

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

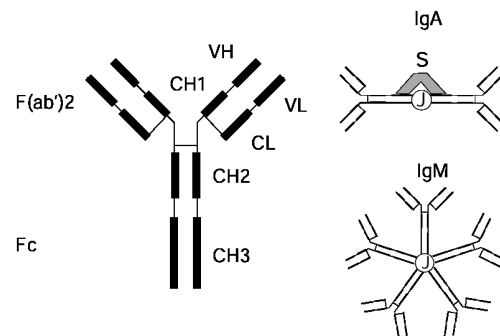
4

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



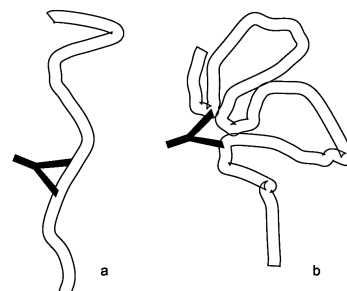
6

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

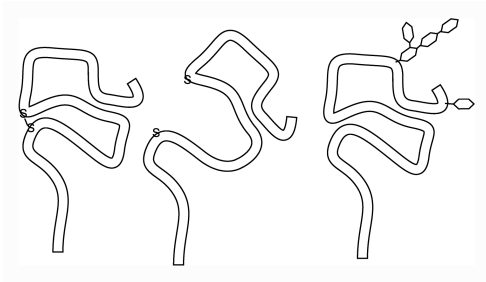
7

Sequenzspezifische, konformationsspezifische Epitope



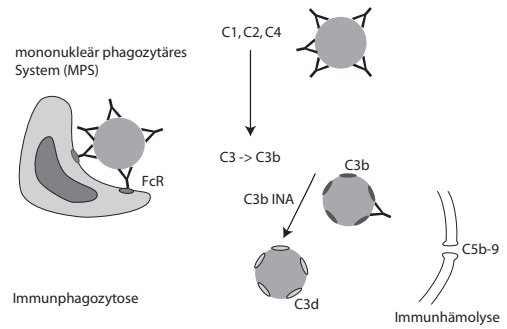
8

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



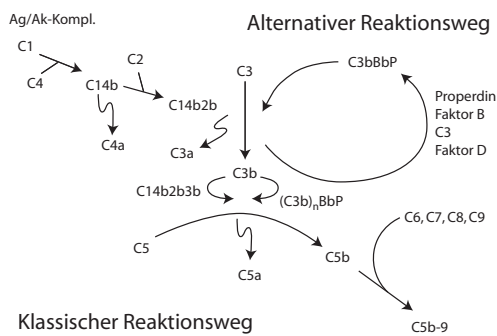
9

Extravasale/intravasale Hämolyse



10

Komplement



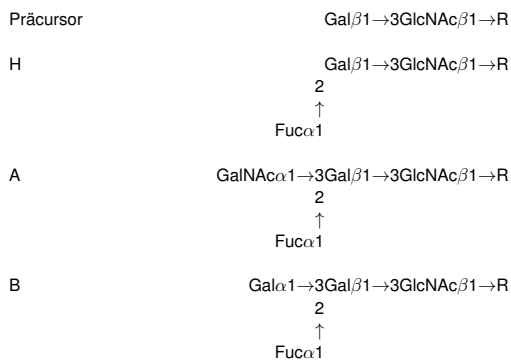
11

Phagozytose antikörperbeladener Erythrozyten



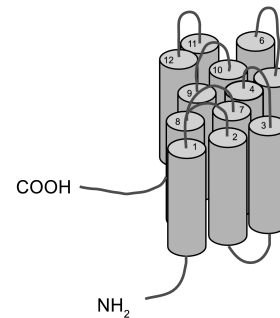
12

ABO-Antigene, immunogene Determinanten



13

Rhesus D tragendes Protein der Erythrozytenmembran



14

Transfusionsreaktionen

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)

15

16

<p>Transfusionsreaktionen – immunologische Einordnung</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 <p style="text-align: right;">17</p>	<p>Akute hämolytische Transfusionsreaktion</p> <ul style="list-style-type: none"> • Häufige Ursachen: ABO-inkompatible Transfusion; seltener Anti-Vel, Anti-PP_1P^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 <p style="text-align: right;">18</p>
<p>Verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion („delayed hemolytic transfusion reaction“ (DHTR))</p> <ul style="list-style-type: none"> • Transfusion vorimmunisierter Patienten bei nicht mehr nachweisbaren Alloantikörperkonzentrationen mit Ag-positiven Ek ⇒ anamnestische Immunantwort ⇒ Lyse der transfundierten Erythrozyten ⇒ <ul style="list-style-type: none"> – 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. <p style="text-align: right;">19</p>	<p style="text-align: center;">Weitere Erkrankungen, die auf erythrozytären Antikörpern beruhen</p> <p style="text-align: right;">20</p>
<p>Autoimmunhämolytische Anämien</p> <ul style="list-style-type: none"> • Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) vom Wärmetyp • Kälteagglutininkrankheit <ul style="list-style-type: none"> – akut reversible Kälteagglutininkrankheit – chronische Kälteagglutininkrankheit – paroxysmale Kältehämoglobinurie (Donath–Landsteiner) <ul style="list-style-type: none"> * akut reversible Form bei Kleinkindern * chronische Verlaufsform bei Erwachsenen (z. B. bei Lues) • medikamentinduzierte Immnhämolyse <p style="text-align: right;">21</p>	<p>Autoimmunhämolytische Anämie vom Wärmetyp</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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. <p style="text-align: right;">22</p>
<p>Transfusion bei Patienten mit AIHA vom Wärmetyp¹</p> <p>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):</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 26 entwickelten auch irreguläre erythrozytäre Alloantikörper. <p>Schlußfolgerungen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Patienten mit einer dekompensierten WT-AIHA sollten Erythrozytentransfusionen aus Furcht vor Alloantikörpern nicht vorenthalten werden. • Manche Patienten (ohne AIHA) entwickeln nach einer Erythrozytentransfusion Autoantikörper und Alloantikörper. <p>¹Salama et al., <i>Lancet</i> 1992;340:1515</p> <p style="text-align: right;">23</p>	<p>Diagnostik der AIHA vom Wärmetyp</p> <ul style="list-style-type: none"> • 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 <ul style="list-style-type: none"> – DD: verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion – antikörperbeladene Erythrozyten ohne Hämolyse – leichte Komplementbeladung bei Intensivpatienten <p style="text-align: right;">24</p>

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: Therapie/Prophylaxe

- Intrauterine Transfusionen
- Beim Neugeborenen Austauschtransfusionen, Phototherapie
- Prophylaxe durch Anti-D an die Mutter 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

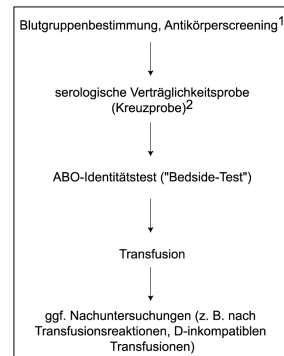
- ABO-kompatibel für Neugeborenes (und Mutter), in Zweifelsfällen O
- Alloantikörper-kompatibel in Bezug auf den Alloantikörper der Mutter (dd bei Anti-D der Mutter)
- Kreuzprobe mit
 1. Blut der Mutter
 2. Blut des Kindes, sofern ausreichend vorhanden

30

Transfusionsimmunologische Labormethoden (Antikörper gegen) Antigene auf Blutzellen

31

Erythrozytenimmunologische Untersuchungen vor Transfusionen

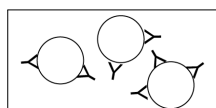
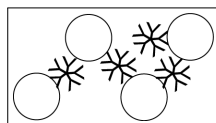


Proben für (1) und (2) müssen aus zwei getrennten Entnahmen stammen

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



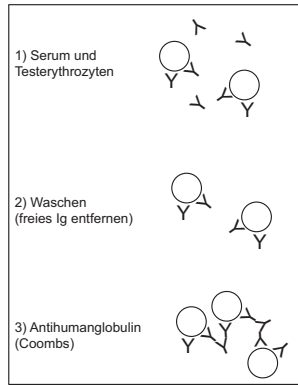
34

Nachweis „inkompletter“ erythrozytärer Antikörper

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

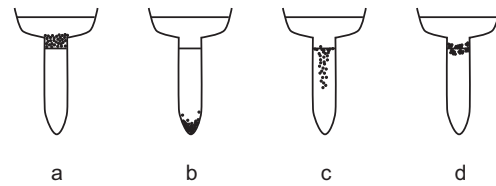
35

Indirekter Antiglobulintest



36

Gelzentrifugationstest



37

ABO-Blutgruppenbestimmung

Blutgruppe	Antigene		Isoagglutinine			
	Anti-A	Anti-B	A ₁	A ₂	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%
A 43.3%
B 10.7%
AB 4.8%

- Häufigkeiten der A-Untergruppen A₁:A₂ 5:1
- Weitere (seltene) schwache A-Varianten: A₃, A_x, A_m, A_{el}
- Schwache B-Varianten sind extrem selten

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

42

Serologische Bestimmung der Blutgruppen A₁, A₂

Reagenz	A ₁	A ₁ B	A ₂	A ₂ B
Anti-A ₁ (verd.)	+	+	-	-
Anti-A ₁ (unverd.)	++	++	(+)	-
Anti-H (verd.)	-	-	++	+
Anti-H (unverd.)	+	(+)	++	+

Anti-A₁: schwaches Anti-A, das vor allem A₁ agglutiniert
Anti-H: Antikörper oder Lectin: *ulex europaeus*

43

Beispiel: Agglutination von Erythrozyten durch Lektine



Ulex europaeus (gewöhnlicher Stechginster, [Leguminosae]): „Anti-H“

44

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 $\bar{c}d\bar{d}\bar{e}\bar{e}$

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.e \bar{e}

Anti-C	Anti-c	Anti-D	Anti-E	Anti-e
-	+	-	-	+

→ \bar{c} cdde \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 \bar{e}	15,81%
Ccdd \bar{e} e	0,83%
ccddEe	0,43%
CcddEe	0,00016%
CcddEE	0,00016%

48

Bildung von Alloantikörpern nach Rhesus-inkompatibler Transfusion

Rhesus-Phänotyp	mögliche Alloantikörper
\bar{c} cdde \bar{e}	Anti-D (-C, -E)
C \bar{c} D.e \bar{e}	Anti-E
C \bar{c} D.E \bar{e}	-
CCD.E \bar{e}	Anti- \bar{c}
CCD.e \bar{e}	Anti- \bar{c} E

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 (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 %

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

Klinische Bedeutung MHN, hämolytische TR

Phänotyp	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

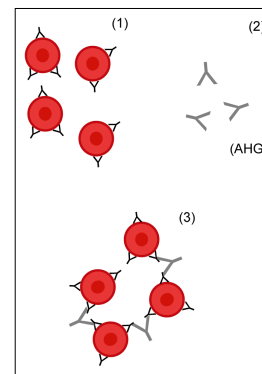
Phänotyp	Frequenz	
	Weißer	Afrikaner
Fy(a+b-)	17	9
Fy(a+b+)	49	1
Fy(a-b+)	34	22
Fy(a-b-)	< 0.1	68

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

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

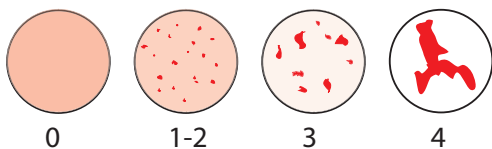
58

Direkter Antiglobulintest



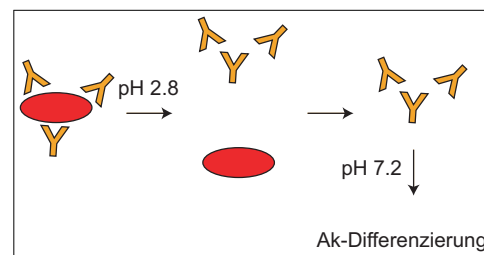
59

Erythrozyten-Agglutination: Scores



60

Charakterisierung von Antikörpern auf Erythrozyten: Elution



61

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

Inhalt der Kurseinheit

- 1. Aufgabe** Bestimmung von ABO-Blutgruppe und von Isoagglutininen
- 2. Aufgabe** Bestimmung des Merkmals Rhesus D
- 3. Aufgabe** Kreuzprobe: Majortest
- 4. Aufgabe** Identitätstest am Krankenbett („Bedside-Test“)
- 5. Aufgabe** Ableitung des Rh-Phänotyps aus einer Antigenbestimmung
- 6. Aufgabe** Antikörperdifferenzierung: Gelkarten ablesen, Herausfinden der Antikörperspezifität anhand der Antigenmatrix des Differenzierungs-Zellpanels

63

Vorbereitung auf die Kurseinheit

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

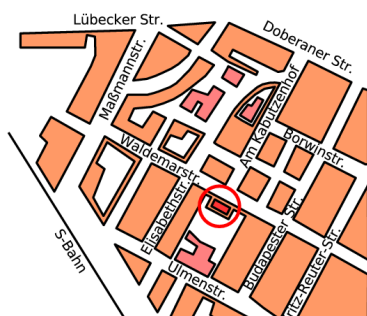
64

Zusammenfassung

- Grundlagen: der ABO-Antigene
- Serologische Bestimmung von A1, A2,
- Screening, Differenzierung irregulärer erythrozytärer Ak,
- Weitere erythrozytäre Blutgruppen (Kell, Fy, Jk, MNSs),
- Erythrozyten-Agglutination: Scores,
- Direkter Antiglobulintest (DAT) (Coombstest),
- Indirekter Antiglobulintest,
- Inhalt der Kurseinheit

65

Blutspende am Univ.-Klinikum Rostock³



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

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

66