Υποτροπή PCH σε παιδί 8 ετών μετά από έκθεση στο κρύο

Ε.Μανταδακης[1], Ζ.Μπεζιργιαννίδου[2], Γ.Μαρτίνης[2], Α Χατζημιχαήλ[1]

1. Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική, Π.Γ.Ν. Αλεξανδρούπολης
2. Κέντρο Αιμοδοσίας, Π.Γ.Ν. Αλεξανδρούπολης

Παρουσίαση περιστατικού

- **Ηλικία: 2,5 ετών**
- **Φύλο: Άρρεν**
- **Ιστορικό: Σπαστική Διπληγία**
- **Αιτία Προσέλευσης στον παιδίατρο: Χαμηλός πυρετός εμμετοί , διάρροιες, ωχρότητα, ταχυκαρδία**
- **Κλινική εικόνα στο νοσοκομείο: Αφυδάτωση, λήθαργος ταχυκαρδία165 bpm, and ΑΠ 80/50mm Hg. Χωρίς ηπατοσπληνομεγαλία και χωρίς αιμορραγική διάθεση**

Εργαστηριακά ευρήματα

- leukocytes 31,420/mL,
- Hemoglobin 3.1 g/dL
- hematocrit 8.3%
- platelets 270,000/mL
- Reticulocytes 2.76%
- MCV 79fl
- MCH 29.5pg
- MCHC 37.3 g/dL
- RDW 14.5%,
- TKE 130 mm/h.

- BUN 78 mg/dL (normal 5 to 18)
- Creatinine 1.3 mg/dL(normal for age <0.6)
- fibrinogen 420 mg/dL
- Haptoglobin 5.83 mg/dL (normal 36 to 195)
- total bilirubin 6.7 mg/dL (normal up to 1.2)
- direct bilirubin 0.7 mg/dL,
- SGOT 175 U/L (normal<35)
- SGPT 27 U/L
- LDH 3766 U/L (normal <248).
- Αιμοσφαιρινουρία(++++)

Εμφανή στοιχεία Ενδοαγγειακής Αιμόλυσης

Ανοσοαιματολογικός έλεγχος

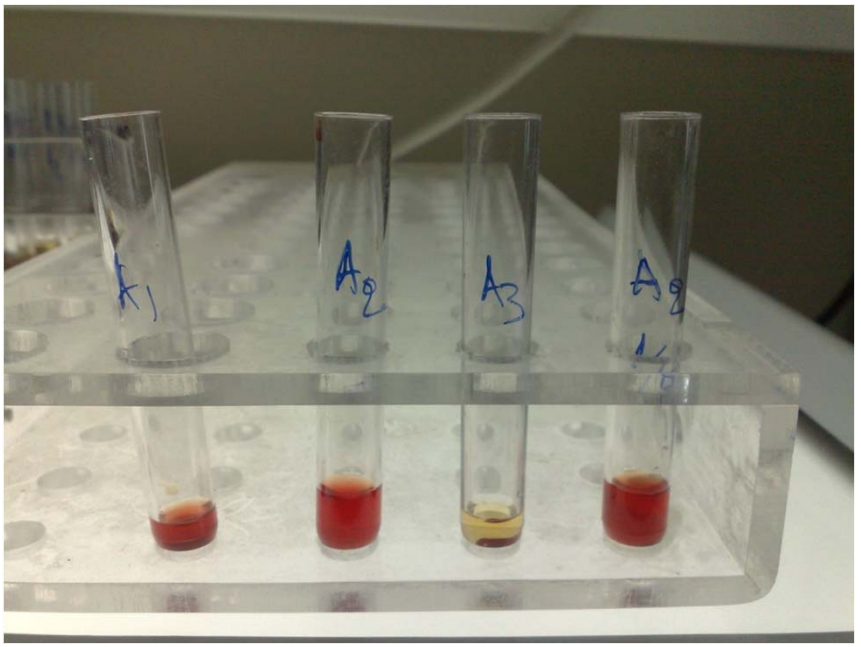
Άμεση Coombs (DAT)	
Polyspecific	(+++) θετ
Anti-IgG	(-) αρν
Anti-IgM	(-) αρν
Anti-IgA	(-) αρν
Anti-C3c	(+++) θετ
Anti-C3d	(++++) θετ
Elution	Αρν(-)

Έμμεση Coombs (IAT) Scteening & Panel	
Polyspecific 37ºC	(-) αρν
Anti-IgG 37ºC	(-) αρν
NaCl + Papaine 37ºC	(-) αρν
NaCl 22ºC	(-) αρν
NaCl 4ºC	(-) αρν

Συμβατότητα: Μονάδες αίματος συμβατές

Υποψία PCH

(Παροξυντικής κρυοαιμοσφαιρινουρίας)

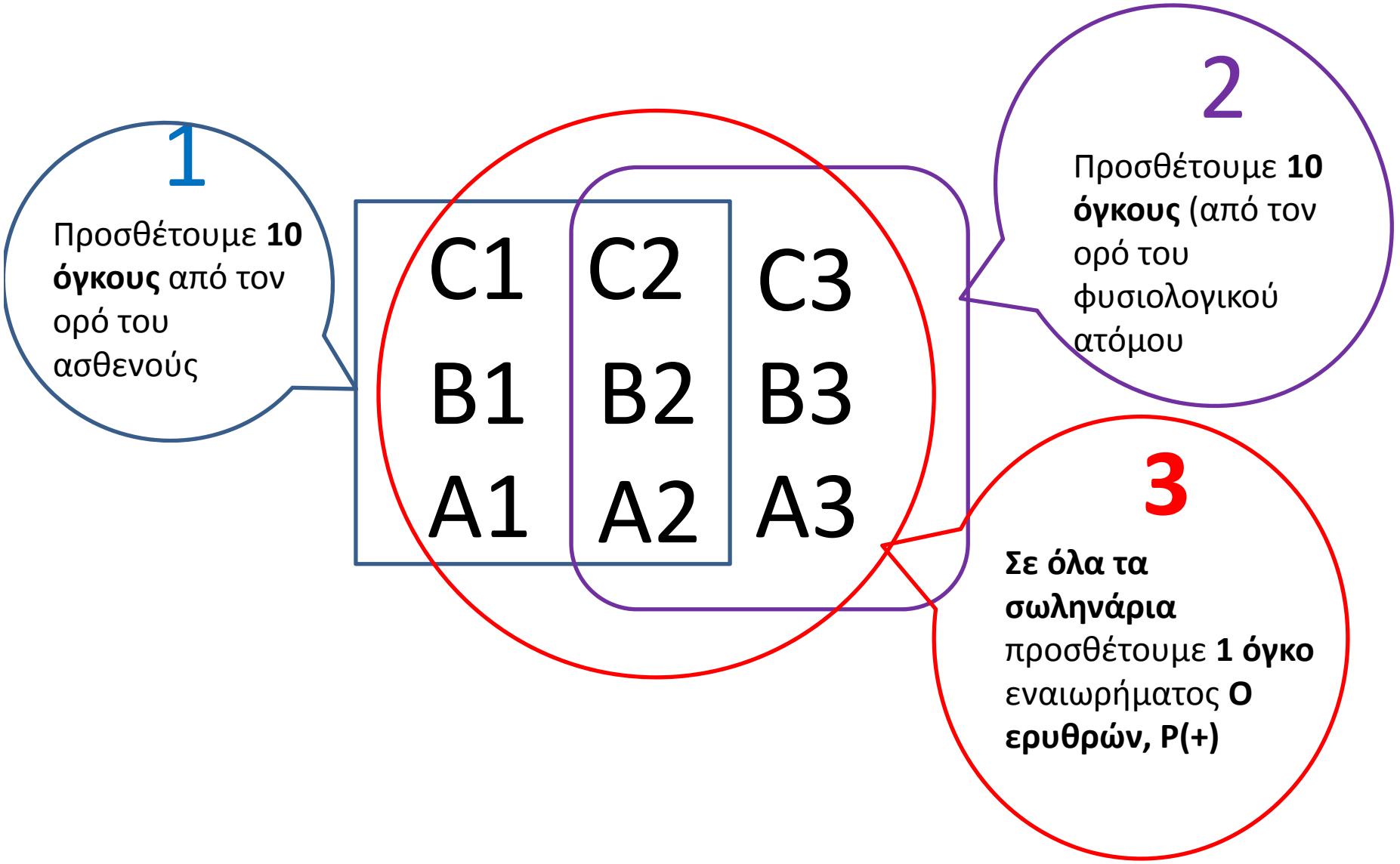


Donath Landsteiner Test: θετικό (+)
με μεγαλύτερη ένταση στο σωληνάριο με προσθήκη ορού φυσιολογικού ατόμου που περιέχει φυσιολογικό Συμπλήρωμα

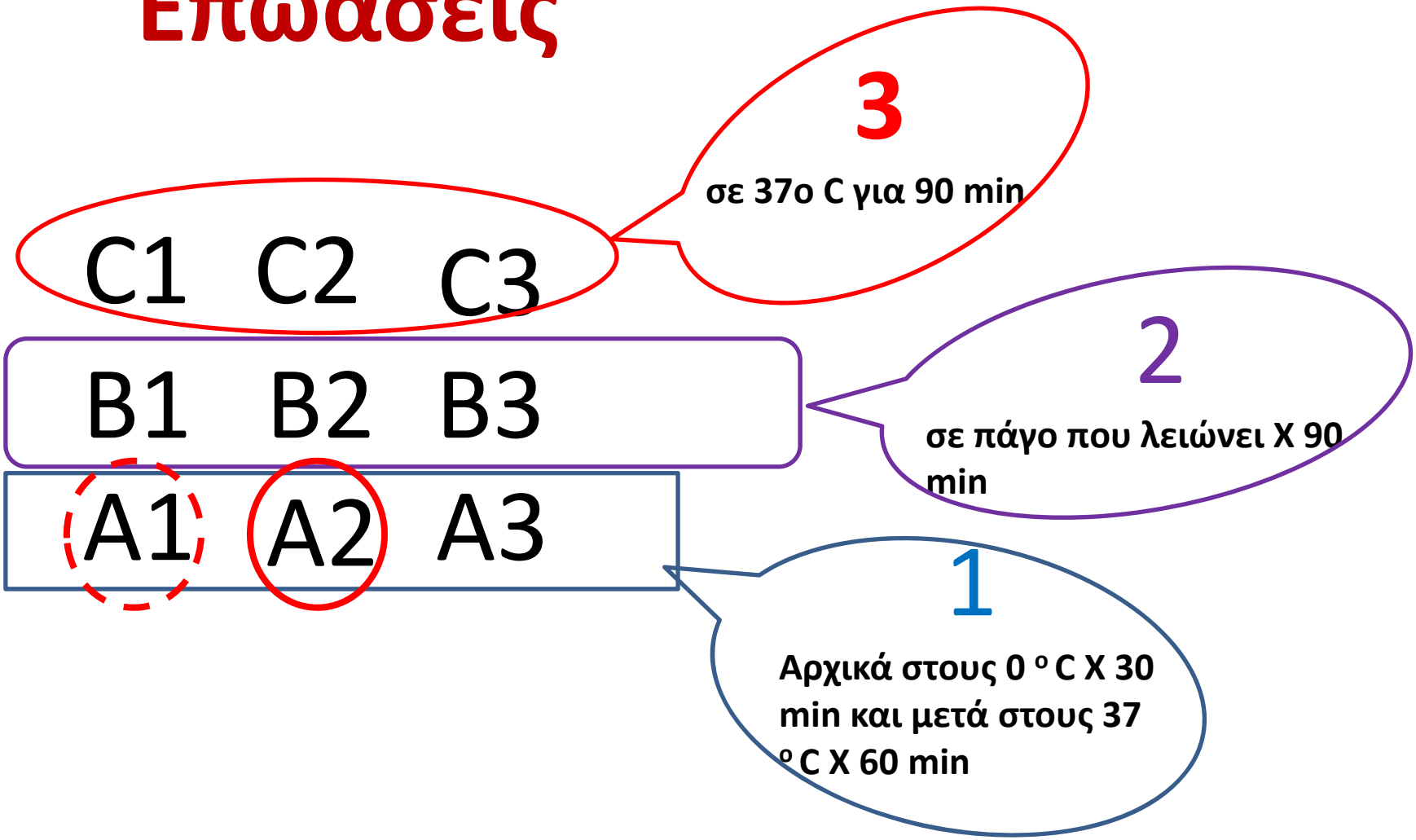
Donath Landsteiner Test

Τεχνική (Υπενθύμιση)

- **Φρέσκος ορός ασθενούς (Δείγμα εν θερμώ)**
- **Φρέσκος ορός φυσιολογικού ατόμου** (Συμβατού ως προς ΑΒΟ με τον ασθενή)
- **Ο ερυθρά πλυμένα.** Εναιώρημα 50% από **Ο ερυθρά πλυμένα** που εκφράζουν το **P1** αντιγόνο για να είναι σίγουρα (P+). **9 ΣΩΛΗΝΑΡΙΑ 10Χ75**


1
Προσθέτουμε **10 όγκους** από τον ορό του ασθενούς
C1 C2 C3
B1 B2 B3
A1 A2 A3
2
Προσθέτουμε **10 όγκους** (από τον ορό του φυσιολογικού ατόμου
3
Σε όλα τα σωληνάρια προσθέτουμε **1 όγκο** εναιωρήματος **Ο ερυθρών, P(+)**

Επωάσεις



ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ στις 1000 στροφές

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ για αιμόλυση στο υπερκείμενο

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

- **Θετικό είναι το test όταν υπάρχει αιμόλυση στο Α1 και Α2 ή μόνο στο Α2.(Ορός ασθενούς που επωάσθηκε στις 2 φάσεις)**

- **Δεν υπάρχει αιμόλυση σε αυτά που επωάστηκαν είτε στους 37 είτε στον πάγο.**

- **Τα Α3,Β3,C3 αποτελούν control και δεν πρέπει να έχουν αιμόλυση.**

- **Στο Α2 η αιμόλυση μπορεί να είναι μεγαλύτερη από το Α1 ενώ στο Α1 μπορεί και να μην υπάρχει αιμόλυση αν ο ασθενής έχει χαμηλό συμπλήρωμα.**

Γενικά για το αντίσωμα PCH

- **Το αντίσωμα είναι μια διφασική αιμολυσίνη που συνδέεται στα ερυθρά στο κρύο και στη συνέχεια προκαλεί ενδοαγγειακή αιμόλυση κοντά στους 37° C με ενεργοποίηση του συμπληρώματος.**

- **Donath–Landsteiner αιμολυτική αναιμία είναι προτιμότερη σαν όρος αφού δεν είναι πάντα παροξυσμική και δεν εκλύεται συνήθως με έκθεση στο κρύο.(Η ιδιαιτερότητα αυτής της περίπτωσης είναι ότι υποτροπίασε μετά από ψυχρά επιθέματα για τον έλεγχο του πυρετού)**

- **Παλαιοτέρα σχετιζόταν με σύφιλη αλλά τώρα συνήθως με ιογενείς λοιμώξεις, ιδιαίτερα στα παιδιά**

- **Συνήθως είναι IgG αλλά δεν αποκλείεται να είναι και IgM**
- **Το θερμικό εύρος κυμαίνεται**

- **Εκτός από τη γνωστή anti-P ειδικότητα, μπορεί να είναι και anti-IH (Weiner *et al. 1964),* anti-I (Engelfriet *et al. 1968a; Bell et al. 1973a), anti-i , anti-p, anti-Pr, κυρίως σε άτυπες περιπτώσεις ενηλίκων αν και δεν έχει κλινική σημασία.***

Τάξη αντισώματος

Διακριση IgM-IgG αντισωμάτων (με χρήση σουλφυδρυλικών παραγόντων DTT)

Τοποθετούμε από 1 ml ορού σε 2 σωληνάρια

Το ένα σωληνάριο ονομάζεται ctl και το άλλο DTT

Στο ctl σωληνάριο προσθέτουμε 1 ml PBS με pH 7,3 και στο DTT σωληνάριο προσθέτουμε 1 ml DTT

Επώαση στους 37^{o} C επί 30-60 min

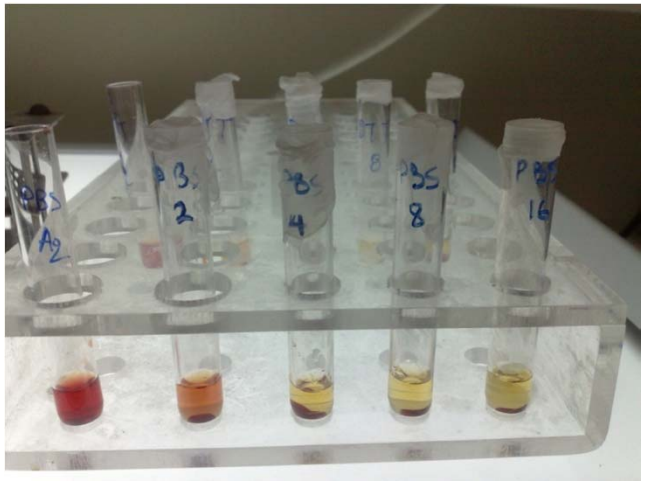
Ελέγχουμε τη δραστηριότητα του αντισώματος με τα αντίστοιχα ερυθρά όπου είχαμε θετικότητα μετά από τιτλοποίηση του ορού του ctl και του DTT

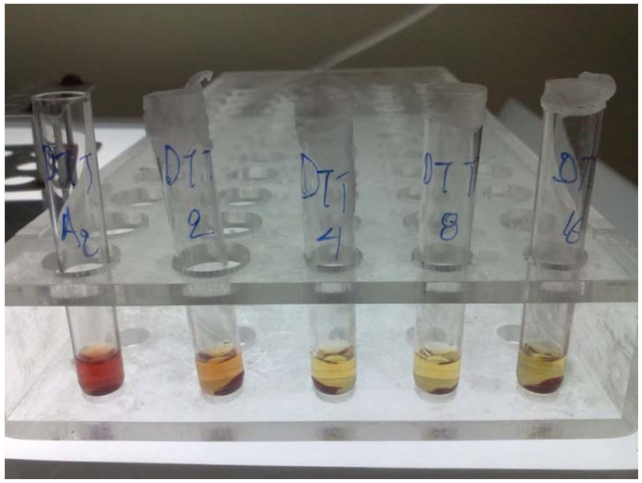
Ερμηνεία

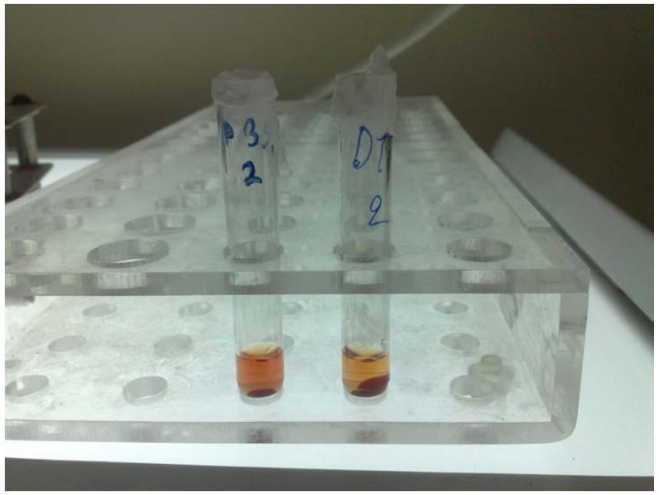
Τα IgM αντισώματα καταστρέφονται ενώ τα IgG διατηρούνται

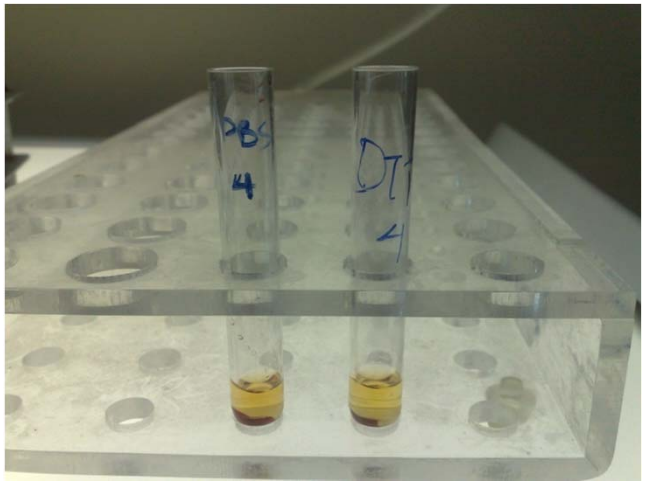
	Αραίωση					Ερμηνεία
Test Sample	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	
Serum+ DTT	3+	2+	2+	1+	0	IgG
Serum + PBS	3+	2+	2+	1+	0	
Serum+ DTT	0	0	0	0	0	IgM
Serum + PBS	3+	2+	2+	1+	0	
Serum+ DTT	2+	1+	0	0	0	IgG+IgM
Serum + PBS	3+	2+	2+	1+	0	

DLT μετά τιτλοποίηση με PBS και DTT









Από την τιτλοποίηση φαίνεται ότι πρόκειται για μικτή διφασική αιμολυσίνη IgM και IgG.

Συνύπαρξη IgG και IgM διφασικής αιμολυσίνης

Ισχύς αντισώματος

Παραλλαγές DLT test

για ανίχνευση διφασικών αιμολυσινών

- **με διαφορετικό θερμικό εύρος ή**
- **ασθενών αντιδράσεων που χρειάζονται ενίσχυση**

Θερμικό εύρος δράσης

Donath-Landstainer Test(DLT) στους 30^{o} C: Θετικό (Αρχικά στους 30 και μετά στους 37)

Donath-Landstainer Test(DLT) στους 22^{o} C: Θετικό (Αρχικά στους 22 και μετά στους 37)

Donath-Landstainer Test(DLT) στους 15^{o} C: Θετικό (Αρχικά στους 15 και μετά στους 37)

Donath-Landstainer Test(DLT) στους 4^{o} C: Θετικό (Αρχικά στους 4 και μετά στους 37)

Ενίσχυση της δράσης του αντισώματος

Donath-Landstainer Test(DLT) με χρήση ερυθρών επεξεργασμένων **με παπαΐνη** αρχικά στους 0 ^{o} C και μετά στους 37 ^{o} C, όπως το κλασσικό)

Donath-Landstainer Test(DLT) με χρήση ερυθρών **από ασθενή με PNH** διότι είναι πιο ευαίσθητα στην αιμολυτική δράση του συμπληρώματος

Τιτλοποίηση

Donath-Landstainer Test(DLT) σε τιτλοποιημένο ορό μπορεί να βοηθήσει στην μετέπειτα παρακολούθηση του ασθενούς. Στο ασθενή αυτόν παρέμεινε θετικό για 4 μήνες ενώ βρέθηκε αρνητικό, μετά 6 μήνες.

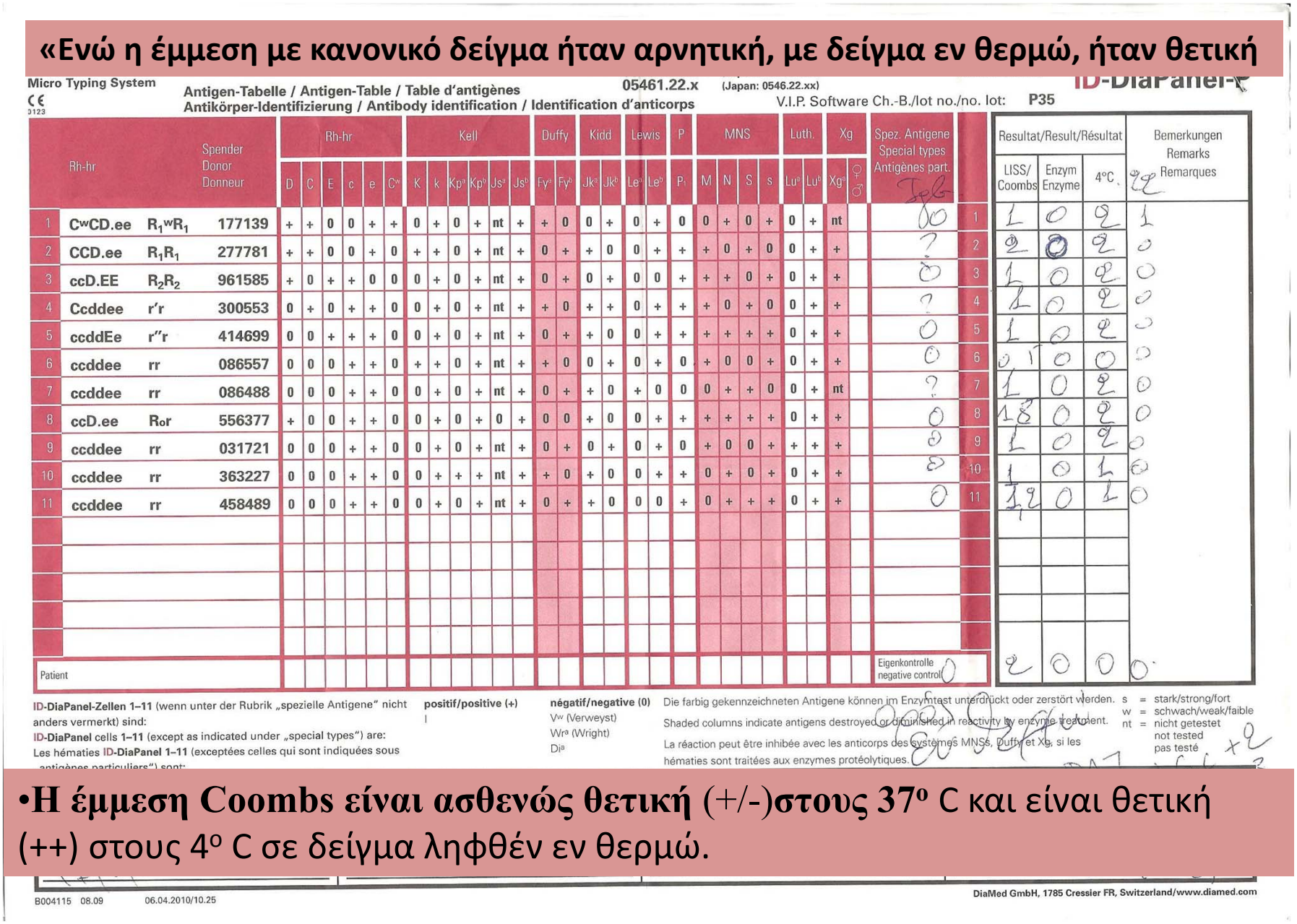
Ειδικότητα αντισώματος

Donath-Landstainer Test (DLT) μετά από προσρόφηση ψυχρών αυτοαντισωμάτων σε στρώμα κονίκλειων ερυθροκυττάρων(REST):

Το αντιδραστήριο προσροφά anti-I, anti-H και anti-IH
Το (DLT) τεστ παρέμεινε θετικό μετά την προσρόφηση των anti-I, anti-H και anti-IH αποκλείοντας έτσι ότι η ειδικότητα της διφασικής αιμολυσίνης στρέφεται έναντι των αντιγόνων H,I,ή IH
Πιθανόν να πρόκειται για anti-Tja(anti-P1+P+Pk).

Επιπλέον έλεγχος άμεσης και έμμεσης Coombs.

«Ενώ η έμμεση με κανονικό δείγμα ήταν αρνητική, με δείγμα εν θερμώ, ήταν θετική



Micro Typing System
CE 0123

Antigen-Tabelle / Antigen-Table / Table d'antigènes
Antikörper-Identifizierung / Antibody identification / Identification d'anticorps

05461.22.x (Japan: 0546.22.xx)

V.I.P. Software Ch.-B./lot no./no. lot: P35

ID-DiaPanel-2

	Rh-hr		Spender Donor Donneur	Rh-hr						Kell						Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luth.		Xg	♀ ♂	Spez. Antigene Special types Antigènes part.	
				D	C	E	c	e	Cᵘ	K	k	Kpᵃ	Kpᵇ	Jsᵃ	Jsᵇ	Fy¹	Fyᵇ	Jkᵃ	Jkᵇ	Le¹	Leᵇ	P₁	M	N	S	s	Luᵃ	Luᵇ	Xgᵃ			
1	CᵂCD.ee	$R_1{}^wR_1$	177139	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	nt	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	nt			1
2	CCD.ee	R_1R_1	277781	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	nt	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+			2
3	ccD.EE	R_2R_2	961585	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	nt	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+			3
4	Ccddee	r'r	300553	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+			4
5	ccddEe	r''r	414699	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+			5
6	ccddee	rr	086557	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	nt	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+			6
7	ccddee	rr	086488	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	0	0	+	nt			7
8	ccD.ee	Ror	556377	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+			8
9	ccddee	rr	031721	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+			9
10	ccddee	rr	363227	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	nt	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+			10
11	ccddee	rr	458489	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+			11
	Patient																													Eigenkontrolle negative control	

Resultat/Result/Résultat			Bemerkungen Remarks Remarques
LISS/ Coombs	Enzym Enzyme	4°C	
1	0	2	1
2	0	2	0
1	0	2	0
1	0	2	0
1	0	2	0
0 1	0	0	0
1	0	2	0
18	0	2	0
1	0	2	0
1	0	1	0
1,2	0	1	0
2	0	0	0

ID-DiaPanel-Zellen 1–11 (wenn unter der Rubrik „spezielle Antigene" nicht anders vermerkt) sind:
ID-DiaPanel cells 1–11 (except as indicated under „special types") are:
Les hématies ID-DiaPanel 1–11 (exceptées celles qui sont indiquées sous

positif/positive (+)
I

négatif/negative (0)
Vʷ (Verweyst)
Wrᵃ (Wright)
Diᵃ

Die farbig gekennzeichneten Antigene können im Enzymtest unterdrückt oder zerstört werden.
Shaded columns indicate antigens destroyed or diminished in reactivity by enzyme treatment.
La réaction peut être inhibée avec les anticorps des systèmes MNSs, Duffy et Xg, si les hématies sont traitées aux enzymes protéolytiques.

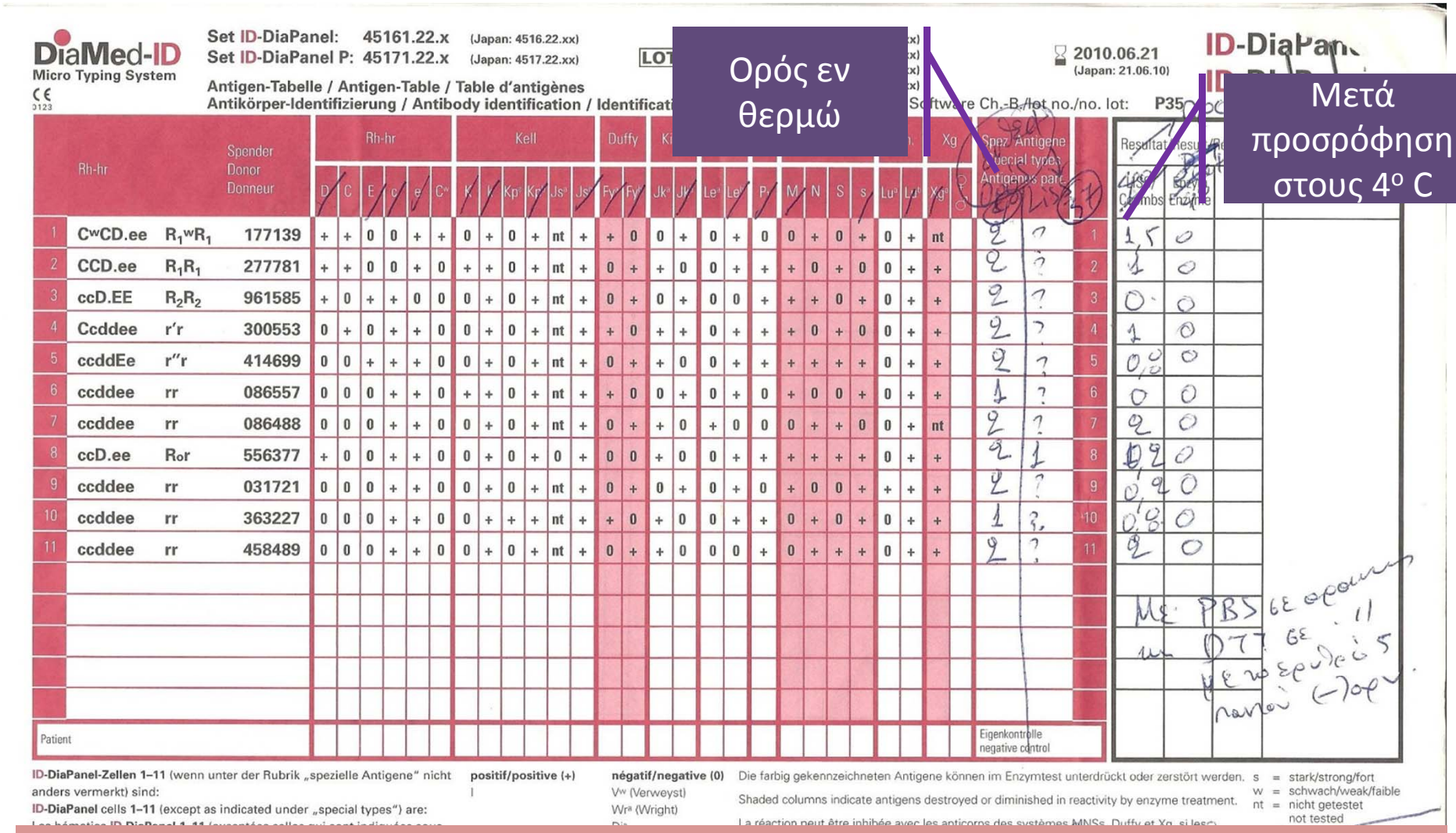
s = stark/strong/fort
w = schwach/weak/faible
nt = nicht getestet / not tested / pas testé

B004115 08.09 06.04.2010/10.25

DiaMed GmbH, 1785 Cressier FR, Switzerland/www.diamed.com

- **Η έμμεση Coombs είναι ασθενώς θετική** (+/-)**στους 37ο** C και είναι θετική (++) στους 4ο C σε δείγμα ληφθέν εν θερμώ.

Προσρόφηση σε REST: Μερική προσρόφηση



Στην έμμεση Coombs παρατηρείται μερική προσρόφηση αντισωμάτων, ενδεικτικό παρουσίας και anti-I, ή anti-H, ή anti-IH αλλά και άλλου αντισώματος που δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίησή του. Πιθανόν να πρόκειται για anti-Tja(anti-P1+P+Pk).

Άμεση Coombs εν ψυχρώ IgG(+/-)

	Τεχνική ID-DIAMED Εν θερμώ	Τεχνική ID-DIAMED Εν ψυχρώ διαδικασία
Polyspecific	(++)θετ	(++)θετ
Anti-IgG	(-) αρν	(+/-) ασθ. θετ
Anti-IgM	(-) αρν	(-) αρν
Anti-IgA	(-) αρν	(-) αρν
Anti-C3c	(-) αρν	(-) αρν
Anti-C3d	(++) θετ	(++)θετ

Η άμεση Coombs είναι θετική στο Anti-C3d(+2) και με τη διαδικασία εν ψυχρώ ανιχνεύθηκε anti-IgG(+/-) ασθ. Θετική. Επισημαίνοντας την παρουσία IgG αντισώματος πάνω στα ερυθρά όπως αναμένεται αλλά συνήθως δεν ανιχνεύεται.

Τίτλος Ψυχροσυγκολλητινών

ΕΡΥΘΡΑ	15min 22ο C	1Hour 4ο C Με φυγοκέντρηση Ή 2Hours Χωρίς φυγοκέντρηση	24 h	48H
O(+) I(+)	0	0	0	
Autologous	0	0	0	
I(-)negative	0	0	0	
Papainized O(+)	0	½: (+)	¼ : (+)	
B(+)	0	0	0	

Ο τίτλος Ψυχροσυγκολλητινών είναι σχεδόν μηδενικός, όπως φαίνεται στον πίνακα. Βέβαια δεν έγινε έλεγχος του τίτλου στη φάση της αιμόλυσης που πιθανόν να ήταν διαφορετικός

Elution «Εν Ψυχρώ»: αρν(-)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

❖**Επιφύλαξη στο να δώσουμε αρνητικό αποτέλεσμα όταν υπάρχουν εργαστηριακά αιμόλυσης**

❖**Η εκτέλεση των δοκιμασιών σε διάφορες θερμοκρασίες και με χρήση ενισχυτικών μέσων μπορεί να αποκαλύψει ευρήματα που με την πρώτη ματιά ήταν αρνητικά όπως στην περίπτωση που αναφέραμε.**

Επί κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων αιμόλυσης

χρειάζεται

Υπομονή, επιμονή,

σχολαστικότητα