

Transfusionsmedizinische Labordiagnostik

Indikationen, Methoden, Bewertung

Prof. Dr. V. Kiefel

Institut für Transfusionsmedizin

Manuskripte

- **Praktikumsskript**, auf der Lehre-Seite des Instituts für Transfusionsmedizin (**Ausdrucken und mitbringen!**):
<http://transfusion.med.uni-rostock.de/lehre/lehrveranstaltungen/>
- **Manuskript/Kurzlehrbuch**:
<http://transfusion.med.uni-rostock.de/fileadmin/Institute/tmed/tmed.pdf>

2

Lernziele

- Prinzip immunhämatologischer Untersuchungstechniken
- Transfusionsreaktionen
 - akute hämolytische Transfusionsreaktion
 - verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion (DHTR: „delayed hemolytic transfusion reaction“)
- Pathophysiologie des *morbus haemolyticus neonatorum* (MHN)
- Autoimmunhämolytische Anämie
- Grundlagen der ABO und Rhesus-Blutgruppensysteme
- Weitere Blutgruppensysteme

3

Immunpathogene Folgereaktionen

- **Typ I-Reaktion**: anaphylaktische Immunreaktion
- **Typ II-Reaktion**: antikörpervermittelte Reaktion vom zytotoxischen Typ
- **Typ III-Reaktion**: immunkomplexvermittelte Reaktion
- **Typ IV-Reaktion**: zellulär vermittelte Immunreaktion

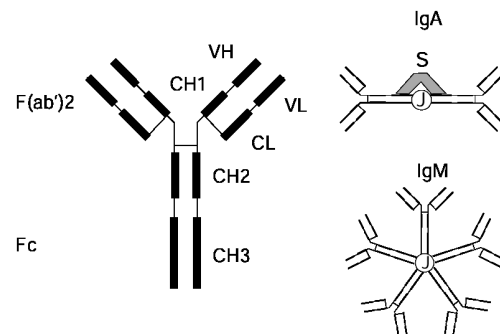
4

Immunreaktionen gegen Blutzellen

- **Alloantikörper**
 - gerichtet gegen Alloantigene: **genetisch determinierte Varianten** von Membranstrukturen von Blutzellen
 - Reaktion mit eigenen Blutzellen: **nein**
 - Reaktion mit Zellen von fremden Individuen: **Muster**
 - Auslöser von Transfusionsreaktionen: **oft ja**
- **Autoantikörper**
 - gerichtet gegen monomorphe Determinaten auf Membranstrukturen von Blutzellen
 - Reaktion mit eigenen Blutzellen: **ja**
 - Reaktion mit Zellen von fremden Individuen: **meist alle Zellen**
 - Auslöser von Transfusionsreaktionen: **meist nein**

5

Immunglobuline



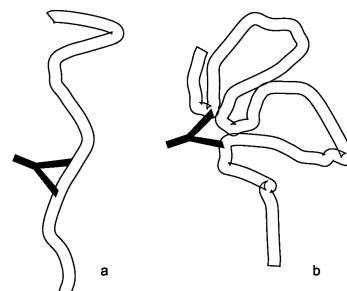
6

Immunglobulinklassen

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
H-Kette	γ	α	μ	δ	ϵ
Subklassen (H-Kette)	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	α_1, α_2	μ_1, μ_2		
L-Kette	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ	κ, λ
Molekulare Formel	γ_2L_2	$\alpha_2L_2, (\alpha_2L_2)_2S_2J^2$	$(\mu_2L_2)_5J$	δ_2L_2	ϵ_2L_2
Sedimentationskoeffizient	6-7	7	19	7-8	8
MW (kDa)	150	160-1400 ^d	900	180	190
Komplementaktivierung	+	0	+++	0	0
HWZ (Tage)	23	6	5	3	2

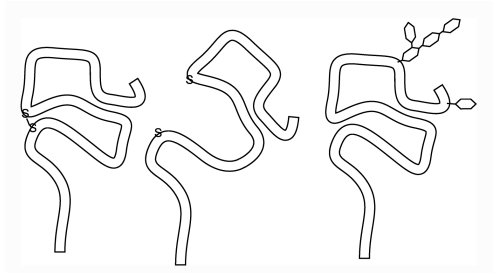
7

Sequenzspezifische, konformationsspezifische Epitope



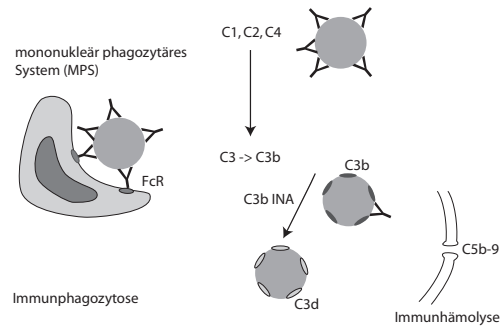
8

Blutgruppen tragende Proteine – Konformationsänderung durch Reduktion von Disulfidbrücken, Oligosaccharide als immunogene Determinanten



9

Extravasale/intravasale Hämolyse



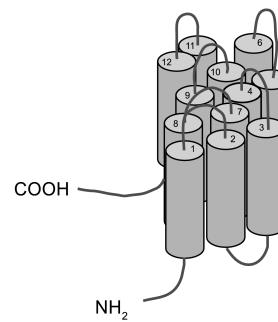
10

ABO-Antigene, immunogene Determinanten



13

Rhesus D tragendes Protein der Erythrozytenmembran



14

Transfusionsreaktionen

15

Transfusionsreaktionen

- Hämolytische Transfusionsreaktionen
 - akute hämolytische Transfusionsreaktion
 - verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion (DHTR: „delayed hemolytic transfusion reaction“)
 - nicht immunologisch induzierte Hämolysen
- febrile, nicht hämolytische Transfusionsreaktionen (FNHTR)
- anaphylaktische Transfusionsreaktionen
- transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI)
- posttransfusionelle Purpura (PTP)
- passive alloimmune Thrombozytopenie
- Transfusionsassoziierte Graft-versus-Host-Krankheit (TA-GvHK)

16

Transfusionsreaktionen – immunologische Einordnung

- **Typ I-Reaktion:** Anaphylaktische Transfusionsreaktionen
- **Typ II-Reaktion:** Hämolytische Transfusionsreaktionen, febrile Transfusionsreaktionen, Alloimmunthrombozytopenie, alloimmune Neutropenie
- **Typ III-Reaktion:** Serumkrankheit
- **Typ IV-Reaktion:** Transfusionsassoziierte Graft-versus-Host-Krankheit (TA-GvHD), Transplantatabstoßung

17

Akute hämolytische Transfusionsreaktion

- **Häufige Ursachen:** ABO-inkompatible Transfusion; seltener Anti-vel, Anti-PP₁P^k
- **Pathophysiologie:** Reaktion eines Alloantikörpers im Empfängerplasma mit den transfundierten Erythrozyten: Ak-Ag-vermittelte Komplementaktivierung, **intravasale Hämolyse**
- **Klinische Symptome:** Wärmegefühl, dann Frösteln, Temperaturanstieg, Schüttelfrost, „Flankenschmerz“, Brechreiz, Unruhe, Kreislaufinsuffizienz, Hämoglobinurie
- **Folgezustände:** DIC, Nierenversagen

18

Verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion („delayed hemolytic transfusion reaction“ (DHTR))

- Transfusion vorimmunisierter Patienten bei nicht mehr nachweisbaren Alloantikörperkonzentrationen mit Ag-positiven Ek ⇒ **anamnestische Immunantwort** ⇒ Lyse der transfundierten Erythrozyten ⇒
 - HB-Abfall
 - Ikterus, Fieber(!) 5–7 Tage nach Transfusion
 - bei manchen Patienten scheinen eigene Erythrozyten in den Abbau mit einbezogen zu werden
- **Diagnose:** Direkter Antiglobulintest, Untersuchung eines Eluats in einer Antikörperdifferenzierung
- **Zur Vermeidung:** Einmal festgestellte **Alloantikörper** werden in einen Blutgruppenpaß des Patienten **zu dokumentieren**.

19

Weitere Erkrankungen, die auf erythrozytären Antikörpern beruhen

20

Autoimmunhämolytische Anämien

- Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) vom Wärmetyp
- Kälteagglutininkrankheit
 - akut reversible Kälteagglutininkrankheit
 - chronische Kälteagglutininkrankheit
 - paroxysmale Kältehämoglobinurie (Donath–Landsteiner)
 - * akut reversible Form bei Kleinkindern
 - * chronische Verlaufsform bei Erwachsenen (z. B. bei Lues)
- medikamentinduzierte Immunhämolyse

21

Autoimmunhämolytische Anämie vom Wärmetyp

- Patienten aller Altersgruppen betroffen, die meisten Erkrankungen treten zwischen 60 und 70 Jahren auf, etwa 60 % der betroffenen Patienten sind weiblich,
- Symptome: Blässe, Schwächegefühl, Ikterus, seltener Fieber, Hämoglobinurie,
- Bei 50–60% der Patienten mäßige Splenomegalie,
- Leukozytenzahl ist normal bei der Hälfte der Patienten, Erhöhungen werden vor allem während akuter hämolytischer Perioden beobachtet.
- Bei Patienten mit mäßiger bis schwerer Hämolyse fällt nicht selten eine hereditäre Sphärozytose auf, bei schwerer Hämolyse werden Fragmentozyten gesehen.
- Typisch ist eine Erhöhung der Retikulozytenzahl, bei manchen Patienten wird aber auch eine Retikulozytopenie festgestellt.

22

Transfusion bei Patienten mit AIHA vom Wärmetyp¹

Retrospektive Untersuchung bei 79 Patienten mit serologischen Befunden einer AIHA vom Wärmetyp (DAT mit eluierbaren Wärmeautoantikörpern, Transfusion an mind. 2 Zeitpunkten, serologische Nachuntersuchung mindestens zweimal in den ersten 6 Monaten nach Beginn der Transfusionstherapie):

- 0/53 Patienten, die wegen einer dekompensierten AIHA vom Wärmetyp transfundiert wurden, entwickelten **erythrozytäre Alloantikörper**.
- 26 Patienten waren zum Zeitpunkt der ersten Transfusion frei von Autoantikörpern und entwickelten anschließend Wärmeautoantikörper, 23 von diesen entwickelten auch irreguläre erythrozytäre Alloantikörper.

Schlußfolgerungen

- Patienten mit einer dekompensierten WT-AIHA sollten Erythrozytentransfusionen aus Furcht vor Alloantikörpern nicht vorenthalten werden.
- Manche Patienten (ohne AIHA) entwickelten **nach** einer Erythrozytentransfusion **Autoantikörper und Alloantikörper**.

¹Salama et al., *Lancet* 1992;340:1515

23

Diagnostik der AIHA vom Wärmetyp

- Ak-Screening → Differenzierung
- DAT mit polyspezifischen Seren (IgG+C3d)
- DAT mit monospezifischen Seren (IgG, C3d, ggf. IgA)
- Eluat (pH 2.8, Äther, Chloroform) → Differenzierung
- Einzelheiten zur Diagnostik
 - DD: verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion
 - antikörperbeladene Erythrozyten ohne Hämolyse
 - leichte Komplementbeladung bei Intensivpatienten

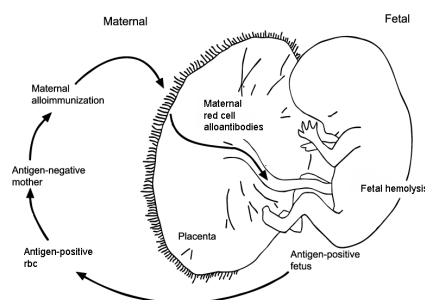
24

Morbus haemolyticus neonatorum durch Anti-D

- Mütterliche Alloimmunisierung (meist im Wochenbett) führt bei Rhesus-D negativer Mutter (fetomaternale Transfusion) zu Alloimmunisierung
- Bei Folgeschwangerschaften mit D. Feten und Transfer von Anti-D über die Placenta in den Feten: Hämolyse
- Fetale Anämie, *Hydrops fetalis*, Neugeborenes: **Ikterus** mit mögl. neurologischen Dauerschäden: Kernicterus

25

Morbus haemolyticus neonatorum



26

**Morbus haemolyticus neonatorum:
Therapie/Prophylaxe**

- Intrauterine Transfusionen
- Beim Neugeborenen Austauschtransfusionen, Phototherapie
- Prophylaxe durch Anti-D an die Mütter bei gegebener Risikokonstellation

28

Morbus haemolyticus neonatorum: **Konstellation bei der immunhämatologischen Untersuchung**

- Serum der Mutter: **Anti-D** oder anderer irregulärer erythrozytärer Antikörper
- Direkter Antiglobulintest beim Neugeborenen (DAT, Coombs-Test): **positiv**
- Direkter Antiglobulintest bei der Mutter: negativ
- Eluat Erythrozyten beim Neugeborenen: **positiv** (z. B. Anti-D)

29

Morbus haemolyticus neonatorum: **Auswahl kompatibler Erythrozyten für Transfusionen beim Feten/Neugeborenen**

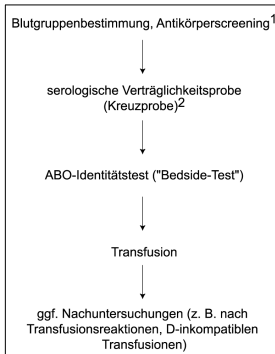
- ABO-kompatibel für Neugeborenes (und Mutter), in Zweifelsfällen O
- Alloantikörper-kompatibel in Bezug auf den Alloantikörper der Mutter (dd bei Anti-D der Mutter)
- Kreuzprobe mit
 1. Blut der Mutter
 2. Blut des Kindes, sofern ausreichend vorhanden

30

**Transfusionsimmunologische
Labormethoden
(Antikörper gegen) Antigene auf
Blutzellen**

31

Erythrozytenimmunologische Untersuchungen vor Transfusionen

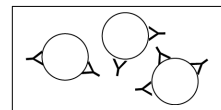
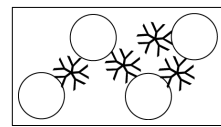


Proben für (1) und (2) müssen **aus zwei getrennten Entnahmen** stammen

33

Vorbereitung Praktikum: Nachweis erythrozytärer Antikörper in Agglutinationstests

- „Komplette“ Antikörper, meist IgM, Beispiele: Anti-A, -B
- „Inkomplette“ Antikörper, meist IgG, Beispiele: Anti-D, Anti-Kell



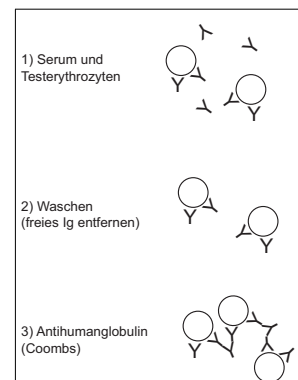
34

Nachweis „inkompletter“ erythrozytärer Antikörper

1. Supplemente: Zellsuspension in Albuminlösung (Rinderalbumin)
2. Enzymbehandlung (Proteasen) der Erythrozyten: Bromelin, Ficin, Papain
3. Indirekter Antiglobulintest (IAT)

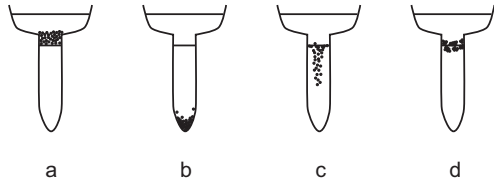
35

Indirekter Antiglobulintest



36

Gelzentrifugationstest



37

Gelzentrifugationstest



38

ABO-Blutgruppenbestimmung

Blutgruppe	Antigene		Isoagglutinine			
	Anti-A	Anti-B	A1	A2	B	O
A	+	-	-	-	+	-
B	-	+	+	(+)	-	-
O	-	-	+	(+)	+	-
AB	+	+	-	-	-	-

39

Zulässige Konstellationen für ABO-ungleiche Erythrozytentransfusionen

Patient	kompatible Erythrozytenkonzentrate
A	A oder O
B	B oder O
O	nur O
AB	AB, A, B, oder O

41

ABO-Blutgruppen: Häufigkeit in Deutschland²

- | | | |
|----|-------|--|
| O | 41.2% | • Häufigkeiten der A-Untergruppen
A ₁ :A ₂ 5:1 |
| A | 43.3% | |
| B | 10.7% | • Weitere (seltene) schwache A-Varianten: A ₃ , A _x , A _m , A _{el} |
| AB | 4.8% | |
| | | • Schwache B-Varianten sind extrem selten |

²Wagner FF et al., *Infusionsther. u. Transfusionsmed.* 1995;22:285

42

Rhesus D: abgestufte Ausprägung

Rhesus positiv (D) (ca. 85%) $C\bar{c}D.\bar{e}\bar{e}, C\bar{c}D.E\bar{e}$ etc.

D^{weak} (verminderte Expression)

D^{VI} (sog. Partial-D)

Rhesus-negativ (dd) (ca. 15%) $\bar{c}\bar{c}d\bar{d}\bar{e}\bar{e}, C\bar{c}d\bar{d}\bar{e}\bar{e}, \bar{c}\bar{c}d\bar{d}E\bar{e}$

46

Klinisch relevante Rhesusantigene

- D, C, c, [C^w], E, e;

- Bestimmung des Rhesus-Phänotyps:

Anti-C	Anti-c	Anti-D	Anti-E	Anti-e	
+	+	+	-	+	→ $C\bar{c}D.\bar{e}\bar{e}$

Anti-C	Anti-c	Anti-D	Anti-E	Anti-e	
-	+	-	-	+	→ $\bar{c}\bar{c}d\bar{d}\bar{e}\bar{e}$

47

Frequenzen häufiger Rhesus-Phänotypen

Rhesus positiv	
CcDee	30,11%
CCDee	16,63%
CcDEe	10,65%
ccDEe	9,57%
ccDEE	1,72%
ccDee	1,41%
CCDEe	0,12%
CcDEE	0,03%
CCDEE	0,0003%
Rhesus negativ	
ccdde	15,81%
Ccddde	0,83%
ccddEe	0,43%
CcddEe	0,00016%
CcddEE	0,00016%

48

Bildung von Alloantikörpern nach Rhesus-inkompatibler Transfusion

Rhesus-Phänotyp	mögliche Alloantikörper
öddēē	Anti-D (-C, -E)
CöD.ēē	Anti-E
CöD.Eē	-
CCD.Eē	Anti-ċ
CCD.ēē	Anti-ċE

49

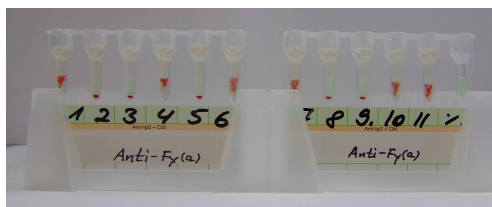
Diagnostik irregulärer erythrozytärer Antikörper

Antikörperscreening: Patientenserum mit 3 „Suchzellen“ (Blutgruppe O) untersuchen, bei positivem Resultat:

Antikörperdifferenzierung: Patientenserum mit 8–11 oder mehr Zellen (Blutgruppe O) testen, serologische Spezifität (z. B. Anti-Fy^a) anhand des Reaktionsmusters mit den Testzellen ermitteln.

50

Antikörperdifferenzierung



51

Antikörperdifferenzierung (1)

	D	C	E	c	e	K	k	...	Resultat
1	+	+	-	-	+	-	+	...	4
2	+	+	-	+	+	-	+	...	4
3	+	+	-	-	+	-	+	...	4
4	+	+	+	+	+	-	+	...	4
5	-	+	-	+	+	-	+	...	0
6	-	-	-	+	+	-	+	...	0
7	+	-	+	+	+	+	+	...	4
...

Resultat: Anti-D

52

Antikörperdifferenzierung (2)

	D	C	E	c	e	K	k	...	Resultat
1	+	+	-	-	+	-	+	...	4
2	+	+	-	+	+	-	+	...	4
3	+	+	-	-	+	-	+	...	4
4	+	+	+	+	+	-	+	...	4
5	-	+	-	+	+	-	+	...	2
6	-	-	-	+	+	-	+	...	0
7	+	-	+	+	+	+	+	...	3
...

Resultat: Anti-CDE, Anti-D nicht auszuschliessen

53

Antikörperdifferenzierung (3)

	D	C	E	c	e	K	k	...	Resultat
1	+	+	-	-	+	-	+	...	0
2	+	+	-	+	+	-	+	...	0
3	+	+	-	-	+	-	+	...	0
4	+	+	+	+	+	-	+	...	3
5	-	+	-	+	+	-	+	...	0
6	-	-	-	+	+	-	+	...	0
7	+	-	+	+	+	+	+	...	4
...

Resultat: Anti-E, Anti-K nicht auszuschliessen

54

Serologische Verträglichkeitsprobe: „Kreuzprobe“

Majoransatz: Empfängerserum + Spendererythrozyten
Minoransatz: Spenderplasma + Empfängererythrozyten

- Die serologische Verträglichkeitsprobe (Majoransatz) wird in verschiedenen Reaktionsmilieus angesetzt (NaCl-Ansatz, Enzymansatz, indirekter Antiglobulintest), um auch „inkomplette“ IgG-Antikörper zu erfassen.
- Der Minoransatz spielt heute praktisch keine Rolle mehr

55

Serologische Verträglichkeitsprobe: „Kreuzprobe“

1	2	3	4	5	6	7	8
Kreuzprobe			leer	Empf.		Kons.	
NaCl	Enzym	Eigenans.		Anti-A	Anti-B	Anti-A	Anti-B
-	-	-		+	-	-	-
-	(+)	-		+	-	+	-
+++	+++	-		-	-	+	-

56

Weitere erythrozytäre Blutgruppen: Kk, MNSs

Kell-System	
Genotyp	Frequenz
K/K	0.2 %
K/k	8.8 %
k/k	90.9 %

Klinische Bedeutung MHN, hämolytische TR

Phänotyp	Frequenz	
	Weißer	Farbige (USA)
M+, N-	28 %	25 %
M+, N+	50 %	49 %
M-, N+	22 %	26 %

Phänotyp	Frequenz	
	Weißer	Farbige (USA)
S+, s-	11 %	5.9 %
S+, s+	44 %	25.5 %
S-, s+	45 %	68.1 %
S-, s-	0	1.5 %

57

Weitere erythrozytäre Blutgruppen: Fy, Jk

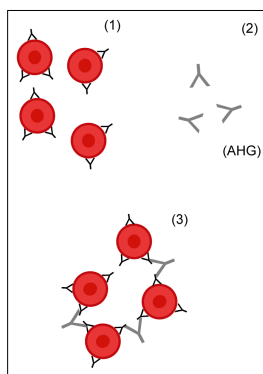
Phänotyp	Frequenz	
	Weißer	Afrikaner
Fy(a+b-)	17	9
Fy(a+b+)	49	1
Fy(a-b+)	34	22
Fy(a-b-)	< 0.1	68

Phänotyp	Frequenz
Jk(a+b-)	27.5
Jk(a+b+)	49.4
Jk(a-b+)	32.1
Jk(a-b-)	< 0.1

Personen mit Fy(a-b-)-Phänotyp sind vor Infektionen mit *plasmodium vivax* (M. tertiana) geschützt

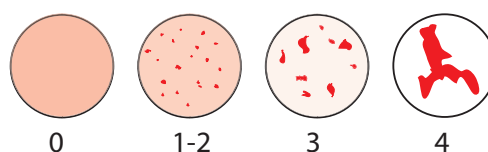
58

Direkter Antiglobulintest



59

Erythrozyten-Agglutination: Scores



60

Indikationen zum direkten Antiglobulintest

- Autoimmunhämolytische Anämie (→ erythrozytärer Autoantikörper im Eluat)
- Transfusionsreaktion, z. B. verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion (→ irregulärer erythrozytärer Alloantikörper im Eluat)
- Neugeborenes mit einem *morbus haemolyticus neonatorum* (→ irregulärer erythrozytärer Alloantikörper im Eluat)

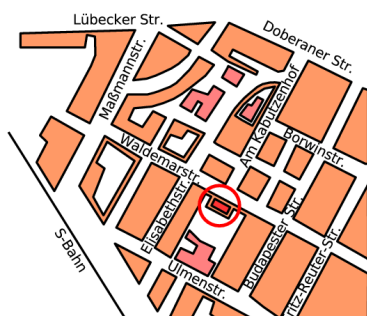
62

Vorbereitung auf die Kurseinheit

1. Dies ist eine **Praktikumseinheit!** Bitte Kittel und Praktikumsanleitung mitbringen
2. Praktikumsanleitung lesen und die darin empfohlene Literatur (Skript)

64

Blutspende am Univ.-Klinikum Rostock³



www.med.uni-rostock.de/blut-spenden

³18057 Rostock, Waldemarstr. 21d, Tel. (0381) 2033630

66