

Strokovni prispevek/Professional article

ZDRAVLJENJE AVTOIMUNSKKE HEMOLITIČNE ANEMIJE Z RITUKSIMABOM

TREATMENT OF AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANAEMIA WITH RITUXIMAB

Uroš Mlakar

Klinični oddelek za hematologijo, Klinični center, Zaloška 7, 1525 Ljubljana

Prispelo 2004-02-13, sprejeto 2004-03-05; ZDRAV VESTN 2004; 73: Suppl. I: 55-8

Ključne besede: avtoimunska hemolitična anemija; hladni aglutinini; rituksimab; limfoplazmatični limfom

Izvleček – Izhodišča. Glede na temperaturo, pri kateri se protitelesa vežejo na antigene eritrocitov, razlikujemo avtoimunske hemolitične anemije (AIHA) s toplimi protitelesi od AIHA s hladnimi protitelesi. AIHA s toplimi protitelesi zdravimo z glukokortikoidi. Če zdravljenje z njimi ni uspešno, ali je učinkoviti odmerek prevelik, prihaja v poštev splenektomija. Imunosupresivno zdravljenje s citostatiki je primerno za bolnike, pri katerih opisano zdravljenje ni bilo uspešno ali je tveganje za splenektomijo preveliko. Bolezen zaradi hladnih aglutininov (BHA) je kronična hemolitična anemija, pri kateri naštejni načini zdravljenja navadno niso učinkoviti. Zato pri AIHA, kjer običajno imunosupresivno zdravljenje ni uspešno, poskušamo zdraviti z novimi zdravili. Rituksimab je monoklonsko protiteleso proti antigenu CD20, ki se nahaja na imunskih celicah B. Uporablja se za zdravljenje limfatičnih novotvorb celic B. Nedavno so poročali o uspešnem zdravljenju z rituksimabom pri bolnikih z idiopatično BHA.

Bolniki in metode. V prispevku prikazujemo tri bolnike s kronično AIHA, neodzivno na običajno imunosupresivno zdravljenje. Dva bolnika sta imela bolezen zaradi hladnih aglutininov. Bolezen je bila sekundarna v sklopu limfoplazmatičnega limfoma. Eden od omenjenih bolnikov je imel poleg hladnih aglutininov v krvi tudi topla protitelesa. Pri tretjem bolniku je bila prisotna kronična idiopatična AIHA s toplimi protitelesi. Zdravljenje sekundarne BHA z rituksimabom ni bilo uspešno. Pri bolniku z idiopatično AIHA s toplimi protitelesi smo z rituksimabom dosegli remisijo. Bolnik je že več kot deset mesecev brez anemije in brez laboratorijskih znakov za hemolizo.

Zaključki. Rituksimab je obetajoče zdravilo za zdravljenje idiopatične AIHA, neodzivne na običajno imunosupresivno zdravljenje. Predpostavljamo, da je pri sekundarni BHA zaradi limfatične novotvorbe primernejši izbor kombinacija rituksimaba s kemoterapijo kot zdravljenje samo z rituksimabom.

Uvod

Skupna značilnost avtoimunske hemolitične anemije (AIHA) je prisotnost protiteles za antigene lastnih eritrocitov. Glede na temperaturo, pri kateri se protitelesa vežejo na antigene

Keywords: autoimmune haemolytic anaemia; cold agglutinin; rituximab; lymphoplasmacytic lymphoma

Abstract – Background. Autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) is characterised by the presence of autoantibodies directed against autologous erythrocytes. Depending on temperature at which they are active AIHA is classified as AIHA due to warm or cold-reacting antibodies. Glucocorticoids are the mainstay of treatment for patients with AIHA due to warm autoantibodies. If haemolysis cannot be controlled by a low dose of glucocorticoids, then splenectomy is indicated. Immunosuppressive therapy with cytotoxic drugs is reserved for those patients who fail to respond to glucocorticoids and splenectomy or for those who are poor surgical risks. Cold agglutinin disease is a chronic haemolytic anaemia that is refractory to the usual treatments for haemolytic anaemia mediated by a warm-reactive antibody. Innovative approaches are needed for patients with AIHA that does not respond to conventional treatment. Rituximab is a monoclonal antibody against CD20 antigens on B cells. It has been introduced for the treatment of B-cell lymphomas. The successful treatments of refractory idiopathic cold agglutinin disease with rituximab were reported recently.

Methods and results. In this paper we present three cases of chronic AIHA refractory to immunosuppressive treatment. Two patients were with cold agglutinin disease secondary to lymphoplasmacytic lymphoma. One of two had mixed cold and warm-reacting antibodies. The third case was with idiopathic AIHA due to warm-reacting antibodies. Treatment of secondary cold agglutinin disease with rituximab was unsuccessfully, while in patient with idiopathic warm-reacting AIHA remission was achieved. The patient has been without anaemia and without laboratory signs of hemolysis more than 10 months.

Conclusions. Treatment with rituximab appears promising for idiopathic refractory AIHA. We suggest that combination of rituximab with chemotherapy in secondary cold agglutinin disease due to lymphoid neoplasm is better choice than rituximab alone.

eritrocitov, razlikujemo AIHA s toplimi protitelesi od AIHA s hladnimi protitelesi. Pri približno 80% so prisotna topla protitelesa, običajno razreda IgG (1). V večini drugih primerov so vzrok za AIHA hladna protitelesa razreda IgM, ki in vitro pri

temperaturah pod 37 °C povzročijo aglutinacijo eritrocitov (hladni aglutinini). Primeri AIHA, kjer so hkrati prisotna topla in hladna protitelesa, so zelo redki. Pri približno polovici bolnikov je AIHA samostojna bolezen (idiopatična ali primarna AIHA). Pogost vzrok za simptomatično (sekundarno) AIHA so limfatične novotvorbe. Na površino eritrocitov vezana protitelesa ali komplemet ugotovimo z direktnim Coombsovim testom. Pri AIHA s toplimi protitelesi običajno ugotovimo na površini eritrocitov protitelesa razreda IgG brez ali hkrati s komplemetom C3d. Pri AIHA s hladnimi aglutinini (bolezen s hladnimi aglutinini, BHA) ugotovimo na eritrocitih samo komplemet C3d. Titri hladnih aglutinonov, ki jih določimo pri 4 °C, so pri BHA $\geq 1:64$. Pogosto so titri 1:10.000 ali več (2, 3). Klinično pomembna je tudi najvišja temperatura, pri kateri še lahko ugotovimo aglutinacijo (termalna amplituda). AIHA s toplimi protitelesi navadno zdravimo z glukokortikoidi. Če to ni uspešno, ali je za vzdrževanje remisije potreben prevelik odmerek prednisonolona, se odločimo za splenektomijo. Pri BHA glukokortikoidi in splenektomija niso učinkoviti (2). Običajno se odločimo za imunosupresivno zdravljenje s ciklofosfamidom ali klorambucilom. To zdravljenje prihaja v poštev tudi pri bolnikih z AIHA s toplimi protitelesi, če glukokortikoidi in splenektomija niso učinkoviti. Rituksimab je humanizirano mišje monoklonsko protiteleso, specifično za antigen CD20 na površini limfocitov B in povzroči izrazito zmanjšanje pozitivnih celic CD20 v telesu. Uporablja se pri zdravljenju limfatičnih novotvorb zrelih celic B (4). V zadnjem času vse pogosteje poročajo o zdravljenju nekaterih avtoimunskih bolezni s tem zdravilom. V prispevku poročamo o zdravljenju z rituksimabom pri treh bolnikih z AIHA. Dva bolnika sta imela BHA, tretji pa idiopatično AIHA s toplimi protitelesi.

Bolniki

Primer 1 (sekundarna bolezen zaradi hladnih aglutinonov)

46-letnemu bolniku so decembra 1988 ob prebolevanju okužbe dihal ugotovili hemolitično anemijo s pozitivnim Coombsovim testom. Zdravljenje ni bilo potrebno, ker je anemija spontano izzvenela. Maja 1995 se je po prehladnem obolenju ponovno pojavila anemija. Bolnik je navajal tudi pojav akrocianoze, če se je zadrževal na hladnem. Zaradi razjasnitve anemije so bolnika napolili na Klinični oddelek za hematologijo v Ljubljani. Ob pregledu smo ugotovili bledico kože, subikterus in povečano vranico (vranica tipljiva 3 cm pod rebrnim lokom, z ultrazvokom izmerjena velikost je bila 19 × 6,5 cm). V krvni sliki je bila prisotna normocitna anemija (hemoglobin (Hb) 75 g/L, povprečni volumen eritrocitov (PVE) 88 fL, število retikulocitov (Rt) $84 \times 10^9/L$, število levkocitov (L) in trombocitov (Tr) je bilo normalno. S citološkim pregledom punktata kostnega mozga smo ugotovili razrast celic rdeče vrste. V serumu je bila povečana koncentracija nekonjugiranega bilirubina (73 mmol/L). Direktni Coombsov test z monospecifičnim serumom za komplemet C3d je bil pozitiven, titer hladnih aglutinonov pri 4 °C pa 1:128. V serumu je bil prisoten tudi monoklonski IgM kapa v koncentraciji 9,6 g/L. Na podlagi laboratorijskih izsledkov smo zaključili, da ima bolnik avtoimunsko hemolitično anemijo, ki glede na imunološke značilnosti ustreza bolezni zaradi hladnih aglutinonov (BHA). Bolnika smo pričeli zdraviti z glukokortikoidi. Ob tem se je razvil steroidni diabetes. Po mesecu dni smo zdravljenje opustili. Zaradi suma, da je BHA sekundarna, smo novembra 1996 in avgusta 1997 napravili biopsijo kostnega mozga. Poleg hiperplastične eritropoeze so bili obkraj prisotni pretežno nodularni limfoidni infiltrati. Ker zaradi pičlega bioptičnega vzorca imunohistokemična preiskava ni bila možna, ni bilo mogoče ugotoviti, ali je limfoidni infiltrat reaktivne narave ali gre za nizko maligni limfom. V nadaljnjem poteku smo opazovali postopno večanje vranice. Oktobra 1999 se je hemolitična anemija tako poslabšala, da je bila potrebna transfuzija eritrocitov. Vranica je bila tipljiva 6 cm pod rebrnim lokom. Povečal se je titer hladnih aglutinonov (1:1024). Pri bolniku smo začeli zdravljenje s ciklofosfamidom (100 mg/dan), ki je trajalo do maja 2001.

Ob ponovnem poslabšanju bolezni jeseni 2001 smo ponovili biopsijo kostnega mozga. Tokrat smo z imunohistokemično preiskavo ugotovili, da so limfoidni infiltrati limfomski (restrikcija lahkih verig kapa) in s tem potrdili sum, da gre za sekundarno BHA v sklopu nizkomalignega limfoma celic B. Ker ponovno zdravljenje s ciklofosfamidom ni bilo več učinkovito, potrebno pa je bilo redno zdravljenje s transfuzijami eritrocitov, smo se novembra 2001 odločili za splenektomijo. Izsledke histološke preiskave odstranjene vranice je ustrezal limfoplazmatičnemu limfomu. Po splenektomiji je bolnik prejel prvi krog zdravljenja s klorambucilom (20 mg na dan 5 dni). Ker se stanje ni popravilo in je bolnik ves čas potreboval nadomestno zdravljenje s transfuzijami, smo februarja 2002 začeli zdravljenje z rituksimabom. Laboratorijski izsledki pred pričetkom zdravljenja so bili: Hb 35 g/L, Tr $189 \times 10^9/L$, nevrofilni (Ng) $1,6 \times 10^9/L$, limfociti $18,5 \times 10^9/L$ s fenotipom CD19+, CD20+, IgM-kapa+. V serumu je bila koncentracija nekonjugiranega bilirubina 30 $\mu\text{mol/L}$, LDH 8,8 $\mu\text{kat/L}$ in monoklonskega IgM kapa 12 g/L. Bolnik je prejel rituksimab 375 mg/m² intravensko enkrat na teden tri tedne zapored. Po tretjem odmerku rituksimaba je nastala tromboza v subklavijški veni, v kateri je bil vstavljen kateter. Zaradi možnosti, da je tromboza posledica zdravljenja z rituksimabom, bolnik četrtega odmerka ni prejel. Po zdravljenju z rituksimabom nismo opazovali izboljšanja hemolitične anemije, potrebe po transfuzijah so ostale nespremenjene. Ocenili smo, da je bilo zdravljenje z rituksimabom neučinkovito.

Od junija do novembra 2002 smo bolnika zdravili s kemoterapijo po shemi VAD (vinkristin, adriamicin, deksametazon) 1-krat mesečno. Od avgusta 2002 do septembra transfuzije niso bile potrebne. Nato pa je prišlo do napredovanja limfoma (povečanje jeter, limfocitoza $44 \times 10^9/L$) in poslabšanja hemolitične anemije s ponovno potrebo po transfuzijah.

Primer 2 (sekundarna AIHA s toplimi in hladnimi protitelesi)

56-letnega bolnika so novembra 2002 napolili na pregled na Klinični oddelek za hematologijo v Ljubljani zaradi hude makrocitne anemije. Bolnik je navajal mesec dni trajajoče slabo počutje. Postal je tudi nekoliko rumen. S kliničnim pregledom smo ugotovili poleg bledice kože in subikterusa tudi povečano vranico (3 cm pod rebrnim lokom). V krvni sliki smo poleg anemije (Hb 63 g/L, MCV 100 fL, Rt $149 \times 10^9/L$) in blage nevtropenije (Ng $1,5 \times 10^9/L$) ugotovili tudi pomik do mieloicitov in 1% normoblastov (levkoeritroblastna krvna slika). Direktni Coombsov test z monospecifičnim serumom anti-IgA je bil pozitiven. Titer hladnih aglutinonov pri +4 °C je bil 1:128 (termalna amplituda +20 °C). S histološkim pregledom biopsije kostnega mozga so ugotovili poleg hiperplastične eritropoeze tudi infiltracijo z limfoplazmatičnim limfomom. Infiltracija je bila intersticijska in nodularna in je zavzela približno 1/3 kostnega mozga. Poleg povečane koncentracije nekonjugiranega bilirubina (31 $\mu\text{mol/L}$) in aktivnosti laktatdehidrogenaze (LDH, 8,17 $\mu\text{kat/L}$) sta bila v serumu prisotna tudi monoklonska imunoglobulina IgA kapa (11,4 g/L) in IgM kapa (6,1 g/L). Ocenjeno je bilo, da gre pri bolniku za sekundarno avtoimunsko hemolitično anemijo s toplimi in hladnimi protitelesi v sklopu limfoplazmatičnega limfoma. Bolnik je prejel transfuzije eritrocitov in prvi krog kemoterapije VAD (vinkristin, adriamicin, deksametazon). Po odpustu iz bolnišnice je nadaljeval zdravljenje z glukokortikoidi (metilprednizolon 32 mg/dan), prejemal je tudi klorambucil. Aprila 2003 so bile zaradi poslabšanja anemije ponovno potrebne transfuzije. Ker se anemija kljub povečanju odmerka glukokortikoidov ni popravila (Hb 84 g/L, MCV 94,8 fL, Rt $47 \times 10^9/L$), smo se v maju 2003 odločili za zdravljenje z rituksimabom. Bolnik je prejel rituksimab 375 mg/m² intravensko enkrat na teden 4 tedne zapored. Zdravljenje ni bilo neuspešno. Potrebe po transfuzijah se niso zmanjšale. Bolnik potrebuje transfuzije eritrocitov približno na 4 tedne.

Primer 3 (primarna avtoimunska hemolitična anemija s toplimi protitelesi)

53-letnega bolnika smo novembra 1987 sprejeli v bolnišnico zaradi razjasnitve normocitne anemije. Bolnik se je 14 dni počutil utrujenega. Ob sprejemu so bile vidne sluznice in koža blede. Prisoten je bil subikterus. V krvni sliki smo ugotovili: Hb 80 g/L, MCV 90 fL, Rt $249 \times 10^9/L$. Število trombocitov in bela krvna slika sta bila nor-

malna. S citološko preiskavo kostnega mozga smo ugotovili razrast celic rdeče vrste. Direktni Coombsov test z monospecifičnim serumom anti-C3d je bil pozitiven. Titer hladnih aglutininov pri +4 °C je bil 1:16. Koncentracija nekonjugiranega bilirubina (32 µmol/L) in aktivnost LDH (7,45 µkat/L) v serumu sta bili povečani. Scintigrafija jeter in vranice je bila normalna. Glede na te izvide smo ocenili, da gre za idiopatično avtoimunsko hemolitično anemijo s toplimi protitelesi. Pričeli smo zdraviti z glukokortikoidi (prednizolon 1mg/kg telesne mase). Ker se je pri bolniku razvila steroidna psihoza, smo prenehali z zdravljenjem z glukokortikoidi in pričeli z zdravljenjem s ciklofosfamidom (100 mg/dan). Ob takem zdravljenju je prišlo do porasta koncentracije Hb (136 g/L), znaki hemolize so izveneli. Aprila 1990 smo zdravljenje s ciklofosfamidom prekinili. Oktobra istega leta je zaradi ponovnega zagona hemolitične anemije bolnik pričel zdravljenje s ciklofosfamidom. Dva meseca kasneje je prišlo do globoke venske tromboze na levi nogi, zaradi česar je bila uvedena antikoagulantna zaščita z marivarinom. Septembra 1991 se je anemija ponovno poslabšala. Aprila 1992 smo na željo bolnika prenehali z zdravljenjem z ciklofosfamidom. Tega leta smo tudi določili življenjsko dobo bolnikovih eritrocitov, ki so jih označili s Cr⁵¹. Življenjska doba eritrocitov je bila skrajšana. Tako označeni eritrociti se niso v večji meri kopičili v vranici. Zaradi zagona hemolize je bilo ponovno potrebno imunosupresivno zdravljenje leta 1996 in v zimi 1998/1999 ter 1999/2000. Decembra 2002 smo opazovali ponovno poslabšanje hemolitične anemije. Stanje se kljub zdravljenju s ciklofosfamidom ni izboljšalo. Potrebne so bile transfuzije na vsakih 14 dni. Marca 2003 smo pričeli zdravljenje z rituksimabom. Bolnik je prejemal rituksimab 375 mg/m² intravensko 1-krat tedensko 4 tedne zapored. Laboratorijski izledki pred pričetkom zdravljenja so bili: Hb 76 g/L, MCV 93 fL, Rt 172 × 10⁹/L, direktni Coombsov test z anti C3d pozitiven, titer hladnih aglutininov pri +4 °C 1:32, nekonjugirani bilirubin 53 µmol/L, LDH 9,4 µkat/L, haptoglobin < 0,1 g/L. Že po prvem odmerku rituksimaba niso bile več potrebne transfuzije. Po zaključenem zdravljenju smo opazovali postopno izzvenevanje hemolitične anemije. Septembra 2003 smo ocenili, da je dosežena remisija: Hb 144, PVE 86 fL, Rt 68 × 10⁹/L, bilirubin in LDH sta bila v mejah normale. Coombsov test z anti C3d je ostal pozitiven. Remisija AIHA je bila prisotna tudi ob zadnjem pregledu v februarju 2004.

Razpravljanje

Tradicionalno razlikovanje med primarno BHA in sekundarno BHA zaradi limfatične novotvorbe je vprašljivo. V obeh primerih klon imunskih celic B izloča monoklonski IgM z lastnostjo hladnih avtoprotites (5). Celice klona v kostnem mozgu pri primarni BHA so CD20 in kapa pozitivne in izločajo monoklonski aglutinin IgM kapa. Z natančnejšo histološko preiskavo kostnega mozga se v polovici primerov primarne BHA ugotovi limfoplazmatski limfom (6). Nekateri predlagajo, naj se diagnoza sekundarna BHA zaradi limfatične novotvorbe nanaša le na primere z novotvorbo srednje ali visoke stopnje malignosti, ki izloča monoklonski IgM lambda (7). Novotvorba se v teh primerih lahko prepozna in bolj kot kostni mozeg prizadene druge limfatične organe. Ker je zdravljenje BHA z glukokortikoidi neuspešno, se zadnjih 30 let za zdravljenje BHA uporabljajo alkilirajoči citostatiki, predvsem klorambucil. Zaenkrat ni prepričljivih dokazov o učinkovitosti takšnega zdravljenja. Slab odziv na zdravljenje s citostatiki je verjetno posledica nizke proliferativne aktivnosti klona celic B in visoka biološka aktivnost protiteles IgM. Rituksimab se sam ali v kombinaciji s citostatiki uspešno uporablja za zdravljenje nekaterih CD20-pozitivnih novotorb celic B (4). Glede zdravljenja BHA z rituksimabom so objavljena poročila o posameznih bolnikih in ena prospektivna raziskava (6–14). V prospektivni raziskavi so zdravili 27 bolnikov in dosegli delni ali popolni odgovor pri polovici primerov. Odgovor je trajal 11 mesecev (mediana) (6). Do sedaj so opisali tudi en primer uspešnega zdravljenja z rituksimabom pri bolniku s primarno AIHA s toplimi in hladnimi protitelesi (15). Pri nas zdravljenje z rituksimabom pri bolniku z BHA in bolniku z AIHA s hladnimi in toplimi protitelesi ni bilo uspešno. V literaturi ni podatkov o bolnikih z

BHA, pri katerih rituksimab ni učinkovit. Predpostavljamo, da je uspešnost rituksimaba manjša pri bolnikih z večjim klonom celic CD20 (večja tumorska masa). To velja tudi za naša bolnika. Glede na delno uspešnost kasnejše kemoterapije pri prvem bolniku predpostavljamo, da bi bilo pri bolnikih z večjo tumorsko maso ustreznejše sočasno zdravljenje z rituksimabom in kemoterapijo.

Poročila o zdravljenju primarne AIHA s toplimi protitelesi z rituksimabom so še redkejša kot o BHA (16–18). Za razliko od BHA je pri tej vrsti AIHA zdravljenje s kortikosteroidi in splenektomijo pri večini bolnikov uspešno. Poročila o zdravljenju z rituksimabom se zato nanašajo le na bolnike, pri katerih je bilo zdravljenje z glukokortikoidi in imunosupresivno zdravljenje s ciklofosfamidom ali klorambucilom neuspešno. O učinkovitosti zdravljenja z rituksimabom so poročali tudi pri bolnikih s sočasno AIHA in avtoimunsko trombocitopenijo (Evansov sindrom), in nekaterih sekundarnih AIHA (17, 19–24). Tudi pri našem bolniku z AIHA s toplimi protitelesi smo se odločili za zdravljenje z rituksimabom potem, ko je postalo imunosupresivno zdravljenje s ciklofosfamidom neuspešno. Veliki odmerki glukokortikoidov zaradi predhodne steroidne psihoze niso prihajali v poštev. Z rituksimabom smo dosegli remisijo AIHA, ki traja že 5 mesecev. Pri naših bolnikih med zdravljenjem z rituksimabom nismo opazovali večjih neželenih učinkov. Nastanek tromboze subklavijske vene, v katero je bil vstavljen kateter, bi težko pripisali infuzijam rituksimaba. Dejavnik tveganja je predvsem zagon hemolize.

Zaključki

Glede na podatke iz literature in naše izkušnje ocenjujemo, da je zdravljenje z rituksimabom sorazmerno varno za izbrane bolnike z AIHA. Sem sodijo predvsem bolniki z BHA, čeprav zaenkrat ni možno vnaprej napovedati, pri katerih bolnikih bo zdravljenje učinkovito. Za bolnike z BHA in večjo tumorsko maso bo morda primernejša kombinacija rituksimaba s citostatiki. Za zdravljenje z rituksimabom so primerni tudi redki bolniki z AIHA s toplimi protitelesi, pri katerih zdravljenje z glukokortikoidi in splenektomijo ni uspešno.

Literatura

1. Packman CH. Acquired hemolytic anemia due to warm-reacting autoantibodies. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U eds. Williams hematology. 6th ed. New York: McGraw Hill, 2001: 649–55.
2. Packman CH. Cryopathic hemolytic syndromes. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U eds. Williams hematology. 6th ed. New York: McGraw Hill, 2001: 639–48.
3. Schwartz RS, Berkman EM, Silberstein LE. Autoimmune hemolytic anemia. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. Hematology, Basic principles and practice. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 2000: 611–30.
4. Boyle J, Elter T, Engert A. An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Annals of Oncology* 2003; 14: 520–35.
5. Berentsen S, Bo K, Shammas FV, Myking AO, Ulvestad E. Chronic cold agglutinin disease of the "idiopathic" type is a premalignant or low-grade malignant lymphoproliferative disease. *APMIS* 1997; 105: 354–62.
6. Berentsen S, Ulvestad E, Gjertsen BT et al. Rituximab for primary chronic cold agglutinin disease: a prospective study of 37 courses of therapy in 27 patients. *Blood* 2004; 103: 2925–8.
7. Berentsen S, Tjonnfjord GE, Brudevold R et al. Favourable response to therapy with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in primary chronic cold agglutinin disease. *Br J Haematol*. 2001; 115: 79–83.
8. Engelhardt M, Jakob A, Ruter B, Trepel M, Hirsch F, Lubbert M. Severe cold agglutinin disease successfully treated with rituximab. *Blood* 2002; 100: 1922–1.
9. Zaja F, Russo D, Fuga G, Michelutti T, Sperotto A, Fanin R, Bacarani M. Rituximab in a case of cold agglutinin disease. *Br J Haematol* 2001; 115: 232–2.
10. Gharib M, Poynton C. Complete, long-term remission of refractory idiopathic cold agglutinin disease after Mabthera. *Br J Haematol* 2002; 117: 248–9.
11. Pulik M, Benet P, Lionnet F, Touahri T. Treatment of primary chronic cold agglutinin disease with rituximab: maintenance therapy may improve results. *Br J Haematol* 2002; 117: 889–9.

12. Bauder F. Rituximab: a very efficient therapy in cold agglutinins and refractory autoimmune haemolytic anaemia associated with CD20-positive, low grade non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2001; 112: 1085-6.
13. Mori A, Tamaru J, Sumi H, Kondo H. Beneficial effect of rituximab on primary cold agglutinin disease refractory to conventional therapy. *Uer J Haematol* 2002; 68: 243-6.
14. Sparling TG, Andricevic M, Wass H. Remission of cold hemagglutinin disease induced by rituximab therapy. *CMAJ* 2001; 164: 1406-6.
15. Lee EJ, Kueck B. Rituxan in the treatment of cold agglutinin disease. *Blood* 1998; 92: 13490-1.
16. Morselli M, Luppi M, Potenza L et al. Mixed warm and cold autoimmune hemolytic anemia: complete recovery after 2 courses of rituximab treatment. *Blood* 2002; 99: 3478-9.
17. Ahrens N, Kingreen D, Seltsam A, Salama A. Treatment of refractory autoimmune haemolytic anaemia with anti-CD20 (rituximab). *Br J Haematol*. 2000; 114: 244-5.
18. Shanafelt TD, Madueme HL, Wolf RC, Tefferi A. Rituximab for immune cytopenia in adults: idiopathic thrombocytopenic purpura, autoimmune hemolytic anemia, and Evans syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2003; 78: 1340-6.
19. Zaja F, Iacona I, Masolini P et al. B-cell depletion with rituximab as treatment for immune hemolytic anemia and chronic thrombocytopenia. *Haematologica*. 2002; 87: 189-95.
20. Gupta N, Kavuru S, Patel D, Janson D, Driscoll N, Ahmed S, Rai KR. Rituximab-based chemotherapy for steroid-refractory autoimmune hemolytic anemia of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002; 16: 2092-5.
21. Chemnitz J, Draube A, Diehl V, Wolf J. Successful treatment of steroid and cyclophosphamide-resistant hemolysis in chronic lymphocytic leukemia with rituximab. *Am J Hematol*. 2002; 69: 232-3.
22. Zecca M, De Stefano P, Nobili B, Locatelli F. Anti-CD20 monoclonal antibody for the treatment of severe, immune-mediated, pure red cell aplasia and hemolytic anemia. *Blood* 2001; 97: 3995-7.
23. Hofer S, Hunziker S, Dirnhofer S, Ludwig C. Rituximab effective in a patient with refractory autoimmune haemolytic anaemia and CD20-negative multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003; 122: 690-1.
24. Perrotta S, Locatelli F, La Manna A, Cennamo L, De Stefano P, Nobili B. Anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) for life-threatening autoimmune hemolytic anaemia in a patient with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol*. 2002; 116: 465-7.
25. Corti P, Bonanomi S, Vallinoto C et al. Rituximab for immune hemolytic anemia following T- and B-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol* 2003; 109: 43-5.