

Aus dem
CharitéCentrum für Tumormedizin
Institut für Transfusionsmedizin
Direktor (komm.): Prof. Dr. Axel Pruß

Habilitationsschrift

Neue Aspekte zur Ätiologie und Diagnostik medikamentös induzierter Immunhämolysen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Transfusionsmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Beate Mayer

Eingereicht:	Mai 2021
Dekan:	Prof. Dr. Axel R. Pries
1. Gutachter/in:	Prof. Dr. Peter Bugert
2. Gutachter/in:	Prof. Dr. Gregor Bein

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1 Immunhämolytische Anämien.....	5
1.2 Medikamentös induzierte Immunhämolytische Anämie (DIIHA)	6
1.3 Pathomechanismus der DIIHA.....	7
1.3.1 Medikamentenabhängige Antikörper	8
1.3.1.1 Adsorptionstyp	8
1.3.1.1 „Immunkomplextyp“	9
1.3.2 Medikamentös induzierte Autoantikörper	10
1.3.3 Nicht-immunologische Proteinadsorption (NIPA)	11
1.4 Klinische Manifestation	11
1.5 Laborbefunde	13
1.5.1 Serologie	13
1.6 Therapie der DIIHA	15
1.7 Prognose der DIIHA	16
2. Eigene Arbeiten	17
2.1 Neue Aspekte zur Inzidenz, Klinik und Serologie medikamentös induzierter Immunhämolysen.....	17
2.1.1 Medikamentös induzierte Immunhämolysen: Ergebnisse der Berliner Fall-Kontroll- Surveillance-Studie (FAKOS)	17
2.1.2 Variabilität medikamentös induzierter Immunhämolysen.....	29
2.2 Klinische und serologische Besonderheiten bisher nicht beschriebener Substanzen als Auslöser einer medikamentös induzierten immunhämolytischen Anämie.....	38
2.2.1 Etoricoxib	38
2.2.2 Iomeprol.....	44
2.3 Besonderheiten Piperacillin-induzierter Immunhämolysen	50
2.3.1 Klinik und Serologie Piperacillin-induzierter Immunhämolysen: Ergebnisse einer Fallserie	50
2.3.2 Risiko einer Piperacillin-induzierten immunhämolytischen Anämie bei Patienten mit Cystischer Fibrose.....	56
3. Diskussion.....	67
3.1 Medikamentenspektrum.....	67

3.2 Komplexität und Fallstricke bei der Diagnostik einer medikamentös induzierten immunhämolytischen Anämie.....	69
3.3 Piperacillin-induzierte Immunhämolysen bei Patienten mit Cystischer Fibrose	73
4. Zusammenfassung.....	81
5. Literatur	83
6. Danksagung	90
7. Erklärung	91

Abkürzungen

AIHA	Autoimmunhämolytische Anämie
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
DAT	Direkter Antihumanglobulintest
DIIHA	Drug-induced Immune Hemolytic Anemia (Medikamentös induzierte Immunhämolytische Anämie)
FAKOS	Berliner Fall-Kontroll- Surveillance-Studie
IHA	Immunhämolytische Anämie
NIPA	Nicht-Immunologische Proteinadsorption
PIIHA	Piperacillin-Induzierte Immunhämolytische Anämie

1. Einleitung

1.1 Immunhämolytische Anämien

Eine Immunhämolytische Anämie (IHA) ist gekennzeichnet durch den vermehrten Abbau von Erythrozyten. Ursächlich ist eine Beladung mit erythrozytären Antikörpern mit oder ohne Komplementbeteiligung. Charakteristisch, und für die Diagnose wegweisend, ist der Nachweis einer Hämolyse in Kombination mit einem positiven direkten Coombstest (direkter Antihumanglobulintest, DAT). Die auslösenden Antikörper gehören überwiegend der IgG-, seltener der IgM- und sehr selten der IgA-Klasse an. In Abhängigkeit der Immunglobulin-(sub)klasse und der Fähigkeit zur Komplementaktivierung werden die Antikörperbeladenen Erythrozyten entweder intravasal in der Zirkulation zerstört oder extravasal durch Phagozytose in der Milz und in der Leber abgebaut. Eine intravasale Immunhämolyse resultiert aus der Aktivierung der terminalen Komplementkomponenten (C5b-9-Komplex, sog. „membrane attack complex“) mit nachfolgender Lyse der Erythrozyten. Ursächlich sind in der Regel IgM-Antikörper. Durch die Anwesenheit von Komplementregulatoren kommt es jedoch überwiegend nicht zur vollständigen Komplementaktivierung. Erythrozyten, die eine Komplementaktivierung überleben, sind an der Beladung mit dem Komplementfragment C3d (inaktive C3b Komponente) erkennbar. Im Falle einer extravasalen Hämolyse werden die sensibilisierten Erythrozyten über die Fc-Rezeptoren für IgG bzw. über den C3b-Komplementrezeptor der Makrophagen abgebaut. Dabei binden die verschiedenen IgG Isotypen mit unterschiedlicher Affinität an den Rezeptoren: vor allem IgG3 und IgG1, in geringerem Maße auch IgG2 sind in der Lage mit dem Fc-Rezeptor zu interagieren.¹

Erythrozytäre Antikörper binden an allogene oder autologe Antigene. Zur Bindung an allogene Antigene und einer dadurch induzierten Hämolyse bzw. Anämie kommt es typischerweise im Rahmen inkompatibler Transfusionen oder fetomaternaler Inkompatibilitäten bei Schwangerschaften. Hiervon zu unterscheiden sind autoimmunhämolytische Anämien (AIHA). Ihre Inzidenz liegt bei ca. 1 auf 100.000 pro Jahr.²⁻⁴ Sie kommen in jeder Altersstufe, vor, die Inzidenz nimmt jedoch mit dem Alter zu.⁵ Frauen sind häufiger betroffen als Männer.⁶⁻⁸ Die Einteilung einer AIHA erfolgt klinisch und serologisch in verschiedene Gruppen. In ungefähr der Hälfte der Fälle tritt eine AIHA sekundär im Rahmen verschiedener Grunderkrankungen, wie z.B. Autoimmunerkrankungen oder lymphoproliferative Erkrankungen, auf.⁹ Findet sich keine Ursache bzw. keine Krankheitsassoziation, spricht man von

primärer oder idiopathischer AIHA.^{5,10} Entsprechend dem Temperaturoptimum, bei dem die Autoantikörper an die Erythrozyten binden, unterscheidet man die AIHA vom Wärmetyt (65%), die AIHA vom Kältetyt (29%) sowie die Paroxysmale Kältehäoglobinurie (AIHA vom Donath-Landsteiner Typ, ca. 1%). Eine Sonderform stellt die medikamentös induzierte IHA dar.⁵

1.2 Medikamentös induzierte Immnhämolytische Anämie (DIIHA)

Bis zu 10% aller AIHA werden durch Medikamente ausgelöst.¹¹ Diese sog. medikamentös induzierten Formen (drug-induced immune hemolytic anemia, DIIHA) sind mit einer geschätzten Inzidenz von 1 bis 4 auf 1.000.000 Einwohner pro Jahr sehr selten,^{12,13} jedoch ist von einer erheblichen Dunkelziffer unerkannter Fälle auszugehen. Obwohl medikamentös induzierte Immnhämolysen eine bekannte Nebenwirkung einer Medikamentenapplikation sind, werden viele Fälle, insbesondere, wenn sie klinisch milder verlaufen, nach wie vor nicht erkannt. Es gibt eine Vielzahl von Gründen, die zur Fehldiagnose führen. Die klinischen Symptome sind sehr variabel, und die serologischen Ergebnisse können leicht fehlinterpretiert werden. Ferner ist die serologische Diagnostik anspruchsvoll und wird nur von wenigen Zentren vorgehalten. Medikamentös induzierte Immnhämolysen werden daher häufig mit anderen Krankheitsbildern, die zu einer Hämolyse führen können, z.B. einer idiopathische AIHA, verwechselt.¹⁴

Der Zusammenhang zwischen Medikamenteneinnahme und Immnhämolyse wurde erstmals 1953 beschrieben.¹⁵ Im Jahre 1967 waren es 13 und 1980 waren es bereits 33 Medikamente, die als ursächlich für eine Immnhämolyse erkannt wurden.^{16,17} Seither wurden ungefähr 100 weitere Substanzen als Auslöser einer DIIHA beschrieben.^{18,19}

Gleichzeitig hat sich das Spektrum der auslösenden Medikamente deutlich geändert. In den 1970er Jahren waren es fast ausschließlich in hohen Dose appliziertes alpha-Methyldopa oder Penicillin (67% bzw. 23% aller beschriebenen Fälle), die eine medikamentös induzierte Immnhämolyse verursachten.¹³ Mit dem abnehmenden Einsatz dieser Substanzen, wurden seit den 1990er Jahren v. a. β -Lactam-Antibiotika, nichtsteroidale Antiphlogistika und Chemotherapeutika als Hauptauslöser identifiziert.²⁰

Es wird davon ausgegangen, dass grundsätzlich jedes Medikament eine Immunhämolyse verursachen kann.^{18,21} Die Dauer für eine primäre und klinisch relevante Immunantwort beträgt dabei mindestens 5 – 6 Tage. Danach kann es jederzeit zur Manifestation der Hämolyse kommen.²² Diese tritt insbesondere bei unregelmäßiger Anwendung oder Re-Exposition auf. Daher sollte jede neu aufgetretene Hämolyse unter einer Medikamenteneinnahme hinsichtlich einer möglichen Medikamenten-Induktion überprüft werden.¹⁸

Die Mehrzahl der Hämolyse-induzierenden Medikamente wurde nur in einzelnen Fallberichten publiziert. Einige dieser publizierten Fälle beruhen jedoch auf unvollständigen Daten, die lediglich den zeitlichen Zusammenhang zwischen Medikamenteneinnahme und einer Hämolyse beschreiben. Darüber hinaus gibt es nur wenige Medikamente, wie beispielsweise Cefotetan, Ceftriaxon und Diclofenac, die in größeren Fallserien beschrieben wurden.²³⁻²⁵ Ferner gibt es nur wenige Medikamente, deren Wahrscheinlichkeit eine Immunhämolyse hervorzurufen, bekannt ist bzw. systematisch untersucht wurde. In Studien aus den 1960er Jahren wurde gezeigt, dass ca. 3-5% der Patienten, die hochdosiert Penicillin erhalten und ca. 30% der Patienten die länger als 3 Monate alpha-Methyldopa einnehmen, einen positiven DAT entwickeln. Nur wenige dieser Patienten bilden jedoch Penicillin-abhängige oder Methyldopa-induzierte AIHA aus.²⁶ Abgesehen von einer Untersuchung aus 2008, in der die Prävalenz von Ceftriaxon-induzierten Antikörpern bei Patienten mit HIV und Sichelzellerkrankheit ermittelt wurde²⁷, gibt es keine systematischen Untersuchungen zur Häufigkeit medikamenteninduzierter Antikörper oder Immunhämolysen durch die aktuell eingesetzten Medikamente.

1.3 Pathomechanismus der DIIHA

Der genaue Pathomechanismus der Immunisierung gegen Medikamente ist bis heute nicht bekannt. Medikamente sind aufgrund ihrer geringen Größe von weniger als 1 kDa nicht in der Lage, direkt eine Immunantwort hervorzurufen. Sie müssen als sog. Haptene zuvor an ein Trägerprotein bzw. Glykoprotein gebunden.²⁸⁻³⁰ Die dabei gebildeten Antikörper richten sich entweder gegen das Hapten, das Trägerprotein oder den gesamten Komplex.^{28,31,32} Entsprechend einer in den 1990er Jahren formulierten und inzwischen allgemein akzeptierten Hypothese, kommt es durch die Interaktion des Medikaments oder seiner Metabolite mit der Zelloberfläche zur Bildung eines Neoantigens, welches die Bildung von

medikamentenabhängigen Antikörpern und/oder medikamentös induzierten Autoantikörpern hervorrufen kann (Abb. 1).^{20,26,33,34}

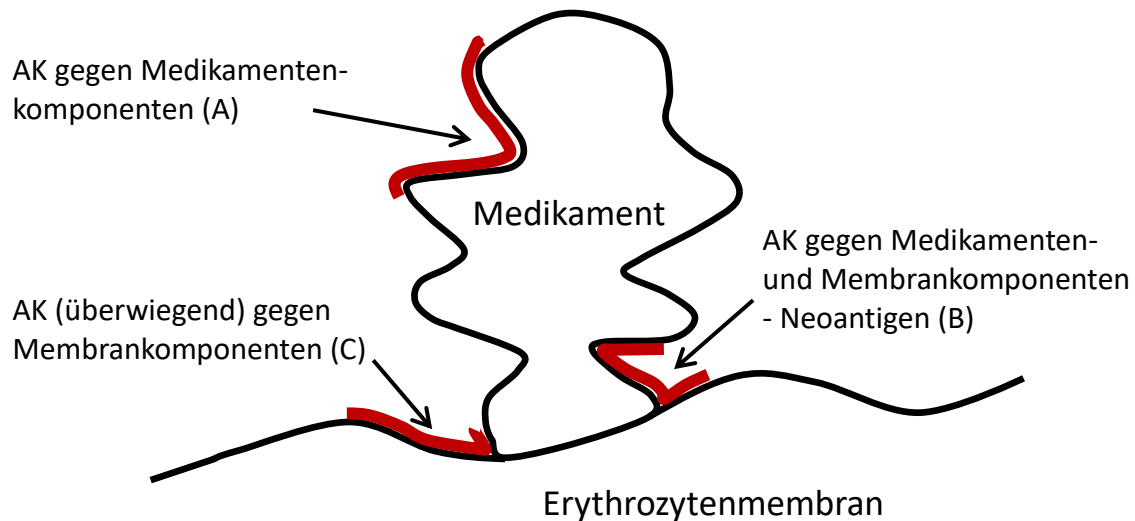


Abb. 1 (mod. nach Arndt 2014²⁰): (A) und (B): medikamentenabhängige Antikörper (A: Adsorptionstyp, B: „Immunkomplextyp“); (C): medikamenteninduzierte Autoantikörper

1.3.1 Medikamentenabhängige Antikörper

1.3.1.1 Adsorptionstyp

Einige wenige Medikamente gehen mit Proteinen auf der Zelloberfläche von Erythrozyten kovalente Bindungen ein.²⁶ Der Prototyp dieser Gruppe ist Penicillin. Einige verwandte Substanzen wie bestimmte Cephalosporine reagieren ebenfalls über diesen Mechanismus.

Antikörper gegen Penicillin wurden erstmals 1958 von Ley et al. beschrieben. Das Serum eines Patienten reagierte mit allen Erythrozyten, die - wie damals üblich - zu Haltbarkeitszwecken mit Penicillin behandelt wurden, aber nicht mit den unbehandelten Erythrozyten des gleichen Spenders.³⁵ Bereits in den Folgejahren wurden die ersten Fälle von Penicillinabhängiger IHA publiziert.³⁶ Penicillin lässt sich bei allen Patienten auf den Erythrozyten nachweisen, die 10 Millionen Einheiten oder mehr erhalten. Bei ungefähr 3% dieser Patienten ist der DAT positiv, aber nur in einigen Fällen kommt es zu einer IgG-vermittelten extravasalen Hämolyse.³⁷ Die medikamentenabhängigen Antikörper im Serum des Patienten sind gegen das auf die Erythrozyten adsorbierte Medikament gerichtet (Abb. 1). Die IgG-be-

ladenen Erythrozyten werden über Fc-Rezeptoren auf Makrophagen in der Milz und Leber extravasal eliminiert.²⁶ In seltenen Fällen kommt es durch Komplement-aktivierende Penicillin-abhängige Antikörper zu einer intravasalen Hämolyse.³⁸⁻⁴⁰

1.3.1.1 „Immunkomplextyp“

Ausgehend von einer durch Ackroyd in den 1940er Jahren begründeten Theorie zur Pathogenese der medikamentös induzierten Immunthrombozytopenie ging man ursprünglich von Immunkomplexen aus Antikörpern und Medikament aus, die sich sekundär und unspezifisch an die Zelloberfläche anlagern und über eine Komplementaktivierung zum Zellabbau führen.⁴¹ Dieser sog. „Immunkomplex-Mechanismus“ wurde jedoch experimentell nie belegt und einige wichtige Beobachtungen sprechen gegen diese Theorie: (1) Medikamentenabhängige Antikörper sind Zelltyp spezifisch, d.h. sie richten sich entweder gegen Erythrozyten, Granulozyten oder gegen Thrombozyten.³⁴ Im Falle einer unspezifischen Anlagerung von Immunkomplexen würde man eine ähnliche Beteiligung aller drei Zellreihen erwarten; (2) medikamentenabhängige Antikörper binden über die spezifische Fab Bindungsstelle an den entsprechenden Zielantigenen auf der Zelloberfläche und nicht über die Fc-Domäne;⁴² (3) medikamentenabhängige Antikörper reagieren häufig mit definierten Antigen auf den Zielzellen (z.B. Rhesusantigene C und e);^{23,43-45} (4) medikamentenabhängige Antikörper können an Erythrozyten spezifisch adsorbiert und eluiert werden;⁴³ (5) bei einer Reihe von Patienten wurde gleichzeitig das Auftreten medikamentenabhängiger und medikamentös induzierter Antikörper beschrieben.^{23,26,46} Ausgehend von diesen Beobachtungen, scheint eine direkte Interaktion des Medikaments mit der Erythrozytenoberfläche und daraus resultierend die Bildung eines sog. Neoantigens, der wahrscheinlichere Pathomechanismus.^{33,47}

Im Gegensatz zu Penicillin, bindet die Mehrzahl der Medikamente jedoch nicht kovalent an die Erythrozytenoberfläche. Die Antikörper vom sog. Immunkomplex-Typ richten sich dabei vermutlich gegen eine Kombination aus Zellmembran und Medikament (Abb. 1). Es handelt sich in der Regel um komplementaktivierende Antikörper, die zu einer massiven und abrupt beginnenden intravasalen Hämolyse führen können. Bei vorimmunisierten Patienten reichen bereits kleine Mengen der Substanz, um eine Immunhämolyse auszulösen. Die Mehrzahl der Medikamente die eine IHA hervorrufen können, gehört dieser Gruppe an.^{20,26} Erstmals

beschrieben wurde diese Form bei Patienten unter Einnahme von Quinidin und Phenacetin.⁴⁸

1.3.2 Medikamentös induzierte Autoantikörper

Einige Medikamente induzieren erythrozytäre Autoantikörper, die weder serologisch noch klinisch von IgG-Wärmeautoantikörpern anderer Genese unterscheidbar sind. Der Nachweis der medikamentösen Genese ergibt sich in diesen Fällen rein aus dem klinischen Verlauf, indem die Hämolyse nach Absetzen des Medikaments selbstlimitierend ist. Von den medikamentenabhängigen Antikörpern unterscheiden sich diese sog. medikamentös induzierten Autoantikörper grundsätzlich dadurch, dass für die ursprüngliche Bildung der Antikörper das Medikament zwar erforderlich ist, im weiteren Verlauf die Bindung der Auto-Antikörper an die Erythrozytenoberfläche aber auch in Abwesenheit des Medikaments erfolgt.^{17,18,49} Ob bei der Entstehung der Autoantikörper nach Anlagerung des Medikaments die Oberflächenstrukturen der Erythrozyten so verändert werden, dass diese die Selbsttoleranz verlieren und immunogen werden,⁵⁰⁻⁵³ oder ob es einen direkten Effekt auf das zelluläre Immunsystem gibt,⁵⁴ ist unklar.

Die historische Leitsubstanz medikamentös induzierter Autoantikörper ist alpha-Methyldopa, welches früher weitverbreitet in der Therapie der Hypertonie eingesetzt wurde. Ungefähr 15% der Patienten die alpha-Methyldopa länger als 3 Monate einnehmen bilden erythrozytäre Autoantikörper, nur ca. 0,5% dieser Patienten entwickeln eine extravasale hämolytische Anämie.^{55,56} Dabei nimmt die Inzidenz eines positiven DAT in Abhängigkeit der Dosis zu.⁵⁷ Die Schwere der Hämolyse korreliert jedoch nicht mit der eingenommenen Menge an alpha-Methyldopa.^{17,50}

Fludarabin, welches in der Behandlung der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) eingesetzt wird, hat inzwischen alpha-Methyldopa als Hauptursache medikamentös induzierten Autoantikörper abgelöst. Ungefähr 20% der Patienten entwickeln unter der Therapie eine AIHA, welche gelegentlich fulminant verlaufen kann.⁵⁸⁻⁶³ Re-Exposition führt bei fast 80% der betroffenen Patienten zu einer erneuten Hämolyse, was die Fludarabin-Induktion als kausale Ursache belegt.^{64,65}

Eine Reihe von Medikamenten, z. B. Diclofenac, Rifampicin und Nomifensin, induzieren sowohl medikamentenabhängige Antikörper, als auch medikamentös induzierte Autoantikörper.^{23,47,66-68}

1.3.3 Nicht-immunologische Proteinadsorption (NIPA)

Einige Medikamente können die Erythrozytenmembran so modifizieren, dass Immunglobuline, Albumin und anderen Proteine unspezifisch angelagert werden und zu einer Positivität im DAT führen. Dieser Vorgang wird nicht-immunologische Proteinadsorption (NIPA) genannt und wird unter anderem durch einige Cephalosporine, platinhaltige Zytostatika (Oxilaplatin, Carboplatin) und Betalaktamase-Inhibitoren (Clavulansäure, Sulbactam und Tazobactam) hervorgerufen. Testerythrozyten, die mit diesen Substanzen inkubiert werden, reagieren typischerweise mit Serum von nicht-immunisierten Blutspendern im indirekten Coombstest positiv.^{19,69-72} Die unspezifische Positivität im DAT lässt sich ferner durch die Reaktion mit Anti-Albumin sowie dem Nachweis eines negativen Eluats belegen.⁷³

Obgleich es sich bei der NIPA nicht um eine spezifische Antikörperproduktion gegen Medikamente handelt, wird diskutiert ob die Beladung der Erythrozyten in-vivo zu einem beschleunigten Abbau durch Bindung an Makrophagen im RES führen kann.^{49,74}

1.4 Klinische Manifestation

Die Klinik ist sehr variabel und wird entscheidend vom Ausmaß und der Geschwindigkeit der Hämolyse bzw. Anämie und nachfolgender Komplikationen geprägt.

Nicht-komplementaktivierende medikamentenabhängige Antikörper und medikamentös induzierte Autoantikörper sind überwiegend vom IgG-Typ und verursachen in der Regel extravasale Hämolysen, während komplementaktivierende medikamentenabhängige Antikörper häufig zu intravasalen Hämolysen mit abruptem Beginn und unter Umständen vital bedrohlicher Symptomatik führen.

Penicillin und bestimmte Cephalosporine können zur Bildung von **nicht-komplement-aktivierenden IgG-Antikörpern** führen. Diese treten typischerweise bei Patienten auf, die

über einen längeren Zeitraum hochdosiert Penicillin (10 Millionen Einheiten oder mehr pro Tag) bzw. Cephalosporine in therapeutischer Dosis erhalten.³⁸ Die entsprechenden Antikörper richten sich gegen kovalent an die Erythrozytenoberfläche gebundenes Penicillin, die IgG-beladenen Erythrozyten werden nachfolgend durch Makrophagen im Retikuloendothelialen System phagozytiert.⁷⁵ Die Hämolyse ist extravasal und tritt typischerweise subakut innerhalb von 7-10 Tagen auf. Massive Hämolysen und rasch auftretende Hämoglobinabfälle sind extrem selten.⁴⁰ Der DAT ist in der Regel positiv mit Anti-IgG und selten auch mit Anti-C3d. Der Nachweis der typischerweise hochtitrigen Antikörper gelingt typischerweise mit Medikamenten-beladenen (gecoateten) Testerythrozyten.¹⁷

Komplementaktivierende medikamentenabhängige IgG- und IgM-Antikörper führen oft zu einer akuten intravasalen Hämolyse mit häufig abruptem Beginn und unter Umständen lebensbedrohlicher Symptomatik. Die Antikörper reagieren nur in Anwesenheit des Medikaments bzw. seiner Metabolite und können schon wenige Minuten bis Stunden nach Applikation bzw. Einnahme eine massive Hämolyse auslösen, wobei unter Umständen schon kleinste Mengen der Substanz ausreichen. Kardinalsymptome der intravasalen Hämolyse sind Hämoglobinämie und -urie. Fieber, Schüttelfrost, Tachykardie, Dyspnoe, Übelkeit und Erbrechen sind häufige, aber eher unspezifische Symptome.²² Sie führen dazu, dass medikamentenbedingte Hämolysen immer wieder als akute Transfusionsreaktionen verkannt sowie mit einer Reihe von anderen akuten klinischen Krankheitsbildern verwechselt werden.^{49,76} Akutes Nierenversagen ist mit 30% – 50% eine relativ typische Komplikation im Rahmen massiver Hämolysen und wird insbesondere bei Ceftriaxon-induzierten Immunhämolysen beobachtet.^{17,77} Ursächlich ist die Nephrotoxizität von freiem Hämoglobin und Hämin.^{78,79} Seltener treten Schock und disseminierte intravasale Gerinnungsstörungen auf.^{18,77} Letal verlaufende Fälle sind insbesondere bei massiven Hämolysen in Abhängigkeit des auslösenden Medikaments in 6% bis 38% bei Erwachsenen und in bis zu 50% bei Kindern zu beobachten.^{46,76,80}

Medikamentös induzierte Autoantikörper sind weder klinisch noch serologisch von erythrozytären wärmerreaktiven Autoantikörpern anderer Genese unterscheidbar. Die Autoantikörper aktivieren in der Regel kein Komplement, liegen häufig in hohen Konzentrationen vor und verursachen extravasale Hämolysen.⁸¹ Analog zu idiopathischen Autoantikörpern,

weisen sie häufig Rhesuspezifität auf.⁸² Die Hämolyse beginnt in der Regel allmählich und kann im Falle von alpha-Methyldopa noch bis zu 4 Jahre nach Beginn der Therapie auftreten.⁸³ Der klinische Verlauf ist mild bis moderat. Nach Absetzen des auslösenden Medikaments bildet sich die Hämolyse in der Regel innerhalb von 2 Monaten wieder zurück, gelegentlich werden jedoch auch protrahiert verlaufende Fälle beobachtet. Der DAT kann bis zu 2 Jahre nach Absetzen positiv bleiben.^{17,84}

1.5 Laborbefunde

Das Ausmaß der Anämie ist bei der medikamentös induzierten Immnhämolyse variabel und abhängig von der Art der zugrundeliegenden erythrozytären Antikörper. Im Falle komplementaktivierender Antikörper findet sich nicht selten ein rapider Abfall der Hämoglobinkonzentration auf unter 5 g/dl bzw. Hämatokritwerte < 20%.^{18,24} Nichtkomplementaktivierende medikamentenabhängige Antikörper und medikamenteninduzierte Autoantikörper verursachen in der Regel weniger rasche und starke Abfälle der Hämoglobinkonzentration.^{17,34,81}

Im peripheren Blutaussstrich können unterschiedliche charakteristische Veränderungen der Erythrozytenmorphologie nachweisbar sein, unter anderem Sphärozyten, Fragmentozyten, Poikilozytose und Anisozytose. Im Stadium der Kompensation findet sich regelhaft eine Retikulozytose. Schwere intravasale Hämolysen sind häufig mit einer Leukozytose > 20.000/ μ l assoziiert.¹⁷ Das Haptoglobin ist typischerweise erniedrigt, häufig bis unter die Nachweisgrenze. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist mild bis moderat erhöht im Falle einer extravasalen Hämolyse, und stark bis sehr stark (> 1000 U/l) erhöht bei intravasalen Hämolysen. Das Gesamtbilirubin sowie das indirekte Bilirubin sind in der Regel ebenfalls erhöht.^{17,34,82}

1.5.1 Serologie

Ähnlich der Klinik, weist auch das serologische Bild in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Antikörper und dem Zeitpunkt der Untersuchung der Probe eine große Variabilität auf. Der Nachweis erfolgt zwar im Wesentlichen mit serologischen Standardmethoden, die Diagnostik ist jedoch technisch anspruchsvoll. Ferner sind die Interpretation der Ergebnisse

und die Differentialdiagnosen häufig komplex. Nur wenige immunhämatologische Referenzlabore besitzen daher die entsprechende Erfahrung und sind mit dem Nachweis medikamenteninduzierter erythrozytärer Antikörper vertraut.

Der wichtigste serologische Hinweis auf eine medikamentös induzierte AIHA ist ein positiver DAT. Dieser ist in der Regel positiv mit Anti-IgG alleine oder in Kombination mit Anti-C3d, selten ist auch eine IgM- oder IgA-Beladung der autologen Erythrozyten nachweisbar. Im Falle komplementaktivierender IgG- bzw. IgM-Antikörper ist der DAT häufig nur isoliert positiv mit Anti-C3d.^{17,18,85}

Der Nachweis medikamentenabhängiger Antikörper erfolgt üblicherweise im Serum bzw. Plasma des Patienten, gelegentlich gelingt dies auch im Eluat der autologen Erythrozyten.⁷³

Medikamentenabhängige Antikörper reagieren nur in Anwesenheit des ursächlichen Medikaments, d.h. ohne Zusatz des Medikaments ist der Testansatz negativ. In der akuten Phase reagiert das Serum bzw. Plasma der Patienten jedoch gelegentlich auch ohne Zugabe mit allen Testzellen panagglutinierend positiv. Ursächlich hierfür sind Residuen des Medikaments oder seiner Metabolite in der Zirkulation des Patienten und / oder zusätzliche medikamentös induzierte Autoantikörper.²¹

Der Nachweis von nicht-komplementaktivierenden Antikörpern gegen Penicillin und einige Cephalosporine erfordert den Einsatz medikamentenbeladener (gecoateter) Testerythrozyten.¹⁷ Im Gegensatz dazu reagieren komplementaktivierende IgG-/IgM-Antikörper typischerweise in Anwesenheit des löslichen Medikaments mit den Testerythrozyten. Einige der letztgenannten Antikörper reagieren auch mit medikamentenbeladenen Testerythrozyten (z.B. Cephalosporine der 2. und 3. Generation).^{17,73} Gelegentlich weisen die Antikörper eine Spezifität gegen spezifische erythrozytäre Antigene auf (z.B. Rhesus-, I-, Kidd-Blutgruppenmerkmale), d.h. diese Antikörper sind nur nachweisbar, wenn die entsprechenden Testzellen eingesetzt werden.²⁰

In einigen Fällen gelingt der Nachweis medikamentenabhängiger Antikörper nur durch den Einsatz entsprechender Metaboliten. Da diese in der Regel kommerziell nicht verfügbar sind, werden Urin und / oder Serum von Patienten nach Einnahme des Medikaments für die Testung metabolitenspezifischer Antikörper verwendet.^{34,86}

Medikamentös induzierte Autoantikörper liegen üblicherweise in hohen Konzentrationen vor und reagieren mit allen Testzellen positiv, wobei häufig eine Spezifität gegen Rhesusantigene, üblicherweise gegen e (Auto-Anti-e), erkennbar ist. Sie sind serologisch nicht von erythrozytären Autoantikörpern anderer Genese unterscheidbar.^{18,56,81,84}

1.6 Therapie der DIIHA

Medikamentös induzierte AIHA unterscheiden sich von anderen AIHA durch den kausalen Zusammenhang mit einer Medikamenteneinnahme. Die erste und wichtigste Therapie besteht daher im Absetzen der auslösenden Substanz.^{18,21} Eine sofortige bzw. frühzeitige Antigenkarenz begünstigt die Prognose und geht mit deutlich weniger Komplikationen und einer geringeren Mortalität einher.⁸⁷ Fälle von schwerer intravasaler Hämolyse bedürfen zumindest in der akuten Phase der intensivmedizinischen Überwachung. Der hämolytische Prozess ist in der Regel selbstlimitierend, im Falle von Komplikationen wie z.B. Kreislauf-schock oder Gerinnungsstörungen sind temporär supportive Maßnahmen erforderlich.¹¹ Bei klinisch relevanter anämischer Hypoxie ist die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten indiziert. Dies ist bei ca. 55% der Patienten erforderlich.¹² Bedingt durch evtl. zusätzlich vorhandenen Autoantikörper und / oder Medikamentenreste im Plasma der betroffenen Patienten ist dabei mit positiven Reaktionen in der Antikörpersuche und serologischen Verträglichkeitsprobe (Kreuzprobe) zu rechnen. Diese Positivitäten unterscheiden sich jedoch grundlegend von einer Inkompatibilität durch erythrozytäre Alloantikörper und dürfen nicht zur Verzögerung einer notwendigen Transfusion führen.¹⁸

Nierenversagen und / oder persistierende Hämolyse durch Medikamentenreste in der Zirkulation können einen Plasmaaustausch bzw. eine Hämodialyse erforderlich machen.^{46,77,87} Im Falle von Cisplatin, welches in die autologen Erythrozyten inkorporiert wird und mit Hämoglobin Komplexe eingeht, ist bei nichtbeherrschbarer Hämolyse ggf. ein Erythrozytenaustausch indiziert.¹⁸ Für den Einsatz von Steroiden gibt es zumindest bei medikamentenabhängigen Antikörpern keine klare Evidenz.^{11,21} Eine AIHA durch medikamentös induzierte Autoantikörper kann gelegentlich nach Absetzen des Medikaments über Wochen oder gar Monate anhaltenden. In diesen Fällen kann die Gabe von Steroiden zu einer beschleunigten Genesung beitragen.^{18,21,46} Die hochdosierte Gabe von Immunglobulinen i.v. ist in Einzelfällen bei Kindern beschrieben.⁸⁸

1.7 Prognose der DIIHA

Trotz des initial häufig hoch akuten und dramatischen Verlaufs, ist die Prognose der medikamentös induzierten Immnhämolyse bei rechtzeitiger Antigenkarenz insgesamt sehr günstig. Die Hämolyse bildet sich in der Regel innerhalb weniger Tage zurück und eine hämatologische Stabilisierung ist innerhalb von 1 - 2 Wochen zu erwarten.²¹ Jedoch kommt es bedingt durch massive Hb-Abfälle und daraus resultierender Komplikationen (z.B. Verbrauchskoagulopathie, Nieren- und Leberversagen, Schock) immer wieder zu tödlich verlaufenden Fällen. Vor allem durch Ceftriaxon ausgelöste Immnhämolyse sind mit einer hohen Letalität insbesondere bei Kindern behaftet.^{24,77,87} Im Falle medikamentös induzierter Autoantikörper kann die Hämolyse auch nach Absetzen des auslösenden Medikaments persistieren und der DAT kann noch über Wochen oder Monate positiv bleiben.^{18,81,84}

2. Eigene Arbeiten

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift umfasst sechs Originalarbeiten, deren Ergebnisse im nachfolgenden kurz zusammengefasst werden.

2.1 Neue Aspekte zur Inzidenz, Klinik und Serologie medikamentös induzierter Immunhämolysen

2.1.1 Medikamentös induzierte Immunhämolysen: Ergebnisse der Berliner Fall-Kontroll-Surveillance-Studie (FAKOS)

Garbe E, Andersohn F, Bronder E, Klimpel A, Thomae M, Schrezenmeier H, Hildebrandt M, Späth-Schwalbe E, Grüneisen A, Mayer B, Salama A, Kurtal H. Drug induced immune haemolytic anaemia in the Berlin Case-Control Surveillance Study. British Journal of Haematology 2011 Sep;154(5):644-53. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08784.x

Die medikamenteninduzierte immunhämolytische Anämie (DIIHA) ist eine seltene, schwerwiegende Nebenwirkung verschiedenster Medikamente. Sie ist allgemein nur wenig bekannt und vermutlich unterdiagnostiziert. Im Rahmen der Berliner Fall-Kontroll Surveillance-Studie (FAKOS) wurde eine mögliche medikamentenöse Ätiologie neu aufgetretener Immunhämolytischer Anämien (IHA) untersucht. Ziel der Studie war es, das Spektrum der Medikamente, die mit einer DIIHA assoziiert sind, zu charakterisieren sowie das mit der Medikamenteneinnahme verbundene Risiko einer IHA in einem Fall-Kontroll-Design zu quantifizieren.

Stationäre und ambulante Patienten mit neu aufgetretener IHA und Patienten der Kontrollgruppe wurden zwischen 2000 und 2009 in 50 Berliner Krankenhäusern (>180 klinische Abteilungen), sowie 17 hämato-onkologischen Praxen und 21 Laboratorien durch aktive Surveillance ermittelt. Chronische Fälle wurden in einem Follow-up nach 6 oder mehr Monaten identifiziert. Für alle Patienten mit Verdacht auf DIIHA wurde die Arzneimittelexposition ermittelt und eine standardisierte Kausalitätsbeurteilung entsprechend den Kriterien der Kausalitätsbeurteilungsmethode der Weltgesundheitsorganisation (WHO) durchgeführt, um eine mögliche Arzneimittelätiologie abzuschätzen.

Insgesamt wurden 134 Fälle (124 ambulant, 10 stationär) einer neu aufgetretenen IHA identifiziert, davon 59 Fällen mit zumindest wahrscheinlicher Kausalität der IHA mit einer

Medikamenteneinnahme. Am häufigsten wurden Diclofenac, Fludarabin, Oxaliplatin, Ceftriaxon und Piperacillin mit 14, 6 und jeweils 3 Patienten als sichere oder wahrscheinlich Ursache einer IHA eingestuft. In einer Fall-Kontroll-Analyse, die alle 124 ambulant entwickelten Fälle einer IHA und 731 Kontrollpatienten umfasste, wurden signifikant erhöhte Odds Ratios (OR) für Beta-Laktam-Antibiotika (OR = 8.8; 95% Konfidenzintervall [CI] 3.2–25.2), Cotrimoxazol (OR = 6.5; CI 1.1–37.9), Ciprofloxacin (OR = 6.9, CI 1.3–38.5), Fludarabin (OR = 22.2; CI: 2.8–454.5) und Lorazepam (OR = 5.3; CI: 1.2–21.2) beobachtet. Unter Ausschluss neu auftretender Fälle mit einem chronischen Krankheitsverlauf einer IHA zeigte sich auch ein erhöhtes Risiko für Diclofenac mit einem OR von 3.1 (CI 1.3–7.).

Es handelte sich um die erste und bisher einzige Fall-Kontroll-Studie, in der systematisch Medikamente als mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer IHA untersucht wurden. Im Ergebnis bestätigte sich in der standardisierten Kausalitätsbewertung ein erhöhtes Risiko für bestimmte Medikamente.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08784.x>

2.1.2 Variabilität medikamentös induzierter Immunhämolyse

Mayer B, Bartolmäs T, Yürek S, Salama A. Variability of Findings in Drug-Induced Immune Haemolytic Anaemia: Experience over 20 Years in a Single Centre. Transfusion Medicine and Hemotherapy 2015 Sep;42(5):333-9. doi: 10.1159/000440673

Die medikamenteninduzierte immunhämolytische Anämie (DIIHA) ist gekennzeichnet durch einen plötzlichen Abfall des Hämoglobins im Zusammenhang mit einer Medikamentengabe. Die Klinik ist sehr variabel und die exakte Diagnose oftmals erschwert und wenigen Speziallaboren vorbehalten. Ferner ist das Spektrum der Medikamente, die eine DIIHA verursachen können, nur unzureichend bekannt. Daher kommt es immer wieder zu Fehldiagnosen.

In dieser Arbeit wurden kumulativ alle Fälle von DIIHA vorgestellt, die in den Jahren 1996 – 2015 am Institut für Transfusionsmedizin der Charité diagnostiziert und deren auslösende Substanz serologisch bestätigt wurden. Ziel der Arbeit war es, einen Überblick über die Klinik und die serologischen Besonderheiten der DIIHA zu geben und auf diese Weise einen Beitrag zur verbesserten Diagnose der Erkrankung zu leisten.

Insgesamt wurden 73 Fälle einer DIIHA identifiziert, die mit 15 verschiedenen Medikamenten assoziiert waren. Die am häufigsten als Auslöser einer IHA identifizierten Einzelmedikamente waren Diclofenac (n=23), Piperacillin (n=13), Ceftriaxon (n=12) und Oxaliplatin (n=10). Insgesamt waren diese vier Medikamente für mehr als 80% aller nachgewiesenen Fälle einer DIIHA verantwortlich. Soweit eruierbar, war die Hämolyse bei allen Patienten akut, und in 90% der Fälle lagen Zeichen einer intravasalen Hämolyse vor. Die Hämolyse führte bei 17 Patienten (23%) zum Tod. Bei den übrigen Patienten kam es zu einer Restitutio ad integrum, jedoch kam es als Komplikation der akuten Hämolyse bei 11 Patienten zur Schocksymptomatik bzw. zu einem vorübergehendem Nieren- und / oder Leberversagen. In 31 (42%) der Fälle wurden die initialen klinischen Symptome fehlinterpretiert und eine DIIHA primär übersehen.

Mit Ausnahme eines Patienten, dessen Blutprobe erst 6 Monate nach dem hämolytischen Ereignis untersucht wurde, war der DAT bei allen untersuchten Proben positiv. Ein positiver DAT zumindest mit Anti-C3d wurde in 65 Fällen gefunden, eine isolierte Beladung der autologen Erythrozyten mit IgG lag in 6 Fällen und mit IgA nur in 1 Fall vor. Die initialen

serologischen Ergebnisse zeigten typische Merkmale einer AIHA vom Wärmetyp in 27 (37%) Fällen und einer AIHA vom Kältetyp in 3 (4%) Fällen.

DIHA ist eine seltene, aber potenziell lebensbedrohliche Erkrankung, die in Betracht gezogen werden sollte, wenn ein Patient unter medikamentöser Behandlung eine Hämolyse entwickelt. Wie wir mit unseren Daten zeigen konnten, weist die DIHA in allen Aspekten, einschließlich ihrer Pathogenese und der klinischen und serologischen Befunde eine große Variabilität auf. Fehldiagnosen sind häufig. Eine DIHA sollte bei allen Patienten mit einer akuten Hämolyse, die sich serologisch als AIHA vom Wärme- oder Kältetyp präsentiert, in Betracht gezogen werden. Der wichtigste serologische Befund ist ein positiver DAT, der in der Regel mit Anti-C3d positiv ist.

Die Arbeit erlaubt ferner erstmals einen Überblick über das Spektrum DIHA auslösender Medikamente in Deutschland und belegt die Bedeutung von Piperacillin nach Diclofenac als Auslöser einer immunhämolytischen Anämie.

<https://doi.org/10.1159/000440673>

2.2 Klinische und serologische Besonderheiten bisher nicht beschriebener Substanzen als Auslöser einer medikamentös induzierten immunhämolytischen Anämie

Hinweisend auf eine DIIHA ist in der Regel eine akute hämolytische Anämie unklarer Genese im Zusammenhang mit einer Medikamenteneinnahme. Eine besondere Herausforderung bei der Diagnostik bisher nicht beschriebener Substanzen stellt dabei die serologische Testung dar, da nichts über die in der Regel substanztypische Reaktivität der Antikörper bekannt ist.

In den beiden nachfolgenden Publikationen werden die klinischen und serologischen Besonderheiten der Primärbeschreibungen einer DIIHA durch Etoricoxib und lomeprol näher erläutert.

2.2.1 Etoricoxib

Mayer B, Genth R, Dehner R, Salama A. The first example of a patient with etoricoxib-induced immune hemolytic anemia. Transfusion 2013 May;53(5):1033-6. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03843.x

Verschiedene nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID) sind als Verursacher einer medikamentös induzierten Immunhämolyse (DIIHA) bekannt. Seit den 1990-iger Jahren werden zunehmend Cyclooxygenase-2-Hemmer (Coxibe) für die Behandlung von Schmerzen und Entzündungen eingesetzt, da sie weniger gastrointestinale Nebenwirkungen haben als die traditionellen NSAID. Bis 2013 war von den Coxiben nur Etodolac als Auslöser einer DIIHA beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals über Etoricoxib berichtet, einem selektiven Coxib, der bei einem 84-jährigen Patienten zu einer hämolytischen Anämie führte. Obwohl es sich um medikamentös induzierte Antikörper vom sog. „Immunkomplex“-Typ handelte, welche üblicherweise eine abrupte und intravasale Hämolyse verursachen, war die resultierende Immunhämolyse überwiegend extravasal und bildete sich nur allmählich aus. Die Klinik und das serologische Bild ähnelten dem von wärmereaktiven Autoantikörpern, daher wurde initial eine AIHA vom Wärmetyt vermutet. Aus serologischer Sicht war der einzige Hinweis auf medikamenteninduzierte Antikörper der klassische Befund eines nicht reaktiven Eluats. Erst die weitere serologische Spezialdiagnostik erbrachte die korrekte Diagnose.

Der DAT war stark positiv mit Anti-IgG und -C3d. Der Nachweis medikamentenabhängiger Antikörper gelang sowohl mit Etoricoxib-gecoateten Testerythrozyten als auch deutlich stärker in der Testung von Erythrozyten in Gegenwart von löslichem Etoricoxib und seiner Urin-Metabolite. Ferner konnten in der akuten Phase auch Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit verschiedenen anderen NSAID bzw. Coxiben nachgewiesen werden.

Unsere Untersuchungen zeigten erstmals, dass Etoricoxib eine akute IHA verursachen kann, welche durch komplementaktivierende IgG-Antikörper ausgelöst wird. Wenngleich dies bei unserem Patienten nicht der Fall war, haben diese Antikörper grundsätzlich das Potential eine intravasale Immunhämolyse zu verursachen. Dies wurde durch einen zweiten, 2019 publizierten Fall bestätigt, bei dem es zu einer akuten Etoricoxib induzierten Immunhämolyse mit nachfolgendem Nierenversagen kam.⁸⁹

<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03843.x>

2.2.2 Iomeprol

Mayer B*, Leo A*, Herziger A, Houben P, Schemmer P, Salama A. *Intravascular Immune Hemolysis caused by the Contrast Medium Iomeprol. Transfusion* 2013 Oct;53(10):2141-4. *geteilte Erstautorenschaft; doi: 10.1111/trf.12089

Iomeprol ist ein nicht-ionisches jodhaltiges monomeres Röntgenkontrastmittel, welches seit 1995 in Europa auf dem Markt ist. Iomeprol besitzt eine Halbwertszeit von ca. 110 min und wird unverändert renal ausgeschieden. Unerwünschte Ereignisse im Zusammenhang mit Iomeprol sind denen ähnlich, die bei anderen nicht-ionischen Kontrastmitteln beobachtet werden und bestehen im Wesentlichen aus Überempfindlichkeitsreaktionen, Nierenfunktionsstörungen und Hyperthyreose. In der vorliegenden Arbeit wird eine 34-jährige Patientin beschrieben, die nach Injektion von 50 ml Iomeprol eine massive IHA entwickelte.

Während der Infusion kam es zu einem abrupten Abfall des Hämoglobinwerts von 9,1 g/dl auf 2,6 g/dl einhergehend mit einem Anstieg des freien Hämoglobins auf 45 mg/dl und des LDH von 228 auf 727 IU/ml. Zunächst wurde eine allergische Reaktion angenommen, und als die Hämolyse offensichtlich wurde, wurde eine toxische Hämolyse vermutet. Die serologische Nachuntersuchung ergab jedoch einen Iomeprol-abhängigen erythrozytären Antikörper.

Der DAT wies eine deutliche aber isolierte C3d-Beladung auf. Im Plasma war ein panagglutinierender Iomeprol-abhängiger Antikörper der Subklasse IgM nachweisbar, welcher nach Dialyse des Plasmas deutlich abgeschwächt reagierte. Der Antikörper zeigte keine Kreuzreaktivität mit zwei weiteren niedermolekularen, nicht-ionischen Röntgenkontrastmitteln (Iohexol, Iopromide). Zusätzlich waren IgG-Autoantikörper mit e-Spezifität nachweisbar, die möglicherweise ebenfalls durch Iomeprol induziert waren.

Eine IHA im Zusammenhang mit Röntgenkontrastmitteln wurde zuvor nur einmal 1991 beschrieben. Die vorliegende Arbeit belegt, dass die Entwicklung einer IHA als seltenes Risiko einer Röntgenkontrastmittelgabe in Betracht gezogen werden sollte.

Nachfolgend diagnostizierten wir einen weiteren Fall einer IHA durch das strukturell ähnliche Röntgenkontrastmittel Iohexol.⁸⁰ Maurin et al. beschrieben 2018 einen zweiten Fall einer durch Iomeprol verursachten akuten und schweren IHA.⁹⁰ Die Daten dieser Publikationen

unterstützen die Bedeutung von Röntgenkontrastmitteln als Auslöser akuter und schwerer Immunhämolyse.

<https://doi.org/10.1111/trf.12089>

2.3 Besonderheiten Piperacillin-induzierter Immunhämolysen

2.3.1 Klinik und Serologie Piperacillin-induzierter Immunhämolysen: Ergebnisse einer Fallserie

Mayer B, Yürek S, Salama A. Piperacillin-induced immune hemolysis: new cases and a concise review of the literature. *Transfusion* 2010 May;50(5):1135-8. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02544.x.

Piperacillin, ein β -Lactam-Antibiotikum, hat das breiteste Wirkungsspektrum aller Penicilline und wirkt sowohl im grampositiven wie gramnegativen Bereich, inklusive gegen sogenannte Problemkeime wie *Pseudomonas aeruginosa* und Enterobakterien. Daher wird es häufig bei Patienten mit schweren Infektionen eingesetzt. Da Piperacillin nicht β -Lactamase stabil ist, wird es üblicherweise mit einem β -Lactamase-Inhibitor, z.B. Tazobactam, kombiniert.⁹¹

Schon kurz nach der Markteinführung in den 1980-iger Jahren wurde erstmals über eine Piperacillin-induzierte Anämie und Leukopenie berichtet.⁹² Es folgten eine Reihe serologisch bestätigter Fälle Piperacillin-induzierten Autoimmunhämolytischen Anämie, fast ausnahmslos handelte es sich dabei um Einzelfallberichte.^{85,93-97}

In der vorliegenden Fallserie konnte bestätigt werden, dass Piperacillin im Gegensatz zu Penicillin Medikamentenabhängige Antikörper vom sog. „Immunkomplextyp“ verursacht und dass die Hämolysen in der Regel abrupt und intravasal sind. Ein Patient verstarb, bei einem Patienten war die Hämolyse mit einem akuten Nierenversagen und in einem weiteren Fall bei Abfall des Hämoglobinwerts auf 1,6 g/dl mit einer vorübergehenden Schocksymptomatik assoziiert. Es handelte sich dabei um den bisher im Rahmen einer Piperacillin-induzierten Autoimmunhämolyse beschriebenen niedrigsten Hämoglobinwert, der zu einer Restitutio ad integrum geführt hat. Der DAT war bei allen Patienten positiv mit Anti-IgG und häufig zusätzlich auch mit Anti-C3d, was für eine Komplementaktivierung der ursächlichen Antikörper spricht. Ferner konnte erstmals gezeigt werden, dass einige der Antikörper gegen Piperacillin nur in der Testung mit ex-vivo Metaboliten reagieren. Dies ist auch von anderen medikamentenabhängigen Antikörpern, insbesondere gegen Diclofenac bekannt, und unterstreicht den Stellenwert der Testung von Urinmetaboliten zur Sicherung der Diagnose.

Zudem wurde erstmals eine mögliche Assoziation zwischen Piperacillin-induzierter Immunnämolyse und Patienten mit Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) hergestellt. So litten 5 der 8 (63%) untersuchten Patienten und mind. 3 der davor publizierten Fälle einer Piperacillin-induzierten Autoimmunhämolyse an einer Mukoviszidose. Diese Assoziation wurde durch eine Reihe sich anschließender Fallberichte bestätigt

<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02544.x>

2.3.2 Risiko einer Piperacillin-induzierten immunhämolytischen Anämie bei Patienten mit Cystischer Fibrose

Röhmel J, Specht P, Staab D, Schwarz C, Salama A, Mayer B*. Risk of piperacillin-induced hemolytic anemia in patients with Cystic Fibrosis and antipseudomonal treatment: a prospective observational study. Transfusion 2019;59:3746-3754
geteilte Letztautorenschaft; doi: 10.1111/trf.15591

Auf der Basis der Beobachtungen aus der vorangegangenen Studie aus 2010, die eine erhöhte Inzidenz Piperacillin-induzierter Immunhämolysen bei Patienten mit Mukoviszidose vermuten ließ, wurde eine prospektive Beobachtungsstudie durchgeführt. Ziel war die Ermittlung der Prävalenz von medikamentenabhängigen Antikörpern und der Inzidenz einer DIIHA. Als Modellkohorte wurden Patienten mit Mukoviszidose gewählt, die sich in der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie, Immunologie und Intensivmedizin der Charité in Behandlung befinden, da es sich hierbei um ein sehr gut charakterisiertes Patientenkollektiv im Hinblick auf vorausgegangene Antibiotikagaben und -intervalle handelt.⁹⁸

Eingeschlossen wurden Patienten, die zwischen Oktober 2015 und Juni 2016 zur i.v. Antibiose stationär behandelt wurden und mindestens 3 vorausgegangene Antibiotikazyklen erhalten hatten. Gemäß Standardprotokoll erhielten alle Patienten zwei i.v. Antibiotika über einen Zeitraum von 14 Tagen. Am Tag 3 (+1) und am Tag 12 (+/- 2) erfolgten Probenabnahmen zur Untersuchung der Hämolyseparameter und für die serologische Diagnostik inkl. Testung auf medikamentenabhängige Antikörper. Letztere wurde für alle parenteralen Antibiotika durchgeführt, die während des jeweiligen Behandlungsverlaufs verabreicht wurden. Zusätzlich erfolgte bei allen Patienten eine Testung auf Antikörper gegen Piperacillin / Tazobactam, unabhängig vom aktuellen Behandlungsregime.

Insgesamt wurden 52 Antibiotikazyklen bei 43 Patienten ausgewertet. Piperacillin-abhängige Antikörper wurden bei zwei der Patienten (4,7%) nachgewiesen. Der DAT war bei beiden Patienten positiv mit Anti-IgG, nur ein Patient entwickelte eine klinisch manifeste (milde) AIHA. Beide Patienten hatten vorher wiederholt Piperacillin erhalten ohne offensichtliche Hämolyse. Antikörper gegen andere Antibiotika wurden nicht nachgewiesen. Eine Analyse der Risikofaktoren ergab keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Piperacillin-abhängigen Antikörpern und der Anzahl an vorangegangenen Antibiotikazyklen oder der kumulativen Expositionsdosis.

Durch diese erste prospektive Beobachtungsstudie konnte erstmals wissenschaftlich belegt werden, dass die Prävalenz Piperacillin-abhängiger Antikörper bei Patienten mit Mukoviszidose deutlich höher ist als bisher vermutet. Ferner wurden die Beobachtungen aus einer vorangegangenen Fallbeschreibung⁹⁹ bestätigt, dass neben den akuten und schweren Verläufen, auch subklinische Hämolysen auftreten.

Risk of piperacillin-induced hemolytic anemia in patients with cystic fibrosis and antipseudomonal treatment: a prospective observational study

Jobst Roehmel,¹ Philip Specht,¹ Doris Staab,¹ Carsten Schwarz,¹ Abdulgabar Salama,^{2,†} and Beate Mayer^{3,†}

BACKGROUND: Drug-induced immune hemolytic anemia (DIIHA) is a rare but severe side effect caused by numerous drugs. Case reports and case series suggest that piperacillin-related DIIHA may be more common among patients with cystic fibrosis (CF). However, the prevalence is speculative. The aim of this prospective, observational study was to determine the prevalence of DIIHA in such affected patients.

METHODS AND MATERIALS: Patients with CF hospitalized for parenteral antibiotic therapy at Charité Universitätsmedizin Berlin, who had previously been exposed to IV antibiotics, were enrolled. Blood samples were collected on Days 3 and 12 of antibiotic treatment courses. Serological studies were performed using standard techniques with gel cards. Screening for drug-dependent antibodies (ddab) was performed in the presence of the drugs and their urinary metabolites.

RESULTS: A total of 52 parenteral antibiotic cycles in 43 patients were investigated. Ddab against piperacillin were detected in two patients (4.7%). The direct AHG was positive with anti-IgG only in both patients. However, only one of these patients developed mild immune hemolytic anemia. Both patients had been repeatedly treated with piperacillin without any evident hemolysis. There was no correlation between the exposure to piperacillin and the prevalence of ddab.

CONCLUSION: Our prospective study indicates that piperacillin-induced ddab occur more frequently in patients with CF than previously suggested. The question related to the significance of piperacillin-dependent antibodies may reflect new aspects in this field.

With an incidence rate of 1.4 per 1,000,000 individuals annually, drug-induced immune hemolytic anemia (DIIHA) is a rare but severe side effect of drug administration.^{1,2} Yet, DIIHA is likely underdiagnosed, as symptoms vary and hemolysis can be overlooked or misdiagnosed.³

More than 130 drugs have been reported to cause DIIHA. The most common causative agents are second- and third-generation cephalosporins, piperacillin, and platinum-based chemotherapies.⁴ The exact pathomechanism of DIIHA is unknown. One hypothesis is that the immune response to drugs may be initiated by the interaction of the drug or its metabolites with the target cell membrane, leading to the formation of neoantigens and consequently the production of drug-dependent antibodies (ddab) and/or autoantibodies (aab).^{1,5-7} Ddab react only in the presence of the drug and/or its metabolites and can be classified into two types. Most ddab of the first type belong to the IgG and/or IgM class and cause

From the ¹Department of Pediatric Pneumology, Immunology and Intensive Care Medicine – Division of Cystic Fibrosis, ²Department of Gynecology, and the ³Institute of Transfusion Medicine, Charité Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany.

Address reprint requests to: Dr. Beate Mayer, senior physician, Institute of Transfusion Medicine, Charité Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany; e-mail: beate.mayer@charite.de.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

[†]Shared senior authors.

Funding: There was no external funding of the reported study.

Received for publication June 3, 2019; revision received September 23, 2019, and accepted September 28, 2019.

doi:10.1111/trf.15591

© 2019 The Authors. *Transfusion* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of AABB.

TRANSFUSION 2019;59:3746–3754

intravascular hemolysis via complement activation (so called “immune complex mechanism”). The vast majority of the second type belong to non complement activating IgG antibodies (ab), such as penicillin dependent ab, and cause extravascular hemolysis. In contrast, drug induced aab react with target cells independent of the drug. They are neither clinically nor serologically distinguishable from idiopathic aab and usually cause extravascular hemolysis.⁷⁻⁹ In addition, some drugs can cause a positive DAT with or without hemolysis by nonimmunologic protein adsorption (NIPA).^{4,10}

Very little attention has been paid to the proportion of patients producing ddab and/or a positive DAT with or without hemolytic anemia. In studies dating back to the 1960s, approximately 3% to 5% of patients receiving large doses of IV (intravenous) penicillin and up to 30% of patients ingesting alpha methyl dopa for more than 3 months develop a positive DAT. However, only a small percentage of such patients develop penicillin dependent or autoimmune IgG mediated extravascular hemolysis, respectively.^{1,11-14} More recently, Quillen et al. reported on the prevalence of ceftriaxone induced antibodies in patients with sickle cell disease (SCD) and HIV.¹⁵ To our knowledge, there are no other studies dealing with the prevalence of drug induced antibodies.

Patients with cystic fibrosis (CF) suffer from chronic bronchial infections with multi resistant, primarily gram negative bacteria and require repeated treatment with high dose antibiotics.¹⁶ Previous case reports¹⁷⁻²⁶ and case series^{27,28} suggest a higher incidence of DIIHA due to piperacillin in patients with CF compared to the general patient population. Indeed, more than 50% of the reported cases of piperacillin induced hemolytic anemia (PIHA) were observed in patients with CF.²⁹⁻³⁶ PIHA is usually characterized by acute intravascular hemolysis due to complement activation.^{17,18,20,22,23,27,34,35,37} We recently reported a mild course of hemolytic anemia due to piperacillin/tazobactam treatment in a patient with CF.³⁸

The prevalence of drug induced ab with hemolytic potential in patients with CF is unknown. This prospective study was conducted to evaluate the incidence of DIIHA in patients with CF and to assess the prevalence of ddab to RBCs as a possible risk factor or biomarker for DIIHA. The focus was on all relevant antipseudomonal antibiotics to evaluate their potential in causing DIIHA.

METHODS

Setting and study population

This prospective observational study was conducted at the Charité Universitätsmedizin Berlin. Patients at the CF center of the Charité (Pediatric Pneumology Department) were selected to represent patients with extremely high exposure to parenteral antibiotics.¹⁶ From this cohort of currently treated 450 patients with CF (320 adults, 130 children), pediatric (minimum age of 12 years) and adult patients

were recruited prospectively at the beginning of in hospital IV antibiotic treatment courses between October 2015 and June 2016. Inclusion criteria were at least three previous parenteral antibiotic treatment courses and willingness to consent. Exclusion criteria were a history of organ transplantation. Patients were excluded from the final analysis in the case of an incomplete (<10 days of IV antibiotics) treatment course or incomplete laboratory analysis. The project was approved by the ethics committee of Charité Universitätsmedizin Berlin (Number: EA2/079/15).

Study design

After providing written informed consent, patients were interviewed using a standard questionnaire for drug allergies (ENDA Questionnaire³⁹), which is a structured questionnaire that evaluates drug allergy history. The following clinical information was additionally collected for risk factor analysis: FEV1 predicted (forced expiratory volume in 1 second, FEV1), CF transmembrane regulator (CFTR) genotype, microbial colonization, and a detailed quantitative history of exposure to IV antibiotics. Medical records were reviewed to expand and verify the information from the interviews.

According to standard protocols, treatment courses for patients with CF comprised two IV antibiotics for 14 days.⁴⁰ For included patients, testing for ddab was performed for all parenteral antibiotics administered during the respective treatment course (aztreonam, ceftazidime, cefepime, meropenem, imipenem, tobramycin, fosfomycin, colistin, tigecycline, ampicillin/sulbactam, and piperacillin/tazobactam). Additionally, testing for ddab against piperacillin/tazobactam was performed for all patients independently from the current treatment regime. EDTA samples were collected on Days 3 (+1) and 12 (+/- 2) of treatment and analyzed within 48-72 hours. Samples were stored at 2-8°C until further analysis. On Day 3, samples from 24 hour urine collections were taken for testing of early onset and late onset drug metabolites. Hemoglobin and laboratory evidence of hemolysis were investigated on Days 0, 3, and 12 of the treatment courses, using the following parameters: reticulocyte count, lactate dehydrogenase, and haptoglobin. In patients with verified ddab, follow up samples for the investigation of hemolysis and serological demonstration of antibodies against RBCs were performed up to 6 months after the last antibiotic exposure, depending on patient availability.

Serological investigation

RBC antibodies were assessed by direct and indirect anti globulin test (DAT and IAT, respectively) using standard techniques with gel cards (Bio Rad, Cressier sur Morat, Switzerland). Antibody screening was performed with papain treated RBCs on neutral cards in all patients with positive DAT and/or positive IAT. Monospecific DAT was conducted using DC Screening I cards (Bio Rad). Eluates

from patients' RBCs were prepared using the acid technique (BAG Health Care).

Ddab were investigated using the gel technique with polyspecific antiglobulin reagents (ID Card LISS/Coombs, Bio Rad), as previously described, with few modifications.^{41,42} Briefly, drugs were dissolved in 0.9% NaCl to prepare a 1 mg/mL drug solution. Plasma samples (25 µL) from patients were incubated for 30 minutes at 37°C with pooled group 0 RBCs (50 µL of a 1% vol/vol suspension) in the presence of the drugs (25 µL) and with different urinary (ex vivo) metabolites of the drugs (50 µL). To obtain early and late onset drug metabolites, samples from 24 hour urines (autologous urine) and from at least one different CF patient taking the same antibiotics were used as described above. In parallel, identical tests were performed using saline instead of the drug (Negative control 1). In addition, serum samples from random donors were incubated with RBCs in the presence of the drug and the metabolites, respectively (Negative control 2). In cases of a positive test for ddab in the presence of piperacillin/tazobactam (drug solution and/or ex vivo metabolites), the test was repeated using piperacillin and tazobactam as a single substance. In patients with a positive IAT before drug analysis, serum samples were dialyzed prior to analysis to eliminate potential drug residues and retested in the presence of the culprit drug.⁴²

RESULTS

Of 58 patients that provided informed consent, 43 patients fulfilled the criteria for analysis. Of these, six patients received more than one course of antibiotics. In total, 52 antibiotic cycles were analyzed. The following antibiotics were administered (number of patients treated): piperacillin/tazobactam (20), tobramycin (19), colistin (15), ceftazidime (13),

meropenem (11), fosfomycin (7), aztreonam (2), tigecycline (1), ampicillin/sulbactam (1), cefepime (1), and imipenem (1).

In 33 (63%) of the cycles, a positive IgG DAT was detectable during antibiotic treatment. A newly positive DAT with IgG or an increase of RBC bound IgG was detectable in 26 (50%) of the cycles (Day 12 [+/- 2] vs. Day 3 [+1] of antibiotic treatment). Piperacillin/tazobactam and/or ceftazidime were involved in 24 of these 26 antibiotic cycles. In the subgroup of patients receiving piperacillin/tazobactam, 39% had a positive DAT on Day 3 of the treatment course, and 83% had a positive DAT at the end of the treatment course. Ddab against piperacillin were detected in two patients.

Patient 1

The first patient was a 50 year old female with previous exposure to piperacillin without any evident hemolytic episode. During the study, she was treated with piperacillin/tazobactam for 14 days. On Day 3 of treatment, the patient had a weak positive DAT with IgG and weak positive antibody screening with papain treated RBCs only. Drug dependent antibody testing was weak positive with piperacillin/tazobactam and two ex vivo metabolites (including autologous patient urine). On Day 12 of antibiotic treatment, serological reactivity (DAT and IAT) was markedly increased and an autoantibody with Rhesus e specificity (auto anti e) was detectable in the patient's plasma. After plasma dialysis, the autoantibody disappeared, signaling that the culprit drug had still been present in the patient's plasma. However, its reactivity was restored in the presence of piperacillin/tazobactam and five different ex vivo metabolites. This serological reactivity is typical for a drug dependent antibody, but not for an alloantibody. Interestingly, 2 weeks after discontinuation of the drug, piperacillin dependent antibody reactivity increased and specific ddab were detectable up to 7 months later (Table 1). No ddab against tazobactam or colistin were detected.

TABLE 1. Serological findings in two patients with piperacillin-dependent antibodies

Patient No.	Day	Ab screening		DAT			Piperacillin/Tazobactam dependent ab			
		IAT	Papain	Poly	IgG	C3d	Eluate	Drug*	Ex vivo (au) [†]	Ex vivo (allo) [‡]
1	3	0	+++	++	++	0	0	+/	+	+
	12	++	++++	+++	+++	0	0	+	++	++
	26	0	+	0	+/	0	0	+++	+++	+++
	210	0	nt	0	0	0	0	+/	+/	0
2	3	0	nt	0	nt	nt	nt	0	0	0
	12	0	0	+/	+/	0	0	0	0	+
	15	0	nt	+	+/	0	0	+	+	+++
	20	0	nt	0	0	0	0	++	+++	+++
	22	0	nt	0	0	0	0	+++	+++	+++
	100	0	nt	0	+/	0	0	0	0	0

Treatment with piperacillin/tazobactam 3 × 4.5 g/d: Patient number 1 from Day 1 to Day 14; Patient number 2 from Day 1 to Day 12.
 Degree of reactivity: 0 (negative), +/ (very weak), + (weak), ++ (moderate), +++ (strong) ++++ (very strong).
 * Drug: piperacillin/tazobactam or piperacillin.
 † Ex vivo (au): autologous urine.
 ‡ Ex vivo (allo): urine from other patients taking the same drug (maximum degree of reactivity: in Patient number 1 urine from up to five different patients was tested after dialysis of the plasma; in Patient number 2 urine from up to four different patients was tested).
 Ab = antibodies; nt = not tested; IAT = indirect antiglobulin test; DAT = direct antiglobulin test.

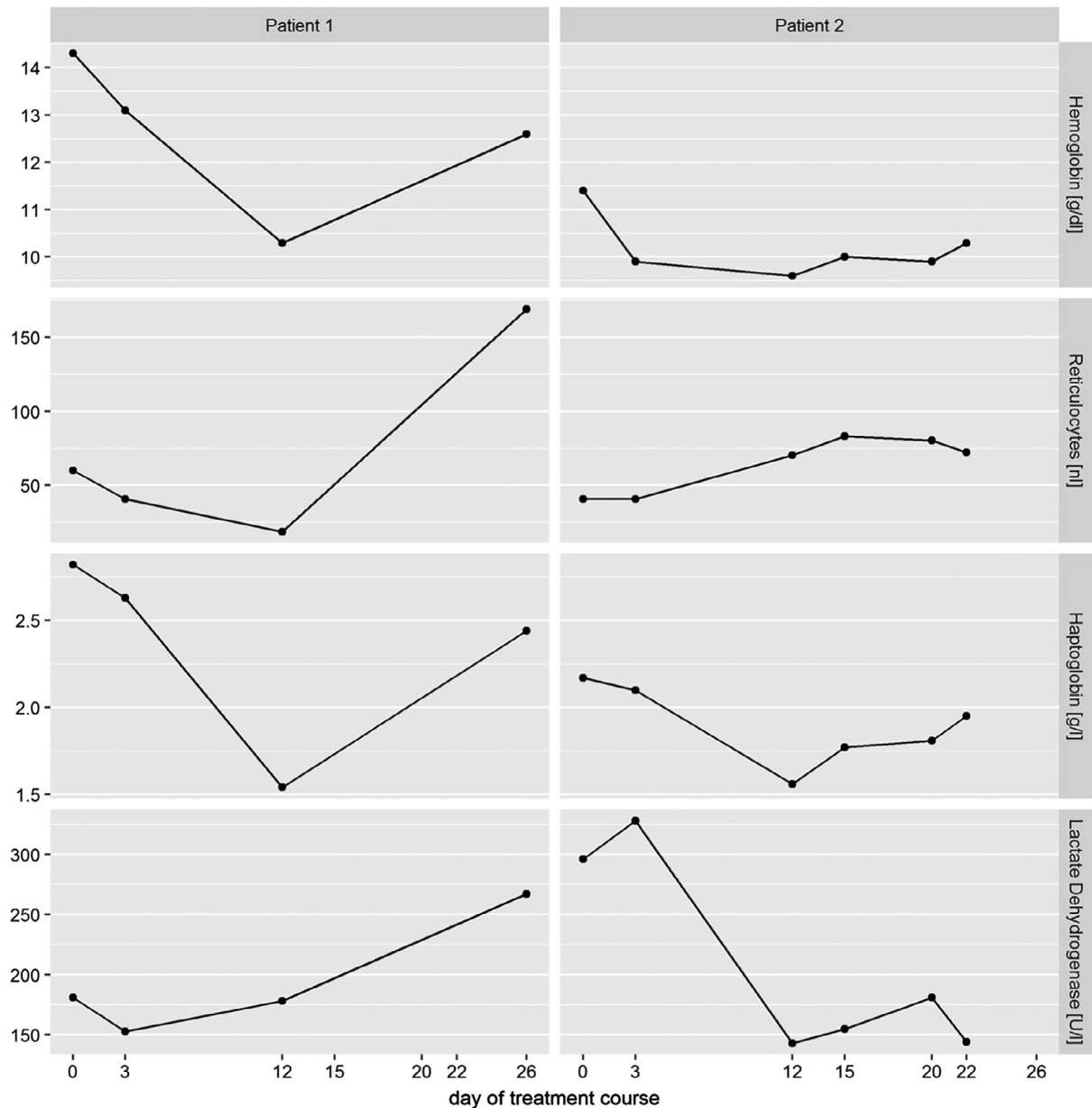


Fig. 1. The course of laboratory parameters in the two patients with piperacillin dependent antibodies.

Despite a marked decrease in hemoglobin (from 14.3 g/dL on admission to 10.3 g/dL on Day 12) and detectable weak ddab on Day 3, continuous piperacillin therapy led to comparatively mild hemolysis. This was reflected by a mild increase in LDH and the reticulocyte count, which was only evident during follow up (Day 26) but not during piperacillin treatment (Fig. 1).

Patient 2

The second patient was a 23 year old female patient previously exposed to piperacillin without any evident hemolytic episode who had experienced urticaria once while receiving

piperacillin/tazobactam. She received three courses of antibiotics during the study. Initially, no ddab were detectable. On Day 12 of the second antibiotic course with piperacillin/tazobactam and tobramycin, the DAT became weakly positive with IgG. The antibody screening test was negative in the absence of any drug, but weakly positive in the presence of four different ex vivo metabolites of piperacillin/tazobactam. Follow up samples on Days 3, 8, and 10 after completion of antibiotic therapy were also positive with a piperacillin/tazobactam drug solution and testing showed increasing reactivity during further observation. Three months later, ddab were undetectable (Table 1). Ddab against tazobactam or tobramycin were not detected.

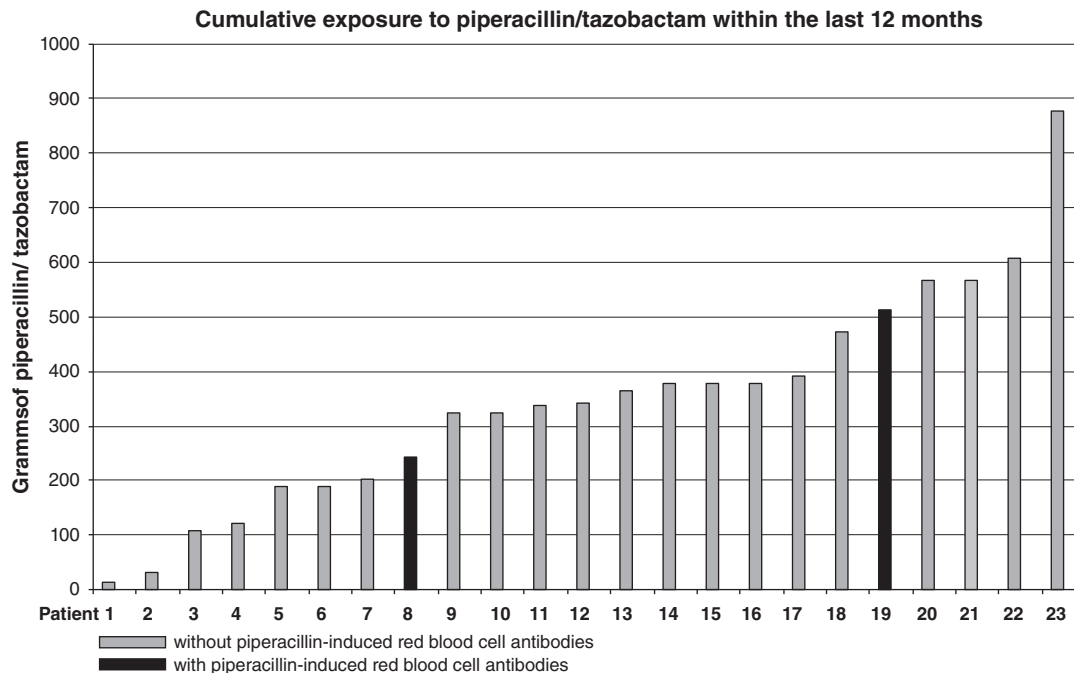


Fig. 2. Cumulative exposure to piperacillin/tazobactam within the last 12 months prior to the study in 23 patients. The two patients with detectable piperacillin dependent antibodies are highlighted in dark gray.

Of note, the patient experienced a decrease in hemoglobin from 11.4 g/dL to 9.9 g/dL and mild to moderately elevated LDH of unknown reason from admission to Day 3. On Day 12, hemoglobin levels reached a nadir of 9.6 g/dL with normal LDH levels. Furthermore, haptoglobin levels and the reticulocyte count remained within normal limits throughout the observation time. Therefore, the patient did not show evidence of hemolysis at the time of the first serological detection of ddab to piperacillin (Day 12) (Fig. 1 and Table 1).

The usual dosage of piperacillin was 4.5 g three times per day over an average of 13.5 days in the patients without, and 13 days in the two patients with piperacillin dependent antibodies. In the former case, the mean interval of the last piperacillin administration prior to the study was 4.6 months and in the latter case 7.5 months. The median number of previous piperacillin treatment courses within 30 months prior to study recruitment was not significantly different in patients with and without piperacillin dependent antibodies (5.5 vs. 2 administrations). There was no correlation between the cumulative dose of piperacillin and the prevalence of piperacillin dependent antibodies (Fig. 2). The prevalence of ddab against piperacillin was 4.7% (2 of 43) in the whole study, and 5.4% (2 of 37) in the subgroup of patients ever exposed to piperacillin or piperacillin/tazobactam. Ddab against other drugs were not detected. Risk factor analysis for FEV1, exposure to piperacillin/tazobactam, pseudomonal colonization, and total IgE levels were heterogeneous and did not reveal significant risks for DIIHA.

DISCUSSION

Drug hypersensitivity in patients with chronic bacterial infections and high antibiotic exposure is a common clinical problem. In the high risk cohort of patients with CF, exanthema, drug fever, and bronchospasm have been reported to occur in up to 60% of treated patients.^{16,43-45} The present study reports on the first cross sectional prospective trial to evaluate the incidence of DIIHA as a manifestation of drug hypersensitivity in patients with CF. The prevalence of 4.7% of piperacillin dependent antibodies to RBCs shows that this phenomenon is more common than previously suggested. Our results are supported by previous research focusing on drug hypersensitivity in CF, which consistently shows piperacillin as the most immunogenic drug.^{46,47} Piperacillin appears to have a higher inclination of causing DIIHA than other antipseudomonal antibiotics. With the exception of one suspected case of ceftazidime induced hemolytic anemia,⁴⁸ only piperacillin and piperacillin/tazobactam have so far been reported to cause DIIHA in patients with CF. These findings raise questions regarding whether PIHA is much more common in the high risk cohort of patients with CF or in general, with mild manifestations potentially escaping detection. A study of a non CF cohort with high exposure to antipseudomonal antibiotics, especially piperacillin, would be required to address these questions.

The onset and the severity of PIHA are variable and may occur within 1 to 14 days after initiating piperacillin or

piperacillin/tazobactam therapy. Hemoglobin frequently decreases to 3–5 g/dL^{18–24,26–28,31,33} or even lower levels^{25,37} and results in fatalities in up to 6% of cases.⁴⁹ Therefore, PIHA has been regarded as a highly acute and life-threatening event, particularly if it remains undetected in due time. In contrast, the two patients described in the present study and in a patient from a previously published case report developed only mild PIHA.³⁸

There is little information about the immunologic mechanism leading to the production of drug dependent antibodies. In a recent study, drug specific B cells were characterized. In piperacillin hypersensitive patients with CF, drug responsive B cells secreting drug specific IgG were detected.⁴⁶ The significance of these IgG ab remains unclear. A subsequent study focused on the specificity of anti piperacillin IgG ab using structurally related drug protein adducts. Anti piperacillin IgG was shown to bind with high specificity to piperacillin.⁵⁰ However, the hemolytic potential of these antibodies has not yet been evaluated.

It remains unclear whether patients with CF are at a greater risk of developing piperacillin dependent ab to RBCs simply due to high antibiotic exposure or if other predisposing factors exist. Descriptive analysis of risk factors in our study did not reveal trends for FEV1, total serum IgE, or cumulative exposure to specific antibiotics. The presence of an association between hypersensitivity reactions to antibiotics and drug induced hemolysis of RBCs remains ambiguous. Patient number 2 had urticaria and our previous patient (described in the case report by Meinus et al.³⁸) had drug fever due to piperacillin before developing PIHA. In these two cases, a sequence of different immune responses to piperacillin could be observed. In our patient cohort with and without detectable piperacillin dependent antibodies, there was no difference in the occurrence of previous allergic drug reactions to piperacillin. The only risk factors presently identified are piperacillin exposure and the diagnosis of CF.

While the cumulative dose of single antibiotics has been shown to be a risk factor for general drug hypersensitivity in patients with CF,¹⁶ an association between the administered drug dose and the occurrence of DIIHA is not likely.⁸ This is also supported by the results in the present study. Furthermore, repeated exposure to the same drug has been suggested to be important in the antibody formation process and DIIHA development.^{8,31,49,51} The latter findings are in line with the results of this study. Both of the patients described with PIHA were treated recurrently with piperacillin.

Another important issue is a potential predisposition between CF related cofactors and the development of ddab and DIIHA. Altered CF transmembrane conductance regulator (CFTR) in CF patients has been hypothesized to potentially play an important role. The mutation in CFTR causes decreased nitrous oxide production, leading to vasoconstriction and an enhanced risk of intravascular RBC sludging. This may explain why patients with CF are more susceptible

to severe forms of DIIHA.²⁰ The chronic hyperinflammatory state in CF patients may also be crucial,^{19,52} as inflammation is associated with a higher probability of alloimmunization. This might be comparable to the alloimmunization process of transfused RBC, whereby an increased inflammatory status of the recipient appears to enhance the immune response to transfused antigens.⁵³

Whether patients with mild hemolysis can have a sequence to severe intravascular hemolysis with complement activation under repetitive treatment with the culprit drug is an open question.^{54,55} There is some evidence that the complete clinical picture of PIHA in patients with CF might be preceded by a mild hemolytic episode, which may be overlooked in some cases.²⁶ In Garcia, Gala and colleagues report on a patient with immune hemolysis due to piperacillin/tazobactam, the patient developed weak positive DAT, hemolysis, and increased serological reactivity under continuous treatment with the drug.²⁹ This is in line with the clinical course of Patient number 1, in which the serological picture changed remarkably under continuous treatment with piperacillin/tazobactam. The patient eventually showed a strong positive DAT, negative eluate (without adding piperacillin), and detectable auto anti e antibodies. In addition, there was laboratory evidence of hemolysis.

The significance of ddab and/or a positive DAT without clinical or laboratory signs of hemolysis is rather speculative. Ceftriaxone induced RBC antibodies have been reported to be common in children with SCD or human immunodeficiency virus (HIV) infection, with a high likelihood of ceftriaxone exposure. The reported prevalence was 5.3 and 15.6%, respectively. Only two of the eight patients with detectable ddab developed hemolysis, with one fatal case.¹⁵ As ceftriaxone is rarely used in patients with CF due to its poor antipseudomonal activity, there are no equivalent data concerning the prevalence of ceftriaxone induced antibodies in the CF patient group.

The pathomechanism may be somewhat comparable to that in patients receiving large doses of penicillin or alpha methyl dopa, where only a proportion of patients that develop a positive DAT and/or aab develop DIIHA or autoimmune hemolysis, respectively.⁸ In patients with warm reactive aab of IgG type, the ability to activate complement has been proposed as one of the variables that predict the occurrence of severe hemolysis.^{1,56} Most of the reported cases of PIHA implicate a complement mediated intravascular process. Only a few cases with severe hemolysis without detectable complement fragments on patient RBC have been described.^{25,33,34} The observation that both of the patients with piperacillin dependent ab in our study did not develop severe or significant hemolysis may be explained by the occurrence of non complement activating IgG ab. Further studies are required to determine predictive factors to identify patients with detectable ddab at risk of developing DIIHA.

The clinical significance of the frequently observed positive DAT under antibiotic treatment in our study remains

unclear. Penicillin and cephalosporin administered in large doses can frequently lead to a positive DAT and hemolysis in a few cases. Some drugs are able to alter the RBC membrane, leading to protein (e.g., immunoglobulins) uptake and as a result to positive DAT in immunohematology testing, the so called "nonimmunological protein adsorption (NIPA)." ^{4,10} Therefore, NIPA is independent of the drug antibody formation. NIPA is known to occur as a result of the tazobactam but not the piperacillin component of piperacillin/tazobactam. ⁵⁷ The high rate of positive DATs in patients treated with ceftazidime was unexpected, as this has only been described previously in other cephalosporins, e.g., cefotetan, cephaloridine, and cephalothin. ⁴

In summary, the repetitive use of piperacillin can lead to piperacillin dependent antibodies in a certain number of patients (with CF) and subsequently lead to clinically relevant PIHA in a portion of these patients. The predictive value of ddab detection per se and potential predisposing factors for developing severe hemolysis in these patients need to be addressed in future studies.

Strengths and limitations

To the best of our knowledge, this study is the first prospective study on DIIHA in patients with CF. To date, DIIHA has been regarded as a rare complication of drug treatment. Despite the limited number of patients enrolled, our data suggest a higher prevalence of piperacillin induced antibodies in the high risk cohort of patients with CF and suggest a new recommendation for patient safety in high risk cohorts.

A potential bias lies in patient selection toward patients with advanced lung disease because of their higher need for parenteral antipseudomonal treatment and the exclusive recruitment of patients from the inpatient ward. Such patients frequently have high levels of inflammation that may favor adverse reactions. Therefore, the transferability of the high incidence of DIIHA in this study to other cohorts with lower levels of inflammation may be limited.

A limitation of our study might have been that we used plasma but no serum samples. Some ddab activate complement. In these cases, the use of serum might be better than the use of plasma. Furthermore, we used drug solution for testing but no drug coated RBCs. For the investigation of piperacillin ddab, testing in the presence of the drug is the more reliable method compared to using drug coated RBCs. ⁵⁸ However, in the samples which were negative in our study, we could have missed ddab against other antipseudomonal antibiotics only reacting with drug coated RBCs. Therefore the prevalence of ddab in our study might have been underestimated.

Finally, the present study has provided insight on an important issue for the safety of patients with CF and all patients with chronic exposure to piperacillin. Following the detection of drug dependent hemolytic antibodies, the only recommendation that can be presently made is the life long

avoidance of the culprit antibiotics. Furthermore, as a positive DAT is known to be a necessary but insufficient condition for hemolysis, we suggest screening patients with repeated and/or high exposure to piperacillin for a positive DAT. Patients that develop a positive DAT under piperacillin treatment should be closely monitored for hemolysis and/or screened for the presence of piperacillin dependent ab.

Our findings should be confirmed in a multicenter prospective trial to confirm the high incidence of DIIHA in patients with CF and in other high risk patient cohorts. Additionally, risk factor analysis in a larger cohort may reveal new findings.

ACKNOWLEDGMENTS

Dr. Justine Röhmel, an economist, supported with no funding, was involved in data analysis and illustration.


CONFLICT OF INTEREST

The authors declare to have no conflict of interests.

REFERENCES

- Petz L, Garratty G. Immune hemolytic anemias. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004.
- Garbe E, Andersohn F, Bronder E, et al. Drug induced immune haemolytic anaemia in the Berlin Case Control Surveillance Study. *Br J Haematol* 2011;154:644-53.
- Salama A, Mayer B. Diagnostic pitfalls of drug induced immune hemolytic anemia. *Immunohematology* 2014;30:80-4.
- Garratty G, Arndt PA. Drugs that have been shown to cause drug induced immune hemolytic anemia or positive direct antiglobulin tests: some interesting findings since 2007. *Immunohematology* 2014;30:66-79.
- Mueller Eckhardt C, Salama A. Drug induced immune cytopenias: a unifying pathogenetic concept with special emphasis on the role of drug metabolites. *Transfus Med Rev* 1990;4:69-77.
- Salama A, Mueller Eckhardt C. Immune mediated blood cell dyscrasias related to drugs. *Semin Hematol* 1992;29:54-63.
- Arndt PA. Drug induced immune hemolytic anemia: the last 30 years of changes. *Immunohematology* 2014;30:44-54.
- Salama A. Drug induced immune hemolytic anemia. *Expert Opin Drug Saf* 2009;8:73-9.
- Garratty G. Immune hemolytic anemia caused by drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2012;11:635-42.
- Ehmann WC. Cephalosporin induced hemolysis: a case report and review of the literature. *Am J Hematol* 1992;40:121-5.
- Abraham GN, Petz LD, Fudenberg HH. Immunohaematological cross allergenicity between penicillin and cephalothin in humans. *Clin Exp Immunol* 1968;3:343-57.

12. Levine BB. Immunologic mechanisms of penicillin allergy. A haptenic model system for the study of allergic diseases of man. *N Engl J Med* 1966;275:1115-25.
13. Carstairs KC, Breckenridge A, Dollery CT, et al. Incidence of a positive direct coombs test in patients on alpha methyl dopa. *Lancet* 1966;2:133-5.
14. Worledge SM. Autoantibody formation associated with methyldopa (aldomet) therapy. *Br J Haematol* 1969;16:5-8.
15. Quillen K, Lane C, Hu E, et al. Prevalence of ceftriaxone induced red blood cell antibodies in pediatric patients with sickle cell disease and human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:357-8.
16. Roehmel JF, Schwarz C, Mehl A, et al. Hypersensitivity to antibiotics in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2014;13:205-11.
17. Thickett KM, Wildman MJ, Fegan CD, et al. Haemolytic anaemia following treatment with piperacillin in a patient with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:435-6.
18. Arndt PA, Garratty G, Hill J, et al. Two cases of immune haemolytic anaemia, associated with anti piperacillin, detected by the 'immune complex' method. *Vox Sang* 2002;83:273-8.
19. Chavez A, Mian A, Scurlock AM, et al. Antibiotic hypersensitivity in CF: drug induced life threatening hemolytic anemia in a pediatric patient. *J Cyst Fibros* 2010;9:433-8.
20. Bandara M, Seder DB, Garratty G, et al. Piperacillin induced immune hemolytic anemia in an adult with cystic fibrosis. *Case Rep Med* 2010;2010:161454.
21. Gehrie E, Neff AT, Ciombor KK, et al. Transfusion medicine illustrated. Profound piperacillin mediated drug induced immune hemolysis in a patient with cystic fibrosis. *Transfusion* 2012;52:4-5.
22. Nagao B, Yuan S, Bon Homme M. Sudden onset of severe anemia in a patient with cystic fibrosis. *Clin Chem* 2012;58:1286-9.
23. Marik PE, Parekh P. Life threatening piperacillin induced immune haemolysis in a patient with cystic fibrosis. *BMJ Case Rep* 2013;2013:1-2.
24. Zanetti RC, Biswas AK. Hemolytic anemia as a result of piperacillin/tazobactam administration: a case report and discussion of pathophysiology. *Mil Med* 2013;178:e1045-7.
25. Prince BT, McMahon BJ, Jain M, et al. Meropenem tolerance in a patient with probable fulminant piperacillin induced immune hemolytic anemia. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015;3:452-3.
26. Kerkhoff AD, Patrick L, Cornett P, et al. Severe piperacillin tazobactam induced hemolysis in a cystic fibrosis patient. *Clin Case Rep* 2017;5:2059-61.
27. Mayer B, Yürek S, Salama A. Piperacillin induced immune hemolysis: new cases and a concise review of the literature. *Transfusion* 2010;50:1135-8.
28. Arndt PA, Leger RM, Garratty G. Serological characteristics of anti piperacillin in seventeen patients with drug induced immune hemolytic anemia. *Transfusion* 2010;50:37A.
29. Garcia Gala JM, Vazquez Aller S, Rodriguez Vicente P, et al. Immune hemolysis due to piperacillin/tazobactam. *Transfus Apher Sci* 2009;40:97-8.
30. Johnson ST, Weitekamp LA, Sauer DE, et al. Piperacillin dependent antibody with relative e specificity reacting with drug treated red cells and untreated red cells in the presence of the drug. *Transfusion* 1994;34:70S.
31. Lohiya GS, Tan Figueroa L, Krishna V. Piperacillin induced immune hemolysis presenting with tachycardia and cardiac arrest. *Case Rep Med* 2011;2011:816497.
32. Bressler RB, Huston DP. Piperacillin induced anemia and leukopenia. *South Med J* 1986;79:255-6.
33. Audeh YM, Wehrli G. Hemolytic anemia due to Zosyn and the blood bank physician's role. *Transfusion* 2002;42:106S.
34. Shirey R, Iding J, King KE, et al. Drug induced immune hemolysis mimicking an acute hemolytic transfusion reaction. *Transfusion* 2005;45:100A-1A.
35. Shirey R, Yamada C, Ness PM, et al. Drug induced immune hemolytic anemia imitating a severe delayed hemolytic transfusion reaction. *Transfusion* 2007;47:185A.
36. Johnson ST, Fueger JT, Gottschall JL. One center's experience: the serology and drugs associated with drug induced immune hemolytic anemia a new paradigm. *Transfusion* 2007;47:697-702.
37. Kunzmann S, Thomas W, Mayer B, et al. Immune mediated severe hemolytic crisis with a hemoglobin level of 1.6 g/dl caused by anti piperacillin antibodies in a patient with cystic fibrosis. *Infection* 2010;38:131-4.
38. Meinus C, Schwarz C, Mayer B, et al. Piperacillin induced mild haemolytic anaemia in a 44 year old patient with cystic fibrosis. *BMJ Case Rep* 2016;2016:1-3.
39. Demoly P, Kropf R, Bircher A, et al. Drug hypersensitivity: questionnaire. EAACI interest group on drug hypersensitivity. *Allergy* 1999;54:999-1003.
40. Döring G, Conway SP, Heijerman HG, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 2000;16:749-67.
41. Salama A, Berghöfer H, Mueller Eckhardt C. Detection of cell drug (hapten) antibody complexes by the gel test. *Transfusion* 1992;32:554-6.
42. Salama A, Kroll H, Wittmann G, et al. Diclofenac induced immune haemolytic anaemia: simultaneous occurrence of red blood cell autoantibodies and drug dependent antibodies. *Br J Haematol* 1996;95:640-4.
43. Burrows JA, Nissen LM, Kirkpatrick CM, et al. Beta lactam allergy in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2007;6:297-303.
44. Koch C, Hjelt K, Pedersen SS, et al. Retrospective clinical study of hypersensitivity reactions to aztreonam and six other beta lactam antibiotics in cystic fibrosis patients receiving multiple treatment courses. *Rev Infect Dis* 1991;13(Suppl 7):S608-11.
45. Pleasants RA, Walker TR, Samuelson WM. Allergic reactions to parenteral beta lactam antibiotics in patients with cystic fibrosis. *Chest* 1994;106:1124-8.
46. Amali MO, Sullivan A, Jenkins RE, et al. Detection of drug responsive B lymphocytes and antidrug IgG in patients with β lactam hypersensitivity. *Allergy* 2017;72:896-907.

47. Sullivan A, Wang E, Farrell J, et al. β Lactam hypersensitivity involves expansion of circulating and skin resident T_H22 cells. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:235 49.e8.
48. Yong J, Frost F, Nazareth D, et al. Case report: haemolytic anaemia with ceftazidime use in a patient with cystic fibrosis. *F1000Res* 2018;7:475.
49. Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with drug therapy. *Blood Rev* 2010;24:143 50.
50. Amali MO, Jenkins RE, Meng X, et al. Assessment of antipiperacillin IgG binding to structurally related drug protein adducts. *Chem Res Toxicol* 2017;30:2097 9.
51. Pierce A, Nester T, Education Committee of the Academy of Clinical Laboratory Physicians and Scientists. Pathology consultation on drug induced hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol* 2011;136:7 12.
52. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, et al. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros* 2015;14:419 30.
53. Hendrickson JE, Desmarests M, Deshpande SS, et al. Recipient inflammation affects the frequency and magnitude of immunization to transfused red blood cells. *Transfusion* 2006;46:1526 36.
54. Neuman G, Boodhan S, Wurman I, et al. Ceftriaxone induced immune hemolytic anemia. *Ann Pharmacother* 2014;48:1594 604.
55. Garratty G. Drug induced immune hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009;73 9. [https://doi: 10.1182/asheducation 2009.1.73](https://doi.org/10.1182/asheducation.2009.1.73).
56. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997.
57. Broadberry RE, Farren TW, Bevin SV, et al. Tazobactam induced haemolytic anaemia, possibly caused by non immunological adsorption of IgG onto patient's red cells. *Transfus Med* 2004;14:53 7.
58. Leger RM, Arndt PA, Garratty G. Serological studies of piperacillin antibodies. *Transfusion* 2008;48:2429 34. 

3. Diskussion

Die Relevanz medikamentös induzierter AIHA ergibt sich einerseits aus dem in der Regel akuten Krankheitsbild mit schwer verlaufenden Hämolyse und begleitenden Komplikationen wie akutem Nierenversagen und einer substanzabhängigen Letalität von bis zu 50%, andererseits aus der Problematik der korrekten Diagnosestellung.⁴⁶ Obwohl der Zusammenhang zwischen einer Medikamenteneinnahme und der Ausbildung einer Immuhämolyse seit über 60 Jahren bekannt ist, wird eine DIIHA häufig übersehen. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und schließen mangelnde Kenntnis des Krankheitsbildes und große Variabilität der klinischen Symptome mit ein. Daher werden vermutlich insbesondere mildere Formen häufig übersehen. Andererseits beruhen viele Berichte über eine DIIHA nur auf dem zeitlichen Zusammenhang mit der Medikamentengabe. Die serologische Diagnostik einer DIIHA erfordert Erfahrung und wird daher nur an einigen wenigen Referenzlaboren angeboten. Alle diese Faktoren führen dazu, dass die tatsächliche Inzidenz der DIIHA nicht bekannt ist.

Eine weitere Besonderheit der DIIHA stellt die kausale Therapieoption dar. Die Hämolyse ist nach Wegfall des Agens in der Regel selbstlimitierend. Komplikationen und letal verlaufende Fälle können jedoch bei verspäteter oder unerkannter Diagnose vorkommen.^{68,76,80,100-102}

Ziel der unter Gliederungspunkt 2 dargelegten Originalarbeiten war es daher, die Kenntnisse über DIIHA zu erweitern und neue Aspekte zur Verbesserung der Diagnostik der DIIHA einzubringen. Schwerpunkte lagen dabei auf dem Spektrum und dem Risiko verschiedener Medikamente als Auslöser einer DIIHA, der Beschreibung bisher nicht identifizierter Substanz(gruppen), sowie erstmals der systematischen Charakterisierung der klinischen und serologischen Besonderheiten einer Piperacillin-induzierten Immuhämolyse, einschließlich möglicher Krankheitsassoziationen.

3.1 Medikamentenspektrum

Das Spektrum der Medikamente, die häufiger eine DIIHA auslösen, hat sich in den letzten Jahrzehnten grundlegend verändert. Entscheidend sind hierfür vor allem der geänderte Arzneimittelverbrauch sowie die Entwicklung neuer Substanzen. Während in den USA in den 1970er Jahren mehr als 90% aller DIIHA durch Penicillin und α -Methyldopa verursacht

wurden, haben seit den 1990er Jahren vor allem Cephalosporine der zweiten und dritten Generation beide Substanzen vollkommen abgelöst.^{20,49} Entsprechende Daten zum Spektrum der mit DIIHA assoziierten Medikamente für Deutschland fehlten bislang und wurden erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschrieben. Diclofenac, Piperacillin, Ceftriaxon, Oxaliplatin sowie in der Berlin Fall-Kontroll-Studie Fludarabin, wurden dabei als häufigste Ursache für eine DIIHA identifiziert.^{12,80} Die Ergebnisse bestätigen damit bisher publizierte Beobachtungen aus den Übersichtsarbeiten von Wright und von Salama, die ebenfalls Cephalosporine der 2. und 3. Generation, Diclofenac, platinhaltige Chemotherapeutika und Fludarabin am häufigsten als Auslöser einer DIIHA in Verbindung brachten.^{18,103} Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten untermauern ferner die Bedeutung von β -Lactam Antibiotika, insbesondere Ceftriaxon und Piperacillin, als Ursache einer DIIHA.⁸⁰ Der Anteil an Cephalosporinen war jedoch deutlich geringer als in zwei vergleichbaren US-amerikanischen Fallserien.^{46,85} Der Hauptanteil wurde dort durch Cefotetan verursacht, ein Cephalosporin welches in Deutschland nur kurzfristig auf dem Markt war. In den beiden letzten Jahrzehnten gewann Piperacillin, sowohl die Häufigkeit als auch die klinische Relevanz betreffend, zunehmend an Bedeutung.^{20,49} Dies konnten wir in unserer Studie bestätigen, in der Piperacillin mit 18% der Fälle die zweithäufigste Ursache einer DIIHA darstellte.⁸⁰

Der Zusammenhang zwischen Diclofenac-Einnahme und einer DIIHA wurde in verschiedenen Fallberichten und Fallserien (Übersicht in Ahrens et al.⁷⁶) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde Diclofenac mit Abstand am häufigsten als Ursache einer DIIHA identifiziert¹² und stellt mit 23 Fällen die bisher größte publizierte Fallserie einer Diclofenac-induzierten Immnhämolyse dar.⁸⁰ Die deutliche Differenz in der Häufigkeit im Vergleich zu den USA⁸⁵ spiegelt sehr wahrscheinlich den Unterschied im Konsum dieses Medikaments in beiden Staaten wider. In Deutschland zählte Diclofenac 2012 zu den am häufigsten verschriebenen nichtsteroidalen Antirheumatika.¹⁰⁴ In den USA ist das Medikament im Vergleich von untergeordneter Bedeutung.¹⁰⁵ Vor allem aufgrund der Gefahr von gastro-intestinalen und kardiovaskulären Nebenwirkungen wird Diclofenac auch bei uns zunehmend durch andere nichtsteroidale Antiphlogistika, wie z.B. selektive COX-2-Hemmer, ersetzt. Daher ist zukünftig ein Rückgang Diclofenac-induzierter Immnhämolysen zu erwarten. Jedoch sind auch COX-2-Hemmer in seltenen Fällen mit einer DIIHA assoziiert. Das konnten wir 2013 erstmals für Etoricoxib belegen,¹⁰⁶ 2019 folgte ein weiterer Fallbericht.⁸⁹

Grundsätzlich kann jedes Medikament eine DIIHA hervorrufen. Wenngleich einige Medikamente häufiger als Auslöser für eine DIIHA beschrieben wurden, gibt es doch eine Vielzahl von Substanzen, für die bisher jeweils nur einzelne Fälle einer serologisch bestätigten DIIHA publiziert wurden. Insbesondere über neuere Medikamente sind die Informationen oft begrenzt oder fehlen. In einer Übersicht von Garretty und Arndt aus dem Jahr 2014 wurden insgesamt 136 verschiedene Substanzen mit ausreichender Evidenz als Auslöser einer DIIHA identifiziert. Dabei waren von 89 Substanzen weltweit weniger als 5 Fälle beschrieben worden.¹⁹ Dies trifft auch auf unsere beiden Erstbeschreibungen lomeprol bzw. Etoricoxib zu.^{106,107} Obwohl es sich hierbei keineswegs um selten eingesetzte Substanzen handelt, wurden weitere DIIHAs bei diesen Medikamenten bislang nur noch zweimal^{80,90} bzw. ein weiteres Mal beschrieben.⁸⁹

Die Pathogenese der medikamentös induzierten Immunhämolyse ist vermutlich komplex und bisher nicht geklärt. Es stellt sich die Frage, ob das Risiko einzelner Substanzen eine DIIHA auszulösen unterschiedlich ist. Unklar ist ferner, ob es individuelle prädisponierende Faktoren gibt, die zur Immunisierung und nachfolgender Bildung von medikamenten-induzierten Antikörper führen. Diese Arbeit lieferte erstmals Hinweise, dass eine Mukoviszidose eine mögliche Disposition für eine Piperacillin-induzierte Immunhämolyse darstellen könnte.

3.2 Komplexität und Fallstricke bei der Diagnostik einer medikamentös induzierten immunhämolytischen Anämie

Bei Medikamenten, die nicht typischerweise oder gar nicht dafür bekannt sind, dass sie eine DIIHA auslösen, führt dies häufig zum Verkennen der wahren Ursache für die hämolytische Anämie. Aber auch durch bereits mehrfach beschriebene Medikamente ausgelöste DIIHAs werden aufgrund der äußerst variablen Klinik und komplexen Serologie häufig fehlinterpretiert.

In der Regel ergibt sich der erste Verdacht auf eine DIIHA durch den raschen Abfall des Hämoglobins aufgrund eines hämolytischen Prozesses unklarer Genese in Zusammenhang mit einer Medikamenteneinnahme. Typischerweise handelt es sich dabei um ein Medikament, welches bereits früher ohne Probleme appliziert wurde (primäre

Immunisierung und nachfolgende Hämolyse bei Re-Exposition). Aber auch jedes kürzlich begonnene oder intermittierend angewendete Medikament spielt in der Pathogenese einer DIIHA eine bedeutende Rolle. Der Verdacht wird durch eine gezielte Anamnese und Testung auf substanzspezifische medikamentenabhängige erythrozytäre Antikörper ergänzt. Beweisend ist im weiteren Verlauf ferner die Selbstlimitation des hämolytischen Prozesses nach Absetzen des auslösenden Medikaments.^{21,49} Der wichtigste, und für eine DIIHA kennzeichnende serologische Befund ist ein positiver DAT.²¹ Dieser ist in der Regel positiv mit Anti-IgG und C3d.^{46,80,85} Sowohl die Stärke der positiven Reaktionen als auch die Kombination nachweisbarer Immunglobulinklassen (IgG, IgM, IgA) und des Komplement-fragments C3d sind jedoch sehr variabel.¹⁰⁸

Die Mehrzahl der Patienten mit einer DIIHA zeigt akute Symptome einer ausgeprägten Anämie. Dabei können Komplikationen der DIIHA wie beispielsweise Schocksymptomatik oder akute Niereninsuffizienz das Krankheitsbild so beherrschen, dass eine mögliche Assoziation mit einer Medikamenteneinnahme zunächst übersehen wird. Bei mildem oder protrahiertem Krankheitsverlauf ist es andererseits noch schwieriger, eine DIIHA von anderen Anämieursachen abzugrenzen.¹⁴ Fehldiagnosen sind daher häufig und treten in mehr als 40% der Fälle auf.⁸⁰ Die häufigste Fehldiagnose einer DIIHA stellt eine AIHA vom Wärmetyp dar. Der Verdacht ergab sich in der vorliegenden Studie klinisch in 13% der Fälle und anhand der initialen serologischen Ergebnisse bei 37% der untersuchten Patienten.⁸⁰ Zu ähnlichen Beobachtungen kamen Johnson et al. in ihrer Untersuchung, in der bei 31% der Fälle in der serologischen Diagnostik zunächst Autoantikörper vom Wärmetyp vermutet wurden.⁸⁵ In einer Fallserie von 17 Patienten mit Piperacillin-induzierter Immunhämolyse, wiesen sogar 70% typische serologische Merkmale einer AIHA vom Wärmetyp auf.¹⁰⁸ Ursächlich für die Fehlinterpretation sind gleichzeitig vorhandene medikamenteninduzierte Autoantikörper und / oder positiven Reaktionen in der Antikörpersuche durch Medikamentenreste in der Zirkulation.^{80,85,108,109} Die Tatsache, dass ein Teil der medikamentenabhängigen Antikörper Rhesuspezifität, insbesondere Auto-Anti-e, aufweisen,^{20,80,110} welches ein typisches Kennzeichen wärmereaktiver Autoantikörper darstellt, verstärkt die Gefahr einer Fehldiagnose weiter. Die Reaktivität des Plasmas auch ohne Zugabe des Medikaments verschwindet in der Regel innerhalb von 48 Stunden nach Absetzen des

auslösenden Medikaments oder nach Dialyse des Plasmas, während wärmereaktive Autoantikörper unverändert nachweisbar sind.⁴⁶ Ferner ist ein in der Regel negatives Eluat der wichtigste differentialdiagnostisch hinweisende serologische Befund auf eine DIIHA.^{21,85,106,111}

Begleitende medikamenteninduzierte Autoantikörper im Rahmen von medikamentenabhängigen Antikörpern waren bei 38% der Patienten mit DIIHA nachweisbar.⁸⁰ Sie sind ein bekanntes Phänomen und bei verschiedenen Medikamenten, insbesondere bei Diclofenac-induzierter Immnhämolyse, beschrieben.^{23,67,68,76,112} Da sie weder klinisch noch serologisch von wärmereaktiven Autoantikörpern anderer Genese unterscheidbar sind, ist hier einzig eine gezielte Anamnese sowie der spontane Rückgang der Autoantikörper und der Immnhämolyse nach Absetzen des Medikaments hinweisend.^{21,49}

Wie im Rahmen dieser Arbeit ferner gezeigt werden konnte, können spontan agglutinierende Antikörper vom IgM-Typ zur Fehldiagnose AIHA vom Kältetyp führen, insbesondere wenn der DAT ausschließlich mit C3d positiv ist. Panagglutinierende IgM-Antikörper können in der akuten Phase der Hämolyse verschiedener Medikamenten auftreten und sind insbesondere für Ceftriaxon charakteristisch.^{80,85} Daraus lässt sich folgern, dass der serologische Nachweis von Autoantikörpern eine medikamenteninduzierte Immnhämolyse nicht ausschließt. Diese sollte im Falle einer abrupt auftretenden intravasalen Hämolyse daher immer differentialdiagnostisch in Erwägung gezogen werden. Auch die beiden erstmals als Auslöser einer DIIHA beschriebenen Substanzen Etoricoxib und Iomeprol wurden initial als AIHA vom Wärmetyt bzw. als toxische Hämolyse fehlinterpretiert.^{106,107} Erst die anschließende immunhämatologische Spezialdiagnostik in einem Referenzlabor führte in beiden Fälle zum korrekten Ergebnis und unterstreicht den Stellenwert einer fundierten Anamnese und Diagnostik.

Eine ebenfalls typische Fehlinterpretation ist die Verwechslung der akuten intravasalen Hämolyse im Rahmen einer DIIHA mit einer akuten hämolytischen Transfusionsreaktion. Neben Diclofenac,⁸⁰ 5-Fluoruracil,¹⁰² Rifampicin⁶⁸ und Cefotetan¹¹³ wurde diese Beobachtung auch wiederholt für Piperacillin beschrieben.^{95,96} Sie tritt typischerweise auf, wenn zeitgleich mit dem die Hämolyse verursachenden Medikament Erythrozytenkonzentrate verabreicht werden. Da eine hämolytische Transfusionsreaktion ein wesentlich häufigeres unerwünschtes Ereignis ist, wird diese in der Regel eher vermutet als eine DIIHA.

Die korrekte Diagnose kann in diesen Fällen nur durch eine gezielte immunhämATOlogische Diagnostik und dem Nachweis medikamentenabhängiger Antikörper gestellt werden.

Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese und Diagnostik einer DIIHA spielt nicht nur das Medikament, sondern auch individuelle metabolitenspezifische Antikörper. Sie sind ein wesentlicher Grund für falsch-negative Ergebnisse in der serologischen Testung und häufige Ursache einer Fehldiagnose.¹⁴ Bis zu 23% der der spezifischen Antikörper im Rahmen einer DIIHA sind ausschließlich im Ansatz mit den entsprechenden Metaboliten der Medikamente nachweisbar.⁸⁰ Die eigentliche Ursache für die Pathogenese metabolitenspezifischer Antikörper ist nicht bekannt. Die sog. „Prohaptene-Hypothese“ besagt, dass ein chemisch inertes Medikament durch die normalen Stoffwechselprozesse in der Leber zu chemisch (Protein)-reaktiven Zwischenprodukten oder Haptenen "bioaktiviert" werden kann. Im Ergebnis ist es wahrscheinlich, dass die Grundsubstanz und die verschiedenen chemisch reaktiven Metaboliten sich hinsichtlich ihres Immunisierungsrisikos unterscheiden, wobei letztere viel reaktiver sind und vermutlich im Rahmen der klinischen Sensibilisierung eine entscheidende Rolle spielen.^{114,115}

Bereits 1984 wurden erstmals metabolitenspezifischer Antikörper gegen Erythrozyten beschrieben, die keine Kreuzreaktivität mit der Grundsubstanz Butizid und Nomifensin aufwiesen.⁸⁶ Es folgten weitere Einzelfallberichte metabolitenspezifischer Antikörper gegen Amphotericin B,¹¹⁶ Ceftriaxon¹¹⁷ und mehreren nichtsteroidalen Entzündungshemmern (Diclofenac,¹¹⁸ Etodolac,¹¹⁹ Nabumeton / Indometazin⁸⁵). Die vorliegende Arbeit bestätigte die Bedeutung metabolitenspezifischer Antikörper für Diclofenac (n=10) und Ceftriaxon (n=2), und lieferte erstmals entsprechende Daten für Piperacillin (n=2), Cefotaxim sowie für Cotrimoxazol (n=jeweils 1).^{80,109}

Da Metabolite kommerziell nicht verfügbar und nicht immer bekannt sind, werden in immunhämATOlogischen Speziallaboren Urin und / oder Serum (ex-vivo Antigene) von Patienten nach Einnahme des Medikaments für die Testung metabolitenspezifischer Antikörper verwendet.³⁴ Diese Technik ist aufwendig, und wird daher weltweit nur in wenigen Einzellaboren durchgeführt. Alternativ, aber bisher kaum erforscht, ist der Einsatz sog. Bioreaktoren zur Gewinnung von ex-vivo-Metaboliten von Medikamenten. Hierbei

werden primäre humane Hepatozyten aus Gewebeproben isoliert, auf Kollagen ausgesät und mit Medikamenten inkubiert. Hierdurch können auch nicht primär renal eliminierte Metabolite isoliert und in ihrer antigenen Wirkung untersucht werden (Mayer et al.; zur Publikation eingereicht).

In der Praxis ist eine DIIHA in der Regel eine Ausschlussdiagnose, d. h. eine medikamenten-induzierte Form wird erst in Betracht gezogen, wenn andere Ursachen für eine hämolytische Anämie ausgeschlossen wurden. Auf Grundlage unserer Ergebnisse und den Beobachtungen anderer Autoren, muss jedoch die Trias aus

- 1.) abruptem Abfall des Hämoglobins aufgrund einer Hämolyse,
- 2.) die sich während der Gabe eines Medikaments entwickelt,
- 3.) in Kombination mit einem stark positiven DAT insbesondere mit Anti-C3d

als eindeutiger Indikator für eine DIIHA betrachtet werden. Eine ebenfalls typische (aber nicht zwingend vorausgesetzte) serologische Auffälligkeit ist die Panagglutination des Serums wie bei wärmereaktiven Autoantikörpern, ohne jedoch dem dafür pathognomonischen Nachweis von Autoantikörpern im Eluat.^{21,111}

3.3 Piperacillin-induzierte Immunhämolysen bei Patienten mit Cystischer Fibrose

Hinsichtlich der Klinik einer Piperacillin-induzierten Immunhämolytischen Anämie (PIIHA) waren vor 2010 nur wenige, überwiegend aus Einzelfallberichten stammende Daten verfügbar. Obwohl Piperacillin ein halbsynthetisches Penicillin-Derivat ist, unterscheiden sich die klinischen und serologischen Eigenschaften Piperacillin-induzierter erythrozytärer Antikörper von Antikörpern gegen Penicillin grundlegend. Im Gegensatz zu Penicillin, welches nur in hohen Dosen zu einer IgG-vermittelten und fast ausschließlich extravasalen Hämolyse führt, reichen bei Piperacillin nach Immunisierung geringste Mengen um eine häufig Komplement-vermittelte, intravasale Hämolyse auszulösen. In den 2010 und 2015 publizierten Fallserien wiesen alle Patienten mit Piperacillin-abhängigen Antikörpern eine akute und fast ausnahmslos intravasale Hämolyse auf.^{80,109} Der Hämoglobinwert fällt in der akuten Phase nicht selten drastisch auf Werte unter 5 g/dl ab (Tabelle 1).^{120,121} Die Mortalitätsrate liegt bei 6%.⁴⁶

Tabelle 1: Übersicht bisher publizierte Fälle einer hämolytischen Anämie verursacht durch Piperacillin oder Piperacillin / Tazobactam

Erscheinungsjahr, Referenz	Patienten (n)	Geschlecht (Verteilung)	Alter	Diagnose	Auftreten der Hämolyse (Tag)*	Intravasale Hämolyse	Nadir Hb (g/dl) oder Hkt (%)**	Pipera- cillin- AK	DAT		Komplikationen / Ausgang		
									poly	IgG			
1986, ⁹²	1	W	27	Pyelonephritis	2	k.A.	9,3	k.A.	n.u.		rest. ad integrum		
1994, ⁹³	1 [†]	M	46	Urosepsis	7	vermutlich [‡]	5,4	pos [§]		3+	3+	k.A.	
1999, ¹²²	1	W	34	CF	12	Hb-Uria	5,5	k.A.	+			rest. ad integrum	
2002, ¹²³	1	W	46	Pneumonie	9	vermutlich [‡]	3,1	k.A.			3+	verstorben	
2002, ⁹⁴	2	M	29, 37	2 CF	11, 12	Hb-Uria	3,9 10% Hkt	pos			3+ schw	2+ 1+	rest. ad integrum / verstorben
2005, ¹²⁴	1	M	58	Diabetes, Zellulitis	2	Hb-Uria LDH > 2000	3,3	pos			2+	4+	rest. ad integrum
2005, ⁹⁵	1	W	62	Nierenversagen, Sepsis	k.A.	Hb-Uria	7,3	pos			3+	-	rest. ad integrum
2007, ⁹⁶	1	W	68	Nierenversagen, ALL	1	Hb-Uria	6,5	pos			2+	schw.	rest. ad integrum
2007, ⁸⁵	10	Nd	Nd	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	pos					k.A.
2009, ⁹⁷	1	M	55	Leberversagen	6	k.A.	5,6	pos [§]			4+		k.A.
2010, ¹⁰⁹	8	W (6) M (2)	18-77	5 CF	k.A.	7/8	1,6 - 7,7	pos			+ (8)	+ (7)	verstorben 1/8 rest. ad integrum 7/8
2010, ¹⁰⁸	17	Nd	12-92	8 CF	k.A.	Hb-Uria 5/17	3 - 8	pos ¹	+		+ (15)	+ (14)	verstorben 1/17
2010, ¹²⁵	1	W	17	CF	6	vermutlich [‡]	~ 3,5 (10,5% Hkt)	pos	+				rest. ad integrum

2010, ¹²⁶	1	W	33	CF	7	Hb-Uria	4,8	pos [§]	+	+	+	rest. ad integrum
2011, ¹²⁷	1	M	20	Entwicklungs- störung	8	Nein	4	pos	+	+	+	Herzstillstand, rest. ad integrum
2012, ¹²⁸	1	W	23	CF	15 (12)	k.A.	4,7	pos	+	3+	schw.	rest. ad integrum
2012, ¹²⁹	1	W	26	CF	8	Hb-Uria	~ 4 (11,5% Hkt)	pos	+	2+		verstorben
2013, ¹³⁰	1	M	24	CF	~15	Hb-Uria	4	k.A.	+	+		rest. ad integrum
2013, ¹³¹	1	W	19	CF	17 (13)	vermutlich [†]	4,1	pos	+	+		rest. ad integrum
2015, ¹³²	1	W	41	CF	5	k.A.	2,7	neg ²	+	3+	-	rest. ad integrum
2016, ⁹⁹	1	W	44	CF	14	Nein	8,6	pos		4+	3+	rest. ad integrum
2017, ¹³³	1	W	30	CF	11/14	vermutlich [†]	3,1	pos	+	+	+	rest. ad integrum
2019, ¹³⁴	1	M	36	PNH; Budd- Chiari-Syndrom	sofort	vermutlich [†]	5,3	pos	+	4+	1+	rest. ad integrum

*Tage nach Therapiebeginn; **während der akuten Hämolyse; †dieser Patient ist vermutlich in der Referenz Johnson et al. 2007 enthalten;

‡intravasale Hämolyse wahrscheinlich bei LDH > 1500 U/L

§ anti-e Spezifität der Piperacillin-AK; ¹bei 2 Patienten anti-e, bei 1 Patient anti-f Spezifität der Piperacillin-AK; ²nur Piperacillin- aber keine Metaboliten-Testung
n. u. = nicht untersucht; k.A. = keine Angaben; ALL = Akute Lymphatische Leukämie; Hb = Hämoglobin, Hkt = Hämatokrit; pos = positiv, neg = negativ, schw. = schwach
Piperacillin-AK = Piperacillin-abhängige Antikörper, DAT = direkter Antihumanglobulin Test, CF = Cystische Fibrose, PNH = Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie

Der DAT ist in der Regel positiv mit Anti-IgG und häufig zusätzlich auch mit Anti-C3d. Der Nachweis der Piperacillin-abhängigen Antikörper erfolgt optimaler Weise mittels unbehandelter Testzellen durch Zugabe des löslichen Medikaments. Ein Ansatz mit Piperacillin-gecoateten Testzellen – analog der Testung Penicillin-abhängiger Antikörper - kann zu unspezifischen Agglutinationen führen und sollte daher unterbleiben.⁴⁶ Ursächlich hierfür sind klinisch irrelevante IgM-Antikörper gegen Piperacillin, die sich bei über 90% gesunder Blutspender und bei fast der Hälfte zufällig ausgewählter Patienten nachweisen lassen.¹³⁵ Analog zu medikamentenabhängigen Antikörpern gegen diverse andere Medikament, reagieren einige der Antikörper gegen Piperacillin nur in der Testung mit ex-vivo Metaboliten.^{80,109}

In der Publikation aus 2010 wurde erstmals eine mögliche Assoziation zwischen Piperacillin-induzierter Immunhämolyse und Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) hergestellt. So litten fünf der acht untersuchten Patienten und annähernd die Hälfte der bis dahin publizierten Fälle an einer CF.¹⁰⁹ In den Folgejahren wurden eine Reihe weiterer Fälle von PIIHA publiziert. Mehr als die Hälfte (65%) davon traten ebenfalls bei Patienten mit CF auf und bestätigten daher diese Annahme (Tabelle 1). Im Jahre 2016 wurde erstmals über einen Fall einer Patientin mit CF und Antikörperbildung unter Piperacillin-Therapie mit nur milder und klinisch inapparenter Hämolyse berichtet.⁹⁹ Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass Patienten mit CF häufiger als bisher vermutet Antikörper gegen Piperacillin entwickeln und dass milde Verläufe einer PIIHA möglicherweise unentdeckt bleiben.

Dieser Verdacht wurde durch die Ergebnisse der ersten prospektiven Beobachtungsstudie bestätigt.¹²⁰ Es wurden bei zwei von 43 (4,7%) untersuchten Patienten mit CF Piperacillin-abhängige erythrozytäre Antikörper nachgewiesen. Berücksichtigt man nur die Patienten mit positiver Expositionsanamnese gegenüber Piperacillin, so betrug die Prävalenz entsprechender Antikörper 5,4%. Nur eine der beiden Patientinnen entwickelte eine milde IHA. Antikörper gegen andere Antibiotika wurden nicht gefunden. Im Ergebnis konnte gezeigt werden, dass Piperacillin-abhängige Antikörper mit hämolytischem Potential bei Patienten mit CF wesentlich häufiger vorkommen als bisher bekannt.¹²⁰ Ferner legt das Ergebnis die Vermutung nahe, dass die Inzidenz einer klinisch relevanten PIIHA bei Patienten mit CF deutlich höher liegt, als die bisher angenommene allgemeine Inzidenz einer DIIHA von 1 bis 4

Fällen auf 1 Million Einwohner pro Jahr.¹⁷ In Deutschland leben ca. 7.000 Patienten mit CF. Berücksichtigt man ausschließlich unsere 8 publizierten Fälle,^{99,109,120} so ist von einer Inzidenz einer PIIHA von mindestens 1:1.000 in diesem Patientenkollektiv auszugehen, d. h. es besteht ein ca. 1000-fach erhöhtes Risiko. Daraus ergibt sich die Frage, ob eine PIIHA bei chronischen Infektionen und repetitiver Piperacillingabe grundsätzlich häufiger ist, oder ob hier eine spezifische Assoziation mit einer CF besteht.

Patienten mit CF haben bedingt durch ihre chronischen Infektionen mit multiresistenten, überwiegend gramnegativen Erregern eine extrem hohe Exposition gegenüber verschiedenen Antiinfektiva. Ein besonderes Problem stellt dabei eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* dar, die maßgeblich zur Morbidität und Mortalität der betroffenen Patienten mit CF beiträgt.¹³⁶ Die parenterale Therapie rezidivierender Atemwegsinfektionen insbesondere mit β -Laktam Antibiotika stellt daher eine wesentliche Behandlungsstrategie bei Patienten mit CF dar, die Anwendung ist aber aufgrund von Überempfindlichkeitsreaktionen eingeschränkt. Bis zu 60% der Patienten mit CF leiden an Antibiotika-Allergien, wobei Piperacillin in diesem Patientenkollektiv mit der höchsten Rate an allergischen Reaktionen assoziiert ist.^{137,138} Unsere Studie bestätigt die Gefahr einer Unverträglichkeit von Piperacillin in Bezug auf eine IHA. Das Ergebnis legt ferner nahe, dass Piperacillin bei Patienten mit CF mit einem höheren Risiko der Entwicklung einer IHA assoziiert ist, als andere gegen *Pseudomonas aeruginosa* wirksame Antibiotika. Bisher wurde serologisch ausnahmslos Piperacillin bei Patienten mit CF als Auslöser einer DIIHA bestätigt. Zur Klärung der Frage, ob PIIHA bei Patienten mit CF häufiger vorkommt als in der Allgemeinbevölkerung, oder ob die Inzidenz einer PIIHA grundsätzlich höher ist als bisher vermutet, wäre eine Untersuchung an einer nicht an CF erkrankten Kohorte mit ähnlich hoher Piperacillin-Exposition erforderlich.¹²⁰

Unklar ist, ob bei Patienten mit CF prädisponierende Faktoren vorliegen, die das Risiko einer PIHA erhöhen. Eine Risikofaktorenanalyse ergab keine Korrelation mit dem forcierten expiratorischen Volumen (FEV1), der Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* oder dem Gesamt-IgE im Serum.¹²⁰ Die kumulative Dosis einzelner Antibiotika wurde zwar als Risikofaktor für eine generelle Arzneimittelüberempfindlichkeit bei Patienten mit Mukoviszidose bestätigt,⁹⁸ nicht jedoch für das Auftreten einer PIIHA.^{18,120} Ein Zusammenhang mit der Anzahl vorangegangener allergischer Reaktionen auf Piperacillin und

dem Auftreten einer PIIHA wurde ebenfalls nicht belegt. Die Frage der Assoziation von Überempfindlichkeitsreaktionen und dem Risiko einer PIIHA kann daher nicht abschließend beantwortet werden.¹²⁰

Als wichtiger prädisponierender Faktor für den Antikörperbildungsprozess und die Entwicklung einer DIIHA wird eine wiederholte Exposition mit dem auslösenden Medikament angesehen.^{18,21,46,127} Dabei scheint eine intermittierende Applikation ein allgemein höheres Sensibilisierungsrisiko für die Entstehung einer Hypersensitivitätsreaktion von Medikamenten darzustellen, als eine ununterbrochene Behandlung.¹¹⁵

Einen weiteren prädisponierenden Faktor könnte die chronische Hyperinflammation bei Patienten mit CF darstellen. Aus Alloimmunisierungsprozessen gegen transfundierte Erythrozyten ist bekannt, dass ein erhöhter Entzündungsstatus des Empfängers die Immunantwort verstärkt. Klinische Beispiele sind z.B. die im Vergleich zu anderen chronisch transfundierten Patienten signifikant höheren Immunisierungsraten gegen erythrozytäre Antigene bei Patienten mit Hämoglobinopathien, insbesondere Sichelzellerkrankheit.¹³⁹ Ferner werden die Veränderungen des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) für die Ausbildung schwere Formen einer PIIHA bei Patienten mit CF diskutiert. Hierdurch kommt es zu einer verminderten Bildung von endotheliale Stickstoffmonoxid, was zu einer Vasokonstriktion und einem erhöhten Risiko der intravaskulären Erythrozytenaggregation mit nachfolgender Gewebsischämie führt.¹²⁶

Wenig ist bisher über die immunologischen Pathomechanismen bekannt, die zur Bildung medikamentenabhängiger Antikörper führen. Um grundsätzlich eine Immunantwort nach Medikamentenexposition auszulösen sind zwei Signalwege erforderlich: zum einen das Signal durch das Antigen selbst und zusätzlich ein sog. „Reifungs“- oder „Gefahren“ („Danger“)-Signal an die dendritische Zellen, welche bei Aktivierung ein ko-stimulatorisches Signal an die T-Zellen übermitteln.^{140,141} Der Reifungsprozess der dendritischen Zellen wird durch verschiedenste Faktoren wie z.B. Zellschädigung, Infektion oder oxidativer Stress stimuliert.^{114,140} Das Risiko für eine allergische Arzneimittelreaktion ist abhängig von der Medikamentendosis, der Applikationsform (i.v. versus oral) sowie individuellen Faktoren. Der wesentliche Faktor scheint dabei die Fähigkeit des Immunsystems von Patienten mit

bestimmten Grunderkrankungen zu sein, dendritische Zellreifungssignale zu stimulieren. Dies führt dazu, dass medikamentenspezifische Reifungssignale für eine allergische Arzneimittelreaktion nicht zwingend erforderlich sind oder die zur Stimulation einer Reaktion erforderliche stimulatorische Schwelle der dendritischen Zellen gesenkt wird. Es wird angenommen, dass bei Patienten mit CF der mit den rezidivierenden Infektionen einhergehende gestörte Immunstatus diesen entscheidenden prädisponierenden Faktor für die hohe Rate an allergischen Arzneimittelreaktionen darstellt.¹¹⁴ Unklar ist, ob diese Hypothese auch für die Entstehung einer DIIHA von Bedeutung ist.

In einer experimentellen Studie konnten bei Patienten mit CF und bekannten Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Piperacillin B-Zellen charakterisiert werden, die Piperacillin-spezifische IgG-Antikörper sezernieren. Piperacillin-reaktive B Gedächtniszellen zirkulieren auch noch Jahre nach der Exposition im peripheren Blut von Patienten mit Überempfindlichkeitsreaktionen.¹⁴² Ferner konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass Anti-Piperacillin IgG Antikörper mit hoher Spezifität an Piperacillin, nicht jedoch an andere β -Lactam Antibiotika, binden.¹⁴³ Ob diese Antikörper eine Hämolyse verursachen können ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht bekannt und Gegenstand weiterer Untersuchungen.¹²⁰

Die Relevanz des Nachweises medikamentenabhängiger Antikörper oder eines positiven DAT ohne Hinweise auf eine Hämolyse ist nicht bekannt Für Patienten unter Medikation mit Penicillin oder alpha-Methyldopa werden häufig Konstellationen mit positivem DAT bzw. Autoantikörpern beschrieben, die nicht mit einer Hämolyse einhergehen.¹⁸ Quillen et al. fanden bei 5,3% bzw. 15,6% der Patienten mit Sichelzellerkrankung oder HIV-Infektion und einer hohen Ceftriaxon-Exposition entsprechende Ceftriaxon-abhängige erythrozytäre Antikörper. Von den Patienten mit nachweisbaren Ceftriaxon-abhängigen Antikörpern entwickelten nur 25% eine Hämolyse. Ein Patient verstarb.²⁷ Da Ceftriaxon wegen der geringen Wirkung gegen *Pseudomonas aeruginosa* nur sehr selten bei Patienten mit CF eingesetzt wird, gibt es in dieser Population keine vergleichbaren Daten.¹²⁰

Bei Patienten mit AIHA aufgrund von wärmereaktiven Autoantikörpern ist die Schwere der Hämolyse mit der Fähigkeit zur Komplementaktivierung assoziiert.¹⁴⁴ Die überwiegende Mehrzahl der publizierten PIIHA Fälle waren ebenfalls durch komplementaktivierende Antikörpern verursacht. Nur wenige Fälle nicht-komplementaktivierender Antikörper, die zu

einer DIIHA führten, sind bekannt.^{95,123,132} Die Tatsache, dass beide Patienten in der vorliegenden Studie nicht-komplementaktivierende IgG-Antikörper bildeten, erklärt möglicherweise, warum keine schwere oder klinisch relevante Hämolyse vorlag. Ob eine mildere hämolytische Episode in eine klinisch schwerer verlaufende Hämolyse übergeht, ist bisher ebenfalls nicht geklärt, wenngleich einzelne Fälle darauf hinweisen.⁹⁷ Weitere Studien sind erforderlich, um prädiktive Faktoren bzw. die Patienten mit nachweisbaren medikamentenabhängigen Antikörpern zu identifizieren, die in Gefahr sind eine DIIHA auszubilden.

4. Zusammenfassung

Die medikamentös-induzierte immunhämolytische Anämie (DIIHA) ist eine seltene, aber schwerwiegende Nebenwirkung einer Arzneimitteltherapie. Sie betrifft sowohl Erwachsene als auch Kinder, und geht bei Letzteren mit einer Letalität von bis zu 50% einher. Rechtzeitig erkannt, hat die DIIHA eine sehr gute Prognose, da die Hämolyse nach Weglassen des auslösenden Agens in der Regel selbstlimitierend ist. Es gibt jedoch eine Reihe von Faktoren, die zu Problemen in der Diagnosestellung führen. So ist das Krankheitsbild vielen Medizinern wenig oder nicht bekannt. Ferner sind die klinischen Symptome sehr variabel und die Diagnostik erfordert Erfahrung und wird nur in wenigen immunhämatologischen Speziallaboren vorgehalten.

Seit der Erstbeschreibung einer DIIHA 1953 wurden bis dato mehr als 130 Substanzen als Auslöser beschrieben, die Mehrzahl davon nur in einzelnen Fallberichten oder Fallserien. Die vorgelegte Arbeit belegt anhand von Erstbeschreibungen die Bedeutung von Röntgenkontrastmitteln (Iomeprol und Iohexol) als Auslöser akuter und schwerer Immunhämolysen. Erstmals wurde ferner nachgewiesen, dass Etoricoxib, ein Cyclooxygenase-2-Hemmer, eine akute immunhämolytische Anämie (IHA) verursachen kann.

Die Häufigkeit bestimmter Medikamente als Auslöser einer DIHA hat sich in den letzten Jahrzehnten grundlegend geändert. Während in den USA in den 1970er Jahren fast ausschließlich hochdosiert verabreichtes Penicillin und alpha-Methyldopa als Auslöser einer DIIHA diagnostiziert wurden, haben in den letzten Jahrzehnten vor allem Cephalosporine der zweiten und dritten Generation beide Substanzen vollkommen abgelöst. Entsprechende Daten zum Spektrum der mit einer DIIHA assoziierten Medikamente für Deutschland fehlten bislang und wurden erstmals im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargelegt. Ferner wurde in der Berliner Fall-Kontroll-Surveillance-Studie (FAKOS) erstmals systematisch das Risiko von Medikamenten für die Entwicklung einer IHA untersucht. In dem untersuchten Kollektiv der Berliner FAKOS bzw. der im Immunhämatologischen Referenzlabor des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin zwischen 1996 und 2015 untersuchten Proben von Patienten mit IHA wurden übereinstimmend Diclofenac, Piperacillin, Ceftriaxon und Oxaliplatin als häufigste Ursache für eine DIIHA identifiziert. Die Arbeit belegt damit die Bedeutung dieser Medikamente als potentielle Auslöser einer IHA.

Die Pathogenese der DIIHA ist komplex und bisher nicht geklärt. Ob das Risiko einzelner Substanzen, eine DIIHA auszulösen, unterschiedlich ist, oder ob es individuelle prädisponierende Faktoren gibt, die zur Immunisierung und nachfolgender Bildung von medikamenten-induzierten Antikörper führen, ist unklar. In einer Fallserie von Patienten mit Piperacillin-induzierter Immunhämolyse wurde erstmals eine mögliche Assoziation zwischen dieser und Patienten mit Mukoviszidose hergestellt. In der anschließenden ersten prospektiven Beobachtungsstudie an einer Kohorte von Patienten mit Mukoviszidose wurde diese Beobachtung bestätigt. Es konnte dadurch erstmals gezeigt werden, dass die Prävalenz Piperacillin-abhängiger Antikörper bei Patienten mit Mukoviszidose um das ca. 1000-fache gegenüber der Allgemeinbevölkerung erhöht ist. Ferner wurde bestätigt, dass neben den akuten und schweren Verläufen einer PIIHA, auch subklinische Hämolysen auftreten, die vermutlich in der Praxis häufig nicht erkannt werden.

Die vorliegende Arbeit lieferte wichtige Erkenntnisse für die Sicherheit von Patienten mit wiederholter Exposition gegenüber bestimmten Medikamenten, die besonders häufig eine DIIHA verursachen. Dies trifft in besonderem Maße auf Patienten mit Mukoviszidose und repetitiver Piperacillingabe zu. Diese sollten auf klinische und laborchemische Zeichen einer Hämolyse überwacht werden. Im Falle eines positiven direkten Coombstest sollten die Patienten auf das Vorhandensein von Piperacillin-abhängigen Antikörpern untersucht werden.

Eine wesentliche Rolle im Rahmen der weiteren Erforschung der immunologischen Pathomechanismen, die zu einer DIIHA führen, könnten der Nachweis und die Charakterisierung von medikamentenspezifischen Lymphozyten spielen. Ferner könnte die systematische Untersuchung prädisponierender Faktoren zur Risikoabschätzung des Auftretens einer DIIHA von Bedeutung sein.

5. Literatur

1. Salama A, Gaedicke G. Autoimmunhämolytische Anämien. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J, eds. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006:147-54.
2. Packman CH. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Rev* 2008;**22**: 17-31.
3. Pirofsky B. Immune haemolytic disease: the autoimmune haemolytic anaemias. *Clin Haematol* 1975;**4**: 167-80.
4. Klein NP, Ray P, Carpenter D, Hansen J, Lewis E, Fireman B, Black S, Galindo C, Schmidt J, Baxter R. Rates of autoimmune diseases in Kaiser Permanente for use in vaccine adverse event safety studies. *Vaccine* 2010;**28**: 1062-8.
5. Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A, Haematology BSf. The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2017;**176**: 395-411.
6. Engelfriet CP, Overbeeke MA, von dem Borne AE. Autoimmune hemolytic anemia. *Semin Hematol* 1992;**29**: 3-12.
7. Pirofsky B. Clinical aspects of autoimmune hemolytic anemia. *Semin Hematol* 1976;**13**: 251-65.
8. Worlledge SM, Blajchman MA. The autoimmune haemolytic anaemias. *Br J Haematol* 1972;**23**: Suppl:61-9.
9. Brodsky RA. Warm Autoimmune Hemolytic Anemia. *N Engl J Med* 2019;**381**: 647-54.
10. Kalfa TA. Warm antibody autoimmune hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016;**2016**: 690-7.
11. Hill QA, Stamps R, Massey E, Grainger JD, Provan D, Hill A, Guidelines BSfH. Guidelines on the management of drug-induced immune and secondary autoimmune, haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2017;**177**: 208-20.
12. Garbe E, Andersohn F, Bronder E, Klimpel A, Thomae M, Schrezenmeier H, Hildebrandt M, Späth-Schwalbe E, Grüneisen A, Mayer B, Salama A, Kurtal H. Drug induced immune haemolytic anaemia in the Berlin Case-Control Surveillance Study. *Br J Haematol* 2011;**154**: 644-53.
13. Garratty G. Drug-induced immune hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009: 73-9.
14. Salama A, Mayer B. Diagnostic pitfalls of drug-induced immune hemolytic anemia. *Immunohematology* 2014;**30**: 80-4.
15. Snapper I, Marks D, Schwartz L, Hollander L. Hemolytic anemia secondary to mesantoin. *Ann Intern Med* 1953;**39**: 619-23.
16. Dausset J, Contu L. Drug-induced hemolysis. *Annu Rev Med* 1967;**18**: 55-70.
17. Petz L, Garratty G. Drug-Induced Immune Hemolytic Anemia. *Immune hemolytic anemias: Churchill Livingstone, 2004:261-317.*
18. Salama A. Drug-induced immune hemolytic anemia. *Expert Opin Drug Saf* 2009;**8**: 73-9.
19. Garratty G, Arndt PA. Drugs that have been shown to cause drug-induced immune hemolytic anemia or positive direct antiglobulin tests: some interesting findings since 2007. *Immunohematology* 2014;**30**: 66-79.
20. Arndt PA. Drug-induced immune hemolytic anemia: the last 30 years of changes. *Immunohematology* 2014;**30**: 44-54.
21. Pierce A, Nester T, Scientists ECotAoCLPa. Pathology consultation on drug-induced hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol* 2011;**136**: 7-12.
22. Salama A. Drug-induced immune hemolytic anemia. In: Sipes IG MC, Gandolfi, AJ, eds. *Comprehensive toxicology*. New York: Per gamon Press, 1997:73–85.

23. Salama A, Kroll H, Wittmann G, Mueller-Eckhardt C. Diclofenac-induced immune haemolytic anaemia: simultaneous occurrence of red blood cell autoantibodies and drug-dependent antibodies. *Br J Haematol* 1996;**95**: 640-4.
24. Arndt PA, Leger RM, Garratty G. Serologic characteristics of ceftriaxone antibodies in 25 patients with drug-induced immune hemolytic anemia. *Transfusion* 2012;**52**: 602-12.
25. Arndt PA, Leger RM, Garratty G. Serology of antibodies to second- and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. *Transfusion* 1999;**39**: 1239-46.
26. Petz L, Garratty G. Immune hemolytic anemias. 2nd ed: Churchill Livingstone, 2004.
27. Quillen K, Lane C, Hu E, Pelton S, Bateman S. Prevalence of ceftriaxone-induced red blood cell antibodies in pediatric patients with sickle cell disease and human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008;**27**: 357-8.
28. Eisen HN, Carsten ME, Belman S. Studies of hypersensitivity to low molecular weight substances. III. The 2,4-dinitrophenyl group as a determinant in the precipitin reaction. *J Immunol* 1954;**73**: 296-308.
29. Aster RH. Drug-induced immune cytopenias. *Toxicology* 2005;**209**: 149-53.
30. Franceschini F, Bottau P, Caimmi S, Cardinale F, Crisafulli G, Liotti L, Saretta F, Bernardini R, Mori F, Caffarelli C. Mechanisms of hypersensitivity reactions induced by drugs. *Acta Biomed* 2019;**90**: 44-51.
31. Parker CW. Allergic reactions in man. *Pharmacol Rev* 1982;**34**: 85-104.
32. Park BK, Coleman JW, Kitteringham NR. Drug disposition and drug hypersensitivity. *Biochem Pharmacol* 1987;**36**: 581-90.
33. Mueller-Eckhardt C, Salama A. Drug-induced immune cytopenias: a unifying pathogenetic concept with special emphasis on the role of drug metabolites. *Transfus Med Rev* 1990;**4**: 69-77.
34. Salama A, Mueller-Eckhardt C. Immune-mediated blood cell dyscrasias related to drugs. *Semin Hematol* 1992;**29**: 54-63.
35. Ley AB, Harris JP, Brinkley M, Liles B, Jack JA, Cahan A. Circulating antibody directed against penicillin. *Science* 1958;**127**: 1118-9.
36. Petz LD, Fudenberg HH. Coombs-positive hemolytic anemia caused by penicillin administration. *N Engl J Med* 1966;**274**: 171-8.
37. Abraham GN, Petz LD, Fudenberg HH. Immunohaematological cross-allergenicity between penicillin and cephalothin in humans. *Clin Exp Immunol* 1968;**3**: 343-57.
38. Levine BB. Immunologic mechanisms of penicillin allergy. A haptenic model system for the study of allergic diseases of man. *N Engl J Med* 1966;**275**: 1115-25.
39. Kerr RO, Cardamone J, Dalmasso AP, Kaplan ME. Two mechanisms of erythrocyte destruction in penicillin-induced hemolytic anemia. *N Engl J Med* 1972;**287**: 1322-5.
40. Ries CA, Rosenbaum TJ, Garratty G, Petz LD, Fudenberg HH. Penicillin-induced immune hemolytic anemia. Occurrence of massive intravascular hemolysis. *JAMA* 1975;**233**: 432-5.
41. Ackroyd JF. The pathogenesis of thrombocytopenic purpura due to hypersensitivity to sedormid. *Clin Sci* 1949;**7**: 249-85.
42. Smith ME, Reid DM, Jones CE, Jordan JV, Kautz CA, Shulman NR. Binding of quinine- and quinidine-dependent drug antibodies to platelets is mediated by the Fab domain of the immunoglobulin G and is not Fc dependent. *J Clin Invest* 1987;**79**: 912-7.
43. Salama A, Mueller-Eckhardt C. On the mechanisms of sensitization and attachment of antibodies to RBC in drug-induced immune hemolytic anemia. *Blood* 1987;**69**: 1006-10.
44. Duran-Suarez JR, Martin-Vega C, Argelagues E, Massuet L, Ribera A, Vilaseca J, Arnau JM, Triginer J. The I antigen as an immune complex receptor in a case of haemolytic anaemia induced by an antihistaminic agent. *Br J Haematol* 1981;**49**: 153-4.
45. Salama A, Mueller-Eckhardt C. Rh blood group-specific antibodies in immune hemolytic anemia induced by nomifensine. *Blood* 1986;**68**: 1285-8.

46. Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with drug therapy. *Blood Rev* 2010;**24**: 143-50.
47. Habibi B. Drug induced red blood cell autoantibodies co-developed with drug specific antibodies causing haemolytic anaemias. *Br J Haematol* 1985;**61**: 139-43.
48. Muirhead EE, Halden ER, Groves M. Drug-dependent Coombs (antiglobulin) test and anemia; observations on quinine and acetophenetidin (phenacetin). *AMA Arch Intern Med* 1958;**101**: 87-96.
49. Garratty G. Immune hemolytic anemia caused by drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2012;**11**: 635-42.
50. Worlledge SM, Carstairs KC, Dacie JV. Autoimmune haemolytic anaemia associated with alpha-methyldopa therapy. *Lancet* 1966;**2**: 135-9.
51. Weigle WO. The antibody response in rabbits to previously tolerated antigens. *Ann N Y Acad Sci* 1965;**124**: 133-42.
52. Green FA, Jung CY, Rampal A, Lorusso DJ. alpha-Methyldopa and the erythrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* 1980;**40**: 554-60.
53. LoBuglio AF, Jandl JH. The nature of the alpha-methyldopa red-cell antibody. *N Engl J Med* 1967;**276**: 658-65.
54. Dameshek W, Jandl J, LoBuglio A. Alpha-methyldopa red-cell antibody: Crossreaction or forbidden clones? *New England Journal of Medicine* 1967;**276**: 1382-3.
55. Worlledge SM. Autoantibody formation associated with methyldopa (aldomet) therapy. *Br J Haematol* 1969;**16**: 5-8.
56. Murphy WG, Kelton JG. Methyldopa-induced autoantibodies against red blood cells. *Blood Rev* 1988;**2**: 36-42.
57. Carstairs KC, Breckenridge A, Dollery CT, Worlledge SM. Incidence of a positive direct coombs test in patients on alpha-methyldopa. *Lancet* 1966;**2**: 133-5.
58. Longo G, Gandini G, Ferrara L, Torelli U, Emilia G. Fludarabine and autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1997;**59**: 124-5.
59. Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, Girelli G. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 2000;**95**: 2786-92.
60. Tertian G, Cartron J, Bayle C, Rudent A, Lambert T, Tchernia G. Fatal intravascular autoimmune hemolytic anemia after fludarabine treatment for chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 1996;**38**: 359-60.
61. Maclean R, Meiklejohn D, Soutar R. Fludarabine-related autoimmune haemolytic anaemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1996;**92**: 768-9.
62. Di Raimondo F, Giustolisi R, Cacciola E, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson LB, Keating MJ. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia patients treated with fludarabine. *Leuk Lymphoma* 1993;**11**: 63-8.
63. Myint H, Copplestone JA, Orchard J, Craig V, Curtis D, Prentice AG, Hamon MD, Oscier DG, Hamblin TJ. Fludarabine-related autoimmune haemolytic anaemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1995;**91**: 341-4.
64. Diehl LF, Ketchum LH. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. *Semin Oncol* 1998;**25**: 80-97.
65. Orchard J, Bolam S, Myint H, Oscier DG, Hamblin TJ. In patients with lymphoid tumours recovering from the autoimmune complications of fludarabine, relapse may be triggered by conventional chemotherapy. *Br J Haematol* 1998;**102**: 1112-3.
66. Salama A, Mueller-Eckhardt C. Two types of nomifensine-induced immune haemolytic anaemias: drug-dependent sensitization and/or autoimmunization. *Br J Haematol* 1986;**64**: 613-20.

67. Salama A, Götsche B, Mueller-Eckhardt C. Autoantibodies and drug- or metabolite-dependent antibodies in patients with diclofenac-induced immune haemolysis. *Br J Haematol* 1991;**77**: 546-9.
68. Ahrens N, Genth R, Salama A. Belated diagnosis in three patients with rifampicin-induced immune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2002;**117**: 441-3.
69. Gralnick HR, Wright LD, McGinniss MH. Coombs' positive reactions associated with sodium cephalothin therapy. *JAMA* 1967;**199**: 725-6.
70. Perkins RL, Mengel CE, Saslaw S. Direct Coombs' test reactivity after cephalothin or cephaloridine in man and monkey. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968;**129**: 397-401.
71. Broadberry RE, Farren TW, Bevin SV, Kohler JA, Yates S, Skidmore I, Poole J, Garratty G. Tazobactam-induced haemolytic anaemia, possibly caused by non-immunological adsorption of IgG onto patient's red cells. *Transfus Med* 2004;**14**: 53-7.
72. Arndt P, Garratty G, Isaak E, Bolger M, Lu Q. Positive direct and indirect antiglobulin tests associated with oxaliplatin can be due to drug antibody and/or drug-induced nonimmunologic protein adsorption. *Transfusion* 2009;**49**: 711-8.
73. Leger RM, Arndt PA, Garratty G. How we investigate drug-induced immune hemolytic anemia. *Immunoematology* 2014;**30**: 85-94.
74. Garratty G, Arndt PA. Positive direct antiglobulin tests and haemolytic anaemia following therapy with beta-lactamase inhibitor containing drugs may be associated with nonimmunologic adsorption of protein onto red blood cells. *Br J Haematol* 1998;**100**: 777-83.
75. Erkes DA, Selvan SR. Hapten-induced contact hypersensitivity, autoimmune reactions, and tumor regression: plausibility of mediating antitumor immunity. *J Immunol Res* 2014;**2014**: 175265.
76. Ahrens N, Genth R, Kieseletter H, Salama A. Misdiagnosis in patients with diclofenac-induced hemolysis: new cases and a concise review. *Am J Hematol* 2006;**81**: 128-31.
77. Neuman G, Boodhan S, Wurman I, Koren G, Bitnun A, Kirby-Allen M, Ito S. Ceftriaxone-induced immune hemolytic anemia. *Ann Pharmacother* 2014;**48**: 1594-604.
78. Rifkind JM, Mohanty JG, Nagababu E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Front Physiol* 2014;**5**: 500.
79. Deuel JW, Schaer CA, Boretti FS, Opitz L, Garcia-Rubio I, Baek JH, Spahn DR, Buehler PW, Schaer DJ. Hemoglobinuria-related acute kidney injury is driven by intrarenal oxidative reactions triggering a heme toxicity response. *Cell Death Dis* 2016;**7**: e2064.
80. Mayer B, Bartolmäs T, Yürek S, Salama A. Variability of Findings in Drug-Induced Immune Haemolytic Anaemia: Experience over 20 Years in a Single Centre. *Transfus Med Hemother* 2015;**42**: 333-9.
81. Petz LD. Drug-induced autoimmune hemolytic anemia. *Transfus Med Rev* 1993;**7**: 242-54.
82. Worlledge SM. Immune drug-induced hemolytic anemias. *Semin Hematol* 1973;**10**: 327-44.
83. Petz LD. Drug-induced immune haemolytic anaemia. *Clin Haematol* 1980;**9**: 455-82.
84. Worlledge S. Immune drug induced haemolytic anaemias. In: RH G, ed. *Blood disorders due to drugs and other agents*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1973:11-26.
85. Johnson ST, Fueger JT, Gottschall JL. One center's experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia--a new paradigm. *Transfusion* 2007;**47**: 697-702.
86. Salama A, Mueller-Eckhardt C, Kissel K, Pralle H, Seeger W. Ex vivo antigen preparation for the serological detection of drug-dependent antibodies in immune haemolytic anaemias. *Br J Haematol* 1984;**58**: 525-31.
87. Northrop MS, Agarwal HS. Ceftriaxone-induced hemolytic anemia: case report and review of literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015;**37**: e63-6.
88. Vehapoğlu A, Gökmar N, Tuna R, Çakır FB. Ceftriaxone-induced hemolytic anemia in a child successfully managed with intravenous immunoglobulin. *Turk J Pediatr* 2016;**58**: 216-9.

89. Burgos Pratz L, Santoro D, Coca Mogro B, Valiente VL, Camino P, Scordo W, Salamone H. Etoricoxib-induced immune hemolytic anemia: first case presenting acute kidney failure. *Transfusion* 2019;**59**: 1657-60.
90. Maurin C, Vassal O, Darien M, Raba M, Allaouchiche B, Piriou V. Immune hemolysis secondary to injection of contrast medium. *Transfusion* 2018;**58**: 2113-4.
91. Gin A, Dilay L, Karlowsky JA, Walkty A, Rubinstein E, Zhanel GG. Piperacillin-tazobactam: a beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007;**5**: 365-83.
92. Bressler RB, Huston DP. Piperacillin-induced anemia and leukopenia. *South Med J* 1986;**79**: 255-6.
93. Johnson ST, Weitekamp LA, Sauer DE, Fueger JT, Aster RH. Piperacillin-dependent antibody with relative e specificity reacting with drug treated red cells and untreated red cells in the presence of the drug. *Transfusion* 1994;**34**: 70S.
94. Arndt PA, Garratty G, Hill J, Kasper M, Chandrasekaran V. Two cases of immune haemolytic anaemia, associated with anti-piperacillin, detected by the 'immune complex' method. *Vox Sang* 2002;**83**: 273-8.
95. Shirey R, Iding J, King KE, Ness PM. Drug-induced immune hemolysis mimicking an acute hemolytic transfusion reaction. *Transfusion* 2005;**45**: 100A-1A.
96. Shirey R, Yamada C, Ness PM, King KE. Drug-induced immune hemolytic anemia imitating a severe delayed hemolytic transfusion reaction. *Transfusion* 2007;**47**: 185A.
97. Garcia Gala JM, Vazquez Aller S, Rodriguez Vicente P, Morante Pombo C. Immune hemolysis due to piperacillin/tazobactam. *Transfus Apher Sci* 2009;**40**: 97-8.
98. Roehmel JF, Schwarz C, Mehl A, Stock P, Staab D. Hypersensitivity to antibiotics in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2014;**13**: 205-11.
99. Meinus C, Schwarz C, Mayer B, Roehmel JF. Piperacillin-induced mild haemolytic anaemia in a 44-year-old patient with cystic fibrosis. *BMJ Case Rep* 2016;**2016**.
100. Meyer O, Hackstein H, Hoppe B, Göbel FJ, Bein G, Salama A. Fatal immune haemolysis due to a degradation product of ceftriaxone. *Br J Haematol* 1999;**105**: 1084-5.
101. Seltam A, Salama A. Ceftriaxone-induced immune haemolysis: two case reports and a concise review of the literature. *Intensive Care Med* 2000;**26**: 1390-4.
102. Yürek S, Riess H, Kreher S, Dörken B, Salama A. Fatal immune haemolysis due to antibodies to individual metabolites of 5-fluorouracil. *Transfus Med* 2010;**20**: 265-8.
103. Wright MS. Drug-induced hemolytic anemias: increasing complications to therapeutic interventions. *Clin Lab Sci* 1999;**12**: 115-8.
104. Böger RH, Schmidt G. Antirheumatika und Antiphlogistika. In: Schwabe U, Paffrath D, eds. *Arzneiverordnungs-Report 2012*. Berlin: Springer, 2012:446-67.
105. Lipton B, Laws C, Li L. Workers Compensation Prescription Drug Study: 2011 Update. National Council on Compensation Insurance Inc., 2011.
106. Mayer B, Genth R, Dehner R, Salama A. The first example of a patient with etoricoxib-induced immune hemolytic anemia. *Transfusion* 2013;**53**: 1033-6.
107. Mayer B, Leo A, Herziger A, Houben P, Schemmer P, Salama A. Intravascular immune hemolysis caused by the contrast medium iomeprol. *Transfusion* 2013;**53**: 2141-4.
108. Arndt PA, Leger RM, Garratty G. Serological Characteristics of Anti-Piperacillin in Seventeen Patients with Drug-Induced Immune Hemolytic Anemia. *Transfusion* 2010;**50**: 37A.
109. Mayer B, Yürek S, Salama A. Piperacillin-induced immune hemolysis: new cases and a concise review of the literature. *Transfusion* 2010;**50**: 1135-8.
110. Arndt PA, Revilla J, Leger RM, Garratty G. Studies on specificity of selected drug-dependent antibodies (abstract). *Transfusion* 2013;**53**: 17A.
111. Johnson ST. Warm autoantibody or drug dependent antibody? That is the question! *Immunohematology* 2007;**23**: 161-4.

112. Salama A, Mueller-Eckhardt C. Cianidanol and its metabolites bind tightly to red cells and are responsible for the production of auto- and/or drug-dependent antibodies against these cells. *Br J Haematol* 1987;**66**: 263-6.
113. Stroncek D, Procter JL, Johnson J. Drug-induced hemolysis: cefotetan-dependent hemolytic anemia mimicking an acute intravascular immune transfusion reaction. *Am J Hematol* 2000;**64**: 67-70.
114. Pichler WJ, Naisbitt DJ, Park BK. Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2011;**127**: S74-81.
115. Thong BY, Tan TC. Epidemiology and risk factors for drug allergy. *Br J Clin Pharmacol* 2011;**71**: 684-700.
116. Salama A, Burger M, Mueller-Eckhardt C. Acute immune hemolysis induced by a degradation product of amphotericin B. *Blut* 1989;**58**: 59-61.
117. Garratty G, Postoway N, Schwellenbach J, McMahill PC. A fatal case of ceftriaxone (Rocephin)-induced hemolytic anemia associated with intravascular immune hemolysis. *Transfusion* 1991;**31**: 176-9.
118. Johnson ST, Weitekamp LA, Wilkins JL, Heim ED, MacDonald JD, Barylak EJ. Diclofenac-dependent antibody with relative e specificity causing hemolytic anemia and emphasizing the need for metabolite testing. *Transfusion* 1993;**33**: 63S.
119. Cunha PD, Lord RS, Johnson ST, Wilker PR, Aster RH, Bougie DW. Immune hemolytic anemia caused by sensitivity to a metabolite of etodolac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Transfusion* 2000;**40**: 663-8.
120. Roehmel J, Specht P, Staab D, Schwarz C, Salama A, Mayer B. Risk of piperacillin-induced hemolytic anemia in patients with cystic fibrosis and antipseudomonal treatment: a prospective observational study. *Transfusion* 2019;**59**: 3746-54.
121. Kunzmann S, Thomas W, Mayer B, Kuhn S, Hebestreit H. Immune-mediated severe hemolytic crisis with a hemoglobin level of 1.6 g/dl caused by anti-piperacillin antibodies in a patient with cystic fibrosis. *Infection* 2010;**38**: 131-4.
122. Thickett KM, Wildman MJ, Fegan CD, Stableforth DE. Haemolytic anaemia following treatment with piperacillin in a patient with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 1999;**43**: 435-6.
123. Audeh YM, Wehrli G. Hemolytic anemia due to Zosyn and the Blood Bank Physician's Role. *Transfusion* 2002;**42**: 106S.
124. Mohammed I. SEVERE ACUTE HEMOLYTIC ANEMIA DUE TO PIPERACILLIN. *Critical Care Medicine* 2005;**33**: A182.
125. Chavez A, Mian A, Scurlock AM, Blackall D, Com G. Antibiotic hypersensitivity in CF: drug-induced life-threatening hemolytic anemia in a pediatric patient. *J Cyst Fibros* 2010;**9**: 433-8.
126. Bandara M, Seder DB, Garratty G, Leger RM, Zuckerman JB. Piperacillin-induced immune hemolytic anemia in an adult with cystic fibrosis. *Case Rep Med* 2010;**2010**: 161454.
127. Lohiya GS, Tan-Figueroa L, Krishna V. Piperacillin-induced immune hemolysis presenting with tachycardia and cardiac arrest. *Case Rep Med* 2011;**2011**: 816497.
128. Gehrie E, Neff AT, Ciombor KK, Harris N, Seegmiller AC, Young PP. Transfusion medicine illustrated. Profound piperacillin-mediated drug-induced immune hemolysis in a patient with cystic fibrosis. *Transfusion* 2012;**52**: 4-5.
129. Nagao B, Yuan S, Bon Homme M. Sudden onset of severe anemia in a patient with cystic fibrosis. *Clin Chem* 2012;**58**: 1286-9.
130. Marik PE, Parekh P. Life-threatening piperacillin-induced immune haemolysis in a patient with cystic fibrosis. *BMJ Case Rep* 2013;**2013**.
131. Zanetti RC, Biswas AK. Hemolytic anemia as a result of piperacillin/tazobactam administration: a case report and discussion of pathophysiology. *Mil Med* 2013;**178**: e1045-7.
132. Prince BT, McMahan BJ, Jain M, Peters AT. Meropenem tolerance in a patient with probable fulminant piperacillin-induced immune hemolytic anemia. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2015;**3**: 452-3.

133. Kerkhoff AD, Patrick L, Cornett P, Kleinhenz ME, Brondfield S. Severe piperacillin-tazobactam-induced hemolysis in a cystic fibrosis patient. *Clin Case Rep* 2017;**5**: 2059-61.
134. McDonald L, Brodie R, Murphy K, Wright P, Webster R, Fitzgerald J. Piperacillin-tazobactam drug-induced immune haemolysis in a case of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Transfus Med* 2019;**29**: 138-40.
135. Leger RM, Arndt PA, Garratty G. Serological studies of piperacillin antibodies. *Transfusion* 2008;**48**: 2429-34.
136. Boutin S, Graeber SY, Stahl M, Dittrich AS, Mall MA, Dalpke AH. Chronic but not intermittent infection with *Pseudomonas aeruginosa* is associated with global changes of the lung microbiome in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2017;**50**: 1701086.
137. Pleasants RA, Walker TR, Samuelson WM. Allergic reactions to parenteral beta-lactam antibiotics in patients with cystic fibrosis. *Chest* 1994;**106**: 1124-8.
138. Parmar JS, Nasser S. Antibiotic allergy in cystic fibrosis. *Thorax* 2005;**60**: 517-20.
139. Vichinsky EP, Earles A, Johnson RA, Hoag MS, Williams A, Lubin B. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. *N Engl J Med* 1990;**322**: 1617-21.
140. Sanderson JP, Naisbitt DJ, Park BK. Role of bioactivation in drug-induced hypersensitivity reactions. *AAPS J* 2006;**8**: E55-64.
141. Cho T, Uetrecht J. How Reactive Metabolites Induce an Immune Response That Sometimes Leads to an Idiosyncratic Drug Reaction. *Chem Res Toxicol* 2017;**30**: 295-314.
142. Amali MO, Sullivan A, Jenkins RE, Farrell J, Meng X, Faulkner L, Whitaker P, Peckham D, Park BK, Naisbitt DJ. Detection of drug-responsive B lymphocytes and antidrug IgG in patients with β -lactam hypersensitivity. *Allergy* 2017;**72**: 896-907.
143. Amali MO, Jenkins RE, Meng X, Faulkner L, Whitaker P, Peckham D, Park BK, Naisbitt DJ. Assessment of Antipiperacillin IgG Binding to Structurally Related Drug Protein Adducts. *Chem Res Toxicol* 2017;**30**: 2097-9.
144. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 10th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

6. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich in meiner wissenschaftlichen Laufbahn unterstützt und gefördert haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Abdulgabar Salama als langjährigen beständigen Mentor meiner wissenschaftlichen Tätigkeit, der mir stets mit Rat und Ermutigung zu Seite stand. Er hat nicht nur mein Interesse an der speziellen Immunhämatologie gefördert, ihm verdanke ich auch eine exzellente Ausbildung auf dem Gebiet der klinischen Transfusionsmedizin.

Ich danke Herrn Prof Dr. Axel Pruß für die stetige Unterstützung und dass er mir als komm. Direktor des Institutes für Transfusionsmedizin die Freiräume für meine wissenschaftliche Arbeit ermöglichte.

Mein Dank gilt ferner allen Kolleg:innen der Charité, die meine Arbeit in den vergangenen Jahren auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben. Insbesondere danke ich den medizinisch-technischen Kolleginnen aus dem Antikörperlabor für die praktische Unterstützung und die hervorragende Arbeit. Ohne sie wäre immunhämatologische Forschung auf hohem Niveau nicht möglich. Meinen ärztlichen Kollegen Salih Yürek und Dr. Thilo Bartolmäs danke ich für die vielen fruchtbaren Gespräche und Anregungen und die kollegialen Momente.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die mich in jeder nur erdenklichen Weise unterstützt und nie einen Zweifel aufkommen ließ, dass diese Arbeit zu einem guten Ende geführt werden würde.

7. Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift