

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Koinzidenz von Autoantikörpern und Alloantikörpern durch
Bluttransfusionen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Andreas Kähne

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Salama

2. Prof. Dr. med. R. Eckstein

3. Prof. Dr. med. R. E. Scharf

Datum der Promotion: 29.01.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Erythrozyten-Antikörper und -Antigene	6
1.2	Alloantikörper	7
1.2.1	Natürliche Alloantikörper	7
1.2.2	Immunantikörper	7
1.3	Autoantikörper	8
1.4	Alloimmunhämolyse	10
1.4.1	Hämolytische Transfusionsreaktionen	10
1.5	Autoimmunhämolyse	11
1.5.1	Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) vom Wärmetyp	12
1.5.2	Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) vom Kältetyp	13
1.5.2.1	Akute AIHA vom Kältetyp	13
1.5.2.2	Chronische AIHA vom Kältetyp	13
1.5.3	Paroxysmale Kältehämoglobinurie (Autoimmunhämolytische Anämie vom Donath-Landsteiner-Typ)	14
1.5.4	Medikamentös induzierte Immunhämolyse	14
1.6	Bluttransfusionen bei Patienten mit Autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA) vom Wärmetyp	15
2	Ziele der Studie	17
3	Patientenauswahl und Methoden	18
3.1	Datenerhebung	18

3.2	Datenanalyse	20
4	Ergebnisse	21
4.1	Alloimmunisierung bei autoimmunisierten Patienten	21
4.1.1	Allgemeine Koinzidenz von Auto- und Alloantikörpern	21
4.1.2	Rhesus-Antikörper bei autoimmunisierten Patienten	22
4.1.3	Patienten mit positiver Transfusionsanamnese	22
4.1.4	Autoimmunisierte Patienten mit Hämolyse und Alloantikörpern	23
5	Diskussion	25
5.1	Autoantikörper- und Alloantikörperprävalenz	25
5.2	Multiple Alloantikörper	26
5.3	Rhesus-Antikörper bei autoimmunisierten Patienten	27
5.4	Allo- und Autoimmunisierung durch Bluttransfusionen	28
5.5	Mechanismus der Autoimmunisierung	28
5.6	Der Einfluss von Alloantikörpern auf den klinischen Verlauf bei Patienten mit Autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA)	29
6	Schlussfolgerung	31
7	Anhang	32
8	Referenzen	36

1 Einleitung

Erythrozyten stellen eine der am besten untersuchten Zellen dar. Sie sind 80–100 fl groß,[1] sind bei Menschen im reifen Zustand kernlos und haben einen Durchmesser von 7,5–8,5 µm.[2] Ihre Form weist durch die zentrale Eindellung eine im Verhältnis zum Volumen große Oberfläche auf. Am bekanntesten ist die Fähigkeit der Erythrozyten, Sauerstoff und Kohlendioxid aufzunehmen, zu transportieren und abzugeben zu können. Durch die bikonkave Form der Erythrozyten wird der Gasaustausch erleichtert. Zudem können an der Oberfläche der Erythrozyten eine Vielzahl von physiologischen Substanzen und Medikamente binden. Weiterhin transportieren Erythrozyten Immunkomplexe.[3-5] Schließlich spielen Erythrozyten bei der Thrombozyten-Endothel-Interaktion und Blutgerinnung sowie beim kolloid-osmotischen Druck eine bedeutende Rolle.

Erythrozyten enthalten im Wesentlichen das Funktionsprotein Hämoglobin im Zytoplasma. Zusätzlich enthalten sie die Strukturproteine Spektrin und Aktin, die an der Plasmamembran verankert sind und für die Erythrozyten-Verformbarkeit in den Kapillaren erforderlich sind.[2] Außerdem sind membranständige Proteine zu erwähnen, die unterschiedlich weit in den extrazellulären Bereich ragen. Sie weisen teils eine ausgeprägte Glykosylierung mit Sialinsäure auf, so dass Erythrozyten von einer Zone negativer Ladung umgeben sind. Diese elektrostatische Eigenschaft bedeutet eine gegenseitige Abstoßung der Erythrozyten und ist in-vivo für eine homogene Verteilung der Zellen erforderlich.

1.1 Erythrozyten-Antikörper und -Antigene

Antikörper gegen Erythrozyten kommen relativ häufig vor und können eine Immunhämolyse verursachen. Das klinische Bild der Hämolyse ist extrem variabel. Es können dadurch milde, schwere und lebensbedrohliche Anämien entstehen. Daher ist die Kenntnis der ursächlichen Antikörper und deren korrespondierenden Antigene von großer Bedeutung.

Antikörper binden an Strukturen auf Proteinen oder Glykoproteinen, die Antigene genannt werden. Ein Antigen kann aus einem oder mehreren Epitopen bestehen und weniger als 100 bis über 100 000 Mal pro Zelle exprimiert werden.[6] Gruppen von ähnlichen Antigenen, die auf der gleichen molekularen Struktur lokalisiert sind, bilden eine Blutgruppe.

Erythrozytenantigene können zur Bildung von Antikörpern führen, die gegen Erythrozytenantigene anderer Individuen (Alloantikörper) und/oder gegen eigene Antigene gerichtet sind (Autoantikörper). Die Immunogenität der einzelnen erythrozytären Antigene wird durch die Frequenz der Alloimmunisierung gegen das jeweilige Antigen bestimmt. Diese ist nicht nur von der Antigendichte, sondern auch von anderen Faktoren, wie dem individuellen Immunsystem, der chemischen Zusammensetzung, der Gesamtantigenmenge, der Verabreichungsform, der Expositionsdauer und Reexposition sowie von anderen, bisher nicht bekannten Faktoren abhängig.

Je nach ihrer optimalen Reaktionstemperatur bei 37°C oder bei 0-4°C werden erythrozytäre Antikörper als Wärme- oder Kälteantikörper bezeichnet. Während die Wärmeantikörper auch bei niedrigen Temperaturen mit Erythrozyten reagieren können, zeigen Kälteantikörper keine Reaktionen bei 37°C.

1.2 Alloantikörper

Allogene Antikörper werden in natürliche und in Immunantikörper unterschieden.

1.2.1 Natürliche Alloantikörper

Erythrozytäre Antikörper, die ohne erkennbare Ursache entstehen, werden als natürliche Antikörper bezeichnet. Natürliche Antikörper werden durch Heteroimmunisierung gegen verschiedene bakterielle Polysaccharid-Strukturen und andere Oberflächen gebildet. Sie sind oft vom IgM-, teils vom IgG- und selten vom IgA-Typ. Hierzu gehören die regulären und klinisch relevanten Blutgruppenisoagglutinine Anti-A und Anti-B. Diese Antikörper aktivieren Komplement und verursachen intravasale Immunhämolysen. Mit Blutgruppenantigenen wie ABO, MN, P₁, I, Lewis besteht Kreuzreaktivität.[9] Für natürliche Antikörper ist eine niedrige Avidität (Bindungsfestigkeit) typisch, und sie reagieren meist direkt und bevorzugt im kalten Milieu. Natürliche Antikörper sind aus diesen Gründen, mit Ausnahme von Anti-A und -B, die gegen stark exprimierte Antigene gerichtet sind und insofern sie nicht bei Körpertemperatur reagieren, nicht klinisch relevant.[10] In geringer Konzentration sind sie oft bei Gesunden nachweisbar.

1.2.2 Immunantikörper

Immunantikörper werden durch spezifische Stimulation mit (humanem) Antigen nach Transfusionen mit Fremdblut oder nach fetomaternalem Blutübertritt bei Schwangerschaften gebildet, gehören in aller Regel zur IgG-Klasse und können zur Alloimmunhämolyse führen. Diese Antikörper erfordern bei der Diagnostik in der Regel Verstärker (Supplement) wie Albumin, verschiedene Enzyme oder Anti-humanglobulin (Coombs-Serum[11]) und reagieren bevorzugt im warmen Milieu. Sie werden daher als inkomplette bzw. als wärmereaktive Antikörper bezeich-

net.[12, 13] Diese Antikörper sind gegen Protein- oder Proteoglykan-Antigene gerichtet, die meist aus den Blutgruppensystemen Rh, Kell, Duffy, Kidd oder S/s stammen. Sie können klinisch relevant sein und Hämolysen hervorrufen.[9]

Die Prävalenz alloreaktiver Immunantikörper hängt wesentlich von der Transfusionsanamnese der untersuchten Patienten ab und liegt im allgemeinen bei transfusionsbedürftigen Patienten bei 1,1–9,0%.[13-20] Bei Patienten mit transfusionspflichtigen Hämoglobinopathien, die wesentlich häufiger transfundiert werden, kann die Prävalenz 20–50% erreichen.[21] Neben Rhesusantigenen sollten bei diesen Patienten die meist klinisch relevanten Kell-, Duffy- und Kidd-Antigene berücksichtigt werden.

Allgemeinen haben Frauen sowie Patienten mit Diabetes mellitus, soliden Malignomen oder Patienten nach allogener Blutstammzelltransplantation ein leicht erhöhtes Alloimmunisierungsrisiko, während Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen und symptomatischer Atherosklerose ein diskret erniedrigtes Risiko aufweisen.[22] Die Einführung leukozytendepletierter Blutprodukte scheint das Alloimmunisierungsrisiko ebenfalls gesenkt zu haben.[23]

1.3 Autoantikörper

Es „ist nicht zu verkennen, daß eine ... Bildung hämolytischer Substanzen, die auf das eigene Blut ... wirken, ein Vorgang wäre, der in höchstem Grade dysteleologisch erscheinen müsste.“[24] Der von Paul Ehrlich skizzierte Horror autotoxicus verdeutlicht, dass Autoantikörper prinzipiell möglich sind, und dass die Bildung von Autoantikörpern in der Regel verhindert wird.

Erythrozytäre Autoantikörper sind ebenso für Erythrozyten spezifisch wie die meisten Alloantikörper. Während aber Alloantikörper immer für bestimmte Blutgrup-

penantigene spezifisch sind, erscheint die Reaktivität von Autoantikörpern mit allen Erythrozyten nicht selten gleichförmig. Beispielsweise reagieren bei e-positiven Patienten Autoantikörper oft mit e-positiven Erythrozyten im stärkeren und mit e-negativen Erythrozyten im schwächeren Maß (partielle Blutgruppenspezifität).

Die partielle Blutgruppenspezifität von Autoantikörpern zeigt, daß die erythrozytäre Spezifität auf die Bindung bestimmter Oberflächenstrukturen zurückzuführen ist. Die häufigsten Moleküle, die in über 70% der mit aktuellen Methoden nachgewiesenen Fälle erkannt werden, stellen Rh Proteine dar.[25] Autoantikörper gegen diese Strukturen weisen die typische Wärmereaktivität von Immunantikörpern auf, und diese sind meist vom IgG-Typ, in seltenen Fällen vom IgM und/oder IgA-Typ.

Autoantikörper gegen andere Moleküle wie das stark glykosylierte Glykophorin A oder Bande 3, das nicht Träger von Blutgruppenmerkmalen ist, werden wesentlich seltener produziert.[26, 27] Insbesondere Bande 3-spezifische Autoantikörper scheinen in manchen Fällen eine deutlichere Hämolyse verursachen zu können als Rh-spezifische Autoantikörper, wenn diese nicht natürlicher Genese sind und eine hohe Avidität aufweisen.[28]

Autoantikörper mit I-Spezifität sind zumeist vom kältereaktiven Typ. Diese sind in der Regel vom IgM-Typ, und die Relevanz hängt von der Temperaturamplitude ab.[29]

Einschränkend muss erwähnt werden, dass die Antigenspezifität für die Disposition zur Autoimmunisierung möglicherweise nur eine untergeordnete Bedeutung hat. Gewöhnliche New Zealand Black (NZB)-Mäuse bilden Autoantikörper gegen Bande 3. Bei NZB-Mäusen, die für dieses Protein defizient sind, erfolgt die Autoimmunisierung gegen andere Strukturen.[30]

1.4 Alloimmunhämolysen

Alloimmunhämolysen werden durch Alloantikörper bzw. Immunantikörper verursacht. Diese Antikörper können sowohl hämolytische Transfusionsreaktionen als auch den Morbus haemolyticus neonatorum verursachen.

1.4.1 Hämolytische Transfusionsreaktionen

Hämolytische Transfusionsreaktionen (HTR) werden durch die Transfusion inkompatibler Erythrozyten und selten auch durch passive Übertragung von Alloantikörpern in plasmahaltigen Blutprodukten (Gefrorenes Frischplasma, Thrombozytenkonzentrate, Stammzellkonzentrate oder anderen Plasmaprodukten) verursacht. Die Reaktionen können sofort (akut) oder allmählich (verzögert) innerhalb von wenigen Tagen nach Transfusion beginnen. Bei der akuten Form sind die ursächlichen Antikörper in genügender Konzentration nachweisbar und können bereits zum Beginn, während, oder unmittelbar nach der Transfusion zur Hämolyse führen. Die klinischen Zeichen einer akuten hämolytischen Transfusionsreaktion können unter anderem Schüttelfrost, Blutdruckabfall, Fieber, Brustschmerzen sowie Rückenschmerzen beinhalten.

Die verzögerte HTR beruht auf einer bereits bestehenden Immunisierung, aber die Antikörper lassen sich vor der Transfusion nicht nachweisen. Durch die Transfusion wird die Antikörperbildung stimuliert (sekundäre Immunreaktion, Boosterung) und die sensibilisierten Erythrozyten werden je nach Antikörperstärke und -Eigenschaft entweder sofort durch Komplementaktivierung intravasal hämolysiert, von Makrophagen phagozytiert oder verweilen unbeschadet in der Zirkulation. Die betroffenen Patienten weisen klinische Symptome wie Fieber, Ikterus und Anämie auf.

Komplementaktivierende Antikörper wie die Isoagglutinine Anti-A und Anti-B führen in der Regel abrupt zur intravasalen Hämolyse und die meisten transfundierten Erythrozyten können dabei sofort zerstört werden. Dadurch werden C3a, C5a und zahlreiche, den klinischen Verlauf bestimmenden Zytokine (z.B.: IL-1, TNF, IL-6, IL-8 u.a.) freigesetzt.

Nicht-komplementaktivierende Antikörper verursachen eher eine extravasale Immunhämolyse. Dies schließt jedoch nicht immer eine Aktivierung der Komplementkaskade aus. Auch bekanntlich nicht-komplementaktivierende Antikörper (wie Rhesusantikörper) können gelegentlich eine massive Hämolyse verursachen, die zum Teil durch Komplementaktivierung und/oder eine Beteiligung der zytotoxischen Killerzellen erklärt werden kann. Hinweisend auf die Komplementaktivierung ist der regelmäßig positive Nachweis von C3d im direkten Coombstest nach einer HTR.

Die meisten HTR (>95%) werden durch Antikörper gegen AB0-, Rhesus-, Kell-, Kidd-, und Duffy-Antigene verursacht. Alle anderen Antikörper kommen selten als Ursache in Frage oder sie führen nicht zu einer Immunhämolyse.

1.5 Autoimmunhämolyse

Klinisch und serologisch werden die Autoimmunhämolytischen Anämien (AIHA) in verschiedene Klassen unterteilt.

1.5.1 Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) vom Wärmetyt

Die Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) vom Wärmetyt beruht auf der Wirkung spezifischer Autoantikörper mit einem Temperaturoptimum von 37°C (Wärmeautoantikörper). Der genaue Mechanismus für die Entstehung der Autoantikörper ist bisher nicht bekannt. Mitunter werden strukturelle Veränderungen der Erythrozytenmembran durch exogene Faktoren, Medikamente, Viren, mikrobielle Strukturen sowie somatische Mutationen vermutet. Eine genetische Disposition ist nicht bekannt. Die Erkrankung tritt isoliert und ohne erkennbare Ursachen bei etwa der Hälfte der betroffenen Patienten auf (idiopathische bzw. primäre Form). Bei der anderen Hälfte der Patienten kommt die AIHA als Begleiterkrankung vor (symptomatische bzw. sekundäre Form). Zu den ursächlichen Grunderkrankungen zählen Infektionen im Kindesalter und systemische Autoimmunerkrankungen und lymphoproliferative Erkrankungen bei Erwachsenen.

Wärmeautoantikörper sind meistens inkomplette IgG-Antikörper, die Komplement nicht oder nur partiell aktivieren können. Die mit solchen Autoantikörpern sensibilisierten Erythrozyten werden über Fc- für IgG und/oder C3b-Rezeptoren der Makrophagen in der Milz und bei einer starken Beladung auch in der Leber phagozytiert. Stark komplement-aktivierende Wärmeautoantikörper (Wärmehämolysine) sind sehr selten, gehören meistens zur IgM-Klasse und verursachen eine intravasale Immunhämolyse. Sehr selten kommen IgA-Wärmeautoantikörper allein als Ursache einer Autoimmunhämolytischen Anämie (AIHA) vor. Bei etwa 20% der Patienten mit Autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA) kann mehr als eine Antikörperklasse nachgewiesen werden.

1.5.2 Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) vom Kältetyp

Bei der AIHA vom Kältetyp wird zwischen einem akuten und chronischen Krankheitsbild unterschieden.

1.5.2.1 Akute AIHA vom Kältetyp

Bei der akuten Form handelt es sich um eine stets reversible Form, die im Anschluss an eine Infektion (meistens atypische Pneumonie oder Mononukleose) auftritt und durch die Bildung polyklonaler, kältewirksamer und komplementaktivierender Autoantikörper gegen Erythrozyten verursacht wird. Die Krankheit ist selten und tritt vorwiegend ab dem 14. Lebensjahr auf. Die Entstehung der Kälteautoantikörperbildung ist nicht bekannt. Die Hämolyse wird meist durch IgM-Autoantikörper verursacht, die üblicherweise gegen den Erythrozytenantigen-Komplex I/i gerichtet sind. Die Autoantikörper führen in der Kälte zu Erythrozytenagglutination und bei Temperaturen über 10°C zur Komplementaktivierung bzw. intravasalen Hämolyse. Die Hämolyse ist abhängig von der Temperaturamplitude und Konzentration der Antikörper sowie von der betroffenen Gesamterthrozytenmasse. Klinisch relevante IgG und IgA Kälteautoantikörper kommen extrem selten vor. Kälteautoantikörper mit niedriger Temperaturamplitude (<20°C) sind klinisch nicht relevant.

1.5.2.2 Chronische AIHA vom Kältetyp

Die chronische Form der AIHA vom Kältetyp wird durch die Bildung von monoklonaler kältewirksamer IgM-Autoantikörper verursacht und führt meistens zu einer intravasalen Hämolyse. Sie kann als idiopathische benigne IgM-Gammopathie als auch im Rahmen einer lymphoproliferativen Erkrankung (zB. M. Waldenström) symptomatisch auftreten. Die auftretenden relevanten Antikörper sind üblicherweise gegen den Erythrozytenantigen-Komplex I/i gerichtet. Die Hämolyse tritt

nach Kälteexposition verstärkt auf. Die Krankheit ist bei der idiopathischen Form ohne Therapie irreversibel, während die Prognose bei der symptomatischen Form von der Grunderkrankung abhängig ist.

1.5.3 Paroxysmale Kältehämoglobinurie (Autoimmunhämolytische Anämie vom Donath-Landsteiner-Typ)

Die AIHA vom Donath-Landsteiner-Typ (DL-Typ) / die paroxysmale oder bithermische Kältehämoglobinurie wird durch komplementaktivierende und meist niedrigtitrige Kälteautoantikörper der Klasse IgG und seltener der Klasse IgM verursacht. Die Antikörper reagieren mit den Erythrozyten in kälterem Milieu und führen bei Temperaturen über 10°C zur Komplementaktivierung mit intravasaler Hämolyse. Die AIHA vom DL-Typ ist die häufigste autoimmunhämolytische Anämie im Kindesalter. Sie verläuft akut reversibel, kommt fast ausschließlich bei Kindern unter 10 Jahren nach viralen Infektionen und selten nach Impfungen vor.

Der pathogenetische Zusammenhang zwischen Infektionen und der Bildung von Kälteautoantikörpern vom DL-Typ ist bisher nicht geklärt.

1.5.4 Medikamentös induzierte Immunnämolyse

Als medikamentös induzierte Immunnämolyse werden alle hämolytischen Syndrome bezeichnet, die durch medikamenteninduzierte Antikörper (Autoantikörper und/oder medikamenten- bzw. metabolitenabhängige Antikörper) verursacht werden. Die genauen Mechanismen der Antikörperbildung sind bisher nicht geklärt.

Ursächlich kann eine Bildung von Neoantigenen durch Medikamente bzw. deren Metaboliten an der Zelloberfläche angenommen werden, die zur Bildung von Autoantikörpern und/oder medikamentenabhängigen Antikörpern führen können.

Die Immunisierung kann während der Therapie und häufig nach Absetzen des Medikamentes bzw. durch eine Reexposition entstehen. Zur Zeit werden die medikamentös induzierten Immunhämolysen am häufigsten durch nicht-steroidale Antirheumatika, insbesondere Diclofenac, Cephalosporine der dritten Generation und Tuberkulostatika ausgelöst .

Die medikamentös induzierten Autoantikörper ohne medikamentenabhängige Antikörper sind serologisch und klinisch von den sogenannten idiopathischen IgG-Autoantikörpern nicht zu unterscheiden. Diese liegen in der Regel in hoher Konzentration vor, können eine extravasale Immunhämolyse verursachen und sind üblicherweise nicht in der Lage, die Komplementkaskade zu aktivieren. Die medikamentenabhängigen IgG- und/oder IgM-Antikörper reagieren nur in Anwesenheit des ursächlichen Medikamentes bzw. dessen Metaboliten und führen zu Komplementaktivierung. Interessant ist, dass die medikamenten-abhängige Antikörper in Begleitung von Autoantikörpern auftreten können. Hier handelt es sich meistens um schwache Autoantikörper, die sich meistens rasch zurückbilden.

1.6 Bluttransfusionen bei Patienten mit Autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA) vom Wärmetyp

Bisher wurde angenommen, dass Patienten mit einer AIHA vermehrt Alloantikörper bilden. Es war nicht allgemein bekannt, dass Bluttransfusionen zu einer Autoimmunisierung führen können. Aufgetretene Autoantikörper wurden oft

als „Begleitantikörper“ angesehen und das klinische Bild häufig mit der AIHA vom Wärmetyt verwechselt. Um Transfusionszwischenfälle zu verhindern, wurden mit diesem Hintergrund Transfusionen bei Patienten mit einer AIHA vermieden. Dies bedeutete eine inadäquate Versorgung der Patienten und konnte bis zum Tod der Patienten führen.

Die vorliegende Arbeit, von der Teile bereits veröffentlicht wurden, zeigt, dass Bluttransfusionen sowohl zu einer Alloimmunisierung als auch zu einer Autoimmunisierung führen können.[47]

2 Ziele der Studie

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht:

- 1 inwiefern durch Bluttransfusionen ein gemeinsames Auftreten von Auto- und Alloantikörpern induziert werden kann
- 2 inwiefern eine Beziehung zwischen den Spezifitäten der aufgetretenen Autoantikörper und Alloantikörper durch Bluttransfusionen besteht

3 Patientenauswahl und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden im Zeitraum von August 1998 bis Juni 2006 in einer retrospektiven Analyse 717 Patienten der Charité-Universitätsmedizin Berlin untersucht, bei denen Autoantikörper gegen Erythrozyten nachgewiesen worden sind.

396 (55%) der untersuchten Patienten waren weiblich und 321 (45%) der Patienten waren männlich. Das Durchschnittsalter betrug 42 Jahre (Altersbereich von 0,1 Jahre bis 96 Jahre).

3.1 Datenerhebung

· Tests für Antikörper gegen Erythrozyten

Das Vorhandensein von Antikörpern gegen Erythrozyten wurde mit Hilfe von kommerziellen Testkits nach Angabe der Hersteller durchgeführt. Hierbei wurden Antiglobulin Gelkarten (DiaMed, Cressier sur Morat, Schweiz) sowie autologe Kontrollen verwendet.

· Direkter Antiglobulin Test (DAT)

Für den direkten Antiglobulin Test (DAT) wurden ebenfalls kommerzielle Seren verwendet (Biotest, Dreieich, Deutschland und Dako, Hamburg, Deutschland). Der direkte Antiglobulintest (DAT) dient dem Nachweis einer Erythrozytenbeladung mit Antikörpern und/oder Komplement.

· Elution

Die Elution wurde mit Hilfe der Säuretechnik (Immucor, Rödermark, Deutschland) durchgeführt. Das Eluat (Elution) dient unter anderem der immunhämatischen

Differenzierung von erythrozytären Antikörpern, der Abklärung eines positiven direkten Coombstestes und der Abklärung von erythrozytären Antikörperreaktionen. Die Elution gewinnt an Bedeutung, wenn im Patientenserum kaum freie Antikörper nachweisbar sind und der überwiegende Teil an den Erythrozyten absorbiert ist.

· Identifizierung irregulärer Antikörper

Zur Identifizierung irregulärer Antikörper wurde der Antikörpersuchtest eingesetzt. Die Differenzierung erfolgte mit einer oder mehreren Testerythrozyten-Zusammenstellungen (Panel), deren wesentliche Antigene bekannt waren. Die Testerythrozyten wurden wahlweise unfermentiert im indirekten Antiglobulintest oder nach Vorinkubation mit Papain im salinen Milieu eingesetzt. Das Reaktionsmuster in diesem Panel ergab die Spezifität des aufgefundenen irregulären Antikörpers.

· Autoantikörper-Nachweis

Autoantikörper wurden diagnostiziert, wenn zwei der drei folgenden Kriterien erfüllt wurden:

- ein positiver direkter Antiglobulin Test
- Antikörper gegen Patientenerythrozyten ohne Allospezifität im Eluat
- Antikörper gegen Patientenerythrozyten ohne Allospezifität im Serum.

· Alloantikörper-Nachweis

Alloantikörper wurden diagnostiziert, wenn die autologen Erythrozyten das korrespondierende Blutgruppenantigen nicht aufwiesen.

Die Präsenz von Alloantikörpern wurde ausgeschlossen, wenn der indirekte Antiglobulin Test negativ war oder falls nach Adsorption von Autoantikörpern an geeignete Spendererythrozyten keine Alloantikörper nachweisbar waren.

· Einschlusskriterien für Patienten

Alle Patienten, die Autoantikörper gegen Erythrozyten aufwiesen, wurden in die Studie eingeschlossen.

Zusätzliche Informationen über Zeitpunkt und Häufigkeit durchgeführter Bluttransfusionen wurden durch retrospektive Aktenanalyse gewonnen, um die Rolle von Bluttransfusionen bei der Antikörperproduktion zu analysieren.

3.2 Datenanalyse

Die Patienten- und Untersuchungsdaten wurden mit Hilfe von Filemaker (Filemaker, Unterschleißheim, Deutschland) archiviert und mit Excel (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) bearbeitet. Mit Hilfe von Pivot-Tabellen ließen sich mehrere Proben einem Patienten zuordnen. Durch Verwendung des Summenproduktes konnten bei diesen Patienten Merkmale (z.B. Antikörperspezifitäten) analysiert werden, indem die Anzahl der Datensätze gezählt wurden, die der Merkmalskombination entsprachen.

4 Ergebnisse

4.1 Alloimmunisierung bei autoimmunisierten Patienten

4.1.1 Allgemeine Koinzidenz von Auto- und Alloantikörpern

Von 717 autoimmunisierten Patienten wiesen 517 Patienten (72%) mit Autoantikörpern keine Alloantikörper auf. Bei 200 der Patienten (28%) konnten neben Autoantikörpern auch Alloantikörper gefunden werden. Bei 54 dieser 200 Patienten konnte ein einzelner Alloantikörper nachgewiesen werden (siehe Anhang). Bei 146 Patienten konnten 2 oder mehr Alloantikörper nachgewiesen werden (Abb. 1).

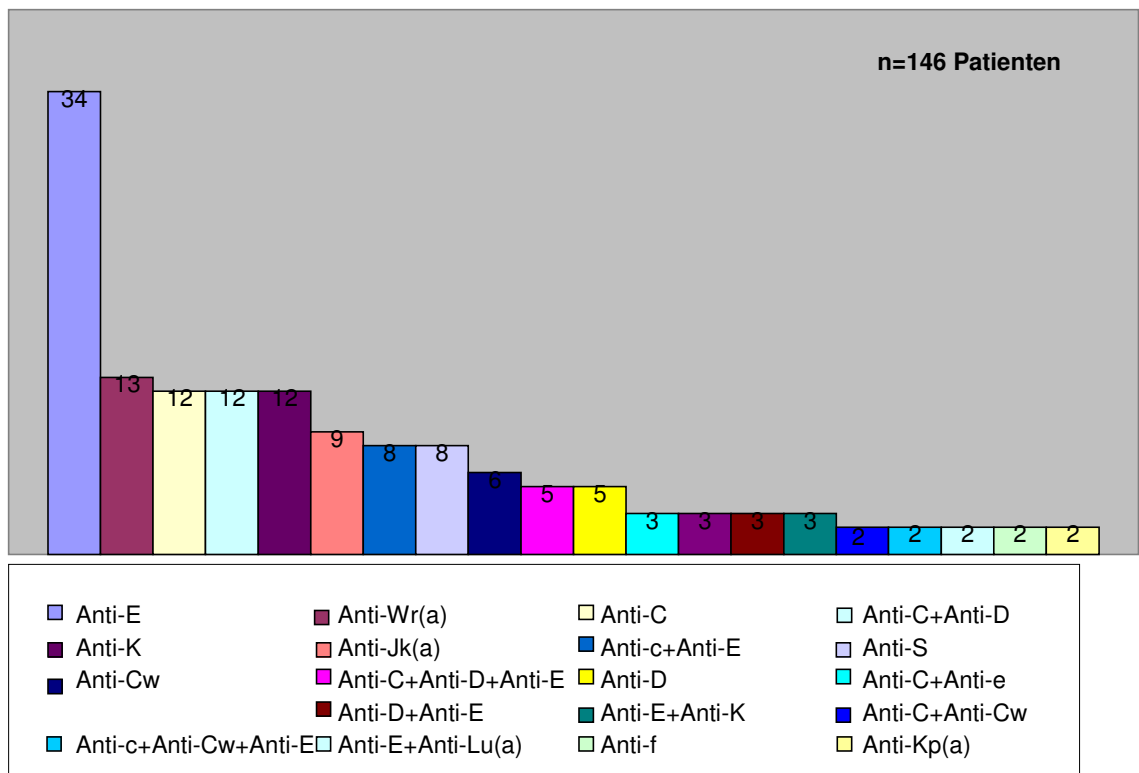


Abb. 1: Koinzidenz von Auto- und Alloantikörpern

4.1.2 Rhesus-Antikörper bei autoimmunisierten Patienten

Bei den untersuchten autoimmunisierten Patienten ließen sich am häufigsten Rhesus-Antikörper nachweisen (n=129 Patienten). Diese Antikörper traten entweder alleine oder in Kombination mit anderen Spezifitäten auf, in denen es sich zu großen Teilen ebenfalls um Rhesus-Antikörper handelte. Die zusammengefassten Spezifitäten der nachgewiesenen Rhesus-Auto/Alloantikörper sind in Abbildung 2 dargestellt.

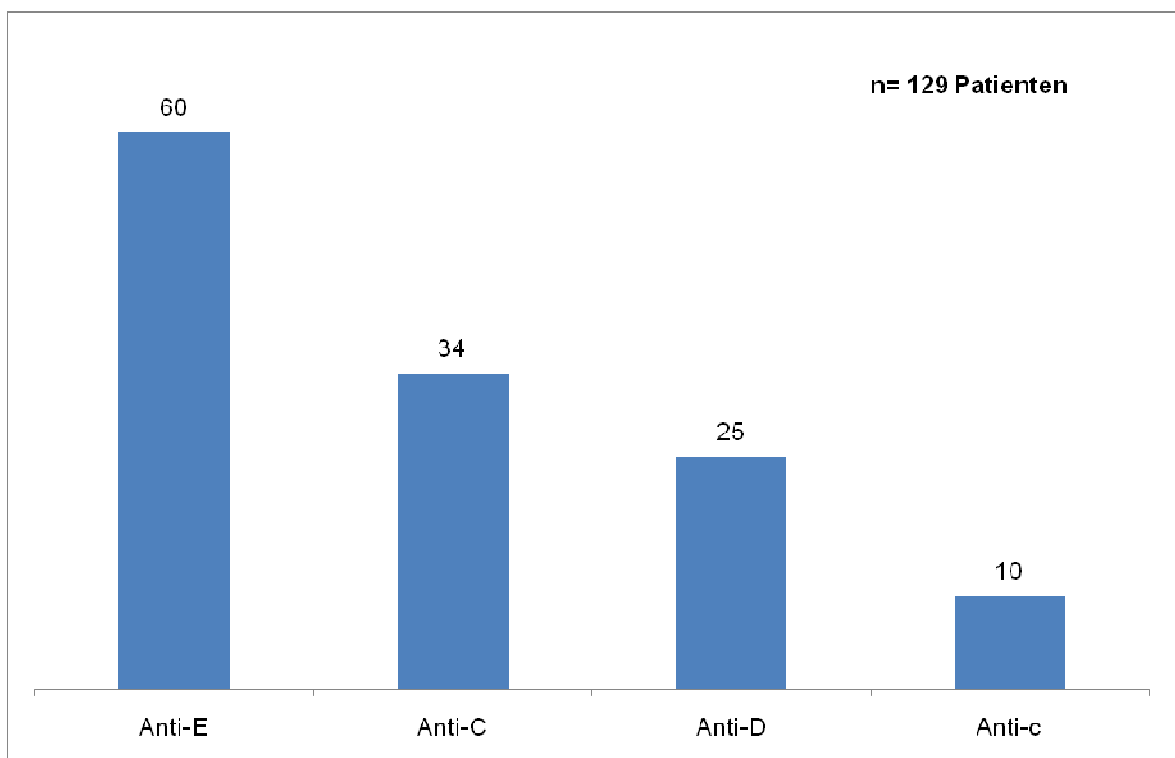


Abbildung 2: Spezifitäten der nachgewiesenen Rhesus-Antikörper

4.1.3 Patienten mit positiver Transfusionsanamnese

Der Verlauf ließ sich bei 98 von 200 Patienten mit Allo- und Autoantikörpern beurteilen. Die anderen Patienten (n=102) waren bereits bei der initialen Untersuchung immunisiert und somit ließ sich die Reihenfolge der Immunisierung nicht feststellen. Von den 98 Patienten traten bei 73 Patienten (75%) Autoantikörper im Zu-

sammenhang mit einer Alloimmunisierung durch Transfusionen auf und bei 6 weiteren Patienten (6%) traten Autoantikörper im Zusammenhang mit einer Alloimmunisierung durch Transplantationen auf. Weitere 9 Patienten waren primär alloimmunisiert und entwickelten in der Folge Autoantikörper. Bei 10 Patienten (10%) waren initial Autoantikörper und zu einem späteren Zeitpunkt Alloantikörper nachweisbar gewesen. Eine Autoimmunhämolytische Anämie lag bei 6 von diesen Patienten vor. Bei 3 von diesen 6 Patienten wurden dabei klinisch irrelevante Alloantikörper gefunden (Anti-Cw, Anti-C und Anti-Wr^a). Die weiteren 3 Patienten entwickelten Antikörper, die mitunter als relevant betrachtet werden können: Anti-E (2 Patienten) sowie Anti-S (1 Patient).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage, wie viel der Patienten mit AIHA, die ohne Immunsuppression Bluttransfusionen erhielten, alloimmunisiert wurden, im Vergleich zu Patienten mit einer AIHA und entsprechender Immunsuppression vor Bluttransfusionen. Relevante Datensätze hierzu liegen aufgrund der nicht immer verfolgten Transfusionsanamnese nicht vor.

4.1.4 Autoimmunisierte Patienten mit Hämolyse und Alloantikörpern

Nach Aktenlage war bei 122 (17%) der untersuchten 717 Patienten mit Autoantikörpern eine Hämolyse aufgetreten. Von diesen 122 Patienten hatten 63 (51%) der Patienten mit Hämolyse Bluttransfusionen erhalten. Durch die retrospektive Auswertung war eine Unterscheidung zwischen Hämolyse durch Autoantikörper oder durch eine hämolytische Transfusionsreaktion bei den einzelnen Patienten nicht möglich.

Bei 6 dieser 63 Patienten mit vorausgegangenen Bluttransfusionen und nachfolgender Hämolyse zeigte sich ein ursächlicher Zusammenhang der Antikörperpro-

duktion mit den zuvor stattgefundenen Bluttransfusionen. Die Spezifitäten der gefundenen Antikörper bei diesen 6 Patienten sind in Abbildung 3 dargestellt.

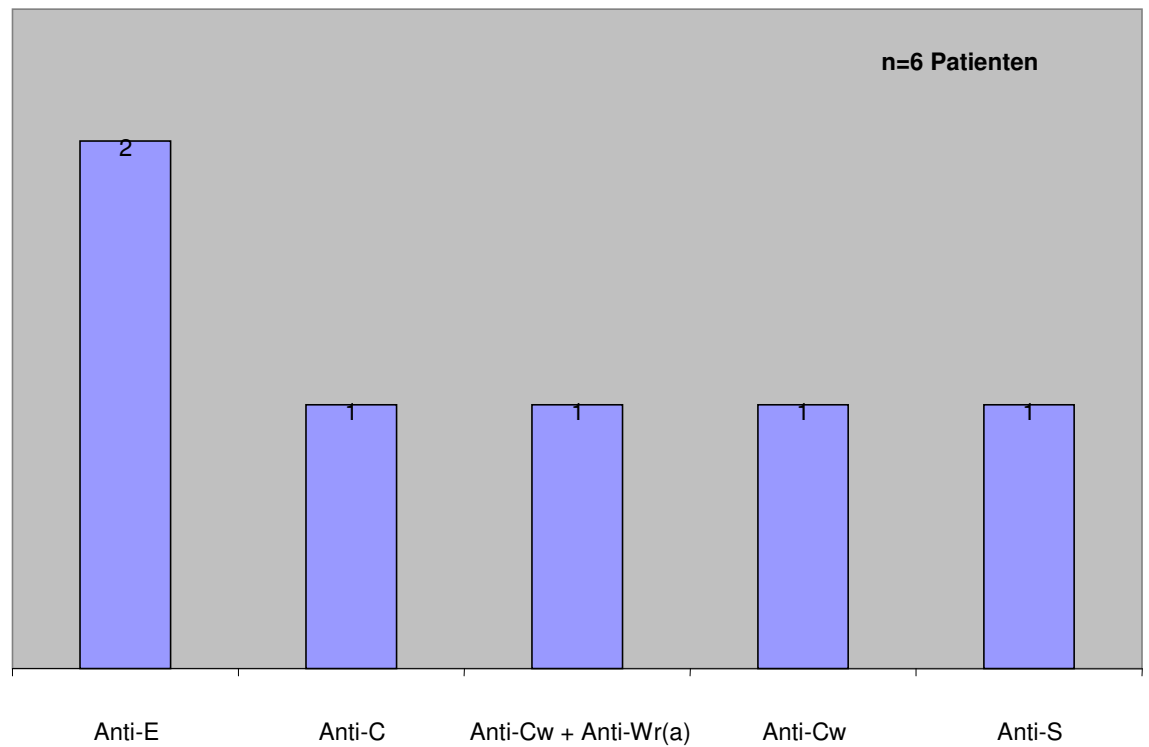


Abb. 3: Spezifitäten der Alloantikörper bei 6 von 63 autoimmunisierten Patienten mit positiver Transfusionsanamnese

5 Diskussion

5.1 Autoantikörper- und Alloantikörperprävalenz

Die Prävalenz von erythrozytären Autoantikörpern liegt bei der Untersuchung von Blutspendern etwa bei 0,04%. [31] Sie sind bei gesunden Personen meist ein Zufallsbefund und führen nicht zur Hämolyse, eine weitere Blutspendetätigkeit ist mit dem Befund erythrozytärer Autoantikörper jedoch nicht mehr erlaubt. Die Prävalenz von Autoantikörpern ist bei Patienten höher und hängt im weiten Umfang von der Diagnose ab. Während Autoantikörper bei Patienten im allgemeinen mit einer Prävalenz von 0,16% gefunden werden, [16] sind sie bei Patienten mit Sichelzellanämie und rezidivierendem Transfusionsbedarf deutlich häufiger (8–9%). [32, 33] Die Autoantikörper-Prävalenz erreicht bei Patienten mit ausgeprägten Thalassämien 25%. [34] Dies weist auf einen möglichen Zusammenhang mit Transfusionen hin, die zur Alloimmunisierung führen können. [35-45] Ein weiterer Hinweis auf diesen Zusammenhang ergibt sich aus Häufigkeit von Alloantikörpern bei Patienten mit Autoantikörpern, die bei 34–53% liegt. [36, 39, 42, 44] Trotz dieser Hinweise gibt es nur vereinzelte Berichte zur transfusionsinduzierten Autoimmunisierung, [44, 46] Der Zusammenhang mit Transfusionen war bislang nicht in seiner Bedeutung bekannt und diese Häufigkeit wurde als Ausdruck der Neigung bestimmter Patienten verstanden, Antikörper sowohl gegen eigene als auch gegen fremde Merkmale zu bilden. Da zudem Kreuzproben bei diesen Patienten mit allen Erythrozytenkonzentraten reaktiv ausfallen können, wurden in diesem Konzept bei Patienten mit Autoantikörpern und Anämie Transfusionen nach Möglichkeit vermieden. Dies führte nicht selten zur Verschlechterung der klinischen Situation und in manchen Fällen zum Tod der Patienten. Aus diesem Grund lässt sich erklären, warum bei Patienten mit lebensbedrohlichen hämolytischen Krisen die schnell wirksame Therapie einer Bluttransfusion nicht durchgeführt wurde.

Einer der wesentlichen, frühen Studien ist die Untersuchung serologischer Transfusionsreaktionen von Salama et al. 1984, in der Komplement sowohl auf den transfundierten als auch auf den autologen Erythrozyten gefunden wurde.[46]

In der vorliegenden Studie betrug die Alloantikörper-Prävalenz 28% bei autoimmunisierten Patienten (200 von 717). Somit beschreibt diese Arbeit eine vergleichsweise geringe Prävalenz des gemeinsamen Nachweises von Autoantikörpern und Alloantikörpern im Gegensatz zu den zuvor gefundenen Prävalenzen von 34–53% anderer Autoren.[36, 39, 42, 44] Da die Immunisierungsprävalenz maßgeblich von der Zusammensetzung des untersuchten Patientenkollektivs abhängt, und da in der vorliegenden Studie nicht eine bestimmte Gruppe, sondern alle Patienten der Charité mit eingeschlossen wurden, ist eine geringere Prävalenz möglich. Zudem wurden sensitive Untersuchungsmethoden für die Antikörperdiagnostik verwendet, welche auch schwache Autoantikörper erfaßten. Aus der im Verhältnis zu anderen Untersuchungen größeren Anzahl von Patienten mit einem 95%-Konfidenzbereich von 25–31% folgt, daß höhere Prävalenzen bei einer allgemeinen Patientenpopulation nicht zu erwarten sind.

5.2 Multiple Alloantikörper

In der vorliegenden Studie war die Prävalenz des Auftretens eines isolierten Alloantikörpers bei autoimmunisierten Patienten 16% (112 von 717 Patienten) und die Prävalenz des Auftretens mutipler Alloantikörper bei autoimmunisierten Patienten 12% (88 von 717 Patienten). Somit waren multiple Alloimmunisierungen vergleichsweise häufig. Diese Beobachtung kann dafür sprechen, daß ein Teil der Patienten besonders leicht immunisiert werden kann (high responder). Alternativ kann es sich bei der Gruppe der multipel immunisierten Patienten um mehrfach transfundierte Patienten handeln. Diese Erklärung ist in Übereinstimmung mit Studien, die besagen, dass Patienten mit multiplen Alloantikörpern zuvor mehrfach

Bluttransfusionen erhalten haben.[19, 53, 54] Am häufigsten konnten multiple Alloantikörper des Rhesus-Systems und des Kell-Systems nachgewiesen werden.

Das Risiko des Auftretens multipler Alloantikörper bei mehrfach transfundierten Patienten kann auch durch eine erweiterte Antigenberücksichtigung bei der Konservenauswahl minimiert werden. In der Regel werden bei Auswahl die ABO- und Rh-Blutgruppenmerkmale berücksichtigt. Bei einer zu erwartenden Alloimmunisierung können darüberhinaus Kell und in ausgewählten Fällen Duffy- und Kidd-Merkmale berücksichtigt werden.

5.3 Rhesus-Antikörper bei autoimmunisierten Patienten

Die bei den untersuchten autoimmunisierten Patienten am häufigsten gefundenen Alloantikörper waren gegen Rh-Antigene gerichtet, insbesondere gegen Antigene des RHCE-Proteins. Antikörper gegen das RHD-Protein wurden bei autoimmunisierten Patienten relativ seltener als bei Patienten ohne Autoantikörper gefunden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das RHD-Protein in 37 der 417 Aminosäuren von dem RHCE-Protein abweicht. Da bei RHD-negative Patienten kaukasischer Ethnität kein RHD exprimiert wird und es kein antithetisches Antigen gibt, ist die höhere Antigenität von RHD plausibel. Die Antigene C und c sowie die Antigene E und e unterscheiden sich dagegen lediglich nur durch eine Aminosäure und sind deutlich weniger immunogen. Die häufigere Autoimmunisierung bei einer RHCE-Immunsierung könnte daher als Ausdruck der immunologischen Ähnlichkeit gewertet werden, die zu einer Kreuzreaktion führen kann.

Kreuzreaktion als Ursache einer Autoreaktivität im Kontext einer Alloimmunisierung ist im Bereich der Erythrozytenserologie auch als Pseudoalloreaktivität bekannt.[38] Diese gelegentlich auch als Mimikry bezeichnete Eigenschaft bezeichnet Alloantikörper, welche sich an Antigen-negative Eryth-

rozyten adsorbieren und von diesen eluieren lassen. Das Reaktionsverhalten entspricht somit dem von Autoantikörpern, so daß die Abgrenzung im Einzelfall schwierig sein kann.

5.4 Allo- und Autoimmunisierung durch Bluttransfusionen

In der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass eine vorausgegangene Alloimmunisierung die Produktion von Autoantikörpern anregen kann. Bei Patienten mit Auto- und Alloantikörpern kann dabei die Alloimmunisierung unter anderem durch stattgefundene Bluttransfusionen erklärt werden. Dagegen lässt das erstmalige Auftreten von Autoantikörpern in diesem Zusammenhang den Schluss zu, dass deren Produktion durch Alloantikörper induziert wurde. Diese Ergebnisse wurden von späteren Studien bestätigt .[15, 17, 34, 43, 44, 46, 55, 56]

5.5 Mechanismus der Autoimmunisierung

In der vorliegenden Analyse wurden bei 200 (28%) der untersuchten 717 autoimmunisierten Patienten neben Autoantikörpern auch Alloantikörper gefunden. Bei 74% der Patienten mit Allo- und Autoantikörpern, deren Verlauf untersucht werden konnte, war ein Zusammenhang mit Bluttransfusionen vorhanden. Obwohl der Mechanismus der Autoimmunisierung in Verbindung mit einer Alloimmunisierung weitgehend unbekannt ist, muss diskutiert werden, ob mit der Produktion von Antikörpern eine Kreuzreaktivität zu ubiquitär vorkommenden Strukturen entsteht. Dieser Kreuzreaktion liegt das Konzept des molekularen Mimikry zu Grunde. Dabei treten Epitope (spezifische Regionen eines Antigens) mit dem Antigen-bindenden Teil eines Antikörpers Wechselwirkung und stimulieren die Produktion von autoreaktiven Antikörpern.[58]

Die Stimulation des Immunsystems durch ein Epitop kann außerdem dazu führen, dass zusätzliche Epitope auf dem Antigen mit in die Immunantwort miteinbezogen

werden. Dieser Effekt („*intramolecular spreading*“) kann sich ebenfalls auf andere Antigene übertragen („*intermolecular spreading*“), die sich meist auf benachbarten Molekülen befinden.[58] Studien beschreiben, dass die Mehrheit beobachteter Autoantikörper und Alloantikörper durch Bluttransfusionen gegen benachbarte Antigene gerichtet ist.[59, 60]

Die klinische Relevanz dieser Beobachtung besteht darin, dass bei Autoimmunreaktionen mehrere unabhängige Moleküle die Bildung eines breiten Spektrums an Autoantikörpern stimulieren können.[61-64] Kryptische Epitope, welche sonst vom Immunsystem nicht erkannt werden, könnten durch eine Veränderung der Antigenprozessierung durch antigenpräsentierende Zellen in die Immunantwort miteinbezogen werden. Beispielsweise können B-Zellen Peptide produzieren, welche nicht von Makrophagen oder dendritischen Zellen produziert werden. Diese kontinuierliche Mutation kann zu einer starken autoreaktiven Immunantwort führen. Nur wenige Gedächtniszellen, die während der Antigenpräsentation produziert wurden, sind hierbei in der Lage, die Mutation zu erkennen.

5.6 Der Einfluss von Alloantikörpern auf den klinischen Verlauf bei Patienten mit Autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA)

In dieser Studie konnten bei 6 von 63 Patienten mit einer AIHA Alloantikörper nachgewiesen werden, die durch Bluttransfusionen bedingt waren. Bei 3 von diesen 6 Patienten wurden dabei klinisch irrelevante Alloantikörper gefunden (Anti-C_w, Anti-C und Anti-Wr^a). Die weiteren 3 Patienten entwickelten Antikörper, die mitunter als relevant betrachtet werden können: Anti-E (2 Patienten) sowie Anti-S (1 Patient).

Es wird diskutiert, ob sich bei Patienten mit einer AIHA und zusätzlich gefundenen Alloantikörpern die klinische Situation verschlechtert.[40] Viele Studien beschreiben jedoch, dass Makrophagen eine limitierte Fähigkeit besitzen, IgG-beladene Zellen zu eliminieren.[46, 65-70] Als Beispiel dafür kann auch durch die Blutplättchensequestration bei immuner Thrombozytopenie herangezogen werden. Diese lässt sich bei Rhesus-positiven Patienten aufhalten, wenn die Patienten mit Anti-D behandelt werden.[71] Die meisten Makrophagen bei Patienten mit einer AIHA sind bereits gesättigt und können so nicht alle IgG-beladenen Erythrozyten in kurzer Zeit zerstören.

6 Schlussfolgerung

- 1 In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bluttransfusionen nicht nur zu einer Alloimmunisierung, sondern auch zu einer Autoimmunisierung führen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden inzwischen durch weitere neue Studien von anderen Gruppen bestätigt.

- 2 Autoantikörper bei Patienten mit Alloantikörpern sind zumeist auf einen Alloimmunisierungsprozeß zurückzuführen und sollten typischerweise nicht als Alloimmunisierung von autoimmunisierten Patienten mißinterpretiert werden.

- 3 Bei den analysierten 717 Patienten mit Autoantikörpern und positiver Transfusionsanamnese war bei 63 Patienten eine Autoimmunhämolytische Anämie aufgetreten. Bei diesen 63 Patienten wurden bei 6 Patienten nach einer Bluttransfusion Alloantikörper gefunden, von denen nur bei 3 Patienten klinisch relevante Alloantikörper wie Anti-S und Anti-E nachgewiesen wurden. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer AIHA ein geringes Risiko haben, Alloantikörper zu entwickeln.

- 4 Bei Patienten mit Autoimmunhämolytischen Anämien vom Wärmetyp sind Besonderheiten zu beachten. Die oft auffällige positive Kreuzprobe infolge freier antierythrozytärer Autoantikörper im Serum der Patienten darf nicht eine lebensnotwendige Transfusion verzögern oder verhindern. Bei lebensbedrohlichen hämolytischen Krisen ist die Gabe von Erythrozytenkonzentraten unter entsprechender Immunsuppression die schnellst wirksame Therapie. Begleitende Alloantikörper, deren Diagnostik häufig zeitaufwendig ist, kommen eher selten vor. Die mögliche Gefahr einer immunologischen Reaktion, ausgelöst durch Alloantikörper ist jedoch nicht zu unterschätzen.

7 Anhang

Zu Abbildung 1 Koinzidenz von Auto- und Alloantikörpern

Spezifitäten der 54 von 200 Patienten mit Autoantikörpern und Alloantikörpern,
Einzelbefunde

Anti-c, -Cw, -E, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-c, -Cw, -E, -K	n = 1 Patient
Anti-c, -Cw, -E, -Kp(a), -S	n = 1 Patient
Anti-C, -Cw, -K, -S	n = 1 Patient
Anti-c, -Cw, -Lu(a), -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-C, -D, -E, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-C, -D, -E, -K, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-C, -D, -E, -Lu(a), -Fy(a)	n = 1 Patient
Anti-C, -D, -E, -P1	n = 1 Patient
Anti-C, -S	n = 1 Patient
Anti-C, -Kp(a)	n = 1 Patient
Anti-C, -K, -S	n = 1 Patient
Anti-C, -D, -K, -Fy(b)	n = 1 Patient
Anti-c, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -Jk(a), -S	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -K, -Yt(b), -Cs(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -Kp(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -K, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -K, -S, -Le(b)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -Jk(a), -S	n = 1 Patient

Anti-Cw, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Cob, -Sc2	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -Kp(a), -Wr(a), -Di(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -Kp(a), -Jk(b)	n = 1 Patient
Anti-D, -E, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-D, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-E, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-E, -K, -Fy(a)	n = 1 Patient
Anti-E, -K, Jk(b)	n = 1 Patient
Anti-E, -Kp(a)	n = 1 Patient
Anti-Le(a), -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-E, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-f, -K, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-Fy(a), -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-Fy(a), -S	n = 1 Patient
Anti-Fy(a), -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Jk(a), -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Jk(b), -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-K, Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-K, -S	n = 1 Patient
Anti-S, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-E, -M	n = 1 Patient
Anti-Le(a)	n = 1 Patient
Anti-Leb(H)	n = 1 Patient
Anti-Lu(a)	n = 1 Patient
Anti-N	n = 1 Patient
Anti-P1	n = 1 Patient

Anti-Vw	n = 1 Patient
Anti-Di(a)	n = 1 Patient
Anti-Jk(b)	n = 1 Patient
Anti-Fy(a)	n = 1 Patient

Patienten mit multiplen Alloantikörpern

Spezifitäten der 45 autoimmunisierten Patienten mit multiplen Alloantikörpern durch Bluttransfusionen, Einzelbefunde

Anti-c, -Cw, -E, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-c, -Cw, -E, -K	n = 1 Patient
Anti-c, -Cw, -E, -Kp(a), -S	n = 1 Patient
Anti-C, -Cw, -K, -S	n = 1 Patient
Anti-c, -Cw, -Lu(a), -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-C, -D, -E, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-C, -D, -E, -K, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-C, -D, -E, -Lu(a), -Fy(a)	n = 1 Patient
Anti-C, -D, -E, -P1	n = 1 Patient
Anti-C, -S	n = 1 Patient
Anti-C, -Kp(a)	n = 1 Patient
Anti-C, -K, -S	n = 1 Patient
Anti-C, -D, -K, -Fy(b)	n = 1 Patient
Anti-c, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -Jk(a), -S	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -K, -Yt(b), -Cs(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -Kp(a)	n = 1 Patient
Anit-Cw, -K, -Wr(a)	n = 1 Patient

Anti-Cw, -K, -S, -Le(b)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -Jk(a), -S	n = 1 Patient
Anti-Cw, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Cob, -Sc2	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -Kp(a), -Wr(a), -Di(a)	n = 1 Patient
Anti-Cw, -E, -Kp(a), -Jk(b)	n = 1 Patient
Anti-D, -E, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-D, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-E, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-E, -K, -Fy(a)	n = 1 Patient
Anti-E, -K, Jk(b)	n = 1 Patient
Anti-E, -Kp(a)	n = 1 Patient
Anti-Le(a), -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-E, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-f, -K, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-Fy(a), -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-Fy(a), -S	n = 1 Patient
Anti-Fy(a), -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Jk(a), -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-Jk(b), -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-K, -Jk(a)	n = 1 Patient
Anti-K, -S	n = 1 Patient
Anti-S, -Wr(a)	n = 1 Patient
Anti-E, -M	n = 1 Patient

8 Referenzen

1. Herklotz, R., et al., *Referenzbereiche in der Hämatologie*. Ther Umsch, 2006. **63**(1): p. 5-24.
2. Goodman, S.R., et al., *The human red blood cell proteome and interactome*. Exp Biol Med (Maywood), 2007. **232**(11): p. 1391-408.
3. Inada, Y., et al., *In vivo binding of circulating immune complexes by C3b receptors (CR1) of transfused erythrocytes*. Ann Rheum Dis, 1989. **48**(4): p. 287-94.
4. Reinagel, M.L., et al., *The primate erythrocyte complement receptor (CR1) as a privileged site: binding of immunoglobulin G to erythrocyte CR1 does not target erythrocytes for phagocytosis*. Blood, 1997. **89**(3): p. 1068-77.
5. Oudin, S., et al., *A soluble recombinant multimeric anti-Rh(D) single-chain Fv/CR1 molecule restores the immune complex binding ability of CR1-deficient erythrocytes*. J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1505-13.
6. Reid, M.E. and N. Mohandas, *Red blood cell blood group antigens: structure and function*. Semin Hematol, 2004. **41**(2): p. 93-117.
7. Daniels, G., et al., *International Society for Blood Transfusion. Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens*, International Blood Group Reference Laboratory.
8. Daniels, G., et al., *International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens: Cape Town report*. Vox Sang, 2007. **92**(3): p. 250-3.
9. Ansart-Pirenne, H., P. Rouger, and F. Noizat-Pirenne, *L'allo-immunisation anti-érythrocytaire: mécanismes cellulaires*. Transfus Clin Biol, 2005. **12**(2): p. 135-41.

10. Petz, L.D. and G. Garratty, *Immune hemolytic anemias*. 2 ed. 2004, Philadelphia, PA: C. Livingstone.
11. Coombs, R.R.A., A.E. Mourant, and R.R. Race, *A new test for the detection of weak and 'incomplete' Rh agglutinins*. *Br J Exp Pathol*, 1945. **26**(255-266).
12. Mollison, P.L., et al., *Blood transfusion in clinical medicine*. 10 ed. 1997, Oxford: Blackwell Science. xxiii, 754.
13. Issitt, P.D. and D.J. Anstee, *Applied blood group serology*. 4 ed. 1998, Durham, N.C.: Montgomery Scientific Publications. 1208.
14. Giblett, E.R., *Blood group alloantibodies: an assessment of some laboratory practices*. *Transfusion*, 1977. **17**(4): p. 299-308.
15. Heddle, N.M., et al., *A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion*. *Br J Haematol*, 1995. **91**(4): p. 1000-5.
16. Hoeltge, G.A., et al., *Multiple red cell transfusions and alloimmunization. Experience with 6996 antibodies detected in a total of 159,262 patients from 1985 to 1993*. *Arch Pathol Lab Med*, 1995. **119**(1): p. 42-5.
17. Redman, M., F. Regan, and M. Contreras, *A prospective study of the incidence of red cell allo-immunisation following transfusion*. *Vox Sang*, 1996. **71**(4): p. 216-20.
18. Schonewille, H., H.L. Haak, and A.M. van Zijl, *Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases*. *Transfusion*, 1999. **39**(7): p. 763-71.
19. Saverimuttu, J., et al., *Implications for urgent transfusion of uncross-matched blood in the emergency department: The prevalence of clinically significant red cell antibodies within different patient groups*. *Emerg Med (Fremantle)*, 2003. **15**(3): p. 239-43.

20. Ahrens, N., et al., *Association between alloantibody specificity and autoantibodies to red blood cells*. *Transfusion*, 2008. **48**(1): p. 20-4.
21. Wayne, A.S., S.V. Kevy, and D.G. Nathan, *Transfusion management of sickle cell disease*. *Blood*, 1993. **81**(5): p. 1109-23.
22. Bauer, M.P., et al., *Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion*. *Transfusion*, 2007. **47**(11): p. 2066-71.
23. Blumberg, N., J.M. Heal, and K.F. Gettings, *WBC reduction of RBC transfusions is associated with a decreased incidence of RBC alloimmunization*. *Transfusion*, 2003. **43**(7): p. 945-52.
24. Ehrlich, P., *Die Schutzstoffe des Blutes*. *Verh. Ges. Dtsch. Naturforsch. Aerzte*, 1902. **1**: p. 250-275.
25. Avent, N.D. and M.E. Reid, *The Rh blood group system: a review*. *Blood*, 2000. **95**(2): p. 375-87.
26. Barker, R.N., et al., *Identification of autoantigens in autoimmune haemolytic anaemia by a non-radioisotope immunoprecipitation method*. *Br J Haematol*, 1992. **82**(1): p. 126-32.
27. Leddy, J.P., et al., *Erythrocyte membrane proteins reactive with human (warm-reacting) anti-red cell autoantibodies*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(4): p. 1672-80.
28. Victoria, E.J., et al., *IgG red blood cell autoantibodies in autoimmune hemolytic anemia bind to epitopes on red blood cell membrane band 3 glycoprotein*. *J Lab Clin Med*, 1990. **115**(1): p. 74-88.
29. Salama, A., N. Ahrens, and H. Kiesewetter, *Serological and clinical aspects of autoimmune hemolytic anemias*. *Infus Ther Transfus Med*, 2002. **29**(4): p. 206-17.
30. Hall, A.M., et al., *Deletion of the dominant autoantigen in NZB mice with autoimmune hemolytic anemia: effects on autoantibody and T-helper responses*. *Blood*, 2007. **110**(13): p. 4511-7.

31. Bellia, M., et al., *The investigation of the significance of a positive direct antiglobulin test in blood donors*. *Immunohematol*, 2002. **18**(3): p. 78-81; discussion 81.
32. Castellino, S.M., et al., *Erythrocyte autoantibodies in paediatric patients with sickle cell disease receiving transfusion therapy: frequency, characteristics and significance*. *Br J Haematol*, 1999. **104**(1): p. 189-94.
33. Singer, S.T., et al., *Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent*. *Blood*, 2000. **96**(10): p. 3369-73.
34. Aygun, B., et al., *Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions*. *Transfusion*, 2002. **42**(1): p. 37-43.
35. Wallhermfecht, M.A., B.A. Pohl, and H. Chaplin, *Alloimmunization in patients with warm autoantibodies. A retrospective study employing three donor alloabsorptions to aid in antibody detection*. *Transfusion*, 1984. **24**(6): p. 482-5.
36. Laine, M.L. and K.M. Beattie, *Frequency of alloantibodies accompanying autoantibodies*. *Transfusion*, 1985. **25**(6): p. 545-6.
37. James, P., G.P. Rowe, and G.G. Tozzo, *Elucidation of alloantibodies in autoimmune haemolytic anaemia*. *Vox Sang*, 1988. **54**(3): p. 167-71.
38. Issitt, P.D., et al., *Studies of antibodies in the sera of patients who have made red cell autoantibodies*. *Transfusion*, 1996. **36**(6): p. 481-6.
39. Leger, R.M. and G. Garratty, *Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies*. *Transfusion*, 1999. **39**(1): p. 11-6.
40. Engelfriet, C.P., et al., *The detection of alloantibodies against red cells in patients with warm-type autoimmune haemolytic anaemia*. *Vox Sang*, 2000. **78**(3): p. 200-7.

41. Winters, J.L., et al., *RBC alloantibody specificity and antigen potency in Olmsted County, Minnesota*. *Transfusion*, 2001. **41**(11): p. 1413-20.
42. Shirey, R.S., et al., *Prophylactic antigen-matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management*. *Transfusion*, 2002. **42**(11): p. 1435-41.
43. Wheeler, C.A., L. Calhoun, and D.P. Blackall, *Warm reactive autoantibodies: clinical and serologic correlations*. *Am J Clin Pathol*, 2004. **122**(5): p. 680-5.
44. Young, P.P., et al., *Autoantibody formation after alloimmunization: are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia?* *Transfusion*, 2004. **44**(1): p. 67-72.
45. Maley, M., et al., *The incidence of red cell alloantibodies underlying p-nreactive warm autoantibodies*. *Immunohematol*, 2005. **21**(3): p. 122-5.
46. Salama, A. and C. Mueller-Eckhardt, *Delayed hemolytic transfusion reactions. Evidence for complement activation involving allogeneic and autologous red cells*. *Transfusion*, 1984. **24**(3): p. 188-93.
47. Ahrens, N., et al., *Coexistence of autoantibodies and alloantibodies to red blood cells due to blood transfusion*. *Transfusion*, 2007. **47**(5): p. 813-6.
48. Walker, R.H., D.T. Lin, and M.B. Hartrick, *Alloimmunization following blood transfusion*. *Arch Pathol Lab Med*, 1989. **113**(3): p. 254-61.
49. Ameen, R., et al., *Frequency of red blood cell alloantibody in Kuwaiti population*. *Med Princ Pract*, 2005. **14**(4): p. 230-4.
50. Spielmann, W. and S. Seidl, *Prevalence of irregular red cell antibodies and their significance in blood transfusion and antenatal care*. *Vox Sang*, 1974. **26**(6): p. 551-9.
51. Hundric-Haspl, Z., et al., *Alloimmunizations following blood transfusions*. *Acta Med Croatica*, 1994. **48**(4-5): p. 193-7.

52. Bhatti, F.A., et al., *Red cell immunization in beta thalassaemia major*. J Coll Physicians Surg Pak, 2004. **14**(11): p. 657-60.
53. Fluit, C.R., V.A. Kunst, and A.M. Drenthe-Schonk, *Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion*. Transfusion, 1990. **30**(6): p. 532-5.
54. Schonewille, H., L.M. van de Watering, and A. Brand, *Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: is it time to take precautionary measures?* Transfusion, 2006. **46**(4): p. 630-5.
55. Garratty, G., *Autoantibodies induced by blood transfusion*. Transfusion, 2004. **44**(1): p. 5-9.
56. Zumberg, M.S., et al., *Autoantibody formation in the alloimmunized red blood cell recipient: clinical and laboratory implications*. Arch Intern Med, 2001. **161**(2): p. 285-90.
57. Novaretti, M.C., et al., *Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study*. J Clin Lab Anal, 2004. **18**(5): p. 255-8.
58. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 108-17.
59. Bruce, L.J., et al., *A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane*. Blood, 2003. **101**(10): p. 4180-8.
60. Van Kim, C.L., Y. Colin, and J.P. Cartron, *Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane*. Blood Rev, 2006. **20**(2): p. 93-110.
61. Lehmann, P.V., et al., *Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen*. Nature, 1992. **358**(6382): p. 155-7.
62. Lehmann, P.V., et al., *Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire*. Immunol Today, 1993. **14**(5): p. 203-8.

63. McCluskey, J., et al., *Determinant spreading: lessons from animal models and human disease*. Immunol Rev, 1998. **164**: p. 209-29.
64. Farris, A.D., et al., *Epitope mimics and determinant spreading: pathways to autoimmunity*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(4): p. 569-78.
65. Mollison, P.L. and P. Engelfriet, *Blood transfusion*. Semin Hematol, 1999. **36**(4 Suppl 7): p. 48-58.
66. Haakenstad, A.O. and M. Mannik, *Saturation of the reticuloendothelial system with soluble immune complexes*. J Immunol, 1974. **112**(5): p. 1939-48.
67. Burin des Rosiers, N. and O. Nasr, *[Irregular erythrocyte antibody screening using gel-test. Analysis of 35,882 samples]*. Rev Fr Transfus Hemobiol, 1993. **36**(4): p. 391-9.
68. Biozzi, G., B. Benacerraf, and B.N. Halpern, *Quantitative study of the granulopoietic activity of the reticulo-endothelial system. II. A study of the kinetics of the R. E. S. in relation to the dose of carbon injected; relationship between the weight of the organs and their activity*. Br J Exp Pathol, 1953. **34**(4): p. 441-57.
69. Biozzi, G., et al., *Exploration of the phagocytic function of the reticuloendothelial system with heat denatured human serum albumin labeled with I131 and application to the measurement of liver blood flow, in normal man and in some pathologic conditions*. J Lab Clin Med, 1958. **51**(2): p. 230-9.
70. Pesanti, E.L. and K.M. Nugent, *Inhibition of macrophage phagocytosis after contact with ingestible particles*. J Reticuloendothel Soc, 1981. **30**(3): p. 157-66.
71. Blackall, D.P., et al., *Contemporaneous autoantibodies and alloantibodies: serological and clinical features*. Transfusion, 2004. **44**(Supplement): p. 27a.
72. Salama, A., H. Berghofer, and C. Mueller-Eckhardt, *Red blood cell transfusion in warm-type autoimmune haemolytic anaemia*. Lancet, 1992. **340**(8834-8835): p. 1515-7.

