

MVZ Laboratoriumsmedizin Koblenz-Mittelrhein

Fortbildung am 19.01.2010

**Kälteagglutinine
- Kälteagglutininkrankheit -**

Wolf D. Kuhlmann

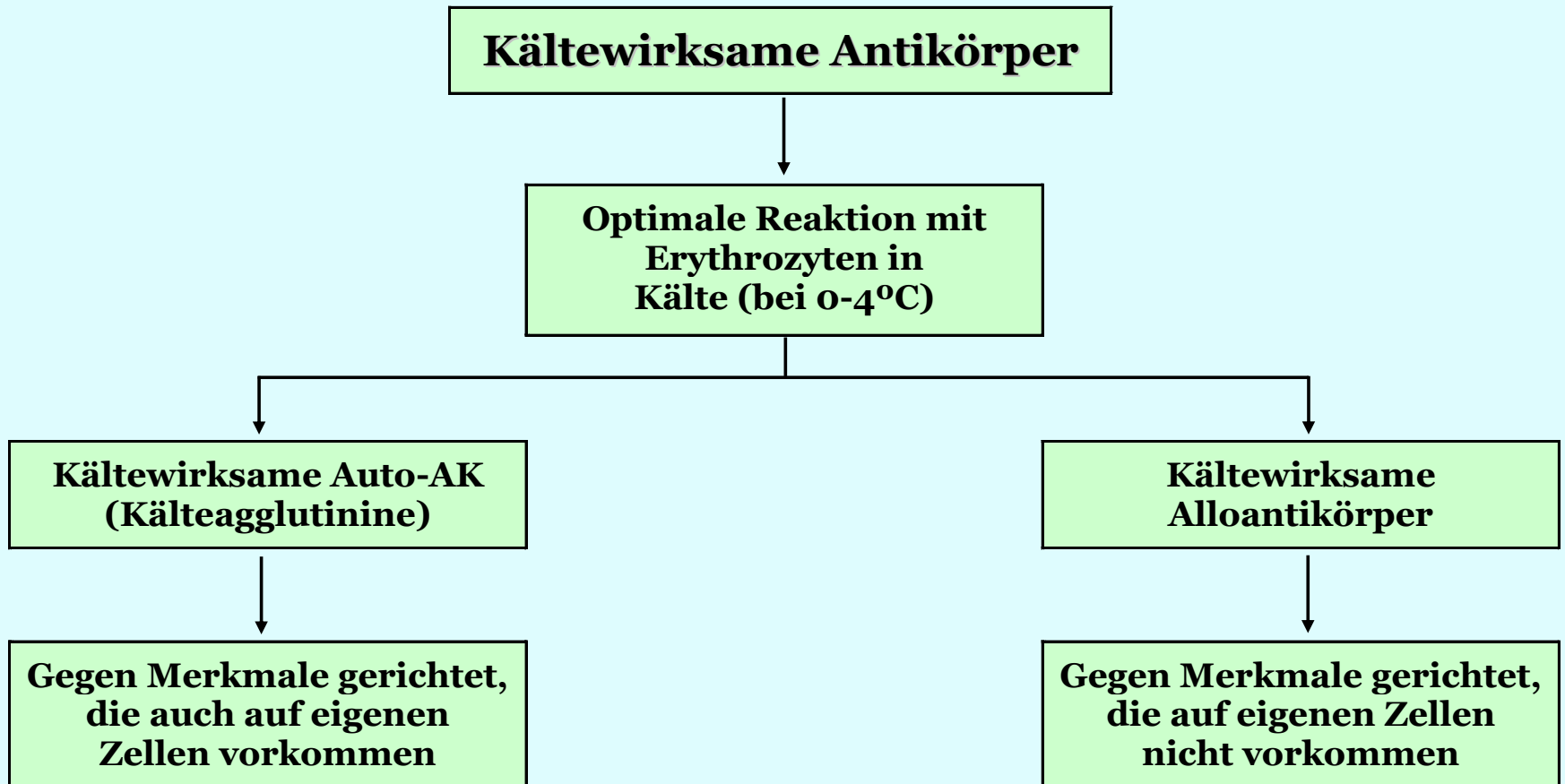
Kälteagglutination als Störfaktor

- **Erschwerte Blutabnahme**
- **Hämolytische Proben**
- **Auffälligkeiten im Blutbild**
- **Störungen bei der BG-Serologie**
- **Störungen bei der Gerinnungsdiagnostik**
- **Patient: mildes bis schweres Krankheitsgefühl**

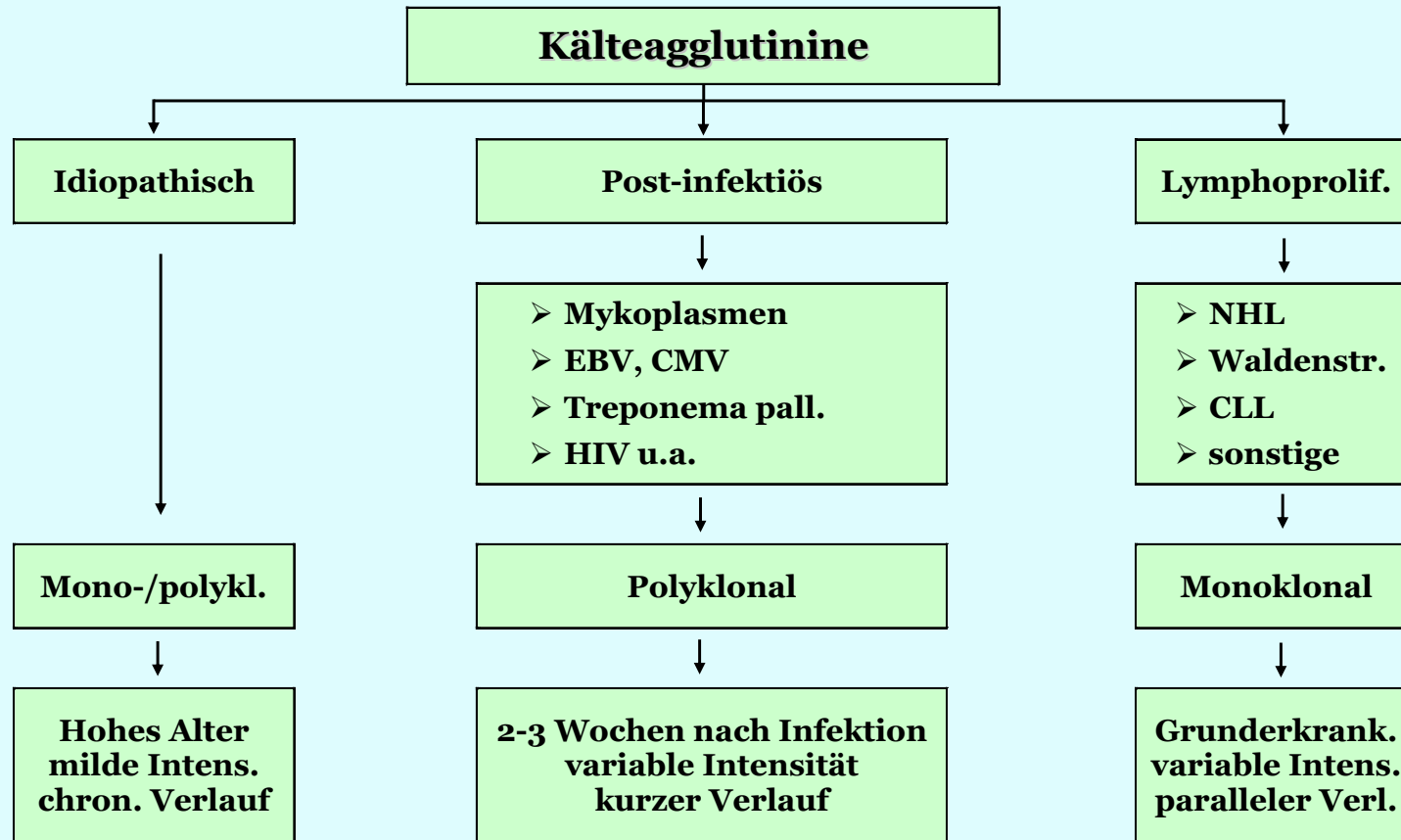
Kälteagglutination - Kälteagglutininkrankheit

- **Kälteagglutination (Erythrozyten):**
physiko-chemischer Vorgang bei Abkühlung; reversibel
- **Auslöser der Kälteagglutination: Kälteagglutinine:**
Kälte-Autoantikörper (verschiedene Immunglobulin-Isotypen)
- **Kälteagglutininkrankheit als Folge**
primäre / sekundäre Erkrankungsformen, variable Verläufe mit Übergängen von mild bis schwer, Hämolysen

Kälteagglutination



Kälteagglutination



Typisch: Hämolysen und Anämien

Hämolytische Anämien (Fünf grosse Gruppen)

- Anämien durch Enzymdefekte
- Thalassämien
- Sichelzellenkrankheiten
- Sonstige hereditäre hämolytische Anämien
- **Erworbene hämolytische Anämien**

Erworbene hämolytische Anämien

- Arzneimittel induzierte autoimmunhämolytische Anämien

- **Sonstige autoimmunhämolytische Anämien**

- Hämolytisch-urämisches Syndrom
- Sonstige nicht-autoimmunhämolytische Anämien
- Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
- Hämoglobinurie durch Hämolyse infolge sonst. äuss. Ursachen
- Sonstige erworbene hämolytische Anämien
- Erworbene hämolytische Anämie, nicht näher bezeichnet

Sonstige autoimmunhämolytische Anämien

- **Primäre autoimmunhämolytische Krankheiten**
- **Sekundäre autoimmunhämolytische Anämien**
- **Chronische Kälteagglutininkrankheit**

Beachte: diagnostische Abgrenzung von Immunhämolysen:

- Immunhämolyse durch Autoimmunhämolyse**
- Immunhämolyse durch Alloimmunhämolyse**

Autoimmunhämolytische Anämien (AIHA)

- Berücksichtigung der Temperaturbereiche -

AIHA durch Kälte-Autoantikörper

- **Akute sek. Kälteaggl. Krankheit** (Infektionen z.B. EBV)
- **Akute sek. Kälteaggl. Krankheit** (Donath-Landsteiner-Typ)
- **Chron. sek. Kälteaggl. Krankheit** (Lymphome)
- **Chron. idiopath. Kälteagglutininkrankheit** (unbekannt)

AIHA durch Wärme-Autoantikörper

- Idiopathische autoimmune hämolytische Anämie (AIHA)
- Sekundäre autoimmune hämolytische Anämie bei anderen Grunderkrankungen (SLE, Lymphome u.a.)

Akut reversible AIHA vom Kältetyp

- **Definition:**

Akute sekundäre, stets reversible AIHA nach Infektionen (s.u.)

- **Kälteagglutinine:**

Polyklonale IgM Kälte-Auto-AK (Anti-I/i), Komplement aktivierend,
Polyklonale IgG bithermische Auto-AK (Anti-P), Komplement aktiv.

- **Epidemiologie:**

Selten, vorwiegend Erwachsene (14 bis 40 Jahre, Frauen)

Ausnahme: Donath-Landsteiner-AK bei Kindern und bei Lues

- **Ätiologie**

im Anschluss an eine atypische Pneumonie, Mononukleose, andere Inf.,
Mechanismus der Auto-AK Bildung weitgehend unbekannt

- **Pathogenese**

Intravasale Hämolyse durch IgM oder IgG Autoantikörper (Anti-I/i od. P)

Chronische AIHA vom Kältetyp

- **Definition:**

Chronische idiopath. oder chronisch sek./symptomatische AIHA

- **Kälteagglutinine:**

Monoklonale anti-erythrozytäre Kälte-Auto-AK, Komplement aktivierend

- **Epidemiologie:**

Selten, vorwiegend Erwachsene

- **Ätiologie**

Monoklonale IgM Auto-AK bei (1) idiopathisch benigner monoklonaler Gammopathie oder (2) symptomatisch bei lymphoprolif. Erkrankungen

- **Pathogenese**

Intravasale Hämolyse durch hochtitrige IgM Kälte-Autoantikörper, zum geringen Teil auch extravasale Hämolyse

Akut reversible AIHA, Donath-Landsteiner

- **Definition:**

Akutes Syndrom, reversibel, intravasale Hämolyse nach Virusinfektion

- **Kälteagglutinine:**

Polyklonale IgG (selten IgM) Kälte-Auto-AK, Komplement aktivierend

- **Epidemiologie:**

Kinder <10 Jahre, Erwachsene (Lues); Klinik s. später

- **Ätiologie**

Polyklonale Auto-AK nach/bei viralen Infektionen, Mechanismus der Auto-AK Bildung nicht hinreichend bekannt

- **Pathogenese**

Intravasale Hämolyse durch meist niedrigtitrige (meist) IgG Kälte-Auto-AK (Anti-P), biphasisch, bei Temp. > 10 Grad Celsius Komplementakt.

Klinik - AIHA vom Kältetyp

- **Abblassung der Akren, Akrozyanose und sekundäres Raynaud-Phänomen (weiss/blau/rot)**
- **Schmerzen, Kälte-Urtikaria (Nekrosen, Ulcus cruris)**
- **Fieber, Blutdruckabfall, Schock**
- **Chronische Anämie (meist milde Hämolyse)**
- **Haut-/Sklerenikterus, Milz-/Lebervergrößerung**
- **Hämoglobinurie, Nierenversagen**
- **Kritisch: hohe AK-Titer, Wärmeamplitude . . .**

Klinik - AIHA vom Kältetyp (DL)

- **Synonym: Paroxysmale Kältehämoglobinurie**

- **Hämoglobinurie, Ikterus, Hb-Abfall
Milz- und Lebervergrößerung**

- **Akut passager, spontane Rückbildung (nach Virusinf.)**

- **Chronisch bei Erwachsenen (Luesinfektion)**

- **Diagnosesicherung: Donath-Landsteiner-Test
(biphasische Kältehämolysine)**

AIHA vom Kältetyp – Auffälligkeiten im Labor

- **Differentialblutbild:**

Agglutinationen (!), MCH/MCHC (!), Polychrom., Retikulozytose, Erythrozyten

- **Hämolyseparameter:**

LDH, Haptoglobin, ind. Bilirubin, Urobilinogen, freies Hb, Eisen

- **Gammopathie:**

monoklonale Immunglobuline (Paraproteine)

- **Coombsstest (direkt, indirekt):**

EK und DCT bei AIHA positiv

- **Probleme bei serologischen Tests:**

Panagglutination durch Auto-Antikörper

Kälteagglutinine nicht mit Kryoglobulinen verwechseln !

Antikörper im „Labor-Jargon“

Antikörperbezeichnungen

IgG Immunglobulin



Immunantikörper

Wärmeantikörper

Conglutin. Antikörper

Inkomplette Antikörper

IgM Immunglobulin

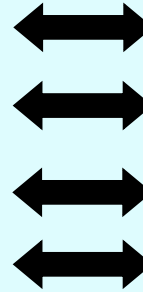


„Natürliche“ Antikörper

Kälteantikörper

Agglutinierende Antikörper

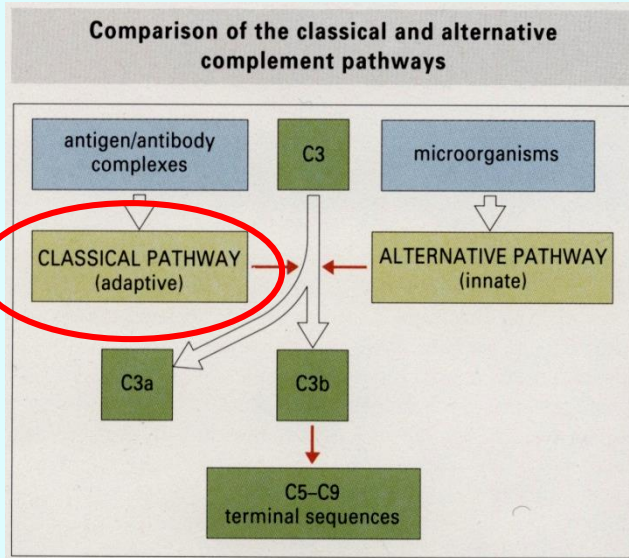
Komplette Antikörper



Kälte-Autoantikörper: Überblick

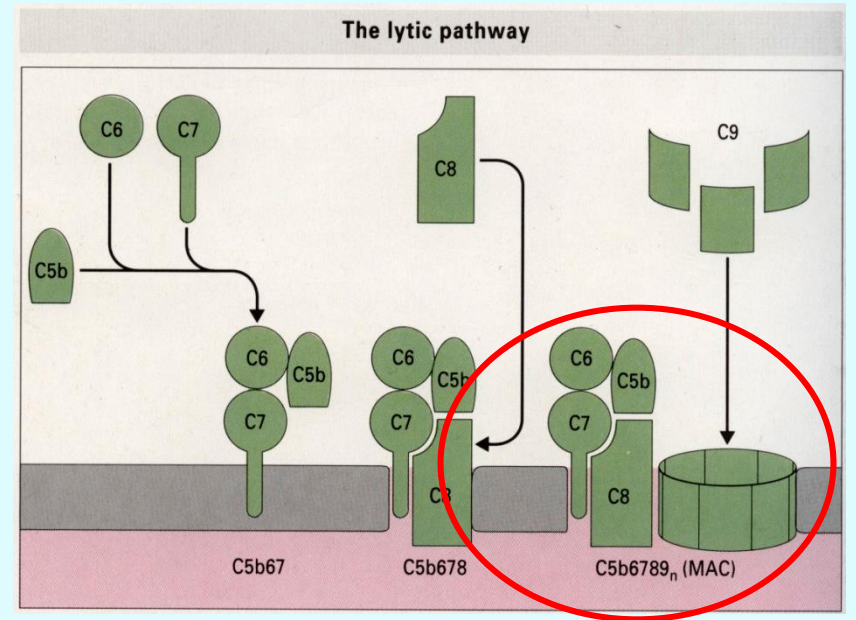
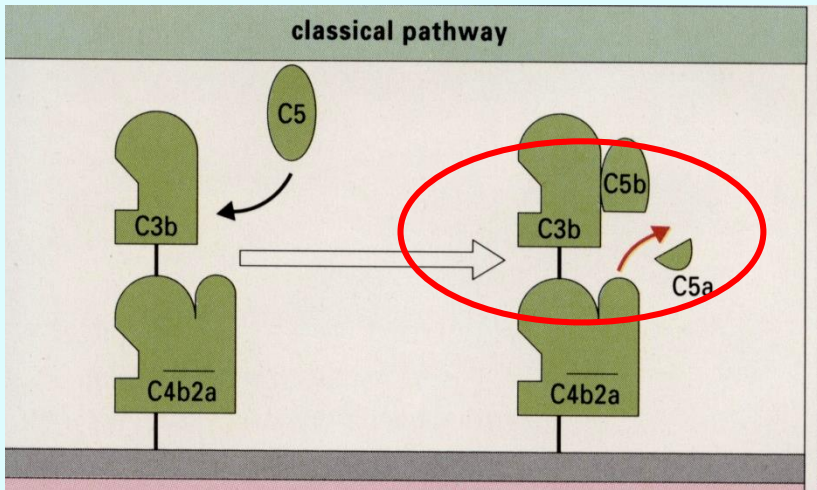
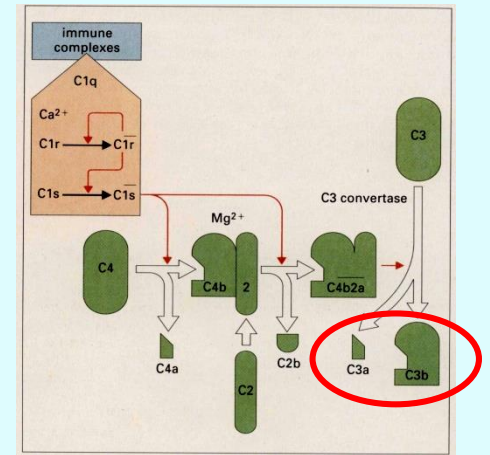
| | |
|--|--|
| Induktion der Auto-AK | <ul style="list-style-type: none">● Indiv. Immunsystem, Immunogenität● Veränderung an den Ery-Antigenen● Membrankomponenten (nicht BG-Ag)● Weit verbreitete Antigene (z.B. I und i) |
| Kälte-Autoantikörper | <ul style="list-style-type: none">● IgM Moleküle, selten IgG● Spezifität (meist) Anti I, Anti-i● Temp. abhängiges Bindungsoptimum |
| Donath-Landsteiner Kälte-Autoantikörper | <ul style="list-style-type: none">● IgG Moleküle● Spezifität Anti-P● biphasische Antikörper |
| Biolog. Wirksamkeit | <ul style="list-style-type: none">● abhängig vom Antikörper-Isotyp● abhängig von Temperaturamplitude● abhängig von Komplementaktivierung |

Immunopathologie der Kälteagglutinine



Komplementsystem

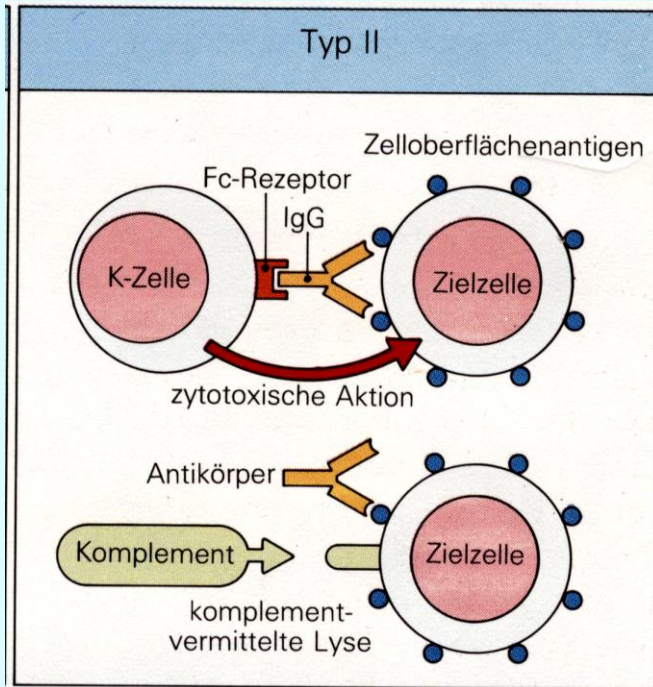
- Neun Hauptkomponenten
- Zwei Aktivierungswege
- AK abhängige Aktivierung
- Hämolyse: Typ II (Gell)



Die pathologischen Immunreaktionen (nach Gell)

| | |
|----------------|--|
| Typ I | Allergie vom Soforttyp, IgE vermittelte Hypersensitivität, z.B. Asthma, Urtikaria, Anaphylaxie |
| Typ II | Zytotoxischer Typ (ADCC, Killer-Zellen), Komplement vermittelte Zytolyse nach Ag-AK-Komplexbildung auf Zellmembranen |
| Typ III | Arthus-Typ, Immunkomplex-Krankheit, Vaskulitis |
| Typ IV | Zelluläre Allergie vom Spättyp (DTH, komplexe Immunreaktionen), z.B. Kontaktallergie |

Die Immunreaktion vom Typ II



- **Lyse durch Zytotoxizität:**
Bindung von NK-Zellen und Phagozyten an Zellmembran gebundene Antikörper (Fc-Rezeptoren)
- **Komplement vermittelte Lyse:**
Komplementbindung (C1qrs) an AK, Aktivierung über den klassischen Weg

Roitt IM, Brostoff J und Male DK: Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 2nd ed.

Hämolysen (Immunreaktion vom Typ II)

| | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">● Intravasale Hämolyse | <ul style="list-style-type: none">➤ Antikörperbindung und Komplementbindung➤ Komplementaktivierung bis zur Bildung des lytischen Kompl. (MAC)➤ Zytolyse |
| <ul style="list-style-type: none">● Extravasale Hämolyse | <ul style="list-style-type: none">➤ Opsonisierung durch Beladung mit AK und sublyt. Komplementfaktoren➤ Bindung an Fc- und C3b-Rezeptoren des RES➤ Phagozytose der Erythrozyten im RES (Milz, Leber) |

Grundlagen der Immunhämolyse

- Zusammenfassung -

● Immunpathologische Vorgänge

- Beladung von Erythr. mit AK (Isotyp/Ag-Menge) u. Komplement
- intravasale Hämolyse: vollständige Aktiv. von Komplement
- extravasale Hämolyse: unvollständige Aktiv. von Komplement

● Pathophysiologische Besonderheiten

- IgG Antikörper: sublytische Komplementaktivierung (meist)
- IgM Antikörper: vollständige Komplementaktivierung (meist)
(Temperaturoptimum)

● Biologische Effekte der intravasalen Hämolyse

- Aktivierung des Gerinnungs- und Kininsystems
- Freisetzung von Mediatoren, z.B. C3a, C5a
- Cave: pseudoallerg. Reaktionen, Kreislaufversagen, Schock

Antikörpernachweis im Labor

- **Hämagglutinationstest** (verschiedene Varianten)
 - Nachweis von IgG und IgM Antikörpern
 - Durchführung bei Raumtemperatur (20 Grad Celsius)
 - Verstärkermedien: LISS, Albumin, Enzym-/Coombsmilieu
- **Pos. Eigenkontrolle, pos. direkter Coombstest**
 - Nachweis einer Erythr.-Beladung mit AK, Komplement
- **Indirekter Coombstest**
 - Nachweis zirkulierender Antikörper (IgG)
 - Durchführung in der Wärme
- **Eluat**
 - Absprengung, Differenzierung von Antikörpern (ICT)

Auffälligkeiten in der Routine immer abklären !

R. R. A. Coombs und der Coombstest

Coombstest:

Antiglobulin-Stufentest zur Sensitivitätssteigerung von Immunassays (u.a. IFT, RIA, ELISA, Blot)

Publikation:

Coombs, R.R.A. *Detection of weak and incomplete Rh agglutinins: a new test* (Lancet 1945, II: 15-16)

R.R.A Coombs:



Coombs gilt als „Entdecker“ des Anti-Globulintests. Coombs schreibt später, dass bereits vor ihm andere Autoren „sein Testprinzip“ publiziert haben

R.R.A. Coombs in Vox Sang 1998, 74:67-73
... „One should never refer to a discovery or a test as being new“

Autoren:

U. Friedemann, 1905 und 1909
(Z Immunitätsforsch 1909, 2:591-641)

C. Moreschi, 1908
(Zbl Bakt 1908, 46:49-51)

Antihumanglobulintechnik (AHG)

Direkter Coombstest (DCT)

- | | |
|----------------------|--|
| ● Testprinzip | <ul style="list-style-type: none">➤ Erythrozyten waschen➤ mit AHG inkubieren➤ auf Agglutination prüfen |
| ● DCT positiv | <ul style="list-style-type: none">➤ Erythrozyten <i>in-vivo</i> „beladen“➤ z.B. Immunglobuline, Komplement |

Indirekter Coombstest (ICT)

- | | |
|----------------------|--|
| ● Testprinzip | <ul style="list-style-type: none">➤ Serum mit „Test-Erys“ inkubieren➤ mit AHG inkubieren➤ auf Agglutination prüfen |
| ● ICT positiv | <ul style="list-style-type: none">➤ Serum enthält Antikörper➤ z.B. irreguläre AK, Auto-AK |

Direkter Coombstest

Der DCT ist kein Routinetest, aber ein „Muss“ bei jedem positiven Eigenansatz, Anamnese beachten !

1. Negative Transfusionsanamnese

- Idiopathisch (oft ohne klin. Relevanz)
- Infektionen (Kälte-Autoantikörper)
- Autoimmunhämolytische Anämien
- Lymphome (andere Malignome)
- Medikamenten induzierte Autoantikörper

2. Nach Transfusionen

- Serologisch inkompatible Transfusion
- Verzögerte Transfusionsreaktionen

3. Fetalblut und Neugeborene

- Morbus haemolyticus neonatorum (Alloantikörper von der Mutter)

Der positive DCT - Folgeuntersuchungen

- **Ein pos. DCT soll immer durch Folgeuntersuchungen plausibilisiert werden,**
z.B. klinisch-chemische Hämolyseparameter
- **Bestimmung der Immunglobulin-Klasse IgG, IgM, IgA und Komplementfaktoren**
- **Bestimmung der IgG-Subklassen (IgG1, IgG3)**
(nützlich, aber nicht zwingend)
- **Bestimmung der Antikörperspezifität**
- **Bestimmung des Antikörpertiters**

„Normale“ Kälteagglutinine

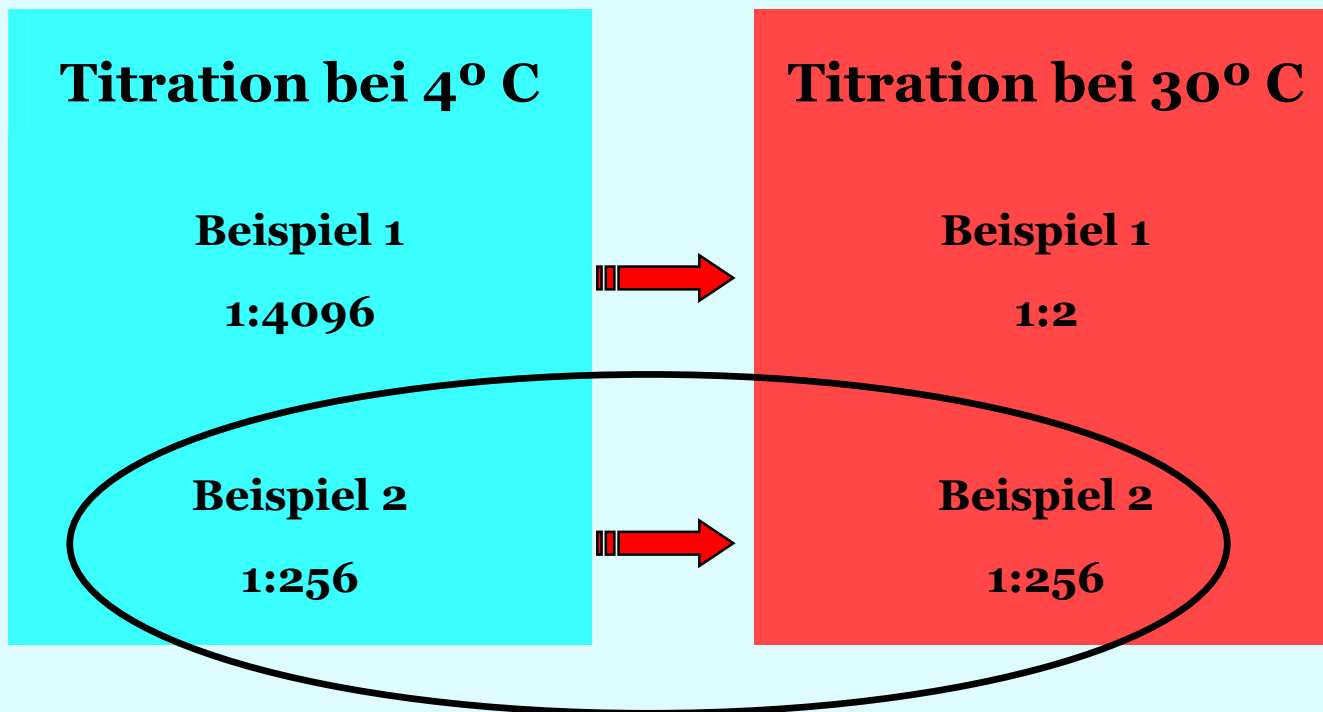
- Sera der meisten Menschen agglutinieren die autologen Erythrozyten bei 0 bis 2 Grad Celsius
- Kälteagglutinine (IgM Isotyp) liegen in geringer Konzentration vor (Titer bis 1:32)

Spezifität (*fast immer*): **Anti-I**

Spezifität (*gelegentl.*): **Anti-I + Anti-i**
 Anti-P, Anti-A₁I
 Anti-A, Anti-B
 Anti-M, Anti-N

Antikörpertiter - Temperaturamplitude

**Klinische Bedeutung eines Kälte-Autoantikörpers:
Fähigkeit zur Erythrozyten-Agglutination bei Körpertemperatur**



Vorkommen von Anti-I / Anti-i

- **Anti-I**
 - meist IgM Typ Kappa
 - Mycoplasma pneumoniae (>50%)
 - MHN selten und milder Verlauf
 - Alloanti-I bei Erwachs. mit Phänotyp i
- **Anti-i**
 - selten im Vergleich zu Anti-I
 - meist IgM, gelegentlich IgG plus IgM
 - bei EBV Infektion
 - bei Patienten mit Immundefizienz
 - Alloanti-i bisher nicht nachgewiesen

Kälteagglutinine: Laborwerte, Bewertung

- **DCT positiv (C3d)** → Hinweis auf Hämolyse
- **Kälteaggl. Typ.** → o-Ery, Nabel-Ery, Pat-Ery
- **Differenzierung Anti-I vs. biphas.** → Anti-I: Kälte-Autoantikörper
Anti-P: biphasisches Hämolysin
- **Temp. Amplitude** → Inkubation bei versch. Temp.
- **Kälteaggl. Titer** → Titer >1:32 (1:64) pathologisch

Kälteagglutinine: Möglichkeiten der Verstärkung

- **Aktivitätsteigerung von Kälteagglutininen:**
 - **Enzymbehandlung** von Test-Erythrozyten
 - Lagerung von Erythrozyten (Ery-Konzentrate)
 - Verwendung von LISS
- **Erhöhung der Auffinderate:**
 - Vorsicht bei **Einsatz von Enzymen** für AKS/Kreuzprobe
 - Vorsicht bei **AKS in Kälte/Raumtemperatur**

- Kältewirksame Antikörper ohne Reaktion bei 28-30 Grad Celsius sind irrelevant
- Transfusion: klinische Bedeutung von „enzyme only“ Antikörpern ist extrem gering

Kälteagglutinine: klinische Probleme

Cave: klinisch wirksame Kälte-AK bei Transfusion

- ➔ Kälte-Antikörper mit hoher Wärmeamplitude
- ➔ EKs mit Umsicht transfundieren (auch bei vorgewärmten EK)
- ➔ allgemein: transfundierte Erythrozyten werden sehr effektiv zerstört (bis zu 50% in der ersten Stunde !)

Zusammenfassung (1)

- **Positiver EK und pos. direkter Coombstest**
 - Bewertung ist abhängig von weiteren Untersuchungen und von der klinischen Situation (Anamnese)
- **Kälteagglutininkrankheit**
 - Kälte-Autoantikörper
 - Autoimmunhämolytische Anämien (AIHA)
 - Akute und chronische AIHA vom Kältetyp (Definitionen, Symptome)
- **Antikörper, Kälte-Autoantikörper**
 - Kälte-Autoantikörper (Isotypen), Spezifitäten
 - Immunpathologie und Wirkungen
 - Serologische Untersuchungstechniken
 - Klinische Bedeutung von Kälteagglutininen

Zusammenfassung (2)

- **Transiente (akute) Syndrome**

- Polyklonale Auto-Antikörper
- Assoziiert mit Infektionen z.B. Mykopl., EBV

- **Chronische Syndrome**

- Monoklonale Auto-Antikörper, IgM Paraproteine
- Assoziiert mit Grunderkrankungen, z.B. chron. lymph. Leukämie, Lymphom, M. Waldenström, (selten) gelegentlich ohne Grunderkrankung
- Kälte-Autoantikörper können der Grunderkrankung vorausgehen

Zusammenfassung (3)

● **Gemischte AIHA**

- sekundäre AIHA bei SLE oder Lymphom
- Hämolyse stark ausgeprägt

● **Temperaturamplitude**

- Kälte-Autoantikörper in der Regel nicht über 25 Grad Celsius reaktiv (dann klinisch nicht bedeutend)
- Antikörper mit hoher Temperaturamplitude und Reaktivität bei 28-30 Grad Celsius sind klinisch relevant
- der direkte Coombstest ist diagnostisch unterstützend
- ausschlaggebend ist der klinische/klinisch-chem. Befund

Literatur

- Beutler E et al. (eds.) *Williams Hematology*, 6th edition, McGraw-Hill, New York, 2000
- Coombs RRA et al. (1945) A new test for the detection of weak and „incomplete“ Rh agglutinins. *Br J Exp Pathol* 26: 255-266
- Coombs RRA (1998) Historical note: past, present and future of the antiglobulin test. *Vox Sang* 74: 67-73
- Dacie SJ (2001) The immune haemolytic anaemias: a century of exciting progress in understanding. *Br J Haematol* 114: 770-785
- Dausset J, Colombani J (1959) The serology and the prognosis of 128 cases of autoimmune hemolytic anemia. *Blood* 14: 1280-1301
- Friedemann U, Weitere Untersuchungen über den Mechanismus der Anaphylaxie. *Z Immunitätsforsch* 1909, 2: 591-641
- Gell PGH, Coombs RRA (eds.) *Clinical aspects of immunology*, 1st edition, Blackwell, Oxford, 1963
- Kiefel V, Greinacher A (2007) *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*.
<http://www.tmed.med.uni-rostock.de/tmed.pdf>
- Kretschmer V, Sonneborn HH, Blutgruppenantigene und -antikörper. In: *Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik* (Thomas L, Hrsg.), 5. Auflage, S.896-955, TH-Books, Frankfurt, 1998
- Landsteiner K, Levine P (1926) On the cold agglutinins in human serum. *J Immunol* 12: 441-460
- McNicholl FP (2000) Clinical syndromes associated with cold agglutinins. *Transfus Sci* 22: 125-133
- Moreschi C (1908) Neue Tatsachen ueber Blutkörperchenagglutination. *Zentralbl Bakteriol* 46: 49-51
- Petz LD (2008) Cold antibody autoimmune hemolytic anemias. *Blood Rev* 22: 1-15

Literatur

- Petz LD, Garratty G (eds.) *Immune hemolytic anemias*, 2nd edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2004
- Pruzanski W, Shumak KH (1977) Biologic activity of cold-reacting autoantibodies (first part). *N Engl J Med* 297: 538-542
- Pruzanski W, Shumak KH (1977) Biologic activity of cold-reacting autoantibodies (second part). *N Engl J Med* 297: 583-589
- Roitt I et al. (eds) *Immunology*, 3rd edition, Mosby, London, 1993
- Roitt I et al. (Hrsg.) *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*, 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, 1991
- Shulman IA et al. (1985) Autoimmune hemolytic anemia with both cold and warm autoantibodies. *JAMA* 253: 1746-1748
- Sokil RJ et al. (1983) Autoimmune hemolysis: mixed warm and cold antibody type. *Acta Haematol* 69: 266-274
- Valent P, Lechner K (2008) Diagnosis and treatment of autoimmune haemolytic anaemias in adults: a clinical review. *Wien Klin Wochenschr* 120: 136-151
- Salama A, Mueller-Eckhardt C, (1996) Nachweis von erythrozytären Antigenen und Antikörpern. In: *Transfusionsmedizin* (Mueller-Eckhardt C, Hrsg.), 2. Auflage, S. 587-596, Springer, Berlin, 1996