3. Μη ανοσολογική προσρόφηση πρωτεϊνών

Έμμεσες ενδείξεις:

- Ύπαρξη χρονική συσχέτιση με τη χορήγηση του φαρμάκου
- Υποχώρηση της κλινικής εικόνας και των εργαστηριακών ευρημάτων μετά τη διακοπή του φαρμάκου
- Αιμολυτική αναιμία όταν εκτεθεί ξανά ο ασθενής στο φάρμακο
- Αύξηση των επιπέδων IgG στο πλάσμα

Φαρμακο-ανεξάρτητοι

Η αιμόλυση συνεχίζεται και μετά τη διακοπή του φαρμάκου

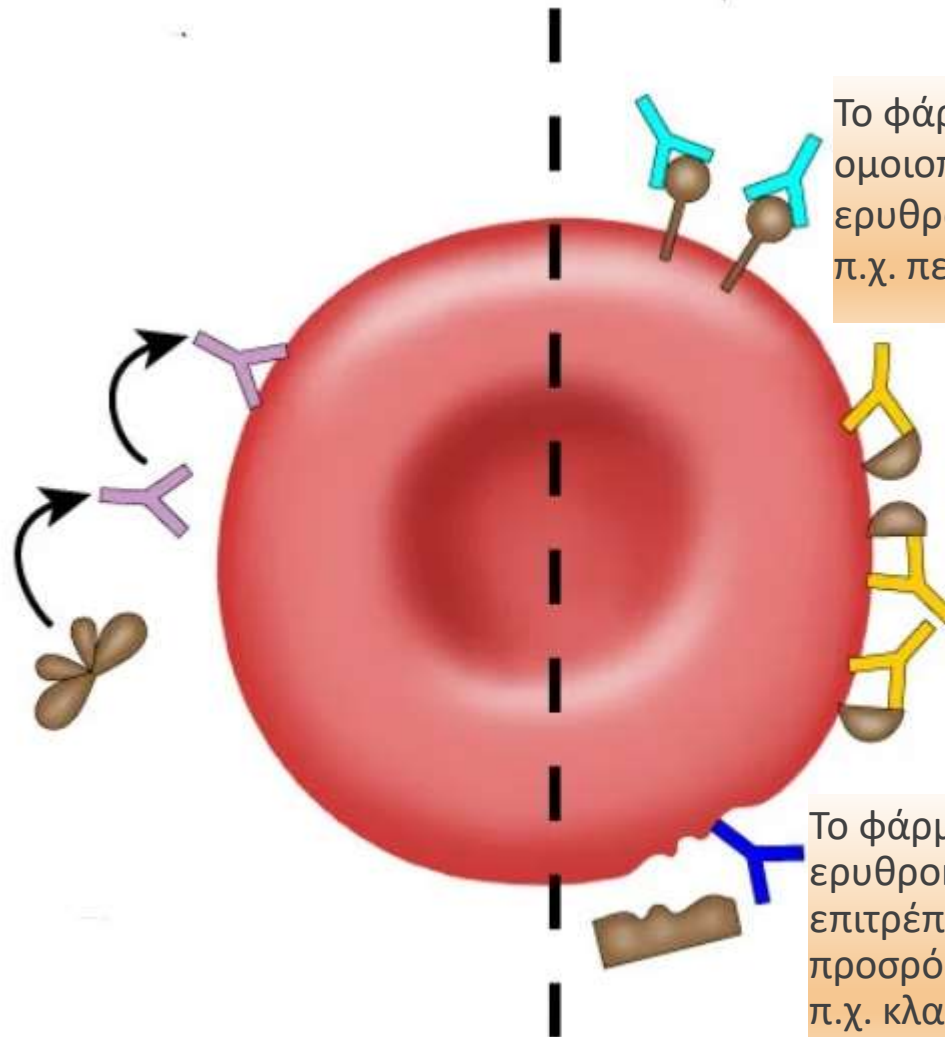
Μηχανισμοί

Φαρμακο-εξαρτώμενοι

Η αιμόλυση απαιτεί τη συνεχή παρουσία του φαρμάκου

Το φάρμακο επάγει την παραγωγή αντι-ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων π.χ. Μεθυλντόπα, Φλουνταραμπίνη

4



Το φάρμακο συνδέεται ομοιοπολικά στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη π.χ. πενικιλίνη, κεφοτετάνη

1

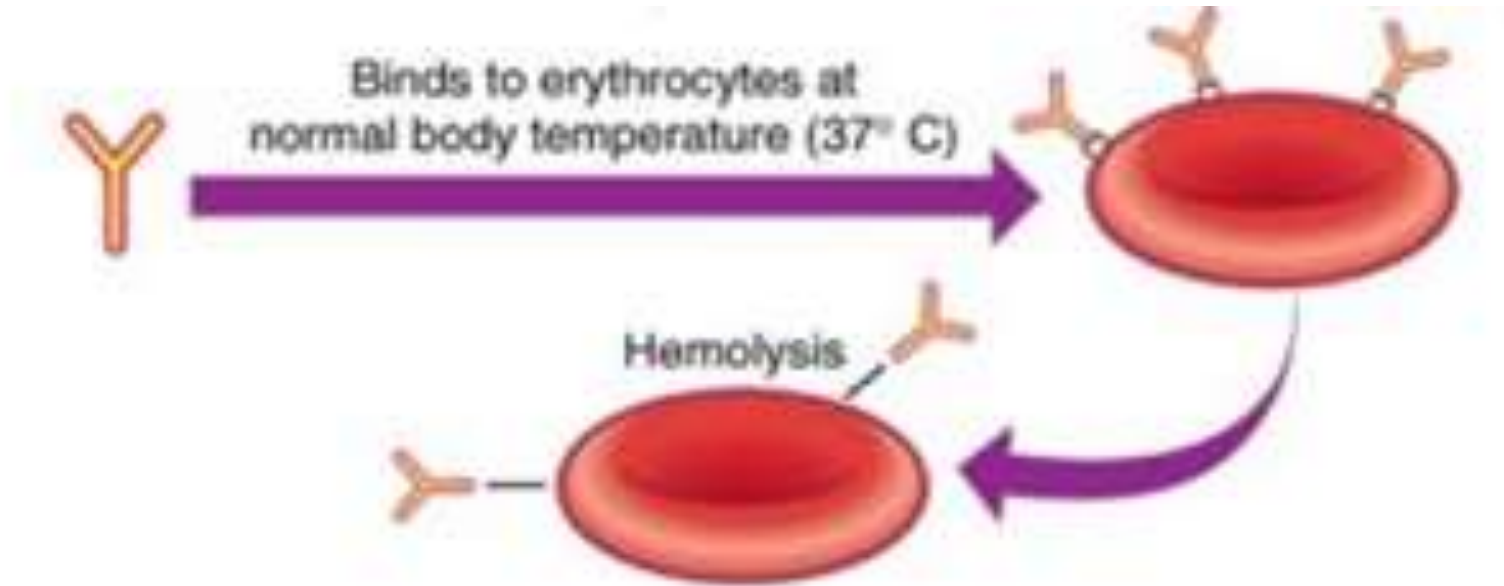
Ανοσοσυμπλέγματα φαρμάκου-αντισώματος συνδέονται μη-ομοιοπολικά στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη π.χ. κινίνη

2

Το φάρμακο τροποποιεί την ερυθροκυτταρική μεμβράνη επιτρέποντας τη μη άνοση προσρόφηση πρωτεϊνών π.χ. κλαβουλανικό, σισπλατίνη

3

4. Αυτοάνοσος Μηχανισμός



- Μεθυλντόπα
- Φλουνταραμπίνη

Μεθυλντόπα

- 10-36% των ασθενών που λαμβάνουν μεθυλντόπα εμφανίζουν θετική DAT(IgG±C3) μετά από 3-6 μήνες χορήγησης.
- Η αντίδραση είναι δοσο-εξαρτώμενη.
- Η DAT παραμένει θετική ακόμη και 2 έτη μετά τη διακοπή της μεθυλντόπα.
- 0,8% των ασθενών εμφανίζουν σταδιακά εξωαγγειακή αιμολυτική αναιμία, η οποία υποχωρεί μετά τη διακοπή του φαρμάκου
- Ο ορός του ασθενούς και το έκλουμα περιέχουν αυτοαντίσωμα που δεν μπορεί να διαχωριστεί ορολογικά από τα θερμού τύπου IgG αυτοαντισώματα.

4. Αυτοάνοσος Μηχανισμός

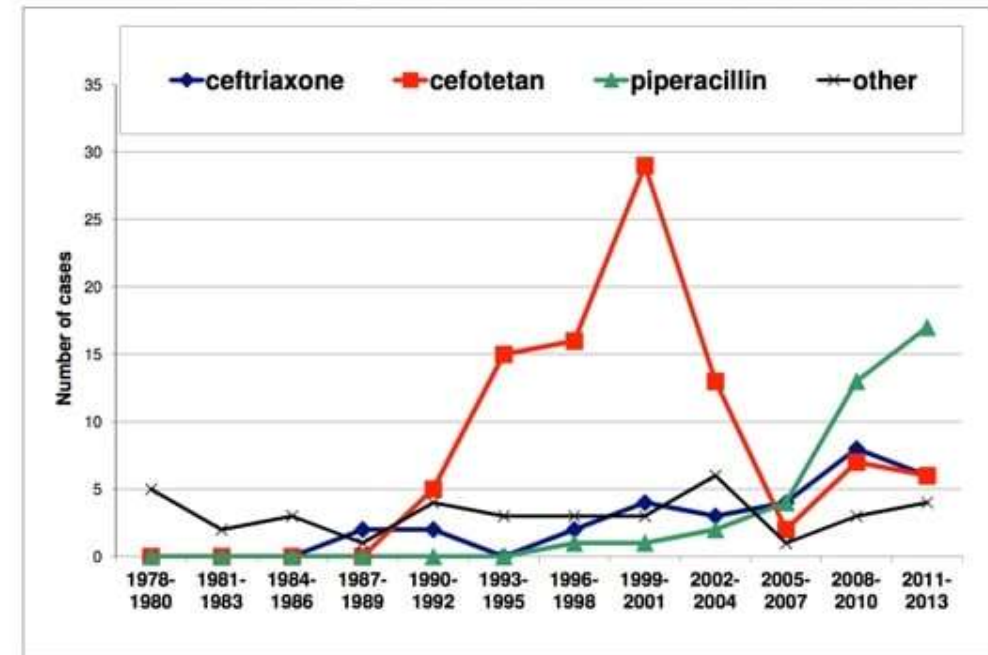
Table 2. Drugs associated with cases of IHA or positive DAT or both in which only drug-independent antibodies (autoantibodies) were detected

Drug (alternative name)	Reference	Therapeutic category	Number of references (single [year] vs. multiple [<5 , <10 , or ≥ 10])	IHA	Positive DAT	More evidence needed
Alemtuzumab	138	Antineoplastic; immunosuppressant	Multiple (<5)	✓	✓	✓
Bendamustine	139	Antineoplastic	Multiple (<5)	✓	✓	✓
Captopril	140	Antihypertensive	Multiple (<5)	✓	✓	✓
Chaparral	141	Herbal	Single (1980)		✓	✓
Cimetidine	142	Antiulcerative	Multiple (<10)	✓	✓	✓
Cladribine (2-chloro-deoxyadenosine)	143	Antineoplastic	Multiple (<10)	✓	✓	
Fenfluramine	144	Anorexic	Single (1973)	✓	✓	✓
Fludarabine*	145,146	Antineoplastic	Multiple (≥ 10)	✓	✓	
Interferon	147	Antineoplastic, antiviral	Multiple (≥ 10)	✓	✓	✓
Interleukin-2	148	Antineoplastic	Multiple (<5)	✓	✓	✓
Ketoconazole	149	Antifungal	Single (1987)	✓	✓	✓
Lenalidomide	150	Immunomodulatory	Single (2006)	✓	✓	✓
Levodopa (L-dopa)	151	Antiparkinsonian	Multiple (≥ 10)	✓	✓	
Mefenamic acid	152	NSAID	Multiple (≥ 10)	✓	✓	
Mesantoin (Mepherytoin)	153	Anticonvulsant	Single (1953)	✓	✓	✓
Methyldopa*	154	Antihypertensive	Multiple (≥ 10)	✓	✓	
Nalidixic acid	155	Antibacterial	Multiple (<10)	✓	✓	✓
Procainamide*	156,157	Antiarrhythmic	Multiple (<10)	✓	✓	✓
Rituximab	158	Antineoplastic	Single (2003)	✓	✓	✓
Tacrolimus	159	Immunosuppressant	Multiple (<10)	✓	✓	✓
Weidean	160	Chinese herbs	Single (2009)	✓	✓	✓

Κεφαλοσπορίνες

Drug	Number (percentage) of cases	
	1969-78	2003-12
Methyldopa	29 (67%)	
Penicillin	10 (23%)	
Ceftriaxone		17 (19%)
Cefotetan		24 (28%)
Piperacillin		32 (37%)
Platinum-based chemotherapies		6 (7%)
Others	4 (9%)	8 (9%)
Total	43	87

DIIHA – Drug Antibodies Most Commonly Encountered at Red Cross (So CA)



Κεφαλοσπορίνες

1^{ης} και 2^{ης} γενεάς κεφαλοσπορίνες

- DAT + , IgG ± C3
- Εργαστηριακή μέθοδος: Ορός και ερυθρά του εξεταζόμενου επωάζονται με φαρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά
- Η προ-επώαση της κεφαλοσπορίνης με το αντίσωμα αναστέλλει την αντίδραση του με φαρμακο-επεξεργασμένα ερυθρά
- Προκαλεί εξωαγγειακή αιμόλυση

Cephalosporin	Reference	Drug-treated RBCs	Serum + RBCs + drug	No in vitro drug
First-generation				
Cephalothin	5	5/5	1/1	0/5
Cefazolin	2	2/2	0/1	0/2
Cephalexin	1	1/1	0/0	?
Second-generation				
Cefoxitin	4	4/4	1/2	0/3
Cefamandole	1	1/1	0/0	0/1
Cefotetan	31	31/31	20/22	12/25
Cefuroxime	2	2/2	0/2	0/2
Cefotaxime	4	3/4	3/4	1/4
Third-generation				
Ceftazidime	4	2/4	3/4	0/4
Ceftriaxone	28	0/12	28/28	5/19
Ceftizoxime	4	2/4	3/4	2/4
Cefixime	1	1/1	1/1	0/1

Κεφαλοσπορίνες

Κεφοτετάνη (2^{ης} γενεάς) : αιμολυτική αναιμία από αντισώματα που αντιδρούν με 3 διαφορετικούς μηχανισμούς:

1. Κεφοτετάνη-επεξεργασμένα ερυθρά
2. Παρουσία διαλύματος κεφοτετάνης
3. Χωρίς την παρουσία κεφοτετάνης

Cephalosporin	Reference	Drug-treated RBCs	Serum + RBCs + drug	No in vitro drug
First-generation				
Cephalothin	5	5/5	1/1	0/5
Cefazolin	2	2/2	0/1	0/2
Cephalexin	1	1/1	0/0	?
Second-generation				
Cefoxitin	4	4/4	1/2	0/3
Cefamandole	1	1/1	0/0	0/1
Cefotetan	31	31/31	20/22	12/25
Cefuroxime	2	2/2	0/2	0/2
Cefotaxime	4	3/4	3/4	1/4
Third-generation				
Ceftazidime	4	2/4	3/4	0/4
Ceftriaxone	28	0/12	28/28	5/19
Ceftizoxime	4	2/4	3/4	2/4
Cefixime	1	1/1	1/1	0/1

Κεφαλοσπορίνες

3^{ης} γενεάς κεφαλοσπορίνες

- Κεφοταξίμη: ενδοαγγειακή αιμόλυση, DAT+(C3), μηχανισμός ανοσοσυμπλέγματος, απουσία αντίδρασης μετά από επώαση με κεφοταξίμη-επεξεργασμένα ερυθρά
- Κεφτριαξόνη: θανατηφόρα αιμόλυση με χαρακτηριστικά ανοσοσυμπλέγματος (DAT+, C3, κεφτριαξόνη-επεξεργασμένα ερυθρά μη αντιδρώντα)

Salama et al, Transfusion 1987

Garatty et al, transfusion 1991

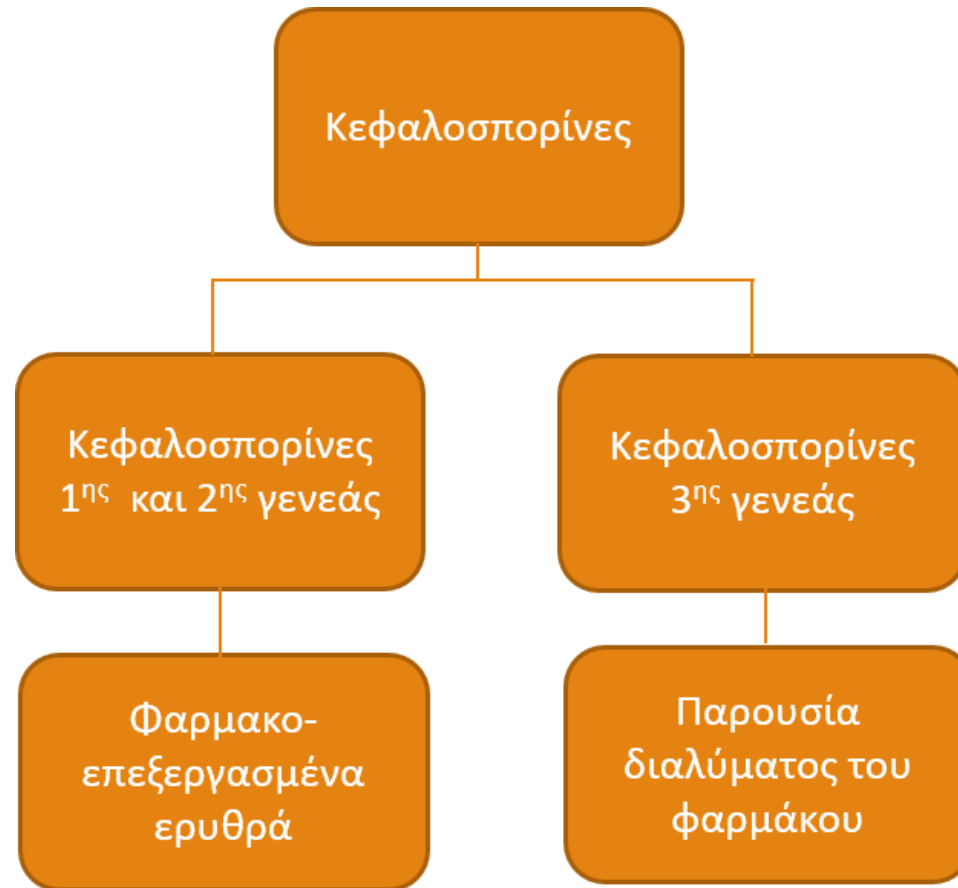
Cephalosporin	Reference	Drug-treated RBCs	Serum + RBCs + drug	No in vitro drug
First-generation				
Cephalothin	5	5/5	1/1	0/5
Cefazolin	2	2/2	0/1	0/2
Cephalexin	1	1/1	0/0	?
Second-generation				
Cefoxitin	4	4/4	1/2	0/3
Cefamandole	1	1/1	0/0	0/1
Cefotetan	31	31/31	20/22	12/25
Cefuroxime	2	2/2	0/2	0/2
Cefotaxime	4	3/4	3/4	1/4
Third-generation				
Ceftazidime	4	2/4	3/4	0/4
Ceftriaxone	28	0/12	28/28	5/19
Ceftizoxime	4	2/4	3/4	2/4
Cefixime	1	1/1	1/1	0/1

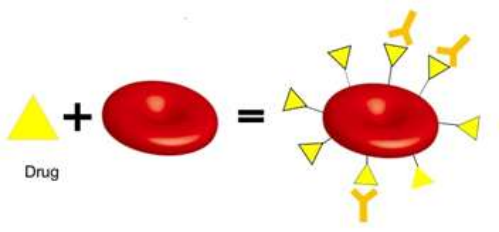
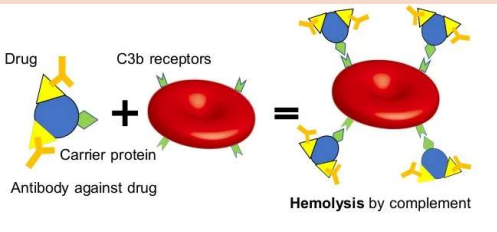
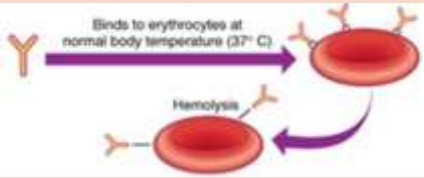
Κεφτριαξόνη

- Η ΔΙΗΑ από κεφτριαξόνη στα παιδιά είναι πιο οξεία και πιο σοβαρή
- ❖ Ο χρόνος από τη λήψη μέχρι την αιμόλυση είναι 1 ώρα ή και λιγότερο
- ❖ Η αιμοσφαιρίνη μπορεί να φθάσει ως και 5g/dl
- ❖ 12/18 θανατηφόρες ΔΙΗΑ από κεφτριαξόνη ήταν σε παιδιά
- Ενδοαγγειακή αιμόλυση
- Εργαστηριακά ευρήματα:
 - ❖ DAT + (C3/ IgG + C3)
 - ❖ Φαρμακο-εξαρτώμενο αντίσωμα που ανιχνεύεται μόνο παρουσία του φαρμάκου
 - ❖ ΑΛΛΑ: Τα 2/3 των δειγμάτων αντιδρούν χωρίς την προσθήκη φαρμάκου in vitro κι αυτό οφείλεται στην παρουσία του φαρμάκου στην κυκλοφορία



Κεφαλοσπορίνες



	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΠΤΙΝΗΣ	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟ-ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ	ΜΗ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	ΑΥΤΟΑΝΟΣΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ				
ΑΙΜΟΛΥΣΗ	ΕΞΩΑΓΓΕΙΑΚΗ	ΕΝΔΟΑΓΓΕΙΑΚΗ	ΟΧΙ	ΕΞΩΑΓΓΕΙΑΚΗ ΑΙΜΟΛΥΣΗ (0,8%)
DAT	+ (IgG ± c3)	+ (IgM ή IgG ± c3 ή MONO c3)	+ (IgG ή IgM ή IgA ή c3)	+ (10-36%) (IgG ± c3) 2 ΕΤΗ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΚΟΠΗ
ΧΡΟΝΟΣ-ΔΟΣΗ	ΜΕΓΑΛΕΣ ΔΟΣΕΙΣ ≥ 1 ΕΒΔΟΜΑΔΑ	ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗ ΕΚΘΕΣΗ ΜΙΚΡΗ ΔΟΣΗ ΑΜΕΣΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ		3-6 ΜΗΝΕΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ
IN VITRO ΕΥΡΗΜΑΤΑ	ΟΡΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ/ΕΚΛΟΥΜΑ + ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΤΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΡΥΘΡΑ	ΟΡΟΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ + ΦΑΡΜΑΚΟ + ΕΡΥΘΡΑ ΤΥΧΑΙΟΥ ΔΟΤΗ	ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΔΥΟ ΜΕΘΟΔΟΙ	ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΑΣΘΕΝΟΥΣ Ή ΣΤΟ ΕΚΛΟΥΜΑ
«ΠΡΟΤΥΠΟ» ΦΑΡΜΑΚΟΥ	ΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗ	ΚΙΝΙΔΙΝΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΑΣΩΝ ΟΞΑΛΙΠΛΑΤΙΝΗ	ΜΕΘΥΛΑΝΤΟΠΑ ΦΛΟΥΝΤΑΡΑΜΠΙΝΗ

Επίκτητη αιμολυτική
αναιμία;

- ↓ Ht/ Hb
- ↑ΔΕΚ
- ↑IDBil
- ↓απτοσφαιρίνης
- ↑LDH

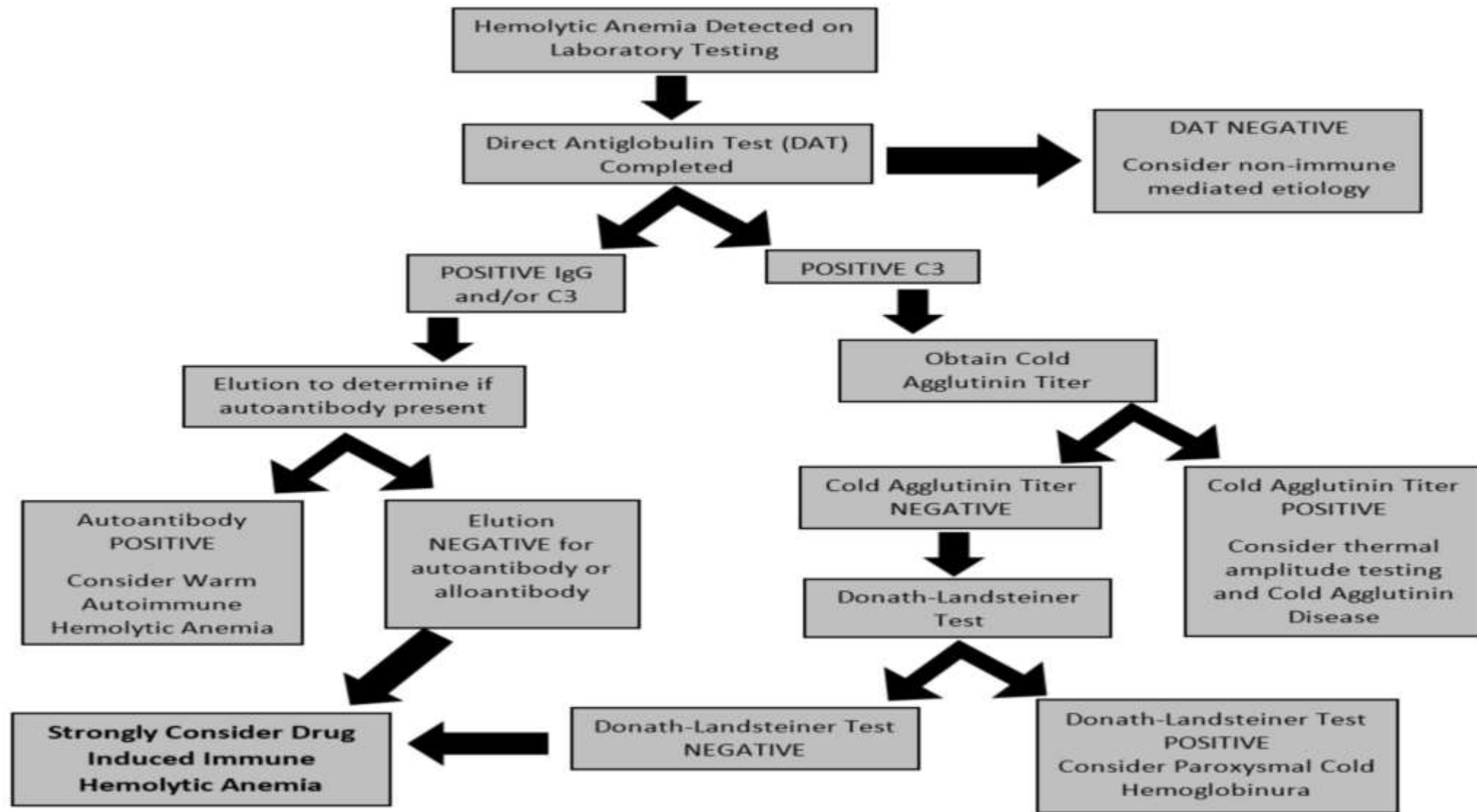
Ποια φάρμακα που
λαμβάνει ο ασθενής
έχουν ενοχοποιηθεί για
αιμολυτική αναιμία;

Θετική άμεση Coombs;

- IgG, C3 ή και τα δύο
- Μη αντιδρών έκλουμα στα μη επεξεργασμένα ερυθρά αναμένεται , αλλά πιο πιθανά να μην οφείλεται σε φάρμακα
- Αντιδρών έκλουμα σε μη επεξεργασμένα ερυθρά μπορεί να παρατηρηθεί αν ο ασθενής λαμβάνει φάρμακο

Υπάρχει χρονική
συσχέτιση ανάμεσα
στη λήψη του
φαρμάκου και την
εμφάνιση αιμολυτικής
αναιμίας;





Θεραπεία

- Άμεση διακοπή του φαρμάκου (βελτίωση σε 1-2 εβδομάδες)
- Ενδοφλέβια χορήγηση υγρών
- Παρακολούθηση ζωτικών σημείων και διούρησης
- Παρακολούθηση αιμοσφαιρίνης και νεφρικής λειτουργίας
- Μετάγγιση συμπυκνωμένων ερυθρών (55%) (Garbe et al, Br Journ Haem 2011)
- Κορτικοστεροειδη:
- ❖ αμφίβολο το όφελος
- ❖ στο 85% των ασθενών χορηγούνται (Garbe et al, Br Journ Haem 2011)
- ❖ Εξατομίκευση σε κάθε ασθενή με βάση τη σοβαρότητα της αιμόλυσης και την πιθανότητα φαρμακο-επαγόμενης αιμολυτικής αναιμίας
- Ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη (IVIg), κυκλοφωσφαμίδη, αζαθειοπρίνη: φαρμακο-ανεξάρτητα αυτοαντισώματα
- Σοβαρή ONB: αιμοδιάλυση, πλασμαφαίρεση

Συμπεράσματα

- Η φαρμακοεπαγόμενη αιμολυτική αναιμία (DIIHA) είναι σπάνια
- Η θνητότητα της DIIHA είναι 6-15%
- Τα συχνότερα φάρμακα που έχουν συσχετιστεί με DIIHA είναι η κεφτριαξόνη, η κεφοτετάνη και η πιπερακιλλίνη
- Τα φαρμακο-εξαρτώμενα αντισώματα, όταν υπάρχουν, αντιδρούν με διάφορους τρόπους:
 - ❖ drug-treated ερυθροκύτταρα
 - ❖ Untreated ή enzyme-treated ερυθροκύτταρα παρουσία διαλύματος φαρμάκου
 - ❖ Untreated ερυθροκύτταρα χωρίς παρουσία φαρμάκου in vitro
- Η μη ανοσολογική προσρόφηση πρωτεϊνών μπορεί να αποδειχθεί μόνο «χρονικά».
- Η DIIHA συγχέεται συχνά με την αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία ή τις αιμολυτικές αντιδράσεις μετά από μετάγγιση



ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΑΣ