



prof. dr hab. med. Krzysztof Lewandowski

Diagnostyka różnicowa niedokrwistości w oparciu o analizę obecności zmian w badaniach morfologicznych i biochemicznych krwi

Z Katedry i Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

Niedokrwistości

- Niedokrwistość stanowi częsty problem w praktyce lekarskiej
- Może ona dotyczyć nawet 20-35% kobiet w wieku rozrodczym
- W badaniach populacyjnych przeprowadzonych w USA u 1/3 do 1/5 kobiet w wieku reprodukcyjnym wykazano niedobór żelaza zapasowego, a u 10% niedokrwistość z niedoboru żelaza
- Częstość występowania poszczególnych rodzajów niedokrwistości jest zależna od regionu geograficznego, stanu socjalnego, płci, wieku oraz współwystępowania innych chorób

Definicja niedokrwistości

- Nie jest dokładnie określona
- Wg WHO- niedokrwistość jeśli poziom Hgb jest < od 11g/dL
 - 1° - łagodna (9,5-10 g/dL)
 - 2° - umiarkowana (8-9,4 g/dL)
 - 3° - poważna 6,5-7,9 g/dL)
 - 4° - zagrażająca życiu (<6,5g/dL)
- Wg NCI anemia przy stężeniu Hgb < od wartości prawidłowych (kobiety 12-16 g/dL, mężczyźni 14-18 g/dL)
 - łagodna (10- do dolnej granicy normy)
 - umiarkowana (8-10g/dL)

Niedokrwistości

- Pod pojęciem niedokrwistości należy rozumieć stany w których poziom hemoglobiny obniża się w przypadku kobiet $< 12\text{g}\%$ a u mężczyzn poniżej $14\text{g}\%$
- Liczba erytrocytów ma niewielkie znaczenie w diagnostyce niedokrwistości, gdyż często np. w przypadku anemii z niedoboru żelaza, pozostaje w granicach normy

Niedokrwistość z niedoboru żelaza

dane epidemiologiczne

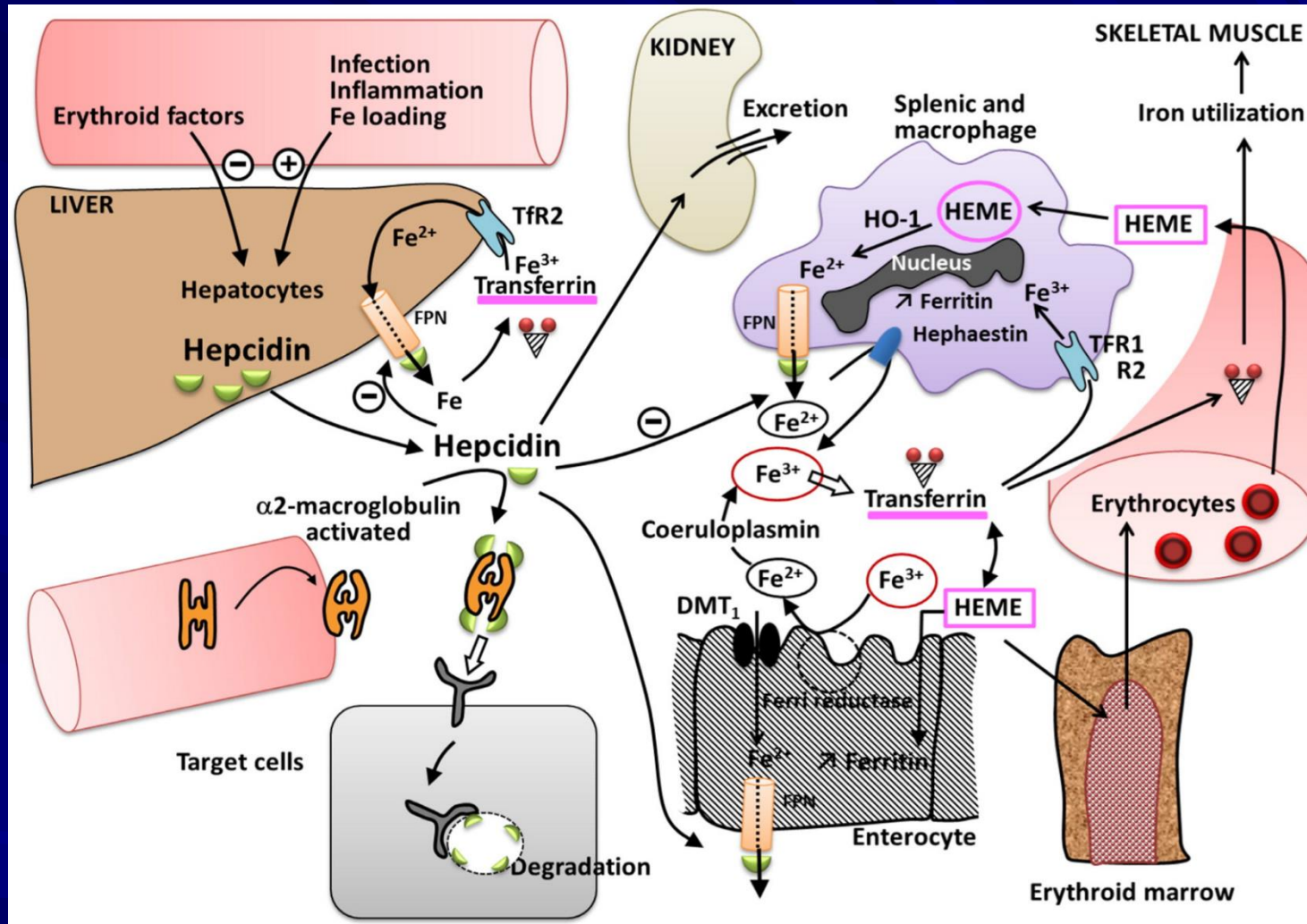
- najczęstsza przyczyna niedokrwistości niedoborowych
- częściej występuje w krajach o wysokim stopniu rozwoju
- określenie rzeczywistej częstości jest trudne do ustalenia

Niedokrwistość z niedoboru żelaza

dane epidemiologiczne

- Pomiar stężenia hemoglobiny lub wartości hematokrytu w diagnostyce niedokrwistości z niedoboru żelaza jest mało czułym wskaźnikiem z uwagi na duże wahania u osób zdrowych
- Podobna ocena przeprowadzona w oparciu o odpowiedź na 3 miesięczne leczenie preparatami żelaza wykazała:
 - u 17% kobiet uprzednio ocenionych jako zdrowe obecna jest niedokrwistość z niedoboru żelaza
 - nie występowanie niedokrwistości z niedoboru żelaza u 21% kobiet z rozpoznaną chorobą

Metabolizm żelaza i ekspresja hepcydyny



Enterocyty inkorporują żelazo poprzez diwalentny transporter metali 1 (DMT1) po jego redukcji z Fe³⁺ do Fe²⁺ przez ferri-reductazę. W wątrobowa hepcydyna reguluje uwalnianie żelaza (efflux) z komórek poprzez regulację aktywności feroportyny (FPN)

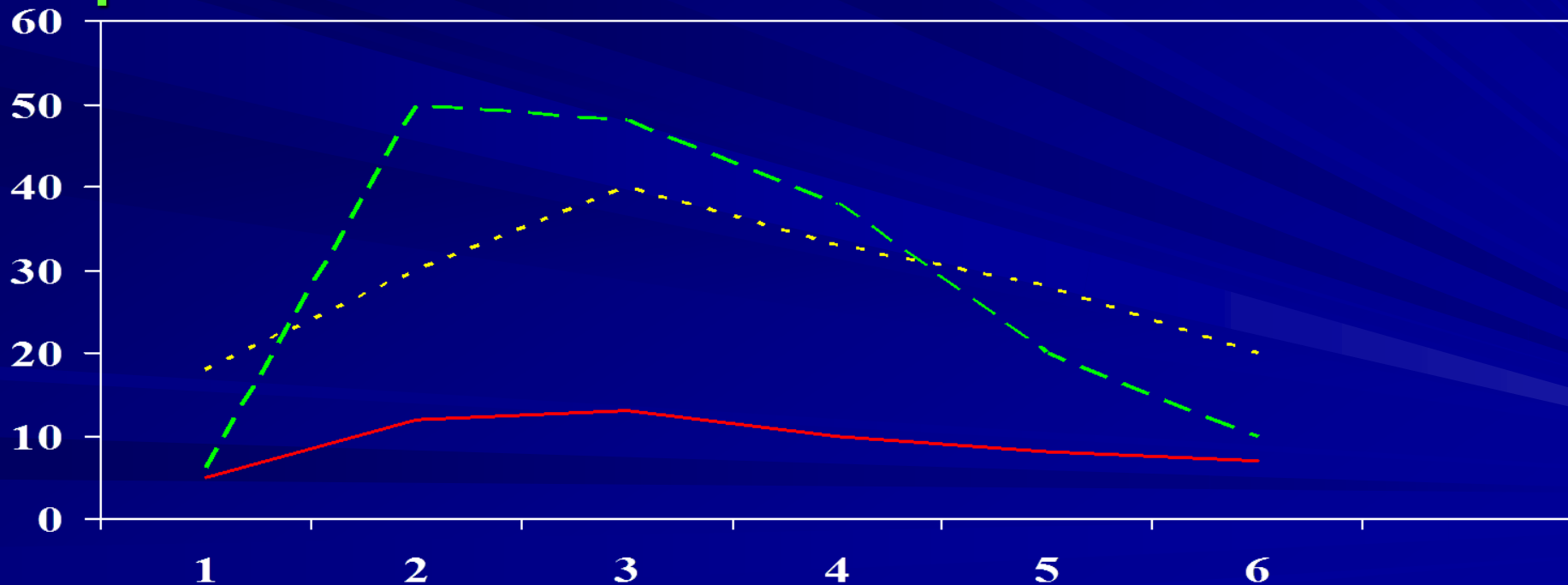
Wchłanianie żelaza

■ po obciążeniu 200 mg Fe^{3+} p.o

_____upośledzenie wchłaniania

-----osoba zdrowa

..... prawidłowe wchłanianie w stanie niedoboru Fe



oś X- godziny po podaniu Fe

oś Y- stężenie żelaza w surowicy w $\mu\text{mol/l}$

Niedokrwistość z niedoboru żelaza

metabolizm żelaza

- Zapotrzebowanie ustroju na żelazo zależy od wielu czynników:
 - noworodki 0,3mg/kg/dzień
 - 2-15 lat 0,5-0,8mg (wzrost, wyższe stężenie Hb, utrata 0,2-0,5mg/dz)
 - > 15 lat 1,2mg
 - kobiety ciężarne: 1 trymestr 0,8mg, 2 trymestr 4mg, 3 trymestr 6mg/dziennie

Czynniki wpływające na absorpcję żelaza

- Ilość żelaza w pokarmach
- Biodostępność żelaza pokarmowego
- Zapasy ustrojowe żelaza osoby badanej

Czynniki wpływające na absorpcję żelaza

- Absorpcja żelaza podlega regulacji już na poziomie komórek błony śluzowej bliższego odcinka jelita cienkiego
- Ilość wchłoniętego żelaza jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości puli zapasowej
- W przypadku zdrowych mężczyzn przy puli zapasowej ok. 1g i podaży 15-20mg żelaza w pokarmach dziennie wchłonięciu ulega jedynie 6%
- w przypadku kobiet przy średniej wielkości puli zapasowej 300mg i podaży żelaza ok. 12 mg przyswojeniu ulega 15%

Czynniki wpływające na absorpcję żelaza

- Upośledzenie procesu wchłaniania jelitowego (zespół złego wchłaniania)
- Leki: (antacida, tetracykliny, H₂-blokery)

Niedokrwistość z niedoboru żelaza

kinetyka utraty żelaza

- Dienne straty żelaza zależą także od wielu czynników
- mężczyźni 0,9-1,0 mg: 0,1mg z moczem, 0,2-0,3mg ze złuszczacą się skórą, 0,6mg ze stolcem
- kobiety nie-miesiączkujące : 0,7-0,8mg
- kobiety miesiączkujące : 1,2 – 1,7mg

Białka uczestniczące w transporcie, magazynowaniu i regulacji wchłaniania żelaza

	Transferyna	Receptor dla transferyny	Ferrytyna	IRP1, IRP-2
Mr	79.570	185.000	440.000	90.000
Lokalizacja genu	3q21-qter	3q.26.2-qter	Podjedn H : 11 Podjedn.L 19	IRP-1:9 IRP-2: 15
Struktura	GP jednołań. z 2 IBS	GP przezłonowa z 2 TBS	Białko sferyczne wiążące 45000 atm Fe	4-domenowe białko(4Fe-4S)
Czynność	Transport Fe w osoczu i płynach pozakomórkowych	Endocytoza kompleksu transferyna –żelazo	Udział w przechowywaniu żelaza	Koordinacja regulacji translacji białek zaangażowanych w metabolizm Fe

Rozpoznanie niedokrwistości sideropenicznych

Diagnostyka

- badanie krwi
- badanie szpiku
- ocena gospodarki żelazem

Badanie krwi (1)

- mikrocytoza i hipochromia
- annulocyty
- stężenie hemoglobiny

< normy

M: 16 (14 - 18) g%

K: 14 (12 - 16) g%

■ MCV

< normy

89 (82 - 100) fl

■ MCH

< normy

30 (27 - 33) pg

■ MCHC

N/↓

34 (32 - 36) g%

Badanie krwi (2)

■ Leukocyty

Norma

4 - 9 G/l

■ Płytki

↑/N/↓

140 - 440 G/l

■ Retikulocyty

↓/N/↑

0.5 - 1.5%

Ocena gospodarki żelazem (1)

■ stężenie żelaza

< normy

120 (70 - 200) $\mu\text{g}\%$

■ TIBC

> normy

340 (250 - 435) $\mu\text{g}/\text{L}$

■ SWT

< normy

30 (20 - 45) %

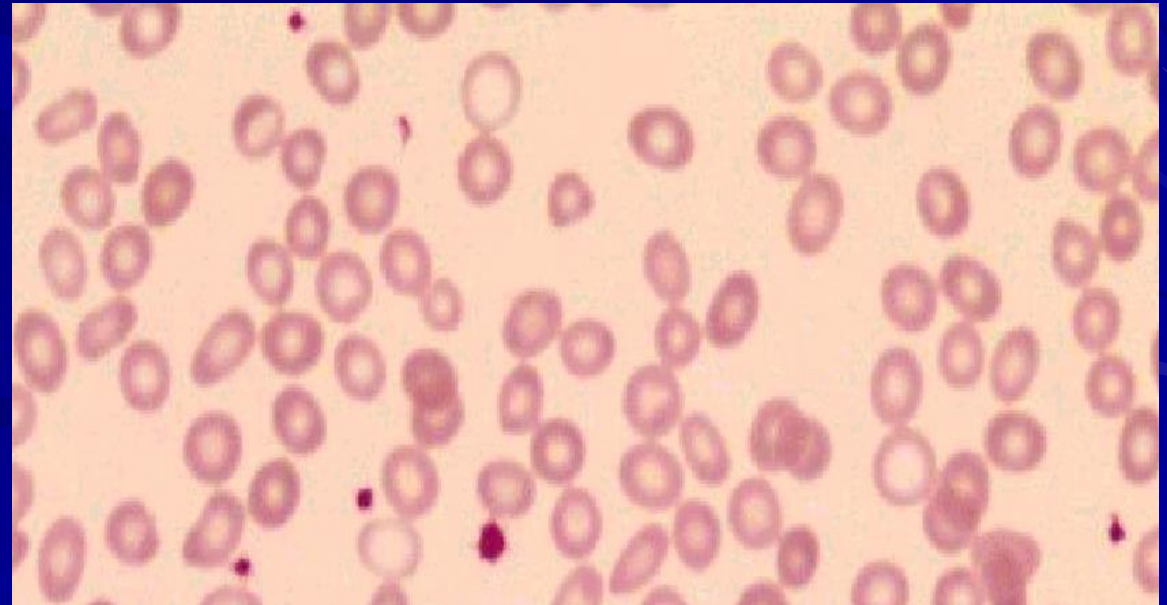
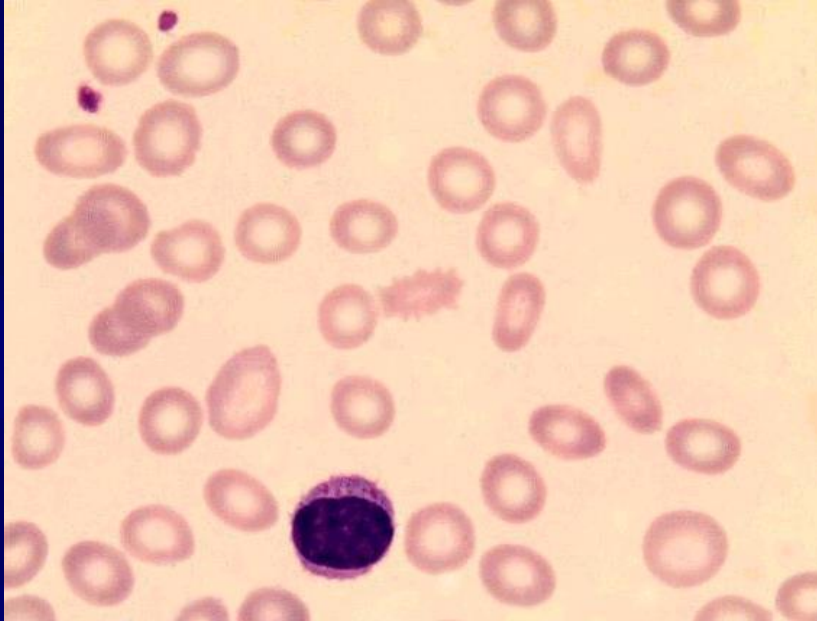
Ocena gospodarki żelazem (2)

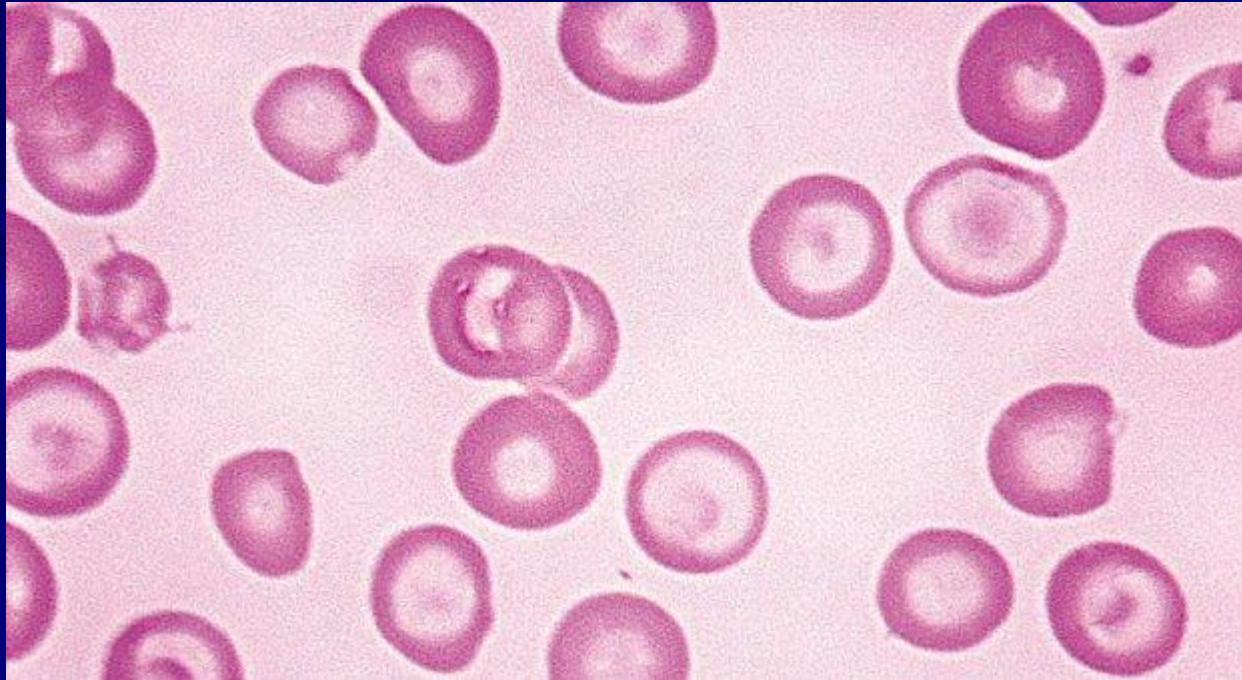
- sideroblasty w szpiku < normy
30 - 50%
- ferytyna w surowicy < 12 $\mu\text{g/l}$
M: 20 - 500 $\mu\text{g/l}$
K: 10 - 200 $\mu\text{g/l}$

- receptor transferyny (TfR) > normy
– oceniany metodą ELISA 2,8 - 8,5 mg/l

Niedobór żelaza

Hipochromia krwinek czerwonych

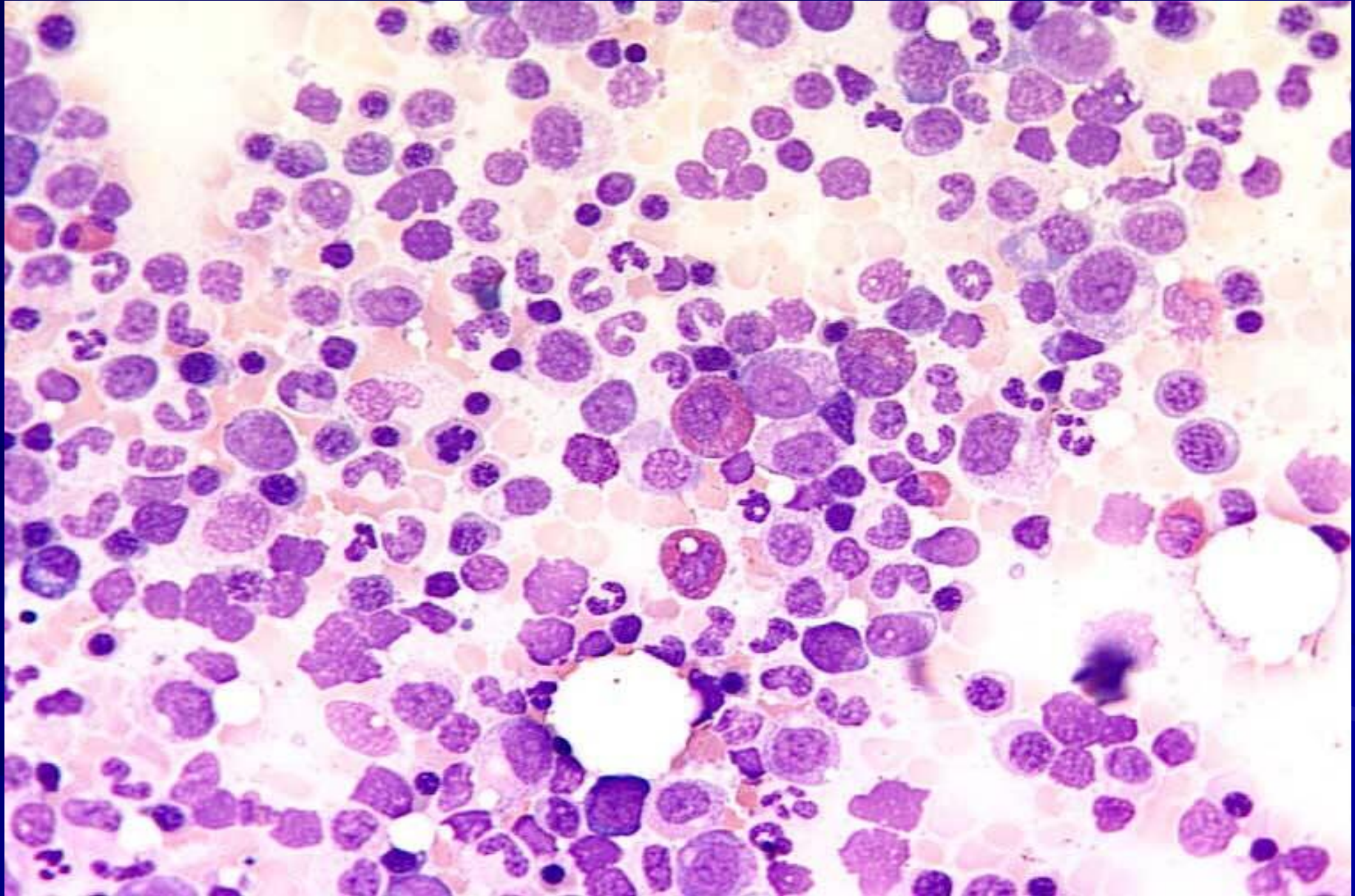




Ocena cytomorfologiczna szpiku

- hiperplazja układu czerwonokrwinkowego $\geq 40\%$;
Norma 20 - 30%
- zahamowanie dojrzewania na poziomie erytroblastów zasadochłonnych lub polichromatofilnych (w zależności od stopnia ciężkości niedoboru żelaza)

Prawidłowy szpik- powiększenie 400x



Różnicowanie niedokrwistości sideropenicznych

- niedokrwistości w przebiegu chorób przewlekłych
- mikrosferocytoza wrodzona
- thalasemie
- hemoglobinopatie (S, C, D, E)

Niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych

Anaemia of chronic disease= Anaemia of chronic disorders
(ACD)

Niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych (ACD) -określenie

- ACD obejmuje niedokrwistość występującą w przewlekłych zakażeniach, stanach zapalnych, nowotworach, urazach z towarzyszącym uszkodzeniem tkanek
- niedokrwistość ta nie wynika z zajęcia szpiku przez nowotwór, hemolizy lub krwawienia.

Niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych (ACD) - występowanie

- druga po niedokrwistości z niedoboru Fe pod względem częstości występowania w całej populacji
- najczęstsza przyczyna niedokrwistości wśród hospitalizowanych
- po wykluczeniu pacjentów z krwawieniem, hemolizą i nowotworami hematologicznymi u 52% pacjentów z anemią spełnione są kryteria ACD
- u 27% niehospitalizowanych i 58% hospitalizowanych pacjentów z RZS stwierdza się ACD

Stany chorobowe mogące przebiegać z ACD (1)

■ Przewlekłe infekcje

- płucne: ropień, ropniak, gruźlica, zapalenie płuc
- podostre zapalenie wsierdza
- choroby zapalne w miednicy
- przewlekłe infekcje (grzybice układowe, HIV, osteomyelitis)

Przewlekłe zapalenia nie-infekcyjne

- RZS
- ciężkie urazy (oparzenia)
- vasculitis

Stany chorobowe mogące przebiegać z ACD (2)

■ Nowotwory złośliwe

- rak
- chłoniaki ziarnicze i nieziarnicze
- białaczki
- szpiczak mnogi

■ Inne

- poalkoholowe choroby wątroby
- zakrzepowe zapalenie żył
- choroba niedokrwienna serca

■ Idiopatyczna ACD

Niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych – patogeneza (1)

- skrócony czas przeżycia krwinek czerwonych
- niewydolność erytropoezy
- nieprawidłowe uwalnianie żelaza z układu siateczkowo-śródbłonkowego (niedokrwistość z zaburzeniem reutilizacji żelaza)

Niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych – patogeneza (2)

- zaburzenie syntezy transferyny
- utrata transferyny przez nerki i przewód pokarmowy
- skrócenie półokresu trwania transferyny we krwi przez sekwestrację w ogniskach zapalnych i nowotworowych
- wzmożony wychwyty i degradacja transferyny w usś

Niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych-badania laboratoryjne (1)

- Niedokrwistość-zwykle umiarkowana Hb 7-11g%
 - u 20-30% pacjentów niższe wartości Hb
- Niedokrwistość najczęściej normocytarna i normochromiczna (MCV i MCHC w normie)
 - w 5-40% MCV 70-80 fl
 - MCHC 26-32 g/dl w 40-70%
- OB często przyspieszone
- Retykulocyty - najczęściej w normie lub nieco obniżone, rzadziej podwyższone

Niedokrwistość w przebiegu chorób przewlekłych-badania laboratoryjne (2)

Gospodarka żelaza

1. Fe w surowicy - obniżone (warunek konieczny rozpoznania ACD)
2. TIBC obniżona lub w dolnych granicach normy (N)
3. SWT umiarkowanie obniżony, zwykle $> 10\%$
4. Stęż. ferrytyny - podwyższone lub w normie
5. Stęż. rozpuszczalnego receptora dla transferyny (sTR) we krwi - N
6. Ilość sideroblastów w szpiku - obecne, obniżone (5-20%)

ACD - różnicowanie

<u>Wskaźnik</u>	Niedobór Fe	ACD	
		bez niedoboru Fe	z niedoborem Fe
Fe	↓↓	↓	↓
SWT	↓<10%	↓>10%	↓<10%
TIBC	↑	↓, N	N, ↓
Ferrytyna	↓<10μg/L	↑>200μg/L, N	↓<30μg/L, N
Syderoblasty	brak	5-20% erytrobl.	brak
sTR	↑	N	↑

Niedokrwistości megaloblastyczne

- Niedokrwistość megaloblastyczna obejmuje grupę zaburzeń wytwarzania krwinek czerwonych (zaburzona synteza DNA) powstałych w wyniku niedoboru witaminy B₁₂ lub kwasu foliowego (rzadziej innych czynników)
- charakteryzuje ją produkcja krwinek czerwonych o większej objętości (średnia objętość; MCV > 100 fL) z odnową megaloblastyczną erytroblastów w szpiku
- U części chorych występują objawy umiarkowanej pozaszpikowej hemolizy ze skróceniem czasu życia krwinek czerwonych o 30-50%

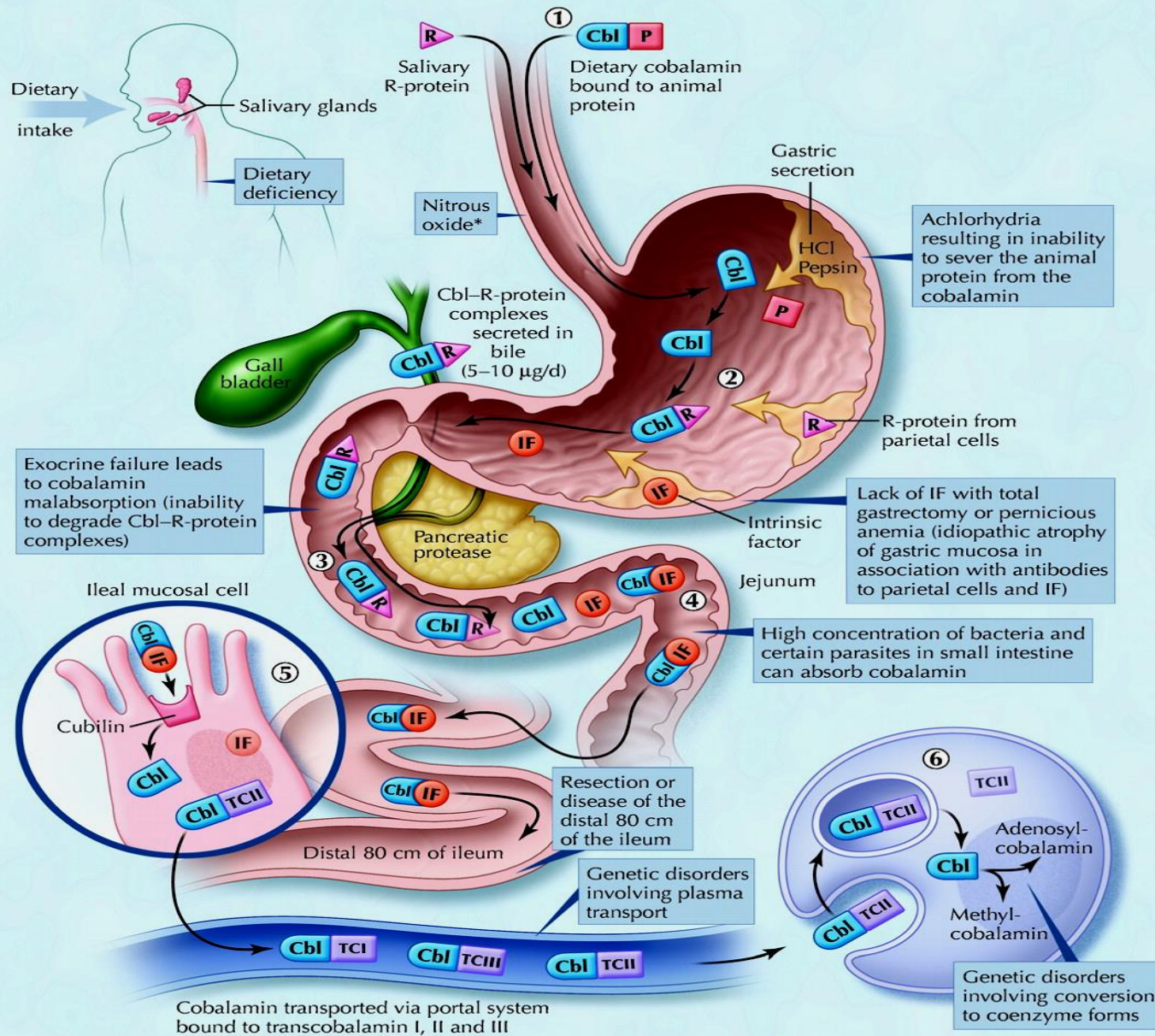
Niedokrwistości megaloblastyczne

- niedokrwistość złośliwa (anemia Adisoni-Biermeri)
- niedokrwistość megaloblastyczną dzieci (wybiórcze upośledzenie wchłaniania kobalaminy lub zespół Imerslund-Gräusbeck)
- niedokrwistość megaloblastyczną polekowa (np. po metotreksacie, trimethoprimie, sulfasalazynie, zidovudine, phenytoinie)
- niedokrwistość megaloblastyczna z powodu niedoboru kwasu foliowego

Niedokrwistość megaloblastyczna

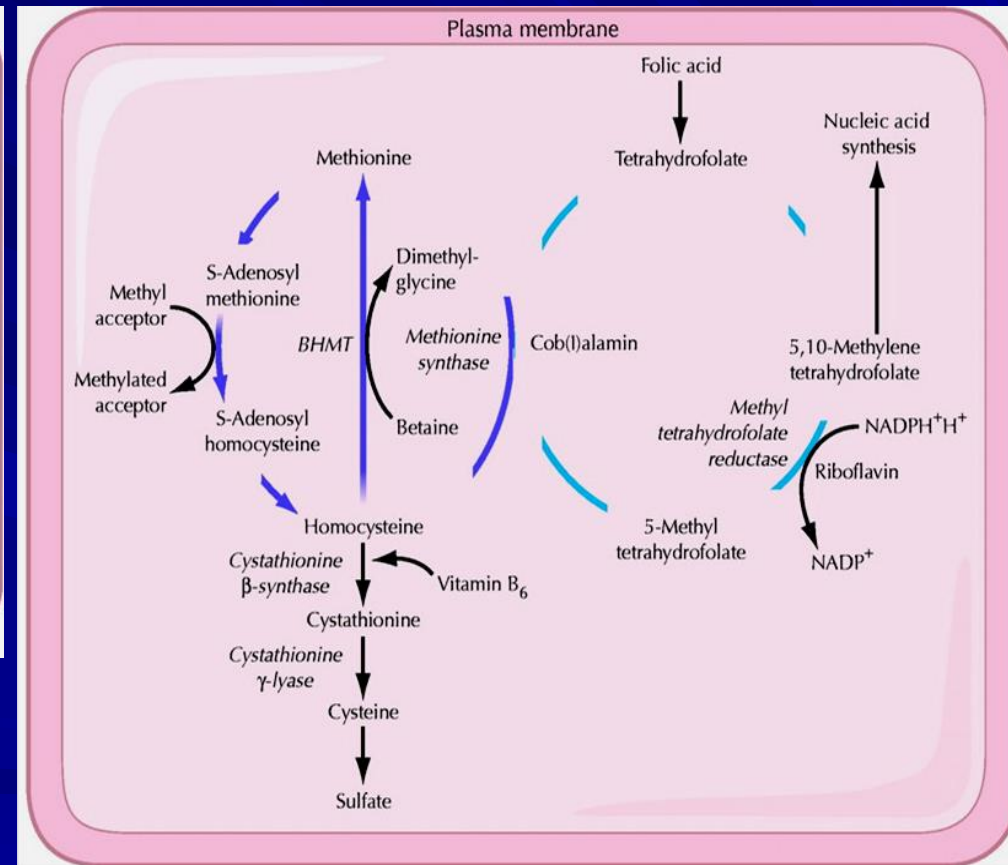
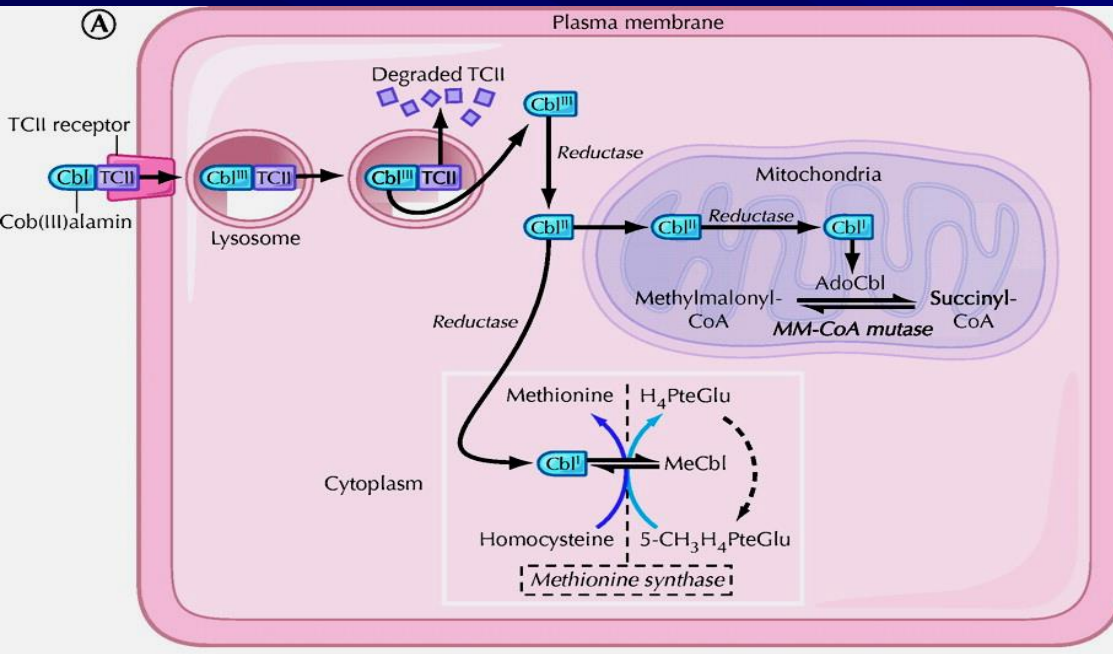
- Z uwagi na możliwe wystąpienie ciężkich, nieodwracalnych powikłań neurologicznych u chorych z niedokrwistością makrocytową spowodowaną niedoborem wit. B₁₂ zastosowanie „testowej” dawki kwasu foliowego przed ustaleniem przyczyny niedokrwistości jest przeciwwskazane!

Wchłanianie kobalaminy i możliwe przyczyny niedoboru



Kobalamina i kwas foliowy

Transport dokomórkowy i funkcja



Kryteria diagnostyczne anemii Addisona – Biermera

Hb < 13g/dL u mężczyzn i <12 g/dL u kobiet

MCV \geq 120fL

Niskie stężenie witaminy B₁₂ we krwi

Atrofia błony śluzowej żołądka

Obecne przeciwciała przeciwko czynnikowi wewnętrznemu i/lub komórkom okładzinowym błony śluzowej żołądka

Anemia Adisona Biermera

Testy diagnostyczne

Badanie
Morfologia krwi z rozmazem
Bezwzględna liczba retikulocytów
Stężenie witaminy B ₁₂ we krwi
Stężenie kwasu foliowego we krwi
Ocena gospodarki żelazem
Obecność przeciwciał przeciwko czynnikowi wewnętrznemu i komórkom okładzinowym ściany żołądka
Badanie szpiku (tylko w wybranych przypadkach)

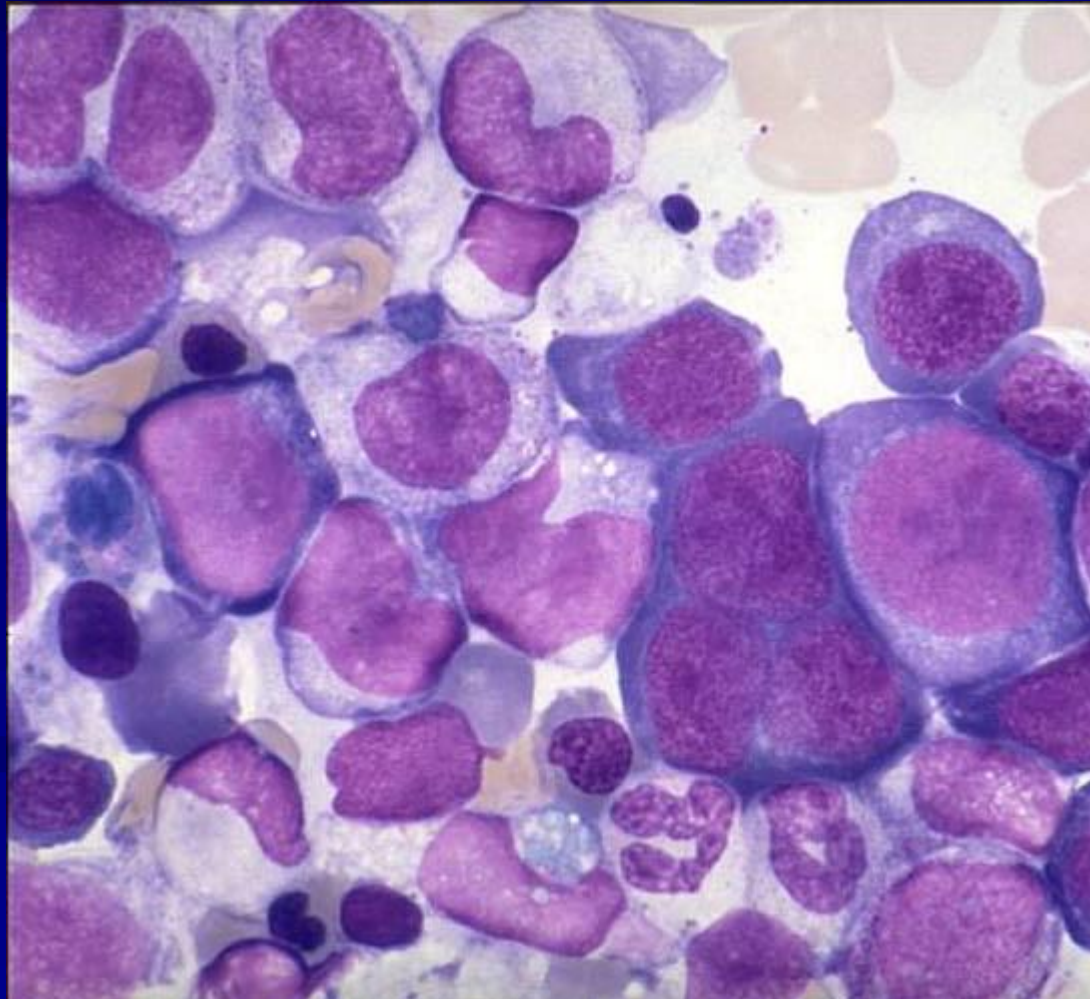
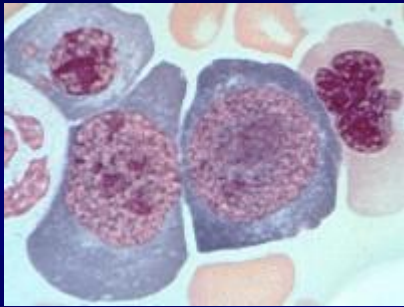
Niedokrwistość megaloblastyczna

rozmaz krwi obwodowej



Anemia megaloblastyczna

rozmaz szpiku



Diagnostyka laboratoryjna niedokrwistości megaloblastycznych

Niedokrwistość megaloblastyczna lub neurologiczne objawy sugerujące niedobór wit. B₁₂

Wit. B₁₂ (pg/ml)	Foliany (ng/ml)	Wstępne rozpoznanie	Wykonanie testów metabolicznych
>300	>4	Niedobór wit. B ₁₂ /fol nieprawdopodobny	Nie
<200	>4	Niedobór wit. B ₁₂	Nie
200-300	>4	Wydeliminuj niedobór wit. B ₁₂	Tak
>300	<2	Niedobór folianów	Nie
<200	<2	Niedobór folianów i wit. B ₁₂ lub izolowany niedobór folianów	Tak
>300	2-4	Niedobór folianów lub niedokrwistość niezwiązana z niedoborem folianów/ wit. B ₁₂	Tak

Diagnostyka różnicowa niedoboru folianów i witaminy B₁₂: testy metaboliczne

Stężenie MMA (norma 70-270nM)	Stężenie Hcys (norma= 5-14uM)	Rozpoznanie
zwiększone	zwiększone	potwierdzenie niedoboru B₁₂, niedobór folianów możliwy
prawidłowe	zwiększone	niedobór folianów prawdopodobny, <5% może mieć jednak niedobór B₁₂
prawidłowe	prawidłowe	Niedobór B₁₂ wykluczony

Wskazania do badania obecności przeciwciał przeciwko czynnikowi wewnętrznemu oraz komórkom okładzinowym żołądka

Sytuacja kliniczna
Niedokrwistość makrocytowa z objawami niedoboru wit. B12, nie odpowiadająca na leczenie doustne
Autoimmunologiczne zapalenie tarczycy, cukrzyca typu 1, choroba Addisona lub inna choroba endokrynologiczna autoimmunologiczna
Obecność objawów dyspeptycznych nie związanych z inną chorobą przewodu pokarmowego (żołądek-jelita)
Niedokrwistość Addisona-Biermera u rodzeństwa

Najważniejsze różnice pomiędzy subklinicznym i jawnym klinicznie niedoborem kobalaminy

	Rozpoznanie kliniczne niedoboru kobalaminy	Rozpoznanie subkliniczne niedoboru kobalaminy
Fenotyp	Choroba jawna klinicznie ^a Zmiany biochemiczne ^c	Bez objawów klinicznych ^b Zmiany biochemiczne ^c
Znaczenie zaburzeń wchłaniania	Najistotniejszy czynnik przyczynowy ^d	Umiarkowane lub bez znaczenia ^e
Rokowanie i przebieg	Zwykle progresywny	Zwykle stabilny lub zmienny (fluktuacje)
Wskazania do terapii	Pilne	Nieznane
Częstość	Bardzo niska (<0,1% u dorosłych; 1-2% w wieku podeszłym)	Znacznie wyższa niż niedoboru jawnego klinicznie

a - niedokrwistość megaloblastyczna i/lub objawy neurologiczne/zaburzenia poznawcze zwykle obecne (mogą być ciężkie). Czasem objawy mogą być nieznaczące (np. hipersegmentacja jąder granulocytów i makrocytoza poprzedzające niedokrwistość)

b - subtelne zmiany elektrofizjologiczne mogą występować u chorych bezobjawowych

c - wzrost stężenia MMA i homocysteiny często jest znaczny w niedoborze jawnym klinicznie, zwykle jedynie minimalny lub umiarkowany w nieoborze subklinicznym

d - niedobór czynnika wewnętrznego lub zaburzenia jego absorpcji są obecne w > 95 % przypadków

e - rzadko obecne są zmiany zależne od czynnika wewnętrznego. W większości przypadków przyczyna niedoboru subklinicznego nieznana. Przypadki nie związane z nieprawidłowym wchłanianiem oraz przypadki zaburzonego wchłaniania kobalaminy związanej z pokarmami dotyczą jedynie 30-50% przypadków

Charakterystyka podstawowych testów biochemicznych przydatnych w diagnostyce subklinicznego i jawnego klinicznie niedoboru kobalaminy

Test diagnostyczny	Rozpoznanie kliniczne niedoboru kobalaminy	Rozpoznanie subkliniczne niedoboru kobalaminy
Kobalamina	Czułość: >90% Specyficzność: nieokreślona (szacowana: 60-75%)	Czułość: 33-73% ^b Specyficzność: 64-73%
Kwas metylomalonowy (MMA)	Czułość: 95-98% Specyficzność: nieokreślona (szacowana: <80%)	Czułość: nieokreślona ^c Specyficzność nie określona ^c
Homocysteina całkowita	Czułość: 94-97% Specyficzność: nieokreślona (niższa niż dla MMA)	Czułość: nieokreślona Specyficzność nieokreślona (niższa niż dla MMA)
Holotranskobalamina (aktywne frakcja wit. B12, tj. związana z transkobalamina)	Czułość: nieokreślona Specyficzność: nieokreślona	Czułość: 55-89% ^d Specyficzność: 28- 77% ^d

b - czułość wzrasta przy wyższych wartościach odcięcia dla kobalaminy (200-300pmol/l), ale specyficzność spada

c – nie ma nie-biochemicznych kryteriów określających subkliniczny niedobór kobalaminy. Z tego powodu nie można określić czułości i specyficzności metod. Oznaczenie stężenia MMA jest uważane za najbardziej wiarygodne spośród wymienionych testów

d - czułość i specyficzność określono wobec MMA, którego własna czułość i specyficzność w przypadku subklinicznego niedoboru kobalaminy jest nieznana

Schorzenie nie związane z niedoborem kobalaminy w przebiegu których stwierdza się niskie poziomy holotranskobalaminy

Cobalamin-unrelated conditions with 'low' holotranscobalamin levels	
Shown with old partition techniques	Shown with current immunoassays
Patients receiving cancer chemotherapy ^a	(not studied)
Alcoholism (3 of 4 cases) ^{b,c}	(not studied)
Myelodysplastic syndrome (2 of 5 cases) ^{b,c}	(not studied)
Methotrexate therapy (1 of 2 cases) ^b	(not studied)
Congenital dyserythropoietic anemia (4 of 4 cases) ^{b,c}	(not studied)
	Oral contraceptive use ^d
	TCN2 gene polymorphism (67A > G) ^e
	Pregnancy (?)

^a See Ref. [66].
^b See Ref. [65].
^c None of the patients with low holotranscobalamin were cobalamin-deficient, as determined with the sensitive deoxyuridine suppression test in that report [65]. Serum cobalamin levels were usually normal.
^d See Ref. [67].
^e See Ref. [68].

R. Carmel. *Biochimie* 2013;95:1047-1055

S.N. Wickramasinghe et al. *J. Clin. Pathol.* 1996;49:755-758
 T. Vu, M. Ramos, et al. *Am. J. Hematol.* 1993;42:202-211
 B. Riedel, et al. *Clin. Chem.* 2005;51:778-781
 B.M. Riedel, et al. *J. Nutr.* 2011;141:1784-1790

Porównanie wyników testów diagnostycznych oceniających poziom holotranskobalaminy i całkowitej kobalaminy u 1651 osób ^{a,b}

	Performance in "probable" cobalamin deficiency (MMA >450 nmol/L)		Performance in "definite" cobalamin deficiency (MMA >750 nmol/L)	
	Utility of low holoTC	Utility of low cobalamin	Utility of low holoTC	Utility of low cobalamin
True abnormal, <i>n</i> (%)	128 (7.8%)	124 (7.5%)	54 (3.3%)	53 (3.2%)
False abnormal, <i>n</i> (%)	303 (18.4%)	366 (22.2%)	377 (22.8%)	437 (26.5%)
True normal, <i>n</i> (%)	1150 (70.0%)	1087 (65.8%)	1204 (72.9%)	1114 (69.3%)
False normal, <i>n</i> (%)	70 (4.2%)	74 (4.5%)	16 (1.0%)	17 (1.0%)
Sensitivity, %	64.7%	62.6%	77.1%	75.7%
Specificity, %	79.2%	74.8%	76.1%	72.4%
Positive predictive value, %	29.7%	25.3%	12.5%	10.8%

^a Data from Ref. [46]. The survey of 1651 persons with normal renal status used MMA levels alone to define deficiency, which can be questioned. However, it chose more stringent cutpoint levels than most other surveys. Two strata of cobalamin-deficient subjects were identified: the 198 individuals with MMA >450 nmol/L were assumed to have "probable" cobalamin deficiency, and the 70 with the even more stringent MMA values >750 nmol/L were assumed to have "definite" cobalamin deficiency. The latter were more likely to include subjects with clinical deficiency, but their proportion among those having SCCD was unknown.

^b holoTC, holotranscobalamin; MMA, methylmalonic acid.

→ ta sama przydatność dla celów detekcji niedoboru kobalaminy

Problemy techniczne przy oznaczaniu stężenia wit. B₁₂ metodą CBLA (Competitive Binding Luminescence Assay)

- cała pula wit. B₁₂ związanej z białkami krwi jest uwalniana (postać wolna)
- wolna wit. B₁₂ wraz z dodaną do układu znakowaną wit. B₁₂ konkuruje o związanie z oczyszczonym czynnikiem wewnętrznym (IF) obecnym w układzie w ograniczonej ilości w fazie stałej (lub pokrywa mikrokulki paramagnetyczne)
- Niezwiązany ligand jest usuwany poprzez płukanie. Do układu dodawany jest następnie koniugat tworzący kompleks z wyznakowaną wit. B₁₂
- Po dodaniu substratu koniugat wyzwala fluorescencję w ilości proporcjonalnej do ilości wyznakowanej B12 obecnej w próbce

→ *odwrotna korelacja pomiędzy poziomem B12 a generowaną chemiluminescencją*

- - *każda substancja interferująca z wielkością wyzwalanej chemiluminescencji zawyża poziom !*
- - *przeciwciała anti-IF obecne w próbce mogą wiązać się z obecnym w układzie IF. Z tego powodu w większości testów CBLA stosuje się etap denaturacji przeciwciał anti-IF*

Niedokrwistość megaloblastyczna z niedoboru wit. B12

Śledzenie odpowiedzi na leczenie

- wzrost liczby retykulocytów (od 3-5 dnia, szczyt 4 do 10 dzień)
- wzrost wartości Hb (prawidłowa po 1 do 2 miesięcy)
- normalizacja odnowy megaloblastycznej w szpiku (już po 12 godzinach od podania leku!)

Niedokrwistość megaloblastyczna z niedoboru wit. B₁₂

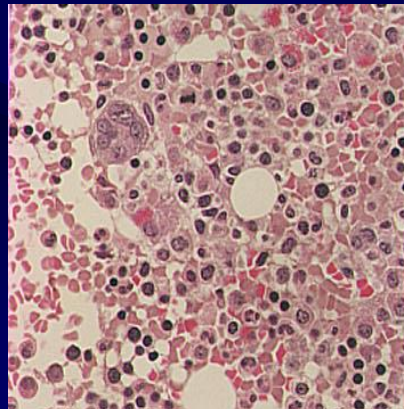
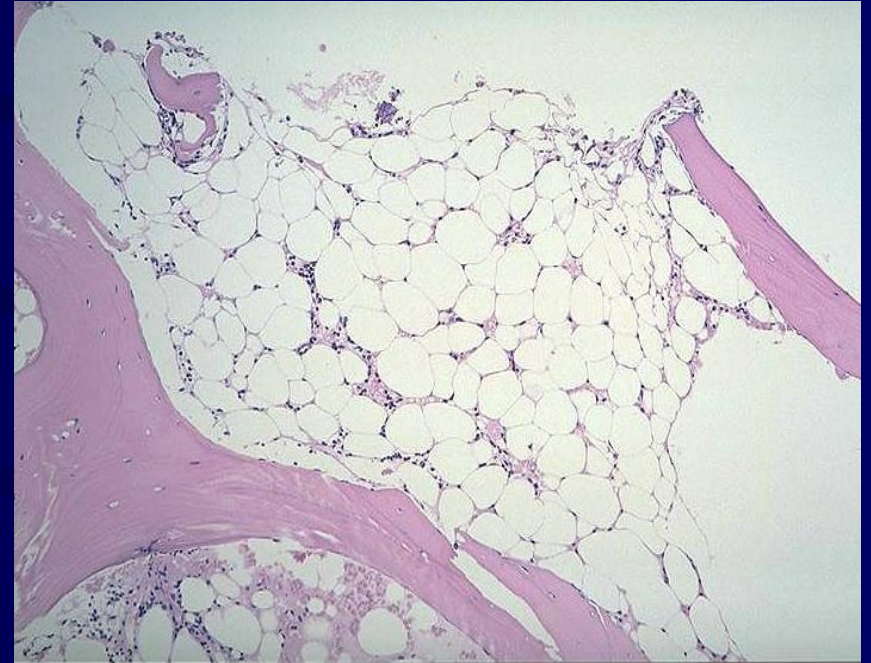
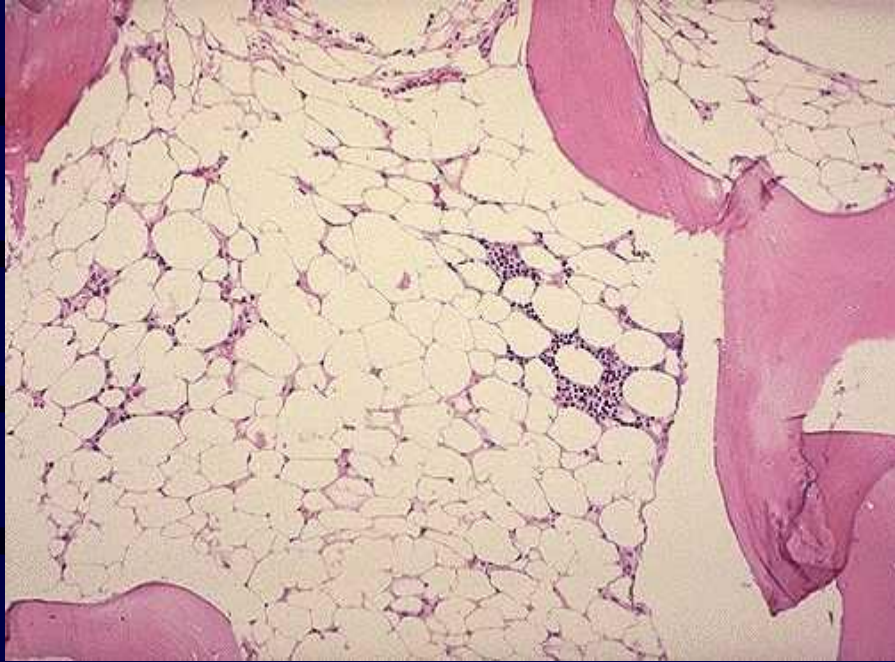
Śledzenie odpowiedzi na leczenie

- po włączeniu leczenia liczba leukocytów i płytek ulega normalizacji szybko, ale hipersegmentacja jąder granulocytów może być obecna do 10-14 dnia od rozpoczęcia terapii
- podobnie szybko powracają do normy stężenie bilirubiny, żelaza (możliwy niedobór po rozpoczęciu leczenia wit. B₁₂ – kontrola stężenia 7-10 dzień) i aktywności dehydrogenazy kwasu mlekowego i potasu
→ groźne zaburzenia rytmu serca (suplementacja!!!)

Anemia aplastyczna

- Częstość ~ 2 przypadki na milion mieszkańców Europy

Anemia aplastyczna - trepanobiopsja



Anemia aplastyczna

- Zespół objawów klinicznych związanych z niedoborem krwinek czerwonych, neutrofilii, monocytów i płytek krwi, degeneracja tłuszczową szpiku kostnego z niemal całkowitą nieobecnością prekursorów hematopoezy w szpiku
- W przypadkach ze skrajną retykulocytopenią, neutropenią, monocytopenią i thrombocytopenią ryzyko zagrażających życiu powikłań jest wysokie
- W większości przypadków nie ma ewidentnej przyczyny wywołującej, a wystąpienie objawów jest związane z pojawieniem się autoreaktywnych limfocytów T, które hamują funkcję (lub niszczą) progenitorowe komórki hematopoetyczne
- Choroba może także wystąpić w związku z
 - (1) przedłużoną ekspozycją na wysokie stężenia toksycznych środków chemicznych (np. benzen),
 - (2) po niektórych infekcjach (np. wirus Epstein-Barr)
 - (3) jako wyraz idiosynkrazji na leki (np. tiklopidynę)
 - (4) jako objaw chorób tkanki łącznej lub chorób autoimmunologicznych (np. lupus erythematosus)
 - (5) w związku z ciążą (b. rzadko)

Anemia aplastyczna

epidemiologia

- Częstość zachorowań 2-5 przypadków na 1,000,000 osób z populacji ogólnej (USA), w badaniu International Aplastic Anemia and Agranulocytosis Study oraz w French study ok. 2 na 1,000,000 z populacji ogólnej
- szczyt zachorowań osoby pomiędzy 15 a 25 rokiem życia; drugi szczyt zachorowań pomiędzy 65 a 69 rokiem życia



Częstość występowania AA

Year	Number of new cases	Inhabitants in the study area	Incidence (n/million inhabitants and year)
1980*	4	2,123,117	1.88
1981	15	4,250,494	3.53
1982	8	4,279,135	1.87
1983	5	4,306,521	1.16
1984	9	4,316,326	2.08
1985	12	4,332,072	2.77
1986	8	4,171,408	1.92
1987	10	4,181,231	2.39
1988	9	4,190,567	2.15
1989	15	4,198,069	3.57
1990	12	4,204,377	2.85
1991	18	4,204,280	4.28
1992	8	4,203,351	1.90
1993	10	4,198,047	2.38
1994	13	4,189,046	3.10
1995	10	4,181,829	2.39
1996	7	4,198,531	1.67
1997	6	4,198,189	1.43
1998	8	4,198,254	1.90
1999	9	4,198,816	2.14
2000	7	4,338,772	1.61
2001	11	4,424,452	2.49
2002	12	4,485,806	2.67
2003	9	4,624,534	1.95
Total	235	100,197,224	2.34

*from July to December

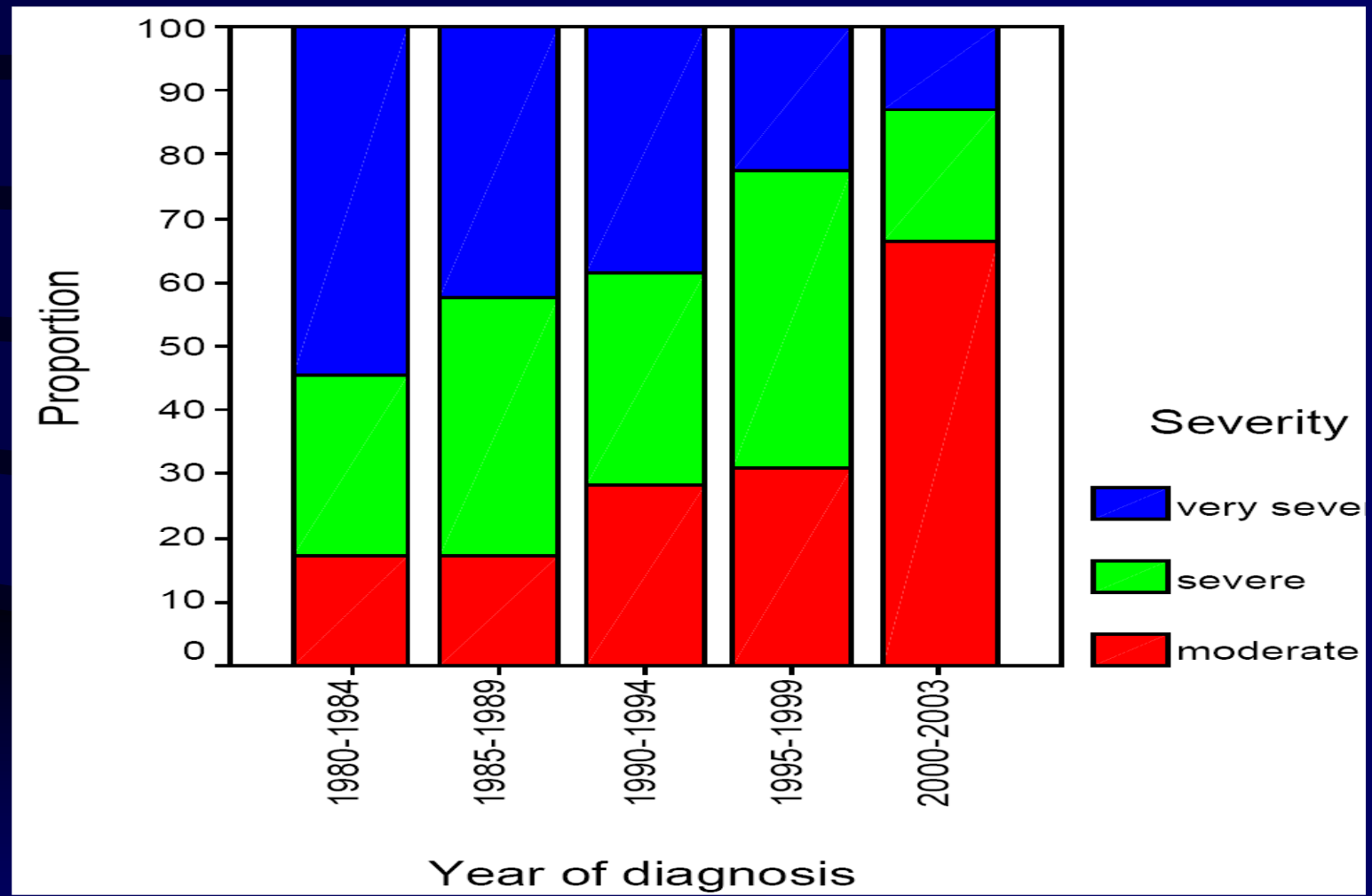


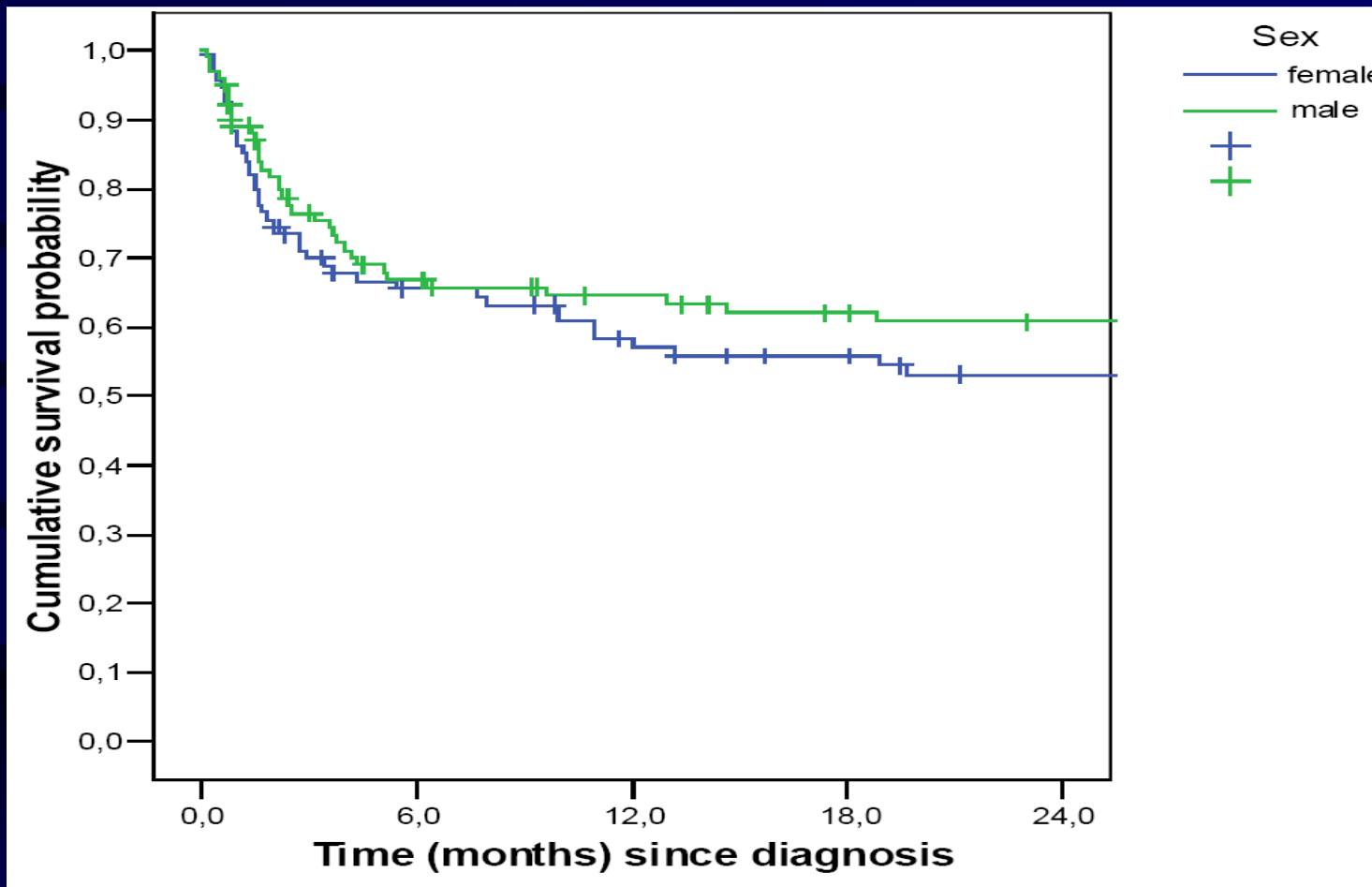
Częstość rozpoznawania poszczególnych postaci AA w zależności od wieku

	Age at diagnosis (years)					Total (%)
	2-14	15-24	25-44	45-64	≥65	
Moderate	4	3	11	7	13	38 (16.2)
Severe	11	21	15	17	29	93 (39.6)
Very severe	14	12	11	35	32	104 (44.2)

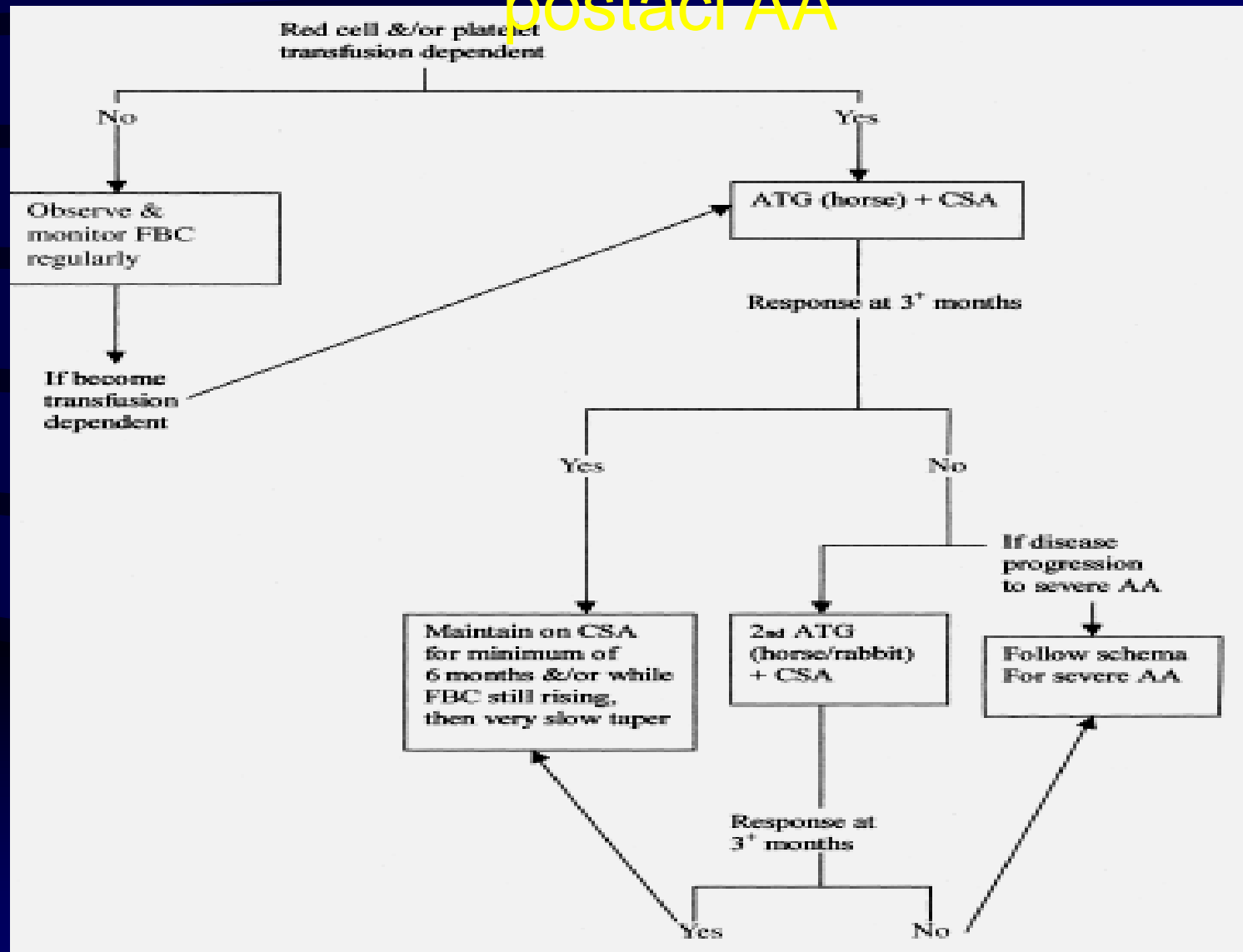


Nasilenie objawów AA w chwili rozpoznania





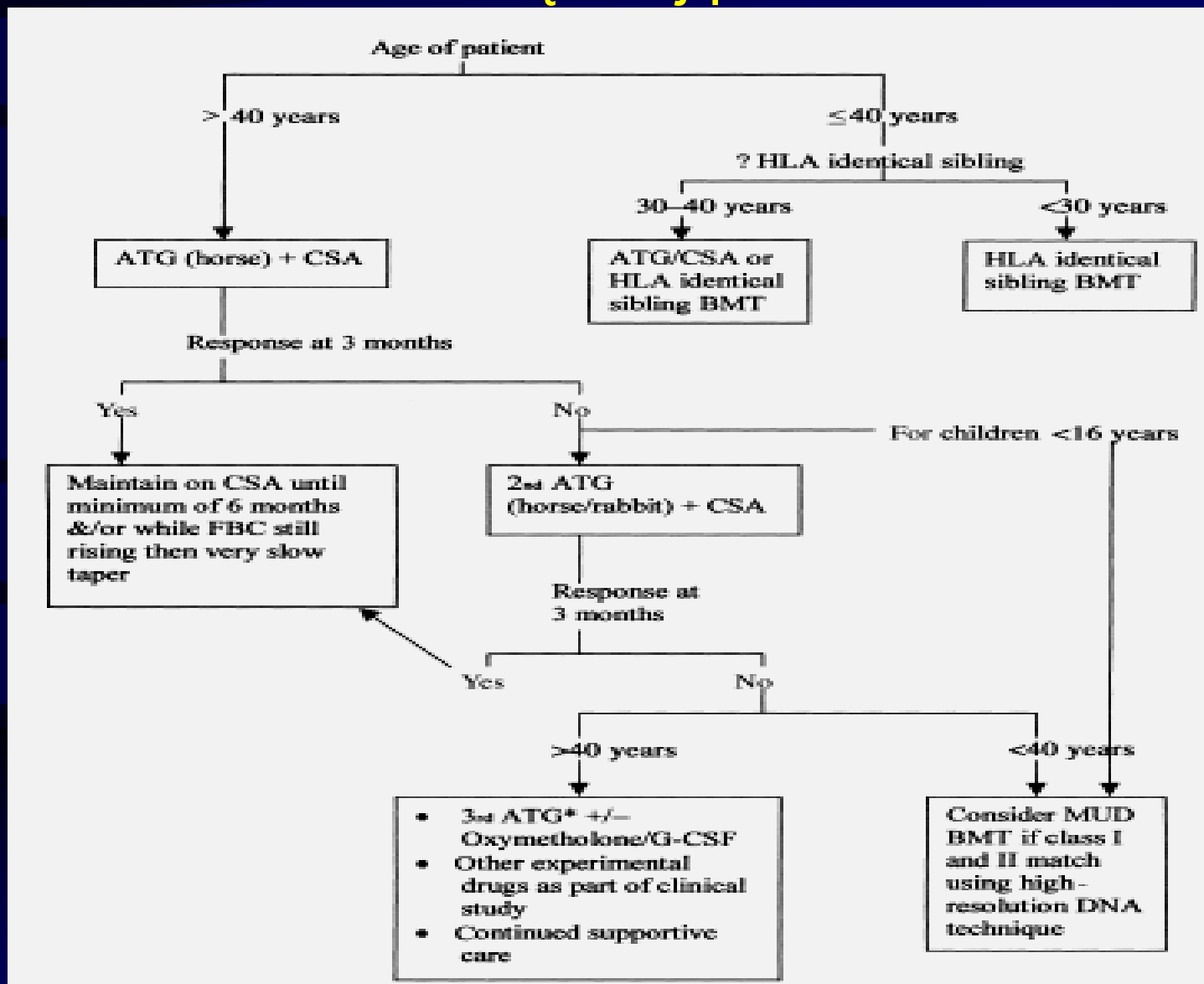
Algorytm terapeutyczny w ciężkiej postaci AA



Kryteria rozpoznania poszczególnych postaci A

Ciężka AA (Camitta et al.)	Komórkowość szpiku <25%, lub 25-50% z <30% resztkowych komórek hematopoetycznych * 2 z 3 następujących: 1. neutrofile <0,5 · 10 ⁹ /l 2. płytki <20 · 10 ⁹ /l 3. retikulocyty <20 · 10 ⁹ /l
Bardzo ciężka AA (Bacigalupo et al, 1988)	Tak jak w ciężkiej ale liczba granulocytów <0,2 · 10 ⁹ /l
Nie ciężka AA	Chorzy nie spełniający kryteriów rozpoznania postaci ciężkiej i bardzo ciężkiej AA

Leczenie ciężkiej postaci AA



CSA - cyclosporyna A; MUD - matched unrelated donor

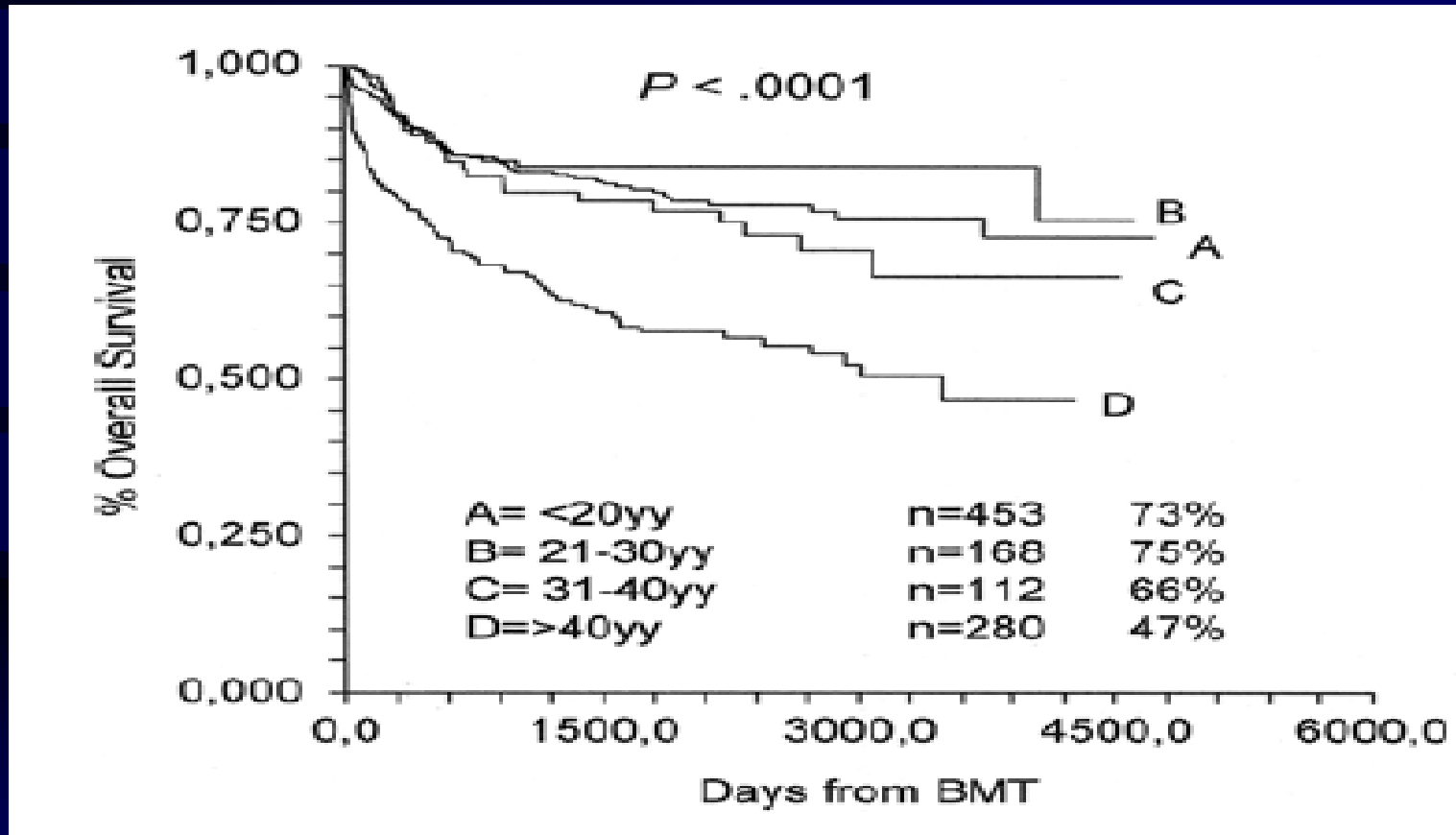
*w 3 podania ATG można użyć króliczy lub koński preparat w zależności od tego co było stosowane wcześniej (uwzględnić tolerancję!)

Kryteria odpowiedzi na leczenie immunosupresyjne u chorych z AA

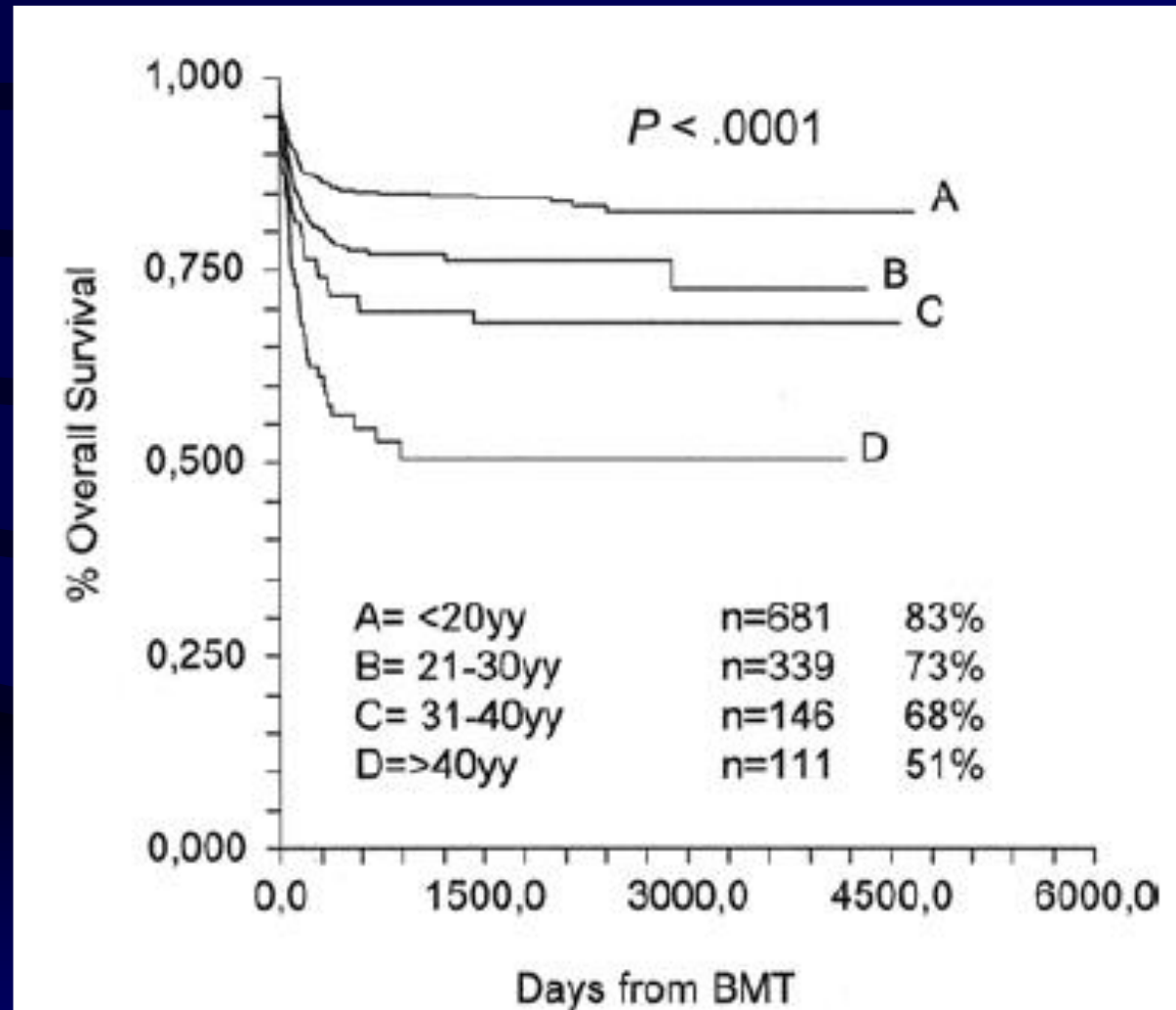
Odpowiedź	Kryteria dla postaci ciężkiej AA	Kryteria dla postaci nie-ciężkiej AA
Żadna	Nadal ciężka	Pogorszenie nie spełniające poniższych kryteriów
Częściowa	Niezależność od przetoczeń . Nie spełnia kryteriów postaci ciężkiej	Niezależność od przetoczeń (jeśli uprzednio zależny) lub podwojenie lub normalizacja w przynajmniej jednej linii lub wzrost Hgb >3 g/dl (jeśli początkowo <6 g/dl), neutrofilii >0,5 · 10 ⁹ /l (jeśli początkowo <0,5 · 10 ⁹ /l) , płytek >20 · 10 ⁹ /l (jeśli początkowo <20 · 10 ⁹ /l)
Complete	Hgb norma wiekowa Neutrofile >1,5 · 10 ⁹ /l Płytki >150 · 10 ⁹ /l	Tak samo jak dla postaci ciężkiej

AA: leczenie immunosupresyjne 1991-2002

(Working Party Severe Aplastic Anemia)

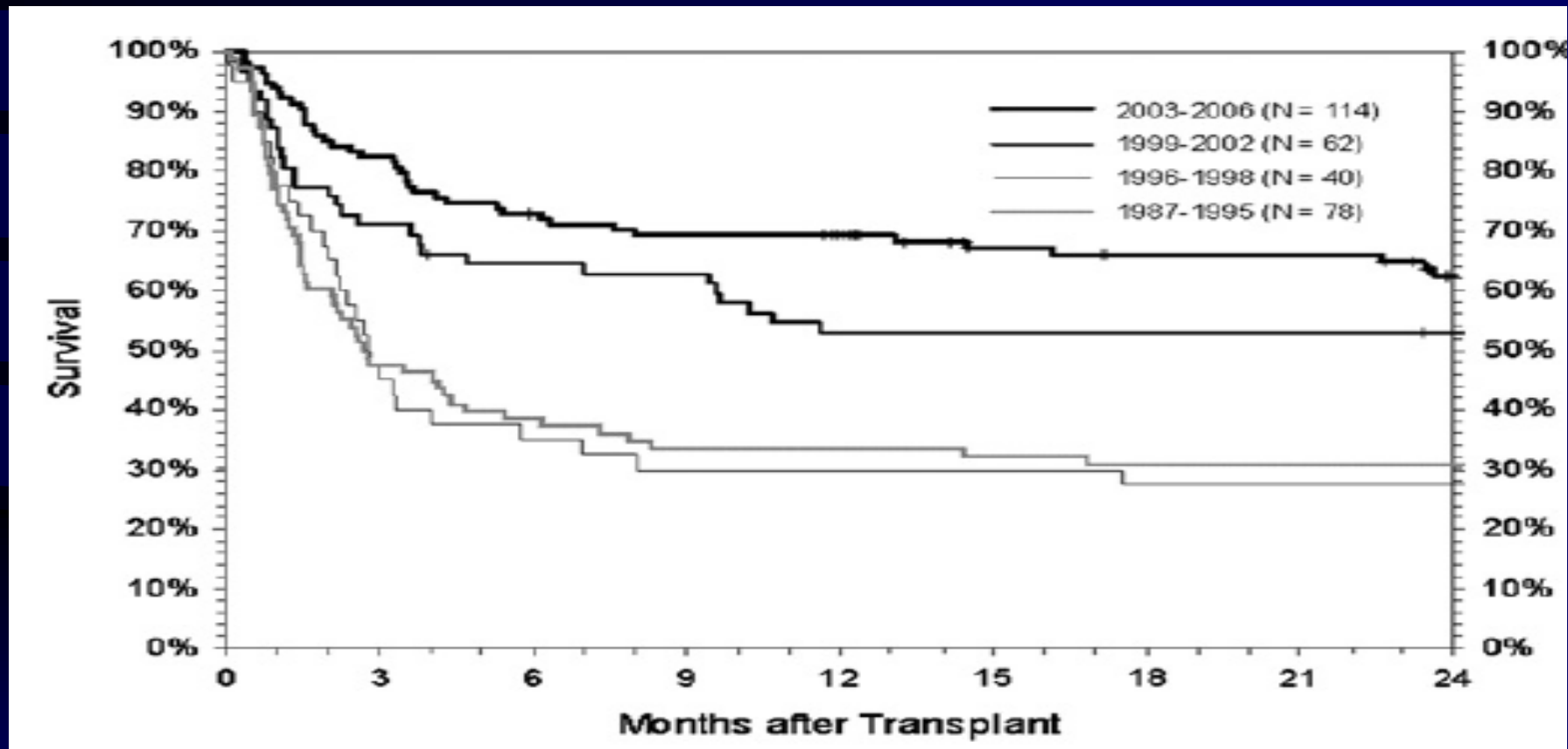


AA: leczenie przeszczepieniem od dawcy rodzinnego 1991-2002 (Working Party Severe Aplastic anemia)

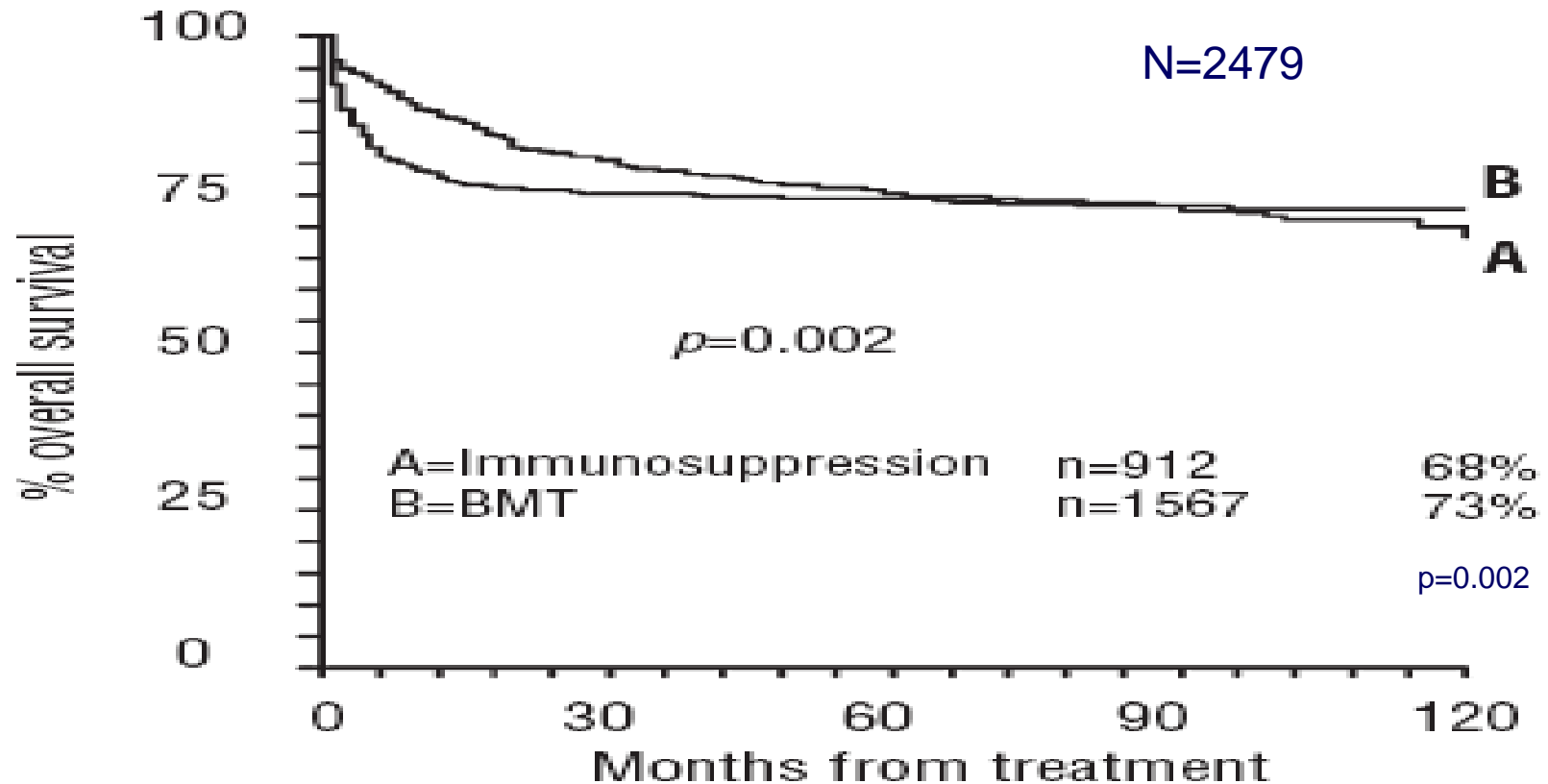


Przeżycie w ciężkiej postaci AA po leczeniu HCT w 4 różnych okresach

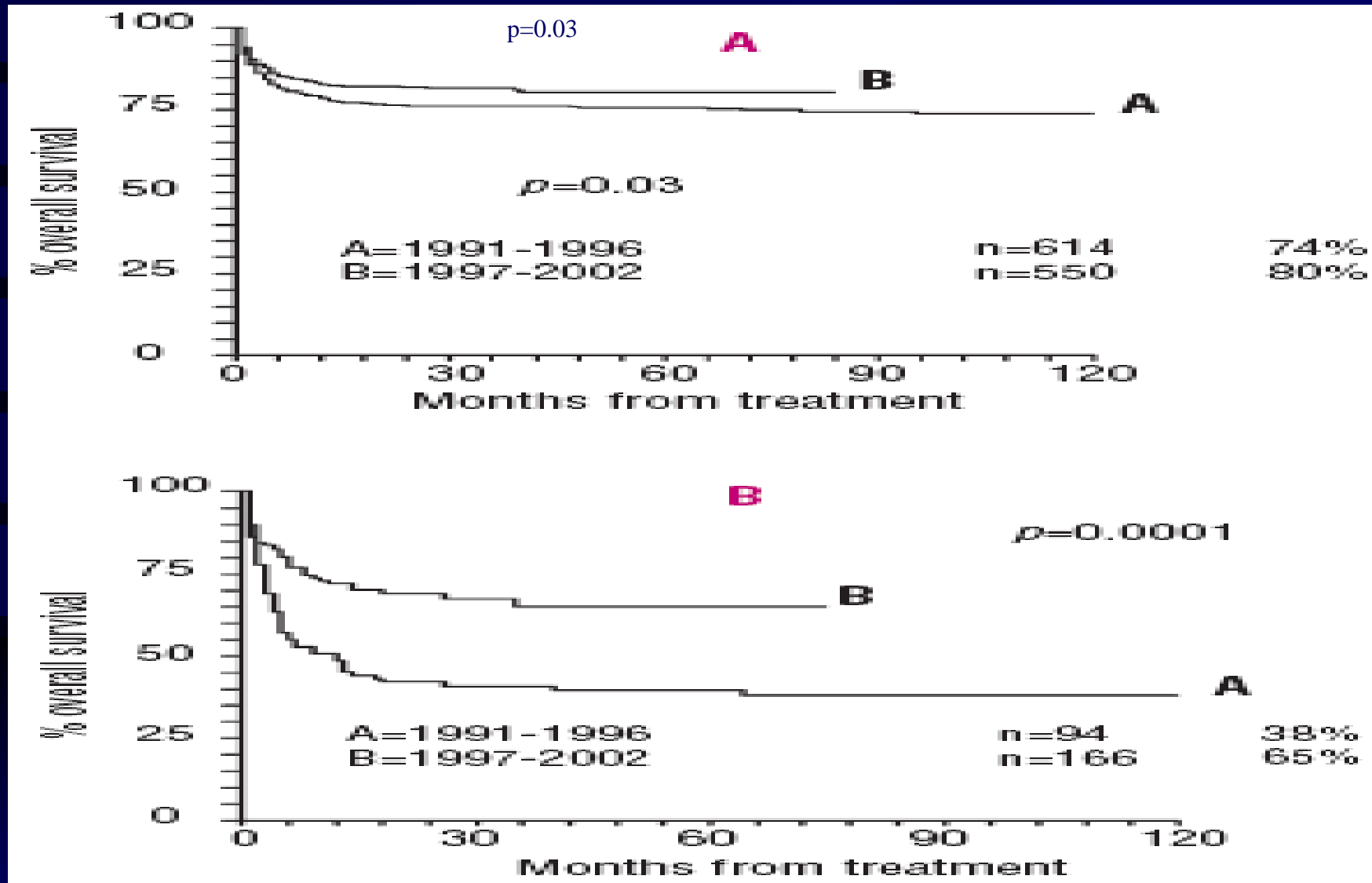
odsetek przeżyć 2-letnich uległ podwojeniu w ostatnich 10 latach



Aktualne przeżycie chorych z ciężką postacią AA w zależności od zastosowanego leczenia 1-liniowego (SCT lub immunosupresja)

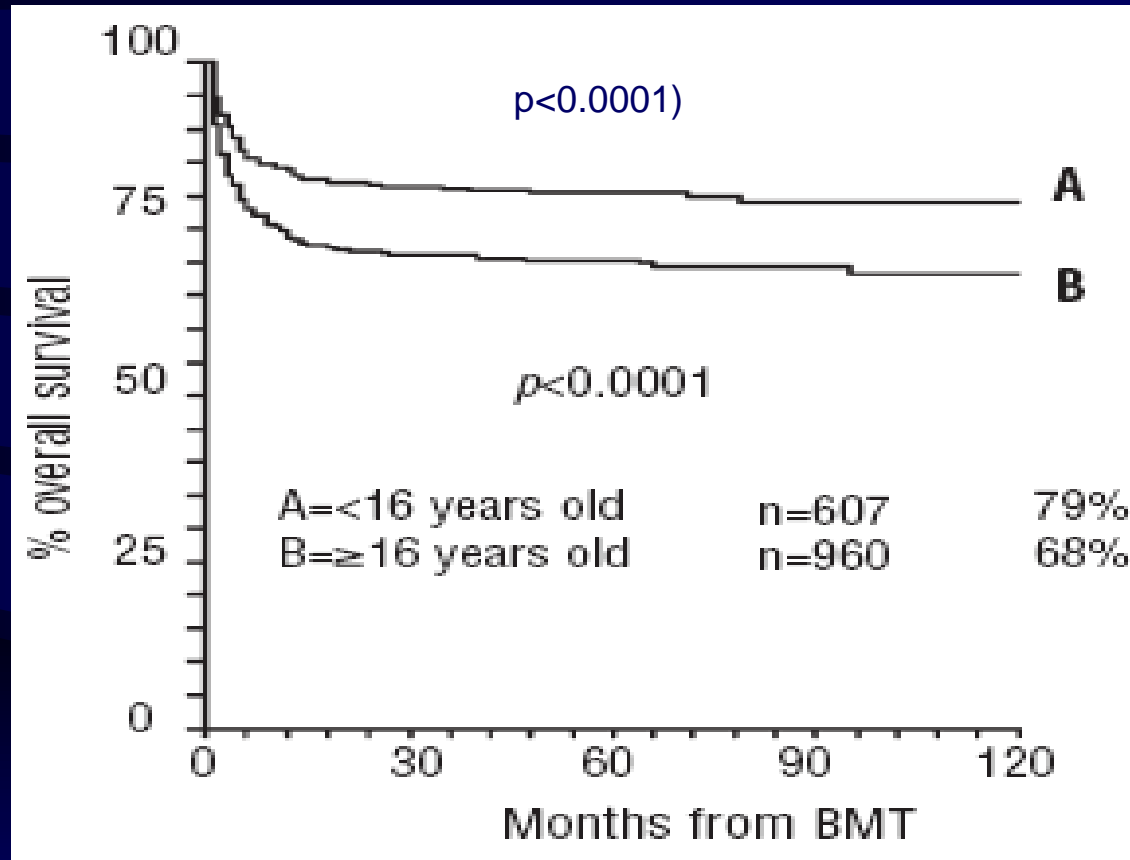


Krzywe przeżycia chorych z AA leczonych SCT



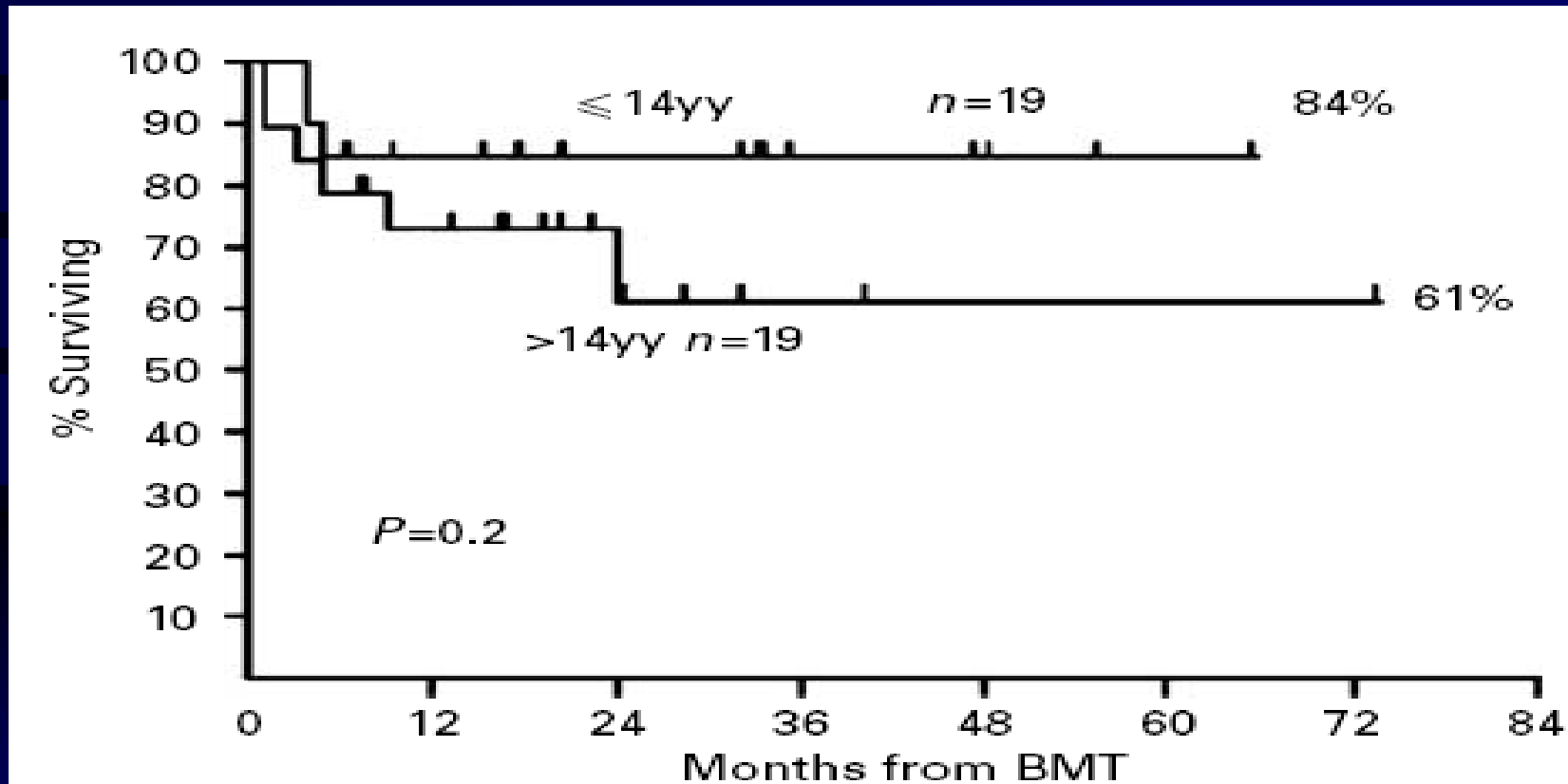
A/od dawców rodzinnych lub aletrnatywnych
B/ w okresie 1991-1996 oraz 1997-2002)

Aktualne przeżycie chorych leczonych SCT



A/ <16 lat
B/ ≥16 lat

Aktualne przeżycie chorych z ciężką postacią AA leczonych SCT od dawcy alternatywnego w zależności od wieku

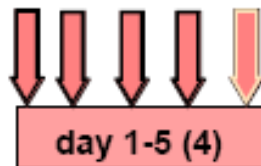


Immunosuppression

Primary immunosuppressive treatment of patients with vSAA / SAA:

ATG (Lymphoglobulin Merieux): 0.75 ml/kg b.w./ day *

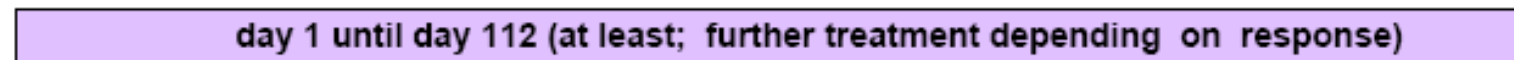
ATG (ATGAM): 40 mg/kg b.w./day **



Methylprednisolon: 1mg/kg b.w./ day;



Ciclosporin : 5 mg/kg b.w. / day; blood level adjusted.

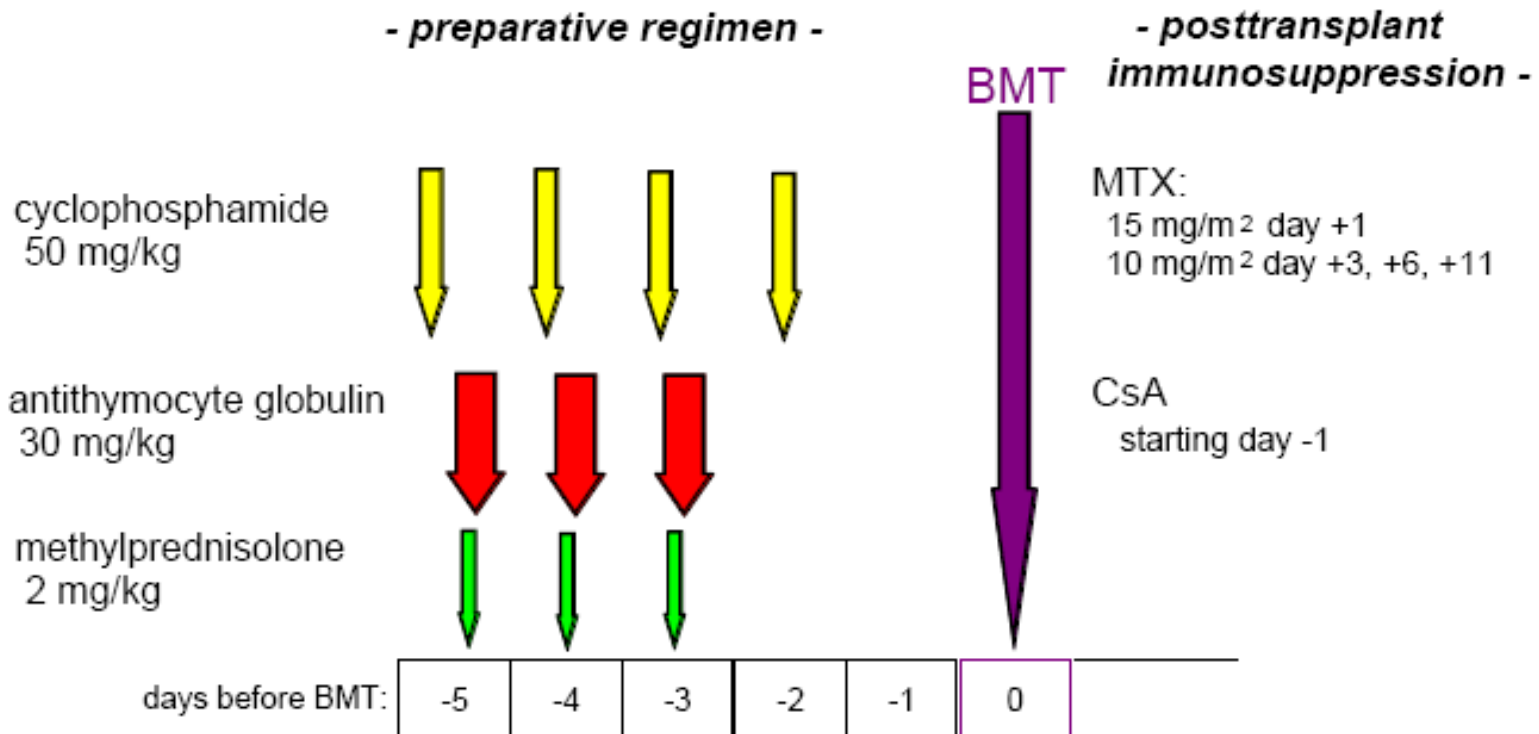


* Lymphoglobulin is recommended for 5 consecutive days

** ATGAM is recommended for 4 consecutive days

Bone marrow transplantation

Preparative regimen and post-transplant immunosuppression in HLA-matched sibling transplantation of aplastic anemia:



Standard terapii ciężkiej AA

Leczenie immunosupresyjne

Globulina anty-tymocytarna

1. Końska ATG (Lymphoglobuline). Dawka dzienna 1,5 fiołki/10 kg cc.
Lek podajemy ATG przez 5 dni w infuzji dożyłnej przez wkłucie centralne przez 12–18 godz.
2. Preparat króliczy (Thymoglobuline, Sangstat) zwykle podajemy w 2 lub 3 kursie.
Dawka dzienna 3,75 mg/kg)

Dawkę testową (1 mg in 100 ml 0,9% NaCl w 1 godz infuzjo dożyłnej) należy podać obowiązkowo przed rozpoczęciem leczenia!

Standard terapii: SAA

Leczenie immunosupresyjne

Cyklosporyna (2)

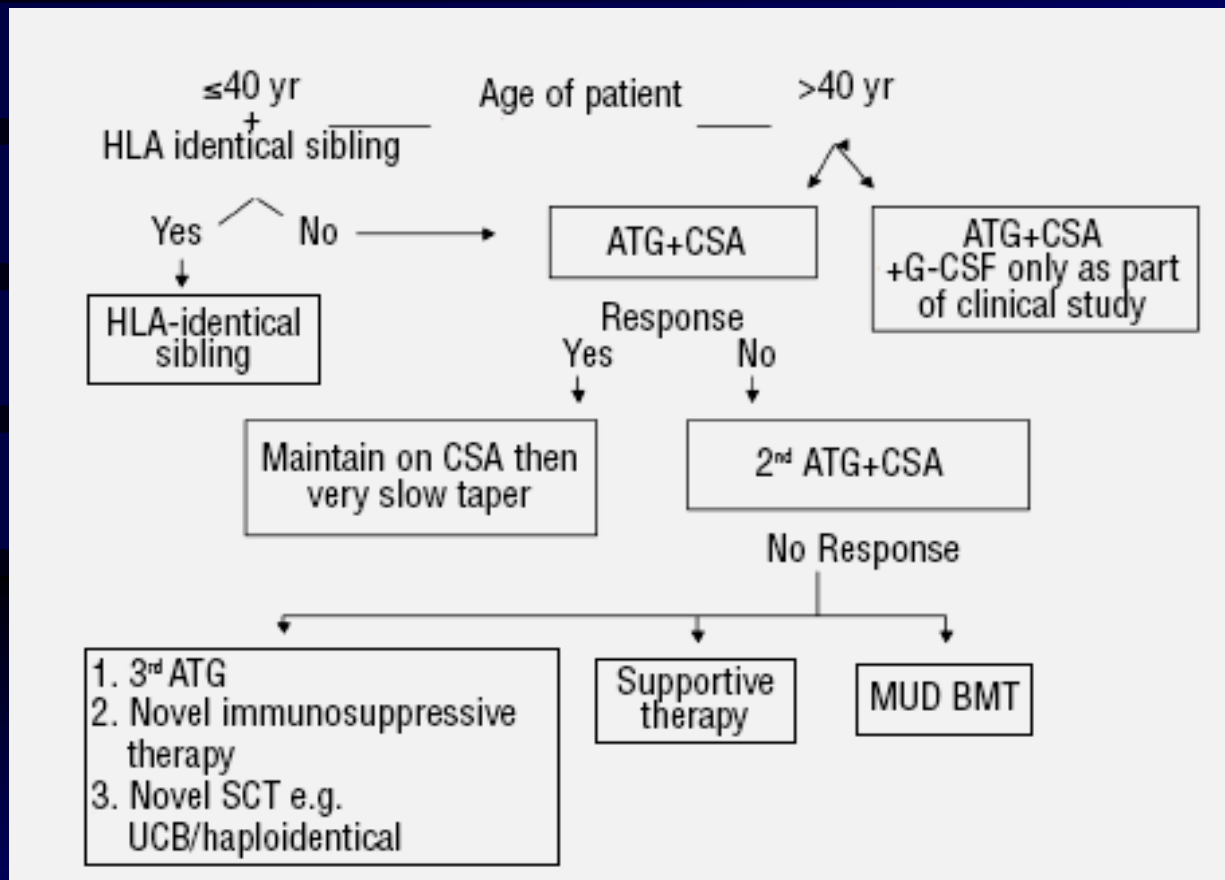
Od 5 dnia ATG, prednisolon 1 mg/kg/dz do dnia 9, z następową redukcją dawki przez kolejne 5 dni
Cyklosporynę należy podać doustnie w dniu 14, w dawce 5 mg/kg/dz, tak aby jej poziom mieścił się w przedziale 150 - 250 mg/l

Postępowanie po leczeniu ATG

- Jeśli pacjent odpowie na leczenie i pozostaje w odpowiedzi przez 6 miesięcy, należy rozpocząć (bardzo powoli) zmniejszanie dziennej dawki cyklosporyny (przez kilka miesięcy)
- W tym czasie zaleca się również ponowne wykonanie badania szpiku, cytogenetycznego oraz w kierunku NNH)

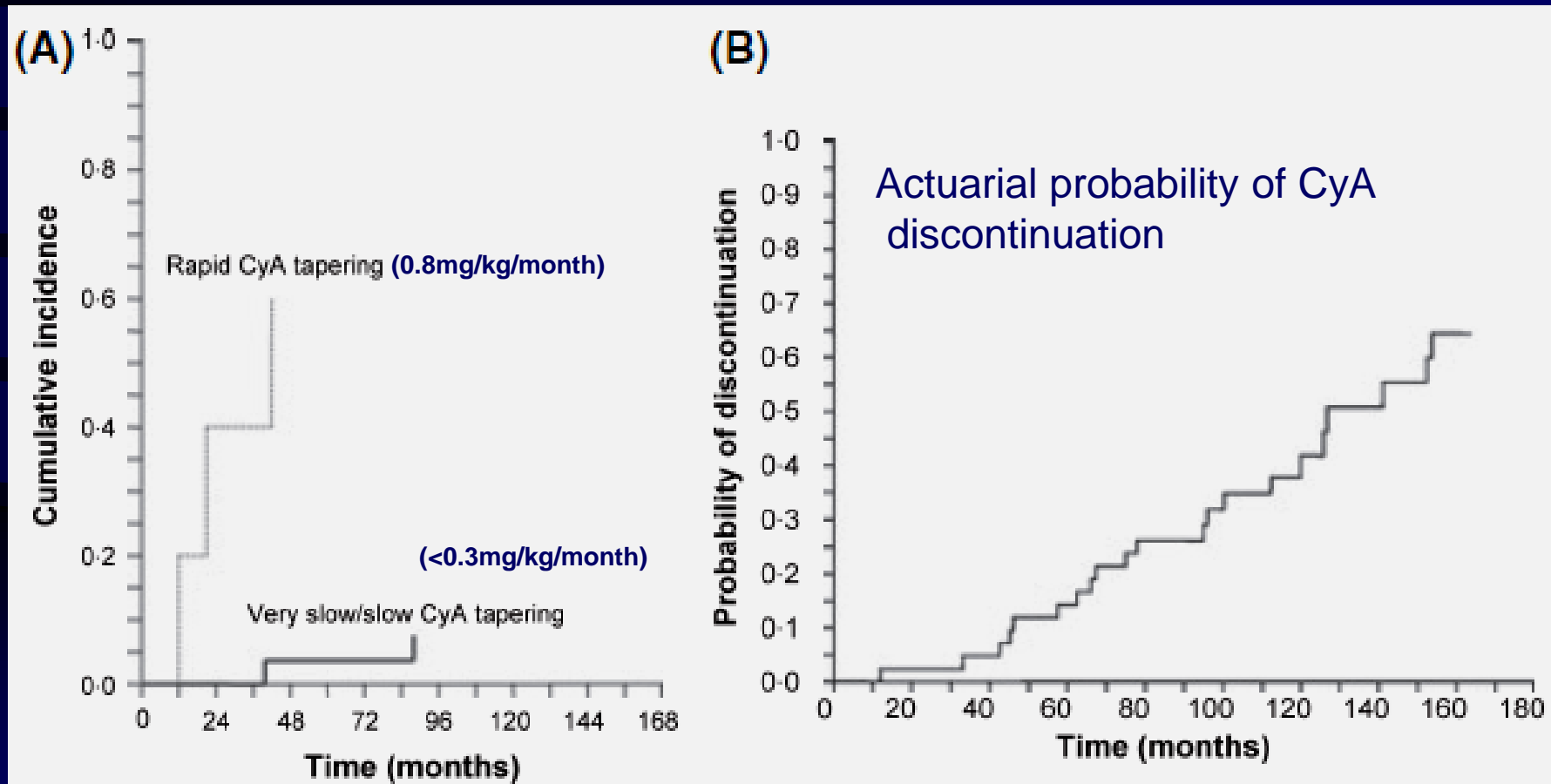
Algorytm leczenia ciężkiej postaci

AA



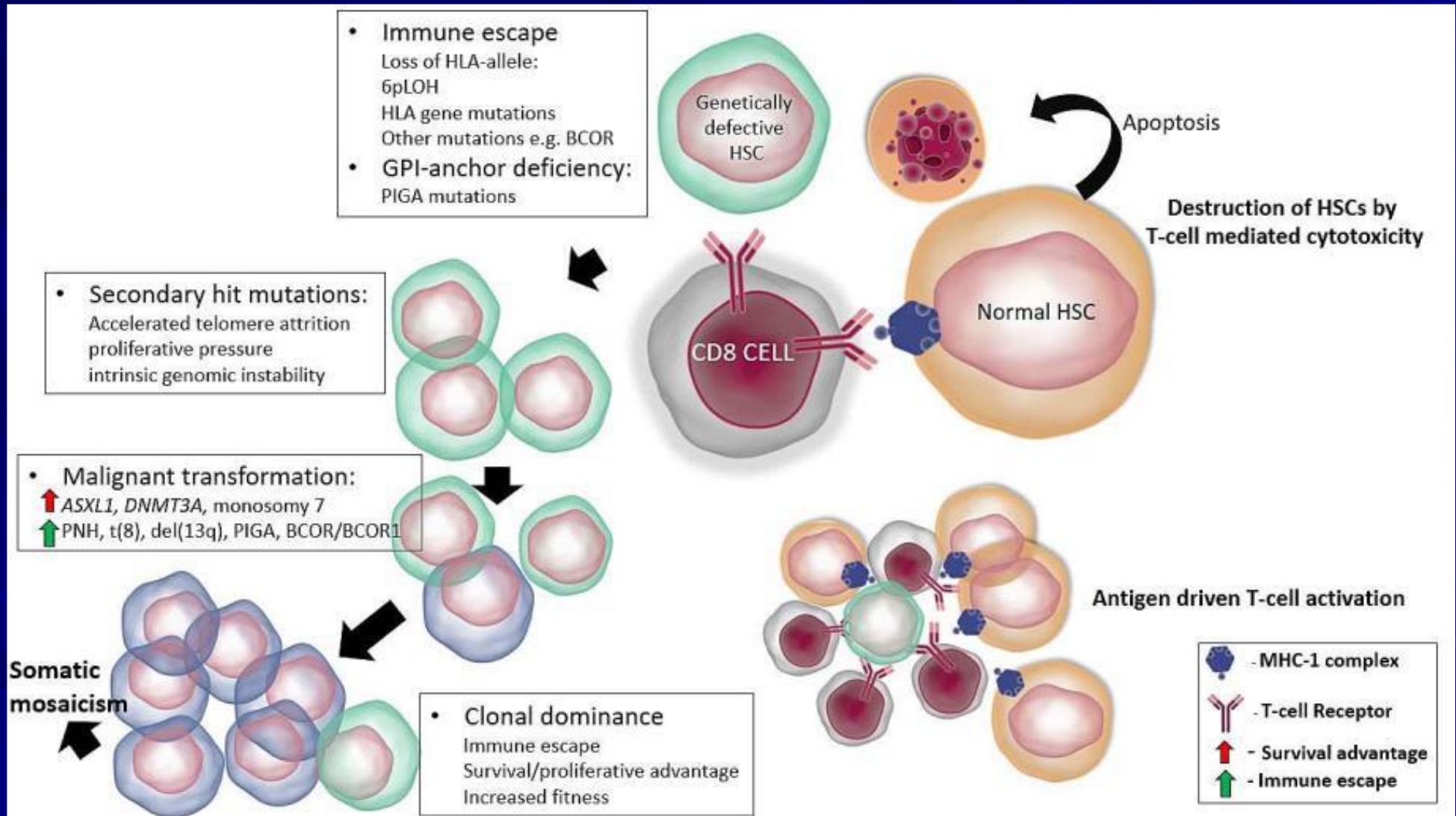
ATG: antithymocyte globulin;
CSA: cyclosporin A;
UCB: umbilical cord blood;
MUD: matched unrelated donor;
SCT: stem cell transplantation

Częstość wznów w trakcie leczenia immunosupresyjnego (w zależności od sposobu zmniejszania dawki)

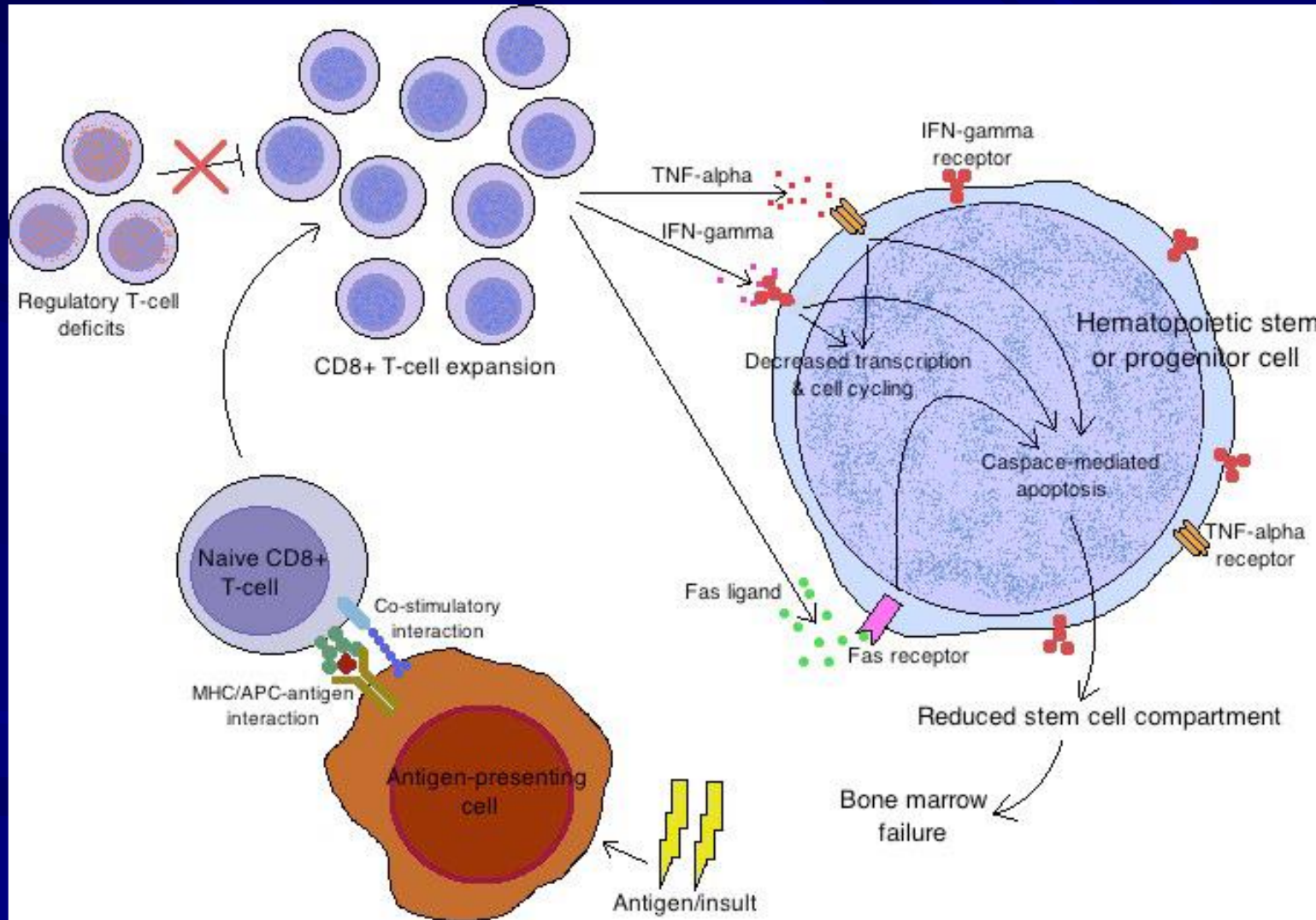


Immune escape and clonal evolution mechanisms in acquired aplastic anemia

Cytotoxic T cells exert T-cell mediated cytotoxicity leading to oligo-clonal hematopoiesis



Immunopathogenic mechanism of hematopoietic stem or progenitor cell apoptosis in the aplastic anemia bone marrow



Recurring cytogenetic abnormalities in acquired aplastic anemia

Abnormality	Incidence ^a , %	Prognostic impact	Reference(s)
6pUPD	13	Favorable response to IST	75,85
Monosomy 7/del(7q)	2.0-13.3	Higher risk of progression to MDS or AML	68,73,92
Trisomy 8	1.3-6.7	Favorable response to IST, lower risk of progression to MDS or AML	68,71,92,96
Del(13q)	0.4-1.8	Favorable response to IST, possibly better survival	75,85
Trisomy 6	2.4	Unknown	71
Trisomy 15	2.4	Unknown	71

6pUPD, uniparental disomy of the 6p arm; AML, acute myeloid leukemia; IST, immunosuppressive therapy; MDS, myelodysplastic syndrome.

^aReferenced studies had variable analyses either performed at diagnosis of aplastic anemia or later in course of disease (without progression to MDS) as well as differences in analyses of peripheral blood vs bone marrow specimens.

Frequently mutated genes in acquired aplastic anemia

Mutated gene	Incidence, %	Prognostic impact	Reference(s)
<i>BCOR</i> or <i>BCORL</i>	4.0-9.3	Favorable response to IST, improved PFS and OS	68,85
<i>DNMT3A</i>	5.3-8.4	Poor response to IST, inferior PFS and OS	68,85
<i>ASXL1</i>	6.2-8.0	Poor response to IST, inferior PFS and OS	68,85
<i>PIGA</i>	7.5-40	Favorable response to IST, improved PFS and OS	85
<i>TERT</i>	5.6	Unknown	46
<i>TERC</i>	3.3	Unknown	47
<i>JAK2</i> and <i>JAK3</i>	1.8	Poor response to IST, inferior PFS	85
<i>RUNX1</i>	1.5	Poor response to IST, inferior PFS and OS	85
<i>TP53</i>	1.5	Poor response to IST, inferior OS	85
<i>CSMD1</i>	1.0	Poor response to IST, inferior OS	85
<i>TET2</i>	0.6-0.7	Unknown	68,85
<i>SRSF2</i>	0.6	Unknown	68
<i>U2AF1</i>	0.6	Unknown	68
<i>ERBB2</i>	0.6	Unknown	68
<i>MPL</i>	0.6	Unknown	68
<i>TERT</i>	0.5	Unknown	85
<i>TERF1</i> or <i>TERF2</i>	N/A	Unknown	48

IST, immunosuppressive therapy; OS, overall survival; PFS, progression-free survival.

Diagnostic evaluation of a patient with suspected acquired aplastic anemia

Initial screening evaluation	
Peripheral blood	CBC with differential, peripheral blood smear, reticulocyte count, complete metabolic panel, LDH, haptoglobin, coagulation parameters
Bone marrow aspirate and biopsy with ancillary studies	Bone marrow aspirate and biopsy, metaphase cytogenetics and FISH panel for MDS-associated chromosomal abnormalities of chromosomes 5, 7, 8, and 20 (*) Molecular studies
Exclusion of alternative diagnoses	
Infectious	HIV, hepatitis B/C, parvovirus B19 PCR, EBV, CMV, bacterial, fungal (+/- mycobacterial testing)
Inherited bone marrow failure	Detailed family history focusing on cytopenias, congenital abnormalities, cancers and lung and liver pathology, chromosomal breakage testing for Fanconi anemia, lymphocyte telomere length for Dyskeratosis congenita, additional syndrome-specific testing if personal or family history is suggestive of specific disorders (IBMF, HLH)
Lymphoproliferative	Flow cytometry and T cell receptor rearrangement testing for clonal LGL expansion
Medication or toxin-related	Detailed drug and occupational exposure history, with attention to excessive alcohol intake, antibiotics, prior cytotoxic chemotherapeutic agents, and immune-activating agents (e.g., interferon and checkpoint blockade inhibitors)
Nutritional	Vitamin B ₁₂ , folate, copper, iron studies, ferritin
Rheumatologic	Antinuclear antibody, rheumatoid factor, erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein
Others (rare)	Exclude other rare etiologies of pancytopenia with a hypocellular marrow: e.g., graft-versus-host disease, HLH

A variety of testing modalities in addition to a detailed personal/family history and exposure history is required both in the initial screening evaluation as well as the subsequent exclusion of alternative diagnoses. *CBC* complete blood count, *LDH* lactate dehydrogenase, *MPN* myeloproliferative neoplasm, *FISH* fluorescence in-situ hybridization, *MDS* myelodysplastic syndrome, *HIV* human immunodeficiency virus, *EBV* Epstein-Barr virus, *CMV* cytomegalovirus, *DEB* diepoxybutane, *SLE* systemic lupus erythematosus, *RA* rheumatoid arthritis, *IBMF* inherited bone marrow failure, *HLH* hemophagocytic lymphohistiocytosis, *LGL* large granular lymphocyte

*Although in current clinical practice molecular sequencing panels of somatic mutations in hematologic malignancy-associated genes are frequently included and can provide useful supporting information, in isolation, presence of somatic mutations in patients with AA should be interpreted with caution due to their high frequency in this patient population and uncertain prognostic significance (see text)