

Aus dem Charité Centrum 14 für Tumormedizin

Institut für Transfusionsmedizin

Prof. Dr. A. Salama

Habilitationsschrift

Mechanismen der Immunisierung gegen erythrozytäre Antigene

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Transfusionsmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von:

Dr. med. Norbert Ahrens

geboren am 18. Januar 1968 in Flensburg

eingereicht:

Dekanin: Prof. Dr. A. Grüters-Kiesling

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	Erythrozyten-Antigene	4
1.2	Alloantikörper	7
1.2.1	Natürliche Antikörper	7
1.2.2	Immunantikörper	7
1.2.2.1	Immunogenität der Blutgruppenantigene	8
1.2.2.2	Mehrfachimmunisierung	8
1.2.2.3	Antikörperrelevanz	9
1.3	Autoantikörper	10
1.3.1	Begleitende Autoantikörper	11
1.3.1.1	Transfusionsinduzierte Autoantikörper	11
1.3.1.2	Autoimmunisierung durch Infektion oder Impfung	11
1.3.1.3	Schwangerschaftsimmunisierung	12
1.3.1.4	Hyperhämolytische Transfusionsreaktion	13
1.3.2	Hämolysierende Autoantikörper	14
1.3.2.1	Therapeutische Aspekte	15
1.4	Medikamentenantikörper	18
1.4.1	Adsorptionstyp	19
1.4.2	„Immunkomplex“-Typ	19
1.4.3	Medikamentös induzierte Autoantikörper	20
1.4.4	Nicht-immunologische Proteinadsorption	20
2	ZIELSTELLUNG	22
3	EIGENE ARBEITEN	23
3.1	Begleitende Autoantikörper durch posttransfusionelle Alloimmunisierung	23
	Ahrens N, Pruss A, Kähne A, Kiesewetter H, Salama A. Coexistence of autoantibodies and alloantibodies to red blood cells due to blood transfusion. <i>Transfusion</i> 2007; 47(5): 813–816	23
3.2	Alloantikörper-Spezifitäten mit Assoziation zu Autoantikörpern	28
	Ahrens N, Pruss A, Mayer B, Genth R, Kiesewetter H, Salama A. Association between alloantibody specificity and autoantibodies to red blood cells. <i>Transfusion</i> 2008; 48(1): 20–24	28
3.3	Begleitende Autoantikörper bei Medikamenten-Antikörpern	34
3.3.1	Rifampicin	34
	Ahrens N, Genth R, Salama A. Belated diagnosis in three patients with rifampicin-induced immune haemolytic anaemia. <i>Br J Haematol</i> 2002;117(2):441-443	34
3.3.2	Diclofenac	38
	Ahrens N, Schewior L, Garbe E, Kiesewetter H, Salama A. Massive haemolysis after intramuscular diclofenac in a patient who apparently tolerated oral medication. <i>Vox Sang</i> 2004; 86(1): 71–74	38
	Ahrens N, Genth R, Kiesewetter H, Salama A. Misdiagnosis in patients with diclofenac-induced hemolysis: new cases and a concise review. <i>Am J Hematol</i> 2006; 81(2): 128–131	38
3.4	Kostimulatorische Proteine bei AIHA: CD47	47
	Ahrens N, Pagenkopf C, Kiesewetter H, Salama A. CD47 is expressed at normal levels in patients with autoimmune haemolytic anaemia and/or immune thrombocytopenia. <i>Transfus Med</i> 2006; 16(6): 397–40247	

4	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	54
4.1	Methodisch-diagnostische Aspekte	54
4.2	Autoimmunisierung durch Kreuzreaktivität bei Alloimmunisierung.....	54
4.3	Begleitende medikamentös induzierte Autoantikörper bei Medikamenten-abhängigen Antikörpern	56
4.4	Epitop-Ausbreitung bei der Immunisierung gegen Erythrozyten-Antigene	59
4.5	Kostimulation und Inhibition. CD47-Expression und AIHA	62
4.6	Autoantikörper durch Toleranzdurchbrechung	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	67
	LITERATUR	68
	Abkürzungsverzeichnis.....	80
	DANKSAGUNG	
	81
	ERKLÄRUNG	82

1 EINLEITUNG

Antikörper gegen Erythrozyten können eine Immunhämolysen mit variablem klinischem Bild verursachen. Die Hämolysen kann einen schweren bis lebensbedrohlichen Verlauf nehmen, oder sie kann ohne Therapie kompensiert und klinisch irrelevant bleiben. Nicht alle Antikörper führen zur Hämolysen, Antikörper gegen Erythrozyten können Zufallsbefunde darstellen. Die Kenntnis der ursächlichen Antikörper und korrespondierenden Antigene ist von großer Bedeutung für die Transfusionsmedizin und Immunhämatologie.

1.1 Erythrozyten-Antigene

Erythrozyten stellen eine der am besten untersuchten Zellen dar. Sie sind 80–100 fl groß,¹¹¹ sind bei Menschen im reifen Zustand kernlos und haben einen Durchmesser von 6–8 µm.⁹⁶ 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 aufnehmen, transportieren und abgeben zu können. Zudem können sie an ihrer Oberfläche eine Vielzahl von physiologischen Substanzen sowie Medikamente binden, und es gibt Hinweise für den Transport von Immunkomplexen durch Erythrozyten.^{115,168,190} Schließlich tragen sie zur Thrombozyten-Endothel-Interaktion und somit zur Blutgerinnung sowie zum kolloid-osmotischen Druck bei.

Erythrozyten enthalten im wesentlichen das Funktionsprotein Hämoglobin im Zytoplasma. Zusätzlich enthalten sie im Zytoplasma die Strukturproteine Spektrin und Aktin, die für die Erythrozyten-Verformbarkeit in den Kapillaren erforderlich sind, und die an der Plasmamembran verankert sind.⁹⁶ Schließlich 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. In-vitro erfordert die Bindung von Antikörpern zur Überwindung dieser Zone negativer Ladung verschiedene Verstärkungstechniken.

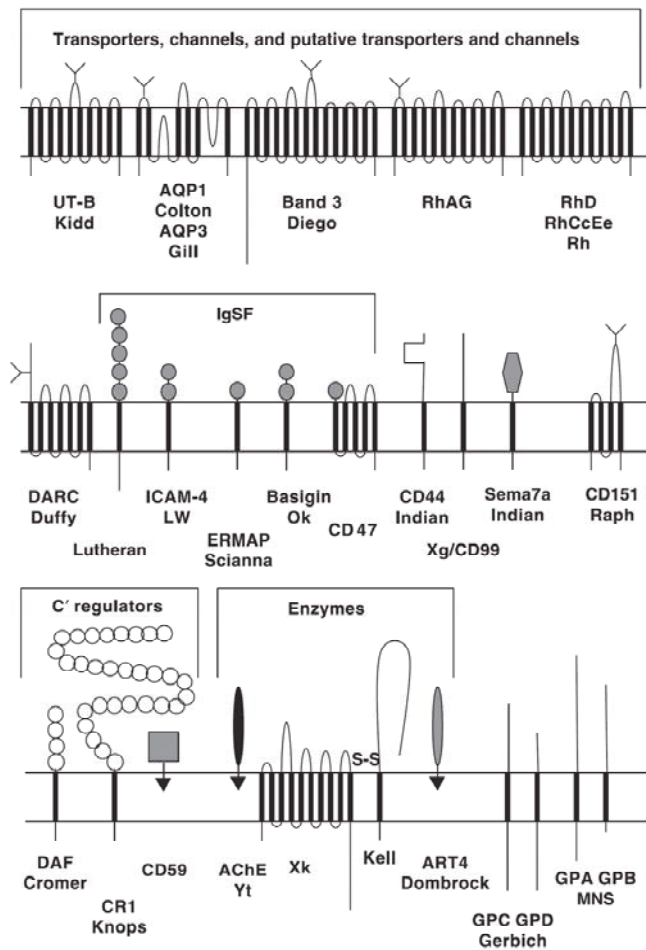
Antikörper binden an Strukturen auf Proteinen oder Glykoproteinen, die Antigene genannt werden. Ein Antigen kann aus einem oder mehreren Epitopen bestehen und weniger als 100 bis über 100 000 Mal pro Zelle exprimiert werden.¹⁸⁹ Gruppen von ähnlichen Antigenen, die auf der gleichen molekularen Struktur lokalisiert sind, bilden eine Blutgruppe. Die derzeit 309 verschiedenen, serologisch definierten Antigene auf Erythrozyten sind in 30 Blutgruppen und 3 Sammlungen organisiert (Tabelle 1 S. 5 und Abbildung 1 S. 6).^{75,77}

Tabelle 1: Systematik der Blutgruppen^{75,77}

Blutgruppensysteme		Blutgruppensammlungen a) niedrigfrequente Antigene		Blutgruppensammlungen b) hochfrequente Antigene	
Name	Antigene	Name	Antigene	Name	Antigene
ABO	4	Batty	1	Langereis	1
MNS	46	Christiansen	1	August	1
P	1	Biles	1	Jr ^a	1
Rh	50	Box	1	Emm	1
Lutheran	19	Torkildsen	1	AnWj	1
Kell	31	Peters	1	Sid	1
Lewis	6	Reid	1	Duclos	1
Duffy	6	Jensen	1	PEL	1
Kidd	3	Livesay	1	MAM	1
Diego	21	Milne	1		
Yt	2	Rasmussen	1		
Xg	2	JFV	1		
Scianna	7	Katagiri	1		
Dombrock	6	Jones	1		
Colton	3	HJK	1		
Landsteiner-Wiener	3	HOFM	1		
Chido / Rodgers	9	SARA	1		
Hh	1	REIT	1		
Kx	1				
Gerbich	8				
Cromer	15				
Knops	9				
Indian	4				
Ok	1				
Raph	1				
John Milton Hagen	5				
I	1				
Globuside	1				
Gill	1				
Rh-associated glycoprotein	3				

Blutgruppensammlungen c) sonstige	
Name	Antigene
Cost	2
li	1
Er	3
GLOB	2
Le ^c , Le ^d	2
Vel	2

Abbildung 1: Schematische Darstellung erythrozytärer Oberflächenproteine und Blutgruppenpen⁷⁶

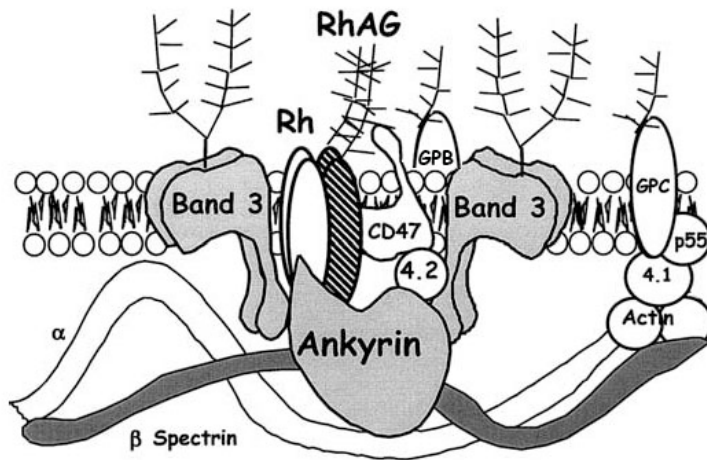


Antigene können auf einer Struktur nebeneinander vorkommen, oder sie können sich gegenseitig ausschließen (antithetische Antigene). Beispiele für Antigene, die nebeneinander vorkommen, sind die Rh-Merkmale c und e oder die Kell-Antigene k und Kp^b. Beispiele für antithetische Antigene sind die Rh-Merkmale C und c oder die Kell-Antigene K und k. Antithetische Antigene existieren nicht für alle Antigene, beispielsweise gibt es für den Rh-Merkmal D („Rhesusfaktor“) kein antithetisches Antigen. Bei D-negativen Personen (sog. Rh-negativ) wird die Antigen-tragende Struktur, das RHD-Protein, nicht exprimiert.

Wenn im Rh-Blutgruppensystem weder das RHD- noch das RHCE-Protein exprimiert wird, liegt ein Rh_{null}-Typ vor. Null-Typen gibt bei den meisten Blutgruppen. Sie sind meist selten, beispielsweise liegt die Frequenz im Kell-Blutgruppensystem bei etwa 1 : 1 000 000.¹³³

Antigene treten unterschiedlich häufig auf. Polymorphe Antigene werden bei mehr als 1% und weniger als 99% der Bevölkerung exprimiert. Antikörper gegen polymorphe Antigene stellen die Mehrzahl der beobachteten Antikörper dar, und diese Antikörper sind oft klinisch relevant. Antikörper gegen häufige und hochfrequente Merkmale mit einer Expressionsfrequenz von mehr als 99% sind seltener. Die Untersuchung hochfrequenter Antigene und ihrer Vererbung erfolgt mit serologischen und molekularbiologischen Methoden.^{36,181,183,188} Bislang sind 1012 verschiedene Blutgruppen-Genotypen bekannt. Sie übersteigt die Anzahl der 309 Phänotypen, da unterschiedliche Genotypen zur phänotypisch gleichen, fehlenden oder abgeschwächten Expression führen können.^{47,48}

Abbildung 2: Rh Komplex der Erythrozyten-Membran mit den RHD- und RHCE-Proteinen (mit Rh bezeichnet), CD47, Bande 3 und Glykophorin B (GPB).^{156,234} Nicht direkt, sondern zytoskelettal ist Glykophorin C assoziiert (modifiziert nach²⁴⁵).



Während die meisten Oberflächenstrukturen auf Erythrozyten frei flottieren können, sind die Moleküle RHD, RHCE, RHAG, CD47, LW, Glykophorin B und Bande 3 assoziiert und intrazellulär durch Bande 4.2 und Ankyrin zytoskelettal verankert (Abbildung 2).²⁴⁵ Ungeachtet dieser räumlichen Assoziation unterscheidet sich die Antikörperbildung gegen die einzelnen Bestandteile dieses supramolekularen Komplexes stark.

1.2 Alloantikörper

Antikörper binden entweder allogene (syn. heterologe, fremde) oder autologe (körpereigene) Merkmale. Alloantikörper werden in natürliche und in Immunantikörper unterschieden. Auf autologe Antikörper wird im nachfolgenden Kapitel eingegangen.

1.2.1 Natürliche Antikörper

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. Mit Blutgruppenantigenen wie ABO, MN, P₁, I, Lewis und anderen besteht Kreuzreaktivität.²⁷ Für natürliche Antikörper ist eine niedrige Avidität (Bindungsfestigkeit) typisch, und sie reagieren meist direkt und bevorzugt im kalten Milieu. Eine sekundäre Immunisierung (Boosterung) und T-Zellinvolvierung in Lymphknoten-Keimzentren ist durch inkompatible Erythrozyten in der Regel nicht möglich. 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.¹⁷⁵ Sie sind mit geringer Reaktivität oft bei Gesunden nachweisbar.

1.2.2 Immunantikörper

Immunantikörper werden durch spezifische Stimulation mit (humanem) Antigen nach Transfusionen mit Fremdblut oder nach fetomaternalen Blutübertritt bei Schwangerschaften gebildet. Diese Antikörper erfordern bei der Diagnostik in der Regel Verstärker (Supplement) wie

Albumin, verschiedene Enzyme oder Antihumanglobulin (Coombs-Serum⁶⁸) und reagieren bevorzugt im warmen Milieu. Sie werden daher als inkomplette bzw. als wärmereaktive Antikörper bezeichnet.^{120,157} 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.²⁷

Die Prävalenz alloreaktiver Immunantikörper hängt wesentlich von der Transfusionsanamnese der untersuchten Patienten ab und liegt bei allgemeinen, transfusionsbedürftigen Patienten bei 1,1–9,0%.^{24,92,110,112,120,187,209,210} Bei Patienten mit transfusionspflichtigen Hämoglobinopathien, die wesentlich häufiger transfundiert werden, kann die Prävalenz 20–50% erreichen.²⁵⁶

Allgemeinen scheinen Frauen sowie Patienten mit Diabetes mellitus, soliden Malignomen oder Patienten nach allogener Blutstammzelltransplantation ein etwas höheres Alloimmunsierungsrisiko als Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen oder symptomatischer Atherosklerose zu haben.⁴⁰ Die Einführung leukozytendepletierter Blutprodukte scheint das Alloimmunsierungsrisiko ebenfalls gesenkt zu haben.⁴⁶

1.2.2.1 Immunogenität der Blutgruppenantigene

Die Immunogenität der Blutgruppenantigene ist unterschiedlich. Während etwa 30% der D-negativen Patienten nach Transfusion serologisch kompatibler, aber D-positiver Erythrozytenkonzentrate (EK) Anti-D bilden,⁸⁶ ist beispielsweise Anti-s trotz einer ähnlich polymorphen Verteilung in der Bevölkerung ein seltener Antikörper.

Die Immunogenität läßt sich berechnen,²⁶¹ wenn Antikörper gegen unterschiedliche Spezifitäten gleich lange persistieren, nur durch Immunisierung nach Transfusion und nicht natürlich sowie unabhängig voneinander gebildet werden. Alle drei Annahmen entsprechen der Realität nur näherungsweise, da Antikörper gegen manche Antigene wie beispielsweise Jk^a rasch extingieren.²¹¹ Weiterhin werden Antikörper gegen einige Antigene nur natürlich (z.B. Anti-Wr^a), teils natürlich und teils nach spezifischer Immunisierung (z.B. Anti-Lu^a oder Anti-E) oder nach spezifischer Immunisierung (z.B. Anti-D) gebildet. Da der Anteil natürlich gebildeter Antikörper variabel und meist nicht genau bekannt ist (z.B. Anti-Lu^a oder Anti-E), wird die berechnete Immunogenität überschätzt. Die Abschätzung der Immunogenität beruht auf der Annahme, daß Antikörper unabhängig voneinander gebildet werden. Empirische Belegen für diese Annahme sind nicht bekannt, und wenn bestimmte Antikörper assoziiert sind, führt dies ebenfalls zu einer Überschätzung der Immunogenität.²¹²

1.2.2.2 Mehrfachimmunisierung

Wenn Antikörper unabhängig voneinander gebildet würden, müßte die Prävalenz von mindestens einem Antikörper unter allen Patienten gleich der Prävalenz von mindestens zwei Antikörpern bei Patienten mit mindestens einem Antikörper und gleich der Prävalenz von mindestens drei Antikörpern bei Patienten mit mindestens zwei Antikörpern sein (u.s.w.). Dies ist nicht der Fall: die Prävalenz weiterer Antikörper ist bei alloimmunisierten Patienten erhöht und liegt statt bei 5% bei etwa 20–40%.^{7,8,22} Dies spricht nicht dafür, daß alle Patienten stets die gleiche Antikörperbildungswahrscheinlichkeit haben.

Es ist unklar, ob die unterschiedliche Immunogenität patientenspezifisch ist, d.h. ob bestimmte Patienten rascher als andere gegen Blutgruppenantigene im allgemeinen immunisiert wer-

den, oder ob der erste Immunisierungsprozeß weitere Immunisierungen triggert. Patientenspezifische Faktoren könnten durch die monozytäre Grundaktivierung oder durch immungenetische Faktoren gegeben sein. Dieses Konzept wird durch Beobachtungen bei der Reihenfolge der Antikörperbildung gestützt, indem bei multipler Immunisierung Antikörper gegen stärker immunogene Antigene nicht bevorzugt zuerst auftreten.²¹³

1.2.2.3 Antikörperrelevanz

Die Potenz eines Antikörpers gegen Erythrozyten, eine Immunhämolyse auszulösen, hängt von mehreren Faktoren ab:

- a) Aktivität und Kapazität der Makrophagen des Patienten
- b) Antikörpertiter und Immunglobulinklasse
- c) Komplementaktivierungskapazität des Antikörpers
- d) Antigendichte.

Die Relevanz läßt sich somit auf individuelle Patientenfaktoren zurückführen (a–c) und auf Faktoren, die durch die Spezifität des Antikörpers gegeben sind (b–d). Mit Einschränkungen können diese Faktoren zur Abschätzung der zu erwartenden Hämolyse erfaßt werden, wenn in-vitro Monozyten und Antikörper des Patienten mit Testerythrozyten inkubiert werden (Immunphagozytose- oder Chemilumineszenztest).^{79,103,145,161} Die Sensitivität und Spezifität dieser aufwendigen Tests erreichen nicht die Zuverlässigkeit der serologischen Spezifitäts-Bestimmung.^{79,103,145,161} Immunphagozytose- oder Chemilumineszenztest werden selten angewendet, da kein verbleibendes Hämolyserisiko einfach durch die Auswahl kompatibler Blutprodukte eingegangen zu werden braucht.

In-vivo kann die Relevanz eines Antikörpers durch das Erythrozytenüberleben bestimmt werden, wenn die Abbaugeschwindigkeit durch nuklearmedizinische ⁵¹Cr-Methode oder mittels durchflußzytometrischer Polymorphismus-Bestimmung untersucht wird.²²³ Bei diesen ebenfalls aufwendigen Methoden ist von einer sekundären Immunisierung auszugehen, sie sind daher nicht verbreitet.

Alternativ kann die Verträglichkeit und Relevanz mittels biologischer Verträglichkeitsprobe grob abgeschätzt werden. Diese Kompatibilitätstestung erfolgt in-vivo, indem 20 ml eines EK in 10 min gegeben werden und die Kompatibilität klinisch sowie anhand der Hämolyseparameter Hämatokrit, Haptoglobin und freiem Hämoglobin nach 30 min beurteilt wird. Für die biologische Verträglichkeitsprobe gibt es keine verbindliche Standardisierung. Im Zweifel kann die Testung mit einem größeren Volumen wiederholt werden. Bei Verträglichkeit werden der verbleibende Teil und gegebenenfalls weitere EK gegeben.^{163,175}

Im klinischen Alltag wird insbesondere die Antikörper-Titerhöhe oft mit der klinischen Relevanz gleichgesetzt, speziell in der Mutterschaftsvorsorge. Dies ist nur eingeschränkt gerechtfertigt, denn es gibt verschiedene, wesentliche Einflußfaktoren. Die Titerhöhe hängt vom Verdünnungsmedium (saline Lösungen – albuminhaltige Puffer), von der Verdünnungstechnik (mit oder ohne Pipettenspitzenwechsel), von der Zusammensetzung des Supplements als low-ionic-strength-solution,^{69,100} von der Inkubationszeit der Testerythrozyten im Supplement (frisch angesetzt – einige Wochen alt), von der Antigenexpression der Testerythrozyten (heterozygot – homozygot), vom Testsystem (Gelkarte – Festphase – Röhrchen)¹² und von der visuellen Beurteilung ab. Jeder Faktor kann den Titer um 1–4 Stufen beeinflussen. Standardi-

sierte Arbeitstechniken können die Titerunpräzision reduzieren,³² bislang erlaubt der Titer jedoch keine objektive Aussage.

Antikörpertiter, Immunglobulinklasse und Komplementaktivierungsaktivität unterliegen allgemein einer gewissen Patientenabhängigkeit, sind aber im wesentlichen für eine gegebene Antikörperspezifität typisch. Die Antigendichte unterliegt spenderabhängig einer geringen Schwankung, ist aber vor allem vom Antigen abhängig. Somit erlaubt die Kenntnis der Spezifität des Antikörpers eine hinreichende Abschätzung der klinischen Relevanz.^{11,182,184}

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.“⁸¹ 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 für bestimmte Blutgruppenantigene spezifisch sind, ist dies bei Autoantikörpern oft nicht der Fall. Beispielsweise reagieren bei e-positiven Patienten Autoantikörper oft mit e-positiven Erythrozyten im stärkeren und mit e-negativen Erythrozyten im schwächeren Maß (partielle Blutgruppenspezifität). Nicht selten erscheint die Reaktivität von Autoantikörpern mit allen Erythrozyten gleichförmig.

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 oder Rh-assoziierte Proteine dar.^{33,142} Autoantikörper gegen diese Strukturen weisen die typische Wärmereaktivität von Immunantikörpern auf, und diese sind meist vom IgG-Typ, in seltenen Fällen vom IgA-Typ.

Autoantikörper gegen andere Moleküle wie das stark glykosylierte Glykophorin A oder Bande 3, das nicht Träger von Blutgruppenmerkmalen ist, werden seltener produziert.^{37,142} Insbesondere Bande 3-spezifische Autoantikörper scheinen in manchen Fällen eine deutlichere Hämolyse verursachen zu können als Rh-spezifische Autoantikörper, wenn sie immuner und nicht natürlicher Genese sind und die Avidität hoch ist.²⁵⁰

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.²⁰⁸ Autoantikörper, die spezifisch für andere Blutgruppenantigene sind, sind von einzelnen Fällen bekannt.¹⁷¹

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.¹⁰⁶

Die Prävalenz von erythrozytären Autoantikörpern liegt bei Blutspendern in neueren Untersuchungen etwa bei 0,04%.⁴² Die Autoantikörper-Prävalenz liegt in früheren Untersuchungen bei 0,007–0,01% der Spender,^{97,157} eventuell aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität der

Methoden. Autoantikörper sind bei gesunden Personen meist ein Zufallsbefund und führen nicht zur Hämolyse, eine weitere Blutspendetätigkeit ist mit dem Befund erythrozytärer Autoantikörper jedoch nicht mehr möglich. Die Prävalenz von Autoantikörpern ist bei Patienten höher und hängt im weiten Umfang von der Diagnose ab.

1.3.1 Begleitende Autoantikörper

Autoantikörper können im Zusammenhang mit bzw. in Begleitung von verschiedenen Immunisierungen gegen fremde Merkmale auftreten. Es gibt Hinweise, daß Autoantikörper in Begleitung von Alloimmunisierungen gegen Blutgruppen auftreten können, nach Infektionen oder Impfungen oder im Rahmen von Schwangerschaften.

1.3.1.1 Transfusionsinduzierte Autoantikörper

Autoantikörper werden unter anderem bei Patienten beobachtet, die aufgrund von Hämoglobinopathien transfusionsbedürftig sind und daher häufig Antikörper gegen fremde Blutgruppenantigene bilden. So können bei 25% der Thalassämie-Patienten mit rezidivierendem Transfusionsbedarf Autoantikörper nachweisbar sein,²²⁴ und von Sichelzell-Patienten sind Autoantikörper-Prävalenzen von 8–9% bekannt.^{34,59}

Die klinische Relevanz von transfusionsinduzierten, begleitenden Autoantikörpern ist in der Regel begrenzt. Diese Autoantikörper sind oft nur transient nachweisbar und extinguieren typischerweise im Verlauf von Monaten.^{22,74,176}

Tiermodelle für transfusionsinduzierte Autoimmunisierungen existieren für Mäuse, Kaninchen und Schimpansen.^{195,266} Die klinische Relevanz ist limitiert. Bei Schimpansen führt die Transfusion von inkompatiblen Erythrozyten temporär (für 4–5 Wochen) zu einem positiven DAT und teils zu einer Immunhämolyse.⁷⁰

Im Menschen werden begleitende, transfusionsinduzierte Autoantikörper außer bei Patienten mit Hämoglobinopathie verschiedentlich beobachtet,^{29,45,62,65,67,73,88,138,162,180,199,231,263,267} die Verbreitung ist jedoch unbekannt.

1.3.1.2 Autoimmunisierung durch Infektion oder Impfung

Begleitende Autoantikörper gegen Erythrozyten können nach Infektionen mit verschiedenen Erregern auftreten. So können nach Infektion mit *Mycoplasma pneumoniae* kältereaktive Autoantikörper mit I-Spezifität passager symptomatisch werden.¹⁷⁶ Dies kann pathophysiologisch auf eine Kreuzreaktivität mit bakteriellen Oberflächenstrukturen zurückzuführen sein, im wesentlichen Polysaccharid-Antigene. Mycoplasmen exprimieren eine I-ähnliche Struktur (Poly-N-Acetyllactosamin).¹²³ Ebenfalls gegen Polysaccharid-Antigene sind Autoantikörper bei paroxysmaler Kältehäoglobinurie gerichtet, i.d.R. gegen P. Sie waren eine bekannte Komplikation bei Syphilis und werden heute passager nach viralen Infektionen im Kindesalter beobachtet. Meist geht eine obere Atemwegsinfektion unbestimmter viraler Genese voraus; ein Zusammenhang ist bei Adenoviren, Inflenzaviren, Masern, Mumps, Windpocken, Enteroviren, Parvoviren, Zytomegalieviren, Epstein-Barr Viren, *Haemophilus influenzae*, Mycoplasmen und Klebsiellen bekannt.¹⁷⁶ Eine Infektion mit Epstein-Barr Viren, Zytomegalieviren, Varizellen, Rötelnviren, Parvoviren oder HIV kann zudem Autoantikörper gegen weitere Strukturen verursachen.¹⁷⁶ Auch bei parasitären Erkrankungen ist eine zumindest partiell immunologisch bedingte Hämolyse möglich, d.h. bei Malaria, Leishmaniose, Trypanomiasis,

Babesiose und Leptospirose.¹⁷⁶ Impfungen, ebenso wie Infektionen, stimulieren das Immunsystem zur Produktion einer Antigen-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort und können ebenfalls von erythrozytären Autoantikörpern begleitet sein.^{66,176,216} Die Pathophysiologie dieser Autoantikörper kann nicht in allen Fällen durch ähnliche Antigene auf Infektionserregern und Erythrozyten erklärt werden. Sie wird erst unter Berücksichtigung immunregulatorischer Mechanismen verständlich. Diese werden im Zusammenhang mit eigenen Beobachtungen bei begleitenden Autoantikörpern im Diskussionsteil besprochen (Diskussion 4.6, S. 64).

Im Gegensatz zu praktisch stets benignen begleitenden Autoantikörpern bei erythrozytärer Immunisierung können postinfektiöse Antikörper gegen Erythrozyten in bestimmten Fällen zur Hämolyse führen. Dies trifft insbesondere auf die T-Aktivierung zu, bei welchem durch Enzyme bakterieller Herkunft ansonsten verborgene Oberflächenstrukturen freigelegt werden, z.B. im Rahmen von EHEC-Infektionen. Diese Erythrozyten werden durch natürlich vorkommende, relevante Antikörper hämolysiert.

Postinfektiöse Autoimmunisierungen sind nicht auf Erythrozyten begrenzt. So werden bei Kindern Lupus antikoaglanzien, d.h. Antikörper gegen Phospholipide oftmals postinfektiös beobachtet.⁵³ Auch bei Patienten, die eine intensivmedizinische Versorgung erfordern, ist das Auftreten von diesen Autoantikörpern nicht ungewöhnlich.²⁵⁹ Sie sind meist transienter Natur und in der Regel ohne wesentliche klinische Relevanz.^{52,149,225}

Es gibt verschiedene Tiermodelle für die Infektionstriggerung einer Autoimmunisierung, beispielsweise die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) in Mäusen mit Myelin-spezifischem, transgenem T-Zellrezeptor. Diese Mäuse bleiben unter sterilen Bedingungen gesund, unter gewöhnlichen Bedingungen entwickeln sie jedoch eine spontane EAE. Ein weiteres Tiermodell sind HLA-B27 transgene Ratten, die eine Arthritis und eine entzündliche Darmerkrankung unter üblichen Bedingungen, aber nicht unter sterilen entwickeln.¹²⁹

1.3.1.3 Schwangerschaftsimmunisierung

Schwangere können gegen fetale Antigene immunisiert werden, daher erfolgen systematische Untersuchungen (bei Feststellung der Schwangerschaft und in der 24. bis 27. Schwangerschaftswoche). Etwa 0,3% der Schwangeren weisen zu Beginn der Schwangerschaft bereits Alloantikörper auf, und weitere 0,3% entwickeln während der Schwangerschaft Alloantikörper (Tabelle 2). Die Prävalenz scheint in Deutschland etwas niedriger zu sein, eventuell aufgrund der im internationalen Vergleich konsequenteren Verwendung von Anti-D-Prophylaxen.

Insgesamt ist (auch in Deutschland) die Prävalenz von Alloantikörpern bei Schwangeren im Vergleich zu der bei Blutspendern (0,004–0,12%) erhöht.¹²⁰ Dies geht mit einer erhöhten Prävalenz von Autoantikörpern bei Schwangeren einher. Je nach Sensitivität des verwendeten Testsystems liegt die Prävalenz viermal so hoch wie im Vergleichskollektiv (Röhrchensystem)²²⁸ oder mit 0,11% im Vergleich zu 0,02% mehr als fünfmal so hoch (Gelkartensystem).¹¹³ Für diese Autoimmunisierungen ist ein benigner Charakter typisch.¹¹³

Anders stellt sich der Verlauf bei Schwangeren mit einer vorbestehenden AIHA dar, die aggraviert werden kann.^{43,238} Dabei kann im Schwangerschaftsverlauf eine zunehmende Hämolyse

lyse auftreten, die innerhalb von 3 Monaten nach Entbindung vollständig oder partiell rückläufig ist.^{64,117}

Die erhöhte Inzidenz von Autoantikörpern gegen Erythrozyten bei Schwangeren lässt sich nicht einfach durch die immunologische Alteration und Toleranz bei Schwangeren erklären. Beobachtungen bei Patientinnen mit chronischer Polyarthritiden zeigen überwiegend eine Verbesserung der klinischen Parameter und Symptome der Autoimmunerkrankung, für die neben ansteigenden Cortisol-Spiegeln ein immunsuppressiver Effekt der Trophoblasten sowie ein Zytokinmilieu diskutiert wird, das Th2-Zellen begünstigt.^{57,170}

Tabelle 2: Bildung relevanter Alloantikörper bei Schwangeren (Inzidenz) und deren Prävalenz

<i>Region</i>	<i>Inzidenz</i>	<i>Prävalenz</i>
Tirol, Österreich ²¹⁴		0,58%
Frankreich ¹⁵⁸	0,25%	
Oxford, GB ⁵¹	0,13%	0,95%
USA ¹⁰⁹	0,24%	0,57%
Mittelschweden ⁹⁸		0,37%
Südschweden ⁸⁵		0,24%
Salzburg, Österreich ¹⁶⁰	0,34%	0,59%
Deutschland ¹¹³		0,19%
China ¹⁴³		0,31%
Niederlande ¹³²		0,33%

1.3.1.4 Hyperhämolytische Transfusionsreaktion

Die Hämolyse kompatibler Erythrozyten im Kontext einer Alloimmunhämolyse ohne den Nachweis von Autoantikörpern wird als Hyperhämolyse bezeichnet. Sie kann bei Patienten mit Transfusionen im Rahmen von Sichelzellkrisen beobachtet werden.^{34,224} Diese Patienten sind in der Regel afrikanischer Abstammung und haben eine andere Antigenverteilung im Kell-, Duffy- und Knops-System im Vergleich zu Spendern, die häufiger kaukasischer Abstammung sind. Sichelzell-Patienten können unter anderem aus diesem Grund Alloantikörper bilden und nach Transfusionen hämolytische Transfusionsreaktionen (HTR) erleiden, die ein positiver DAT, ein Alloantikörpernachweis und eine verkürzten Überlebenszeit der transfundierten Erythrozyten kennzeichnet. Manche Patienten entwickeln darüber hinaus eine lebensbedrohliche Hämolyse, bei der der Hämoglobingehalt beim Patienten nach Transfusion niedriger als vorher ist (Hyperhämolyse). Diese Reaktion kann trotz Transfusion serologisch kompatibler, phänotypisch passender EK auftreten, und ein serologischer Antikörpernachweis fehlt trotz Hämolyse.¹⁷⁶ Häufig wird im Rahmen einer Hyperhämolyse zudem eine Retikulozytopenie gefunden, und Arthralgien sind möglich.¹⁷⁶ Diese Form von überschießender Hämolyse kann auch bei Patienten mit anderen Hämoglobinopathien auftreten, wenngleich seltener, z.B. bei Patienten mit β -Thalassämie.^{224,226} In Einzelfällen können hyperhämolytische Transfusionsreaktionen zudem bei Patienten ohne Hämoglobinopathie nach Transfusion inkompatibler EK mit teils letalem Verlauf beobachtet werden.^{99,180,258} Dies spricht dafür, daß die beobachtete Hämolyse nicht ursächlich auf eine Hämoglobin-Anomalie zurückzuführen ist.¹⁷⁶

Ähnliche Beobachtungen können weiterhin nach Blutstammzelltransplantation beobachtet werden, z.B. bei Patienten mit der Blutgruppe A, B oder AB nach Minor-inkompatibler Blutstammzelltransplantation z.B. mit der Blutgruppe O.¹⁷⁶ Das Ausmaß des erforderlichen Transfusionsbedarfs kann das mehrfache des Ausgangsblutvolumens der Patienten betragen („by-stander immune hemolysis“), ohne daß Blutungen oder andere Antikörper als Isoagglutinine vorhanden sind.¹⁷⁶

Die Pathophysiologie der Hyperhämolyse ist unklar. Diskutiert wird zum einen die Adsorption von löslichen Antigenen oder Antigen-Antikörper Komplexen als Ursache des beschleunigten Zellabbaus.¹⁷⁶ Zum anderen kann eine reaktive Hämolyse beteiligt sein, bei der Komplement-Aktivierung zur Lyse von Zellen führt, die nicht direkt am Immunprozeß beteiligt und die in räumlicher Nähe sind.²⁴¹ Die kurze Halbwertszeit und die erforderliche Diffusionsstrecke der Komplementkomplexe, das selektive Auftreten sowie die Zellspezifität der Zellyse sprechen jedoch eher dagegen.

1.3.2 Hämolisierende Autoantikörper

Wenn Autoantikörper *in vivo* zur Hämolyse führen, liegt die Diagnose einer autoimmunhämolytischen Anämie (AIHA) vor. Autoantikörper gegen Erythrozyten können einen vorzeitigen Abbau der autologen Erythrozyten durch Komplement-bedingte Hämolyse mit C5b-9-Aktivierung (intravasal) oder durch Fc/C3b-Phagozytose durch Makrophagen (extravaskuläre Hämolyse) verursachen (autoimmunhämolytische Anämie, AIHA).²⁰⁸ Während eine AIHA durch intravasale Hämolyse praktisch nicht limitiert ist, begrenzt die Kapazität der Makrophagen die extravaskuläre Hämolyse.^{22,208}

Intravasale Hämolyse ist selten. Sie kann massiv sein und letal verlaufen, u.a. aufgrund der massiven Freisetzung großer Mengen von C3a und C5a Anaphylatoxin.²⁶² Eine schwächere Aktivierung kann durch die große Zahl Komplement-regulierender Proteine im Plasma und auf der Erythrozytenoberfläche kompensiert bleiben.

Eine limitierte Komplementaktivierung ist somit nicht mit intravasaler Hämolyse gleichbedeutend, und der Nachweis von Komplement (C3d) auf Erythrozyten kann unspezifischer Genese sein, indem C3b und Immunkomplexe aus dem Plasma am erythrozytären Komplementrezeptor 1 binden und als Degradationsprodukt C3d nachweisbar werden.²⁰⁸ Schwache Hämolyse können somit nahezu asymptomatisch sein.

Klinisch manifeste AIHA sind beim Menschen, bei Hunden, Katzen, Kaninchen, Pferden, Rindern und Labormäusen (New Zealand Black) bekannt.^{39,175} Beim Menschen ist sie zu 90% durch wärmereaktive und zu 10% durch kältereaktive Autoantikörper bedingt.^{177,208} Die Inzidenz liegt in der westlichen Welt bei etwa 1 : 40 000 bis 1 : 80 000.²⁰⁸ Der Verlauf kann akut und reversibel sein, oder der Verlauf kann sich über viele Jahre erstrecken. Unter der chronischen Form werden Verläufe zusammengefaßt, die akut-rezidivierenden Charakter haben und solche, die mehr oder minder akut beginnen und chronisch persistieren.

Etwa bei der Hälfte der Patienten mit AIHA liegt eine zugrundeliegende Erkrankung vor.¹⁷⁵ Akut reversible Verläufe können postinfektiös auftreten, vor allem im Kindesalter.²⁰⁸ Chronische Formen können bei Lymphomen und Leukämien sowie (seltener) bei soliden Tumoren beobachtet werden, wobei CLL und andere NHL mit etwa 20% einen Schwerpunkt darstellen.⁹⁰ Eine AIHA kann zudem bei Immundefekten wie CVID oder im Rahmen autoimmunolo-

gischer Erkrankungen auftreten (systemischer Lupus erythematodes, chronische Polyarthrit, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, perniziöse Anämie, Diabetes mellitus und andere).^{208,229} Die Diagnose CLL ist eine häufige Grunderkrankung bei AIHA, auch umgekehrt entwickeln viele CLL-Patienten im Verlauf eine AIHA (Tabelle 3).²⁴⁴ Der Zusammenhang von lymphoproliferativen Erkrankungen und AIHA kann auf eine veränderte Antigenpräsentation der B-Zellen zurückzuführen sein. Neoplastische B-Zellen sind eine sehr potente Zellsorte für die Prozessierung und Präsentation von u.a. Rh Proteinen,¹⁰⁵ so daß eine ausgeprägte AIHA entsteht.^{180,199}

Eine AIHA ohne zugrundeliegende Erkrankung wird als idiopathisch bezeichnet. Etwa in der Hälfte der Fälle wird keine Grunderkrankung diagnostiziert. Die Genese dieser idiopathischen Typen ist unbekannt, und ein klonaler Ursprung läßt sich mit den üblichen diagnostischen Methoden nicht feststellen.

Tabelle 3: AIHA-Frequenz bei unterschiedlichen Erkrankungen

<i>Grunderkrankung</i>	<i>Frequenz</i>
CLL ^{80,107,152,175}	4,3–9–37%
Makroglobulinämie ¹²⁴	16%
NHL (außer CLL) ^{80,101,249}	0,2–2,6%
M. Hodgkin ²⁴⁹	0,2–1,7%
systemischer Lupus erythematodes ^{227,237}	7%
Antiphospholipid Syndrom ⁶¹	10%
Colitis ulcerosa ⁹¹	1,4–1,7%

1.3.2.1 Therapeutische Aspekte

Medikamentöse Maßnahmen

Die Therapie der AIHA erfolgt unter Berücksichtigung des individuellen Grades an Hämolyse, der Anämie, des Patientenalters und eventueller assoziierter Erkrankungen. In der Regel werden Glukokortikoide zur Immunsuppression verwendet, meist Prednison oder Prednisolon mit einer initialen Dosierung von 1–2 mg pro kg Körpergewicht und Tag.¹⁷⁵ Mit Stabilisierung der Hämolyse kann die Dosierung rasch auf 15 mg/d und im Verlauf auf 5–10 mg/d gesenkt werden.²⁰⁸ Bei AIHA vom Wärmetyp ist mit einem prompten Ansprechen innerhalb der ersten 10–20 Tage in etwa 82% der Patienten zu rechnen.¹⁷⁵

Glukokortikoide können zudem als Pulstherapie mit hochdosiertem Dexamethason eingesetzt werden (40 mg/d für 4 Tage, ggf. 4-wöchentlich).¹⁵⁴ Diese Therapie vermeidet einige der Nebenwirkungen einer Dauertherapie, muß aber einige Aspekte des Nebenwirkungsspektrums im Blick behalten (Hypertonus, Diabetes mellitus Typ 2, Psychosen, Osteoporose).²⁰⁸

Calcium kann helfen, das Osteoporose-Risiko zu senken, und für Vitamin D₃ wird zusätzlich diskutiert, durch Hemmung der Aktivierung antigenpräsentierender Zellen (APC) Exazerbationen zu verhindern.¹⁰²

Patienten, die nicht innerhalb von zwei Wochen auf hohe Glukokortikoid-Anfangsdosis ansprechen, oder ältere Patienten erhalten in der Regel Azathioprin in einschleichender Dosierung.²⁰⁸ Das therapeutische Ansprechen liegt bei etwa 50%, wobei berücksichtigt werden muß, daß Erfahrungen mit Azathioprin vor allem bei Patienten existieren, die für Glukokortikoide refraktär sind.¹⁷⁵ Der Vorteil von Azathioprin in der Behandlung der AIHA ist in der Wirksamkeit der Metaboliten zu sehen, die eine lange Halbwertszeit haben und sich in Erythrozyten anreichern. Die intraerythrozytäre Halbwertszeit der 6-Thioguanino-Nukleotide liegt mit 3–13 Tagen bei einem Vielfachen der Halbwertszeit von Azathioprin (2 Stunden).

Für den Einsatz von Rituximab (Anti-CD20) existieren keine einheitlichen Empfehlungen. Die Rationale ist durch die Eliminierung der antikörperproduzierenden B-Zellen durch diesen monoklonalen Antikörper gegeben. Überzeugende Remissionsraten (85–90%) werden vor allem im Kontext lymphoproliferativer Syndrome gefunden (sekundären AIHA vom Wärmetyp, Kälteagglutinin-erkrankung).⁹ Bei idiopathischen AIHA-Formen vom Wärmetyp entspricht der Verlauf oft lediglich einer partiellen Remission.⁴

Cyclophosphamid hat als potentes Immunsuppressivum bei Langzeitanwendung den Nachteil einer nicht-reversiblen Knochenmarkstoxizität.^{175,208} Daher hat Cyclophosphamid den Stellenwert eines Reservemedikaments für refraktäre Patienten.

Mycophenolat-Mofetil (MMF) kann als experimentelle Therapie der AIHA bezeichnet werden. Dieses Medikament wird in der Immunsuppression nach solider Organtransplantation und bei Autoimmunerkrankungen wie M. Crohn oder Multiple sclerose eingesetzt.⁵ Bei Patienten mit AIHA konnte für MMF bislang lediglich in Einzelfällen ein Ansprechen dokumentiert werden.¹⁷⁵

Cyclosporin ist ein mögliches Reservemedikament, dessen therapeutischer Nutzen in verschiedenen Einzelfällen berichtet wurde. Bei Cyclosporin steht einem häufigeren Einsatz die potentielle Nephrotoxizität entgegen.^{175,208}

Danazol ist ein attenuiertes Androgen, das bei sowohl bei idiopathischer als auch sekundärer AIHA zu einem Therapieansprechen in 60–77% führen kann. Im Unterschied zu Prednisolon kann nach einjähriger Anwendung von Danazol nach dem Absetzen eine anhaltende Remission möglich sein.¹⁷⁵ In Relation zum publizierten Therapieerfolg insbesondere auch bei refraktären Patienten wird Danazol nur selten eingesetzt.

Im Gegensatz zur ITP ist die Therapie mit intravenösen Immunglobulinen bei AIHA keine etablierte Therapie mit allgemein bewiesenem Nutzen. Eine Ausnahme stellt die akute, post-infektiöse AIHA im Kindesalter dar, die auf eine hochdosierte, intravenöse Immunglobulintherapie ansprechen kann.²⁰⁸

Nicht-medikamentöse Maßnahmen

Die Splenektomie hat einen historischen Stellenwert in der Behandlung der AIHA.²⁸ Bei frühzeitiger Anwendung können dauerhafte Remissionen bei idiopathischen Fällen bei 60% der Patienten beobachtet werden.¹⁷⁵ Bei Ausschöpfung medikamentöser Möglichkeiten und Ausschluß akuter, selbstlimitierter AIHA-Formen liegt die Ansprechrate deutlich niedriger.¹³¹ Aufgrund des erheblichen perioperativen Risikos mit einer Mortalität von bis zu 7% bei Patienten mit gleichzeitiger Immunthrombozytopenie (ITP) oder bei Patienten mit lymphoproliferativen

Erkrankungen¹⁷⁵ und dem erhöhten Infektionsrisiko nach Splenektomie mit regelmäßiger Impfindikation ist eine zurückhaltende Indikationsstellung ratsam.²⁰⁸

Plasmapherese und Immunadsorption reduzieren die Konzentration aktuell vorhandener Antikörper, ohne die Neubildung zu beeinflussen. Dies ist bei akut auftretender Immunhämolyse hilfreich, vor allem in Fällen von Medikamenten-abhängigen Antikörpern.¹⁰ Bei chronisch kranken Patienten ist kein relevanter Nutzen dieser invasiven Therapie zu erwarten.^{175,208}

Darüber hinaus sind allgemeine Maßnahmen insbesondere bei Patienten mit Kälteagglutinerkrankung (neben medikamentösen Maßnahmen zur Behandlung zugrundeliegender klonaler Erkrankungen) mit einer Vermeidung von Kälteexpositionen von Bedeutung.¹²⁵

Den Verlauf aller AIHA-Typen können akute Infekte in einigen Fällen bessern, in anderen Fällen kann postinfektiös eine deutliche Verschlechterung beobachtet werden, die eine Therapieeskalation erforderlich macht. Die Konsequenz eines Infektes ist nicht vorhersehbar. Daher – und weniger wegen einer meist nur diskreten Immunsuppression der Infektabwehr – ist eine Vermeidung von Infektionen ratsam.

Transfusionen

Bluttransfusionen können bei AIHA-Patienten mit vital bedrohlicher Hämolyse die ultimative therapeutische Maßnahme mit akuter Wirksamkeit darstellen, wenn sie für immunsupprimierte Patienten verwendet werden.^{21,208} Bei diesen Patienten ist aufgrund von Autoantikörpern mit reaktiven Kreuzproben zu rechnen, daher ist eine geeignete serologische Diagnostik und die korrekte Zuordnung von Patient und Blutprodukt vor Transfusionsbeginn besonders zu beachten. Zudem kann der ABO-Identitätstest (Bedside-Test) erschwert auszuwerten sein. Fehlerhafte klinische Zuordnungen und inkorrekt durchgeführte ABO-Identitätsteste stellen aufgrund der gestiegenen infektionsserologischen Sicherheit von Blutprodukten derzeit den wesentlichen Risikofaktor bei der Anwendung von Blutprodukten dar.^{16,17}

Eines der vielleicht häufigsten Mißverständnisse im Management von AIHA-Patienten ist die zurückhaltende Indikationsstellung zur Transfusion, weil die Sicherheit und Effektivität „inkompatibler“ EK durch Autoantikörper unklar erscheint.¹⁷⁴ Transfundierte Erythrozyten haben, insofern nicht gegen Alloantikörper antransfundiert wird, bei immunsupprimierten Patienten eine ähnliche Haltbarkeit wie autologe Erythrozyten. Bei Transfusion ist somit von einem signifikanten Nutzen auszugehen.²⁰⁵

Ob schwache Alloantikörper, die vorhanden sein können und die bei Patienten mit AIHA aufgrund vorherrschender Autoantikörper nicht entdeckt werden können, eine bestehende Hämolyse verstärken können, läßt sich nicht definitiv beantworten. Es gibt keine Berichte, die diese Hypothese stützen können. Die große Mehrzahl von Autoantikörpern und alloreaktiven Immunantikörpern sind nicht zur Aktivierung der terminalen Komplementkaskade in der Lage und können lediglich eine extravaskuläre Hämolyse verursachen.²⁶² Dies macht eine Verschlechterung des klinischen Verlaufs bei Patienten mit dekompensierter AIHA unwahrscheinlich, denn die phagozytotische Kapazität der Makrophagen ist begrenzt.¹⁹⁸ Ungeachtet der untergeordneten Signifikanz schwacher Alloantikörper ist der Ausschluß verdeckter Alloantikörper bei Patienten mit Autoantikörpern vor Transfusion stets indiziert.

Toleranzinduktion

Wenn die AIHA auf einen Toleranzverlust gegenüber autologen Antigenen zurückzuführen ist, stellen toleranzfördernde Maßnahmen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Tierexperimentelle Erfahrungen liegen bei DBA-Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis und bei New Zealand Black-Mäusen mit AIHA vor, bei denen eine Toleranzinduktion durch oral-gastrointestinale oder nasale Applikation von passenden Peptiden erreicht werden kann.^{134,218} Korrespondierende Erfahrungen im humanen System existieren für Patienten mit AIHA bislang nicht. Einzelfallberichte über den erfolgreichen Einsatz oral applizierter Erythrozytenmembranen bei D-immunisierten Schwangeren konnten bislang nicht nachhaltig bestätigt werden.⁹⁴

Für die Toleranzinduktion sind für Patienten mit anderen Diagnosen weitere toleranzinduzierende Maßnahmen bekannt. Bei Hämophilie A-Patienten mit Faktor VIII-Hemmkörpern ist die hochdosierte Applikation von Faktor VIII etabliert.¹⁹¹ Bei Patienten mit Insektengiftallergie wird durch Antigen-Applikation ein Immunglobulin-Klassenwechsel oder eine Hemmung der Immunglobulinproduktion angestrebt. Bei organtransplantierten Patienten gibt es experimentelle Ansätze mit der Anwendung mesenchymaler Stammzellen, welche das Risiko einer Graft-versus-Host Erkrankung senken können.^{14,15} Bei Patienten mit anaphylaktischen Reaktionen durch Anti-IgA kann eine Toleranz durch die Gabe von Immunglobulinen erreicht werden, die ansteigende Mengen von IgA enthalten.²³ Der Einsatz autoantigener Sequenzen zur mukösen Toleranzinduktion bei humanem Diabetes mellitus Typ 1, Multiple Sklerose, chronischer Polyarthritis, Allergien und AIHA liegt nahe, wird aber bei der humanen AIHA bislang nicht durchgeführt.¹⁴⁰

1.4 Medikamentenantikörper

Etwa 10% der AIHA werden durch Medikamente ausgelöst.¹⁷⁵ In Abgrenzung zu Allo- und Autoantikörpern werden diese Antikörper als Medikamentenantikörper bezeichnet. Die Inzidenz serologisch bestätigter Fälle liegt bei etwa 1 : 1 000 000.¹⁷⁵ Von anderen AIHA unterscheidet sich diese Form durch die kausale Therapieoption, indem der Verlauf nach Beendigung der verursachenden Medikation in der Regel selbstlimitiert ist und symptomatische Maßnahmen nur temporär erforderlich sind. Zudem unterscheiden sich medikamentös verursachte AIHA von anderen Formen durch den gelegentlich abrupt erscheinenden Beginn der Symptomatik mit einer teils raschen, mitunter lebensbedrohlichen Hämolyse.¹⁸

Während medikamentös verursachte Thrombozytopenien bereits vor etwa 140 Jahren vermutet wurde,²⁵² sind medikamentös bedingte Immnhämolysen erst seit den 1950-er Jahren bekannt. Bis heute haben mehr als 100 klinisch zugelassene Medikamente Immnhämolysen verursacht.^{89,175} Prinzipiell kann jede Substanz eine Immnhämolyse verursachen, und ein Zusammenhang sollte bei jedem Patienten mit einer kürzlich begonnenen oder unregelmäßig angewendeten Medikation vermutet werden, der eine akute Immnhämolyse entwickelt.²⁰⁸ Der Zeitpunkt der Immunisierung ist oft unklar, insbesondere bei unregelmäßig verwendeten Medikamenten. Mitunter kann der Wechsel der Applikationsform für die Manifestation entscheidend sein.¹⁰

Medikamenten-abhängige Antikörper sind stets zellspezifisch, d.h. Medikamenten-abhängige erythrozytäre Antikörper verursachen keine Thrombozytopenie (und umgekehrt). Auf der Erythrozytenoberfläche sind die beteiligten Strukturen unterschiedliche. Gelegentlich weisen Medikamenten-abhängige Antikörper eine Blutgruppenspezifität z.B. für Rh-Proteine auf.^{6,18}

Unklar ist, warum bestimmte Medikamente bestimmte Typen von Medikamentenantikörpern stimulieren. Unter Berücksichtigung einer gewissen biologischen Variabilität weist das Reaktionsverhalten und die klinische Manifestation bei Medikamentenantikörpern in der Regel eine substanztypische Charakteristik auf (Tabelle 4, S. 21), auf die nachfolgend näher eingegangen wird.⁸⁹

1.4.1 Adsorptionstyp

Den Adsorptionstyp kennzeichnet eine feste Bindung der Substanz an die Erythrozytenoberfläche. Die Leitsubstanz des Adsorptionstyps ist Penicillin, das bei etwa 30% der Patienten auf den Erythrozyten nachweisbar ist, die 1,2–2,4 Millionen Einheiten pro Tag erhalten und bei allen Patienten, die 10 Millionen Einheiten oder mehr erhalten. Der direkte Antiglobulintest (DAT) wird bei etwa 3% dieser Patienten mit Anti-IgG positiv, und von diesen entwickeln einige eine gewisse Immnhämolyse.²⁰⁸ In-vitro läßt sich Penicillin durch Barbitalpuffer fest und nicht wegwaschbar an Erythrozyten binden. Seitdem Penicillin und andere Substanzen, die diesen Typ von Medikamentenantikörpern verursachen können, durch neuere Medikamente ersetzt worden sind, sind Immnhämolysen diesen Typs selten geworden.¹⁷⁵

1.4.2 „Immunkomplex“-Typ

Den „Immunkomplex“-Typ, der gelegentlich auch als Haptentyp bezeichnet wird, kennzeichnet eine lockere Anlagerung der Substanz an die Zelloberfläche. Ausgehend von Medikamentenantikörpern gegen Thrombozyten, die bekannt für die Adsorption und Internalisierung großer Mengen von Immunglobulin sind, wurde ursprünglich von Komplexen bestehend aus Immunglobulinen und Medikament ausgegangen, die sich sekundär an Blutzellen anlagern.¹⁷⁵ Experimentell konnten diese Komplexe nicht nachgewiesen werden. Statt dessen ist eine direkte Anlagerung der Substanzen an Erythrozyten der wahrscheinlichere Pathomechanismus. Dies wird zum einen durch Zell-spezifische, Medikamenten-abhängige Antikörper gestützt, die beispielsweise entweder gegen Erythrozyten und nicht gegen Thrombozyten oder gegen Thrombozyten und nicht gegen Erythrozyten gerichtet sind.^{155,202} Die primäre Entstehung von Immunkomplexen würde stets eine ähnliche Beteiligung beider Zellsorten implizieren. Zum anderen haben Medikamenten-abhängige Antikörper gelegentlich Blutgruppenspezifität, meist für das Rh-Antigen C.^{6,18,201} In diesen Fällen reagiert das Patientenserum in Gegenwart der Substanz nur mit C-positiven Erythrozyten (s.u.). Dies spricht für eine Anlagerung des Medikaments an Erythrozyten als erstem Schritt und der Antikörperbindung als zweitem Schritt.

Fälle vom „Immunkomplex“-Typ weisen oft eine massive Hämolyse auf, die abrupt beginnen kann.¹⁸ Als Leitsubstanzen können das thyreostatische Medikament Carbimazol und das Antidepressivum Nomifensin angesehen werden.^{50,200,203}

Adsorptions- und „Immunkomplex“-Typ lassen sich zu Medikamenten-abhängigen Antikörpern zusammenfassen, da Übergangsformen vorkommen, beispielsweise bei Platin-haltigen Verbindungen. Oxaliplatin ist eine Platinverbindung der dritten Generation, welche Medika-

mentenantikörper gegen alle drei Zellreihen (Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten) verursachen kann.²³⁹ Oxaliplatin-abhängige Antikörper können eine ausgeprägte Zytopenie verursachen, die sowohl Eigenschaften des Bindungstyps als auch des „Immunkomplex“-Typs zeigt.

1.4.3 *Medikamentös induzierte Autoantikörper*

Medikamentös induzierte Autoantikörper sind während der Entstehung initial auf die Medikamentengabe angewiesen. Dabei ist unklar, ob die Erythrozytenoberfläche medikamentös verändert wird, oder ob ein Einfluß auf das Immunsystem an anderer Stelle erfolgt.¹⁷⁶ Die induzierten Autoantikörper bestehen nach ihrer Bildung ohne Medikamentengabe einige Zeit fort und können eine begrenzte Hämolyse verursachen. Sie sind serologisch von Autoantikörpern anderer Genese nicht unterscheidbar. In vielen Fällen ist der Verlauf nach Absetzen des Medikamentes selbstlimitiert. Dieser Typ tritt möglicherweise, da oft keine medizinischen Maßnahmen erforderlich sind, wesentlich häufiger als vermutet auf.¹⁷⁵

Als Leitsubstanzen für medikamentös induzierte Autoantikörper können α -Methyldopa, Levodopa und Fludarabin angesehen werden.¹⁷⁵ Methyldopa, wenn es mehr als 3 Monate gegeben wird, induziert Autoantikörper in 11–20% und eine Hämolyse in 0,3–0,8% der Fälle. Auch Levodopa, wenn es mehr als 3 Monate gegeben wird, induziert bei etwa 9,5% der Patienten Autoantikörper. Eine massive Hämolyse ist selten.²⁰⁸ Das Purin-Analogon Fludarabin wird in der Behandlung der chronisch-lymphatischen Leukämie (CLL) eingesetzt und induziert bei etwa 20% der Patienten die Bildung von Autoantikörpern. Die betroffenen Patienten haben oft eine schwere Hämolyse, und die Abhängigkeit der AIHA von der Fludarabin-Induktion wird durch häufige hämolytische Rückfälle bei Reexposition belegt.¹⁷⁵ Es ist unklar, ob das Ausmaß der Hämolyse durch Fludarabin im Vergleich zur oft nur moderaten Hämolyse durch andere medikamentös induzierte Autoantikörper eine Besonderheit der Substanz Fludarabin darstellt oder Ausdruck der Tatsache ist, daß AIHA eine prävalente Komplikation der CLL ist (Tabelle 3, S. 15).

Misch- oder Übergangsformen zu Medikamenten-abhängigen Antikörpern sind möglich. Patienten mit Antikörpern vom „Immunkomplex“-Typ gegen Diclofenac haben häufig einen serologischen Befund, der mit zusätzlichen Autoantikörpern vereinbar ist.¹⁸

1.4.4 *Nicht-immunologische Proteinadsorption*

Die nicht-immunologische Adsorption von Immunglobulinen, Albumin und anderen Proteinen an Erythrozyten führt ebenso wie Medikamenten-abhängige Antikörper zur Konstellation eines positiven DAT und negativen Eluates. Der Vorgang ist Dosis-abhängig und ist von der Länge der Medikation abhängig (Tage–Wochen). Die fehlende Spezifität des positiven DAT läßt sich im konkreten Fall z.B. durch Reaktion der autologen Erythrozyten mit Anti-Albumin darstellen.¹⁷⁵ Für die betreffenden Substanzen ist typisch, daß gewaschene Erythrozyten, nachdem sie mit diesen einige Tage inkubiert worden sind, einen negativen DAT aufweisen, aber nach Zugabe von Serum immunologisch naiver Spender mit Antihumanglobulin reagieren.

Leitsubstanzen diesen Typs sind Cephalothin und die Betalaktamase-Inhibitoren Sulbactam, Clavulansäure und Tazobactam. Im allgemeinen können alle Substanzen mit mindestens zwei Aldehydgruppen mit Proteinen reagieren und einen positiven DAT verursachen (Digly-

coaldehyd, Glutaraldehyd, Folsäure, Glutamat, Nitroglycerin, Penicillinsäure, Picrinsäure, Stibophen).¹⁷⁵ Obgleich dies nahelegt, daß die nicht-immunologische Proteinadsorption nicht relevant ist, zeigen Erfahrungen bei HIV-Patienten, daß Patienten mit positiven DAT ohne den Nachweis von Auto- oder Medikamentenantikörpern niedrigere Hämoglobinkonzentrationen aufweisen.¹³⁶

Tabelle 4: Medikamente, die eine Immuhämolyse verursachen können⁸⁹

Substanz	MIAK	AT	IKT	Substanz	MIAK	AT	IKT
Aceclofenac			•	Isoniazid		•	•
Aciclovir		•		Ketoconazol	•		
p-Aminosalicylsäure			•	Lenalidomid	•		
Amoxicillin		•		Levodopa	•		
Amphotericin B			•	Melphalan			•
Ampicillin		•	•	Mercaptopurin		•	
Antazolin			•	Metamizol		•	•
Butizid			•	Methadon		•	
Captopril	•			Methotrexat	•	•	•
Carbimazol	•	•	•	Methyldopa	•		
Carboplatin	•	•	•	Minocyclin			•
Cefazolin		•		Naproxen			•
Cefixim		•	•	Nitrofurantoin			•
Cefotaxim	•	•	•	Nomifensin	•		•
Ceftazidim	•	•	•	Norfloxacin		•	
Ceftriaxon	•		•	Ofloxacin	•	•	•
Cefuroxim		•		Oxaliplatin	•	•	•
Cephalexin		•		Paracetamol			•
Chinidin	•	•	•	Penicillin G		•	•
Chinin	•		•	Phenytoin			•
Chlorpromazin	•		•	Piperacillin	•	•	•
Ciclosporin	•	•		Probenecid	•		•
Cimetidin	•			Pyrazinamid		•	•
Ciprofloxacin	•		•	Ranitidin		•	•
Cisplatin		•	•	Rifampicin	•	•	•
Cladribin	•			Streptokinase	•	•	
Diclofenac	•		•	Streptomycin	•	•	•
Erythromycin		•		Sulfasalazin			•
Fludarabin	•			Sulfonamide			•
Fluorescein		•	•	Tacrolimus	•		
Fluorouracil (5-FU)			•	Teicoplanin	•		•
Furosemid			•	Tetrazyklin		•	
Hydrochlorothiazid	•	•	•	Thiopental			•
Ibuprofen	•		•	Triamteren		•	•
Imatinib		•		Trimethoprim	•	•	•
Insulin		•		Vancomycin			•
Interferon	•						

MIAK, medikamentös induzierte Autoantikörper; AT, Adsorptionstyp; IKT, „Immunkomplex“-Typ. Substanzen ohne sichere Pathophysiologie sind ohne Markierung

2 ZIELSTELLUNG

Zielstellung der Arbeiten ist die Untersuchung und Beschreibung der Immunisierung gegen erythrozytäre Antigene mit besonderer Berücksichtigung der Bildung von Autoantikörpern.

Mit serologischen und epidemiologischen Methoden wird untersucht, ob zwischen Allo- und Autoimmunisierungen gegen Erythrozyten Zusammenhänge bestehen, es wird nach kausalen Ursachen gesucht und nach Beobachtungen, die auf den pathophysiologischen Mechanismus schließen lassen. Für die Beurteilung der Pathophysiologie der Autoimmunisierung werden Patienten untersucht, die Autoantikörper im Zusammenhang mit Medikamenten-abhängigen Antikörpern am Beispiel von Rifampicin und Diclofenac entwickelt haben.

Schließlich stellt sich die Frage nach Hinweisen auf eine Relevanz von Oberflächenproteinen, die als Promotoren bzw. Inhibitoren der Immunhämolyse fungieren können.

3 EIGENE ARBEITEN

Die vorliegende kumulative Habilitationsschrift umfaßt Untersuchungen zur Entstehung von Antikörpern gegen Erythrozyten. Die Ergebnisse dieser Projekte sind als Originalarbeiten in transfusionsmedizinischen und hämatologischen Zeitschriften veröffentlicht worden.

3.1 Begleitende Autoantikörper durch posttransfusionelle Alloimmunisierung

Ahrens N, Pruss A, Kähne A, Kieseewetter H, Salama A. Coexistence of autoantibodies and alloantibodies to red blood cells due to blood transfusion. *Transfusion* 2007; 47(5): 813–816

Zusammenfassung

Autoantikörper gegen Erythrozyten stellen einen häufigen Befund bei Patienten dar, die Alloantikörper gebildet haben. Von 1998 bis 2006 wurden Autoantikörper bei 717 Patienten der Charité nachgewiesen. Alloantikörper waren bei 200 von diesen vorhanden (28%), wobei die beobachteten Spezifitäten ein typisches Spektrum und Alloantikörper darstellten, die auch bei Patienten ohne Autoantikörper gefunden werden können.¹²⁰ Bei den Patienten mit Autoantikörpern waren multiple Antikörper ein häufiger Befund und bei 88 der Patienten nachweisbar (12%).²²

Der Immunisierungsverlauf ließ sich bei 98 der 200 Patienten beurteilen. Auto- und Alloantikörper traten nach Bluttransfusion in 73 Patienten und nach Knochenmarktransplantation in 6 Patienten auf. Initial alloimmunisiert waren 9 Patienten, die im Verlauf Autoantikörper entwickelten. Bei 10 Patienten schließlich waren anfangs Autoantikörper ohne Alloantikörper vorhanden; letztere entwickelten sich dann in der Folge von Bluttransfusionen. Bei den verbleibenden 102 Patienten ließ sich die Abfolge der Immunisierung nicht klären; zumeist waren initial bereits alle Antikörper vorhanden.²²

Die erythrozytäre Autoimmunisierung trat somit bei 81% der 98 Patienten im Rahmen einer Alloimmunisierung durch Transfusion oder Transplantation auf. Dieses Ergebnis bestätigt die These eines Zusammenhanges zwischen Autoantikörpern und Alloimmunisierung und zeigt, daß Alloimmunisierung ein wesentliches Risiko für das Auftreten von Autoantikörpern ist.

Coexistence of autoantibodies and alloantibodies to red blood cells due to blood transfusion

Norbert Ahrens, Axel Pruss, Andreas Kähne, Holger Kiesewetter, and Abdulgabar Salama

BACKGROUND: Autoantibodies (AUTO) to red blood cells (RBCs) are frequently associated with alloantibodies (ALLO). The mechanism for the coexistence of these antibodies is obscure.

STUDY DESIGN AND METHODS: Between August 1998 and June 2006, all in- and outpatients of the Charité University Hospital, Berlin, with detectable AUTO were included in this study. Serologic examination was performed with standard techniques for the detection of RBC antibodies.

RESULTS: A total of 717 patients were found to have AUTO, with ALLO observed in 200 of these patients (28%). The history of antibody production could be evaluated in 98 of the 200 patients. Both AUTO and ALLO were due to RBC transfusion in 73 cases (75%) and peripheral blood progenitor cell transplantation in 6 cases (6%). Nine (9%) patients were primarily alloimmunized and subsequently developed AUTO. The remaining 10 (10%) patients were primarily autoimmunized and later developed ALLO. Only 6 of these patients had chronic idiopathic autoimmune hemolytic anemia.

CONCLUSION: The majority of AUTO associated with ALLO appears to be due to RBC transfusion that must be recognized as a major cause for autoimmunization.

Blood transfusion may induce autoimmune hemolytic anemia (AIHA) that may in some instances be severe.¹⁻⁶ In addition, 32 percent (weighted mean) of patients with autoantibodies (AUTO) to red blood cells (RBCs) are associated with alloantibodies (ALLO).⁶⁻¹⁶ These findings have led to the assumption that patients with AIHA are easily alloimmunized after RBC transfusion.^{6,17,18} This belief, however, is largely based on serologic findings without any information pertaining to the clinical background of the patient. To date, there has been no study that has investigated the incidence of alloimmunization in patients with significant AIHA. Nevertheless, the fear that ALLO might be masked by AUTO or might be developed in patients with AIHA remains an area of confusion and causes delays in cases where blood transfusion is required. From a serologic perspective, roughly 30 to 40 percent of these patients not only have a positive direct antiglobulin test (DAT), but also both a positive indirect antiglobulin test (IAT) and a cross-match due to serum AUTO.¹⁹ Thus, the recommendation to exclude ALLO before blood transfusion in patients with a positive cross-match due to AUTO¹⁷ cannot be invariably realized, particularly in patients with severe AIHA and high-titer serum AUTO due to a shortage of time and materials. This study will demonstrate that the majority of cases of AUTO associated with ALLO were simultaneously developed after blood transfusion.

PATIENTS AND METHODS

Between August 1998 and June 2006, all in- and outpatients of the Charité University Hospital, Berlin, with AUTO to RBCs were included in this study. The patients were predominantly adult, with 360 adult women (median age, 58 years; range, 18-96 years), 285 adult men (median age, 59 years; range, 19-95 years), and 72 children (median age, 9 years; range, 0.1-17 years).

RBC antibodies were investigated with standard techniques with antiglobulin gel cards and included screening cells and autologous controls (DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland). The following commercially available sera were used: anti-immunoglobulin (Ig)G, anti-IgA, anti-IgM, and anti-C3d (Biotest, Dreieich, Germany; and Dako, Hamburg, Germany). Elution was performed with

ABBREVIATIONS: AIHA = autoimmune hemolytic anemia; ALLO = alloantibodies; AUTO = autoantibodies.

From the Institute for Transfusion Medicine, Charité-University Medicine, Berlin, Germany.

Address reprint requests to: Prof Dr A. Salama, Institut für Transfusionsmedizin, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin; Germany; e-mail: abdulgabar.salama@charite.de.

Received for publication July 20, 2006; revision received October 27, 2006, and accepted November 15, 2006.

doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01194.x

TRANSFUSION 2007;47:813-816.

the acid technique (Immucor, Rödermark, Germany). The presence of AUTO was indicated when two of the following three criteria were met: positive DAT and/or antibodies without allogeneic specificity in the eluate and/or in the serum. The presence of ALLO was excluded if the IAT was negative or if there was no evidence for the presence of ALLO after adsorption of AUTO. Autologous cells were used, if the 4-months' transfusion history was negative. Otherwise different cells were used that were complementary homozygous for the main antigens of the systems Rh, Kell, Kidd, Duffy, and MNS. If the AUTO could not be adsorbed sufficiently, RBCs were treated with ZZAP. Computer software was utilized in this study (Eurolab, IMP, Berlin, Germany; Filemaker, Filemaker, Unterschleißheim, Germany; and Excel, Microsoft, Unterschleißheim, Germany).

RESULTS

AUTO were detectable in the serum and/or eluates of 717 patients (Fig. 1). In 200 of these patients (28%), AUTO were also associated with one (16%, n = 112) or more ALLO (12%, n = 88). The history of immunization could be evaluated in 98 of the 200 patients (Fig. 2). The production of AUTO and ALLO occurred simultaneously after blood transfusion in 73 of the 98 patients (75%) and after marrow transplantation in 6 patients (6%). Nine patients (9%) were primarily alloimmunized before the production of AUTO. The remaining 10 patients had prior AUTO and developed ALLO after blood transfusion. Only 6 of these patients had active AIHA (see below). Three patients had an anti-C, two an anti-E, one an anti-C^w, one an anti-C^w plus an anti-Wr^a, one an anti-K, one an anti-Jk^a, and one an anti-S. The mechanism of immunization could not be clarified in the remaining 102 patients.

Clinical information regarding hemolysis was available in only 122 of the 717 patients, with 63 of these patients having received blood transfusion (median, 15 RBC units; range, 2-98 RBC units). As previously described, 6 patients developed ALLO. ALLO were not observed in the remaining patients. The follow-up study was conducted at least 3 months after transfusion (median, 8 months) for 17 patients and less than 3 months after transfusion in the remaining 40 patients.

DISCUSSION

It has been previously described that patients with AIHA are not susceptible to alloimmunization.²⁰ This finding has recently been confirmed in a brief survey in which 5 of 100 patients with AUTO developed ALLO.²¹ In this study, only 6 of 63 patients with active AIHA developed ALLO after blood transfusion. The ALLO detected in two of these patients are usually considered to be insignificant (anti-C^w and anti-Wr^a). The remaining 4 patients developed anti-E

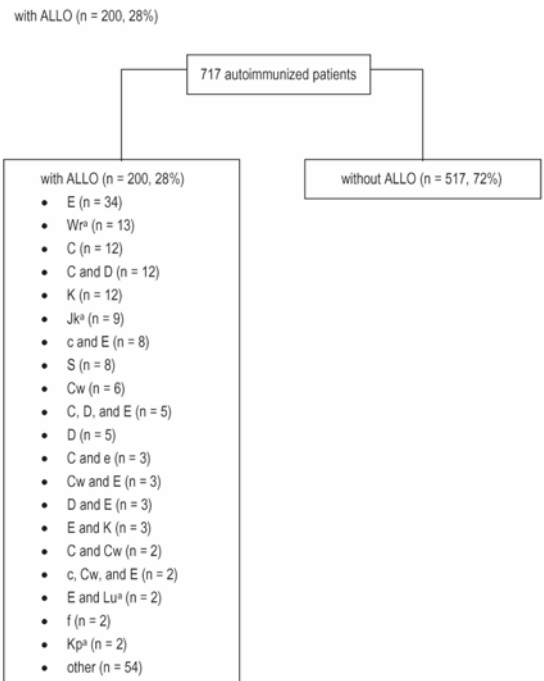


Fig. 1. Alloimmunization in patients with autoimmunization.

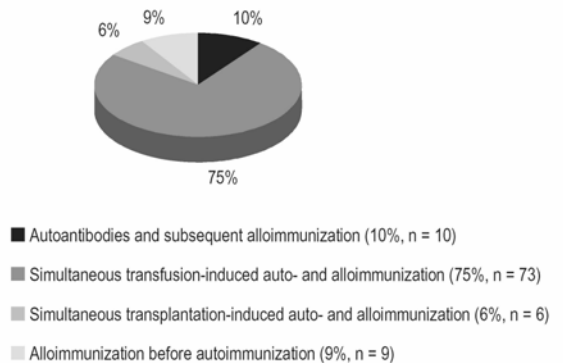


Fig. 2. Evaluation of a temporal relationship between auto- and alloimmunization.

(n = 2), anti-S (n = 1), and anti-C (n = 1). It must be emphasized that these patients do not represent the true incidence of alloimmunization in AIHA, because information regarding blood transfusion was lacking in the majority of cases.

It is well known that AUTO are frequently associated with ALLO (Table 1). Not only could we confirm this relationship, but we also demonstrated that alloimmunization is the most important cause of autoimmunization. Ninety-two of 110 patients (84%) with AUTO associated

TABLE 1. Review of alloimmunization in patients with AUTO

First author (year)	Frequency of auto- and alloimmunization
Wallhermfechtel (1984) ⁷	15% (19 of 125 patients)
Laine (1985) ⁸	38% (41 of 109)
James (1988) ⁹	32% (13 of 41)
Issitt (1996) ¹⁰	39% (49 of 127)
Leger (1999) ¹¹	47% (194 of 411)*
Sokol (2000) ¹²	25% (191 of 759)
Winters (2001) ¹³	31% (51 of 167)
Shirey (2002) ¹⁴	40% (8 of 20)
Wheeler (2004) ¹⁵	53% (53 of 100)
Young (2004) ⁶	34% (41 of 121)
Maley (2005) ¹⁶	31% (39 of 126)
Present study	28% (200 of 717)

* With polyethylene glycol (PEG), ALLO were detected in 47%, and without PEG in 40%.

with ALLO were not immunized when first investigated and thus did not present with active AIHA. The production of AUTO and/or ALLO after blood transfusion was suggested in 1984²² and confirmed by another study later.²³ Recently, the question was raised as to whether blood transfusion may lead to the production of AUTO.^{5,6} The authors have demonstrated that at least 75 percent of AUTO associated with ALLO are related to blood transfusion. On the basis of the data published to date and the results obtained in this study, it may be concluded that blood transfusion is the single most important cause in the production of ALLO and AUTO.

Although the precise mechanism of autoimmunization in the course of alloimmunization is unknown, one might speculate that the antibody would initially be of rather low affinity (compared to the matured antibody) and thus not only bind to alloantigens, but cross-react to common structures. It has been shown that rabbits after the immunization with heterologous or chemically modified thyroglobulin developed AUTO to thyroglobulin.²⁴ It is therefore not too surprising that RBC AUTO mostly bind to Rh proteins, which are the most common targets of ALLO.

Whether weak ALLO that cannot be detected in patients with AIHA due to the presence of high-titer serum AUTO may aggravate hemolysis in these patients cannot be definitively answered. There are no reports, however, which confirm this hypothesis. The vast majority of AUTO and immune ALLO are incapable of activating the terminal complement components and may only cause extravascular hemolysis. It seems unlikely that weak ALLO may lead to a deterioration in the clinical outcome of patients with decompensated AIHA. The phagocytic capacity of macrophages is well known to be limited.²⁵⁻³⁰ This limitation is also illustrated by platelet sequestration in immune thrombocytopenia that can be stopped in D+ patients if they are treated with anti-D.³¹ This explains why

the vast majority of affected patients would survive hemolysis for extended periods of time, even without treatment. Ultimately, the tolerance of patients with AIHA is further facilitated by immunosuppressive therapy that is invariably required in cases with clinically relevant AIHA. Despite the possibly reduced significance of weak ALLO in patients with AIHA, the exclusion of underlying ALLO in patients with AUTO is still indicated before transfusion unless absolutely not possible.

This study demonstrates that blood transfusion appears to play a role in the majority of cases of AUTO associated with ALLO. In contrast, alloimmunization in patients with AIHA seems to be less frequent as the coincidence of AUTO and ALLO might suggest. Further studies are required to answer the question whether a general extended antigen matching is justified and to study the incidence of alloimmunization in AIHA prospectively.

REFERENCES

1. Dameshek W, Levine P. Isoimmunization with rh factor in acquired hemolytic anemia. *N Engl J Med* 1943;228:641-4.
2. Polesky HF, Bove JR. A fatal hemolytic transfusion reaction with acute autohemolysis. *Transfusion* 1964;4:285-92.
3. Chan LT. Severe intravascular hemolysis due to autoantibodies stimulated by blood transfusion. *Immunohematology* 1996;12:80-3.
4. Zumberg MS, Procter JL, Lottenberg R, et al. Autoantibody formation in the alloimmunized red blood cell recipient: clinical and laboratory implications. *Arch Intern Med* 2001; 161:285-90.
5. Garratty G. Autoantibodies induced by blood transfusion. *Transfusion* 2004;44:5-9.
6. Young PP, Uzieblo A, Trulock E, et al. Autoantibody formation after alloimmunization: are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia? *Transfusion* 2004;44:67-72.
7. Wallhermfechtel MA, Pohl BA, Chaplin H. Alloimmunization in patients with warm autoantibodies. A retrospective study employing three donor alloabsorptions to aid in antibody detection. *Transfusion* 1984;24:482-5.
8. Laine ML, Beattie KM. Frequency of alloantibodies accompanying autoantibodies. *Transfusion* 1985;25:545-6.
9. James P, Rowe GP, Tozzo GG. Elucidation of alloantibodies in autoimmune haemolytic anaemia. *Vox Sang* 1988;54: 167-71.
10. Issitt PD, Combs MR, Bumgarner DJ, et al. Studies of antibodies in the sera of patients who have made red cell autoantibodies. *Transfusion* 1996;36:481-6.
11. Leger RM, Garratty G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. *Transfusion* 1999;39:11-6.
12. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R. The detection of alloantibodies against red cells in patients with warm-type autoimmune haemolytic anaemia. *Vox Sang* 2000;78:205.

13. Winters JL, Pineda AA, Gorden LD, et al. RBC alloantibody specificity and antigen potency in Olmsted County, Minnesota. *Transfusion* 2001;41:1413-20.
14. Shirey RS, Boyd JS, Parwani AV, et al. Prophylactic antigen-matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management. *Transfusion* 2002;42:1435-41.
15. Wheeler CA, Calhoun L, Blackall DP. Warm reactive autoantibodies: clinical and serologic correlations. *Am J Clin Pathol* 2004;122:680-5.
16. Maley M, Bruce DG, Babb RG, et al. The incidence of red cell alloantibodies underlying panreactive warm autoantibodies. *Immunohematology* 2005;21:122-5.
17. Branch DR, Petz LD. Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. *Transfusion* 1999;39:6-10.
18. Garratty G, Petz LD. Approaches to selecting blood for transfusion to patients with autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion* 2002;42:1390-2.
19. Petz LD, Garratty G. *Immune hemolytic anemias*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004. p. 591.
20. Salama A, Berghöfer H, Mueller-Eckhardt C. Red blood cell transfusion in warm-type autoimmune haemolytic anaemia. *Lancet* 1992;340:1515-7.
21. Blackall DP, Wheeler CA, Su L, Calhoun L. Contemporaneous autoantibodies and alloantibodies: serological and clinical features. *Transfusion* 2004;44(Suppl):27a.
22. Salama A, Mueller-Eckhardt C. Delayed hemolytic transfusion reactions: evidence for complement activation involving allogeneic and autologous red cells. *Transfusion* 1984;24:188-93.
23. Ness PM, Shirey RS, Thoman SK, Buck SA. The differentiation of delayed serologic and delayed hemolytic transfusion reactions: incidence, long-term serologic findings, and clinical significance. *Transfusion* 1990;30:688-93.
24. Weigle WO. The induction of autoimmunity in rabbits following injection of heterologous or altered homologous thyroglobulin. *J Exp Med* 1965;121:289-308.
25. Benacerraf B, Biozzi G, Halpern BN, et al. Phagocytosis of heat-denatured human serum albumin labelled with ¹³¹I and its use as a means of investigating liver blood flow. *Br J Exp Pathol* 1957;38:35-48.
26. Haakenstad AO, Mannik M. Saturation of the reticuloendothelial system with soluble immune complexes. *J Immunol* 1974;112:1939-48.
27. Iio M, Wagner HN Jr, Scheffel U, Jabbour B. Studies of the reticuloendothelial system (RES). I. Measurement of the phagocytic capacity of the RES in man and dog. *J Clin Invest* 1963;42:417-26.
28. Biozzi G, Benacerraf B, Halpern BN. Quantitative study of the granuloplectic 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;34:441-57.
29. Biozzi G, Benacerraf B, Halpern BN, et al. Exploration of the phagocytic function of the reticuloendothelial system with heat denatured human serum albumin labeled with ¹¹³I and application to the measurement of liver blood flow, in normal man and in some pathologic conditions. *J Lab Clin Med* 1958;51:230-9.
30. Pesanti EL, Nugent KM. Inhibition of macrophage phagocytosis after contact with ingestible particles. *J Reticuloendothel Soc* 1981;30:157-66.
31. Salama A, Kiefel V, Amberg R, Mueller-Eckhardt C. Treatment of autoimmune thrombocytopenic purpura with rhesus antibodies [anti-Rh0(D)]. *Blut* 1984;49:29-35. ■

3.2 Alloantikörper-Spezifitäten mit Assoziation zu Autoantikörpern

Ahrens N, Pruss A, Mayer B, Genth R, Kieseewetter H, Salama A. Association between alloantibody specificity and autoantibodies to red blood cells. *Transfusion* 2008; 48(1): 20–24

Aus der vorangehenden Untersuchung ergibt sich, daß Alloimmunisierung einen wesentlichen Risikofaktor für Autoimmunisierungen darstellt. Systematische Untersuchungen mit der Frage, ob dies für alle Alloantikörper-Spezifitäten gleichermaßen gilt, fehlen und bildeten die Fragestellung der nachfolgenden Arbeit.

Zusammenfassung

Von 2000 bis 2006 wurden alle Patienten und Blutspender eingeschlossen, die an der Charité immunhämatologisch untersucht wurden. Die Daten der EDV-Dokumentation (IMP) wurden aggregiert (SPSS), so daß jede Person nur einmal gezählt wurde. Insgesamt wurden 204 330 Patienten und Blutspendern im Zeitraum von sieben Jahren untersucht.²⁴ Alloantikörper waren bei 4626 Patienten nachweisbar, und zusätzliche Autoantikörper waren bei 413 von diesen vorhanden (8,9%). Autoantikörper ohne Alloantikörper wurden bei 886 Patienten und Spendern beobachtet. Die Prävalenz von Autoantikörpern lag somit bei 0,64% der Patienten und Spender. Bei Alloimmunisierung stieg die Autoantikörper-Prävalenz auf 8,93%.

Die Odds ratio wurde für die einzelnen Antikörperspezifitäten bei Patienten mit und bei Patienten ohne Autoantikörper ausgerechnet. Die relative Häufigkeit einzelner Alloantikörper bzw. Überrepräsentierungen und somit Assoziationen wurde als normalisierte Odds ratio (NOR) errechnet, die sich aus dem Verhältnis der Odds ratio zu der aller Alloantikörper ergibt.²⁴

Unter diesen Antikörpern war Anti-S mit einer NOR von 2,9 überrepräsentiert; etwas schwächer war die Assoziation für Antikörper gegen Antigene des RHCE-Proteins. Die NOR für Anti-Cw, -C, -c, -e, -E und -f war 1,6. Keine Assoziation konnte für Antikörper gegen Glykophorin A (Anti-M, -N), Kell-Glykoprotein, Duffy-Protein, Lewis, P₁ und verschiedene andere nachgewiesen werden.²⁴

Erwartungsgemäß konnte eine scheinbar hohe Assoziation für natürliche Antikörper gegen seltenere Antigene gefunden werden, d.h. Anti-Wr^a, -Di^a, -Vw und -Mit. Diese Antikörper werden bei der systematischen Suche nicht immer erfaßt und daher vor allem bei Patienten gefunden, bei denen eine umfangreichere Diagnostik erfolgt.

Die Assoziation von Anti-S und Autoantikörpern ist mit einer NOR von 15,1 bei Schwangeren wesentlich ausgeprägter als bei Patienten, die durch EK immunisiert wurden. Ein Einfluß durch erstuntersuchende Labore, von denen ein Teil der Proben stammte, ist unwahrscheinlich, da methodisch ähnlich komplizierte Antikörperkombinationen wie Anti-C oder -E mit Autoantikörpern ähnlich assoziiert waren wie bei Charité Patienten und Spendern. Anti-Fy^a oder -Jk^a waren darüber hinaus bei keiner einzigen Schwangeren mit Autoantikörpern kombiniert, obgleich diese Antikörper ähnlich schwierig zu untersuchen sind wie Anti-S und Autoantikörper.²⁴

Diese Arbeit zeigt, daß die meisten assoziierten Allo- und Autoantikörper gegen benachbarte Antigene im Rh-Komplex gerichtet sind und bestätigt die These eines Zusammenhanges zwischen Allo- und Autoimmunisierung.

IMMUNOHEMATOLOGY

Association between alloantibody specificity and autoantibodies to red blood cells

Norbert Ahrens, Axel Pruss, Beate Mayer, Ramona Genth, Holger Kiesewetter, and Abdulgabar Salama

BACKGROUND: Alloantibodies (ALLOs) to red blood cells (RBCs) are frequently associated with autoantibodies (AABs). An association between ALLO specificity and AABs has not yet been described.

STUDY DESIGN AND METHODS: All patients and healthy blood donors screened for RBC antibodies between 2000 and 2006 were included. The odds ratio (OR) for ALLOs in patients with AABs compared to those without AABs was correlated with the OR of general ALLO prevalence in patients with AABs (normalized OR).

RESULTS: ALLOs were found in 4,626 of 204,330 patients and healthy blood donors (2.3%). The ALLOs were associated with AABs in 413 cases (8.9%). Among the specificities, anti-S with a normalized OR of 2.9 was overrepresented. This was most evident in pregnant women who showed a normalized OR of 15.1 for anti-S and AABs. The normalized OR revealed an additional association between Rh antibodies and AABs. No association was found between ALLOs to the Kell glycoprotein, Duffy protein, Lewis, or glycophorin A (M/N) and AABs.

CONCLUSION: The majority of associated ALLOs and AABs are directed against neighboring antigens of the Rh complex and glycophorin B.

It is estimated that approximately 3 percent of patients develop alloantibodies (ALLOs) to red blood cell (RBC) antigens.¹ Antibody prevalence can be used to determine the immunogenicity of an antigen based on two criteria: if the prevalence of the antigen is known² and if the antibodies are being developed independently from one another. This does not seem to be the case, however, because some patients may simultaneously develop more than one antibody after a single stimulation, that is, a blood transfusion.³ In addition, our group⁴ and others^{2,5-8} have shown that alloimmunization to RBCs may simultaneously stimulate the production of RBC autoantibodies (AABs). To date, there is no explanation for these findings.

In this study, we analyzed the specificities of ALLOs to RBCs and observed a predominant association between anti-S and AABs and, to a lesser extent, between Rh antibodies and AABs.

PATIENTS AND METHODS

All inpatients, outpatients, and healthy blood donors screened for RBC antibodies at the Charité from January 2000 through December 2006 were included. The majority of referred outpatient samples were from pregnant women.

Standard serologic and statistical methods were used as described.⁴ All RBC ALLOs and warm-reactive AABs were included. Cold-reactive AABs were not included.

Data were condensed to include each patient only once. The frequencies of the antibodies in patients with RBC AABs and in patients without RBC AABs were used to calculate the odds ratio (OR). Overrepresentation of ALLO specificities was expressed by relating the OR to the general ALLO OR (normalized odds ratio [NOR]; Equation 1).

$$\text{NOR} = \frac{\frac{n_{\text{AB and AAB}}}{n_{\text{AAB}} - n_{\text{AB and AAB}}}}{\frac{n_{\text{AB without AAB}}}{n_{\text{total}} - n_{\text{AAB}} - n_{\text{AB without AAB}}}} \bigg/ \frac{\frac{n_{\text{ALLO and AAB}}}{n_{\text{AAB}} - n_{\text{ALLO and AAB}}}}{\frac{n_{\text{ALLO without AAB}}}{n_{\text{total}} - n_{\text{AAB}} - n_{\text{ALLO without AAB}}}}, \quad (1)$$

where AB is the specific antibody (e.g., anti-S), ALLO is all patients with ALLOs, and n is number of patients.

ABBREVIATIONS: AAB(s) = autoantibody (-ies); ALLO(s) = alloantibody (-ies); ES = epitope spreading.

From the Labor 28 and the Institute for Transfusion Medicine, Charité–University Medicine, Berlin, Germany

Address reprint requests to: Prof. Dr A. Salama, Institut für Transfusionsmedizin, Charité–Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin, Germany; e-mail: abdulgabar.salama@charite.de.

Received for publication April 14, 2007; revision received June 22, 2007, and accepted June 28, 2007.

doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01505.x.

TRANSFUSION 2008;48:20-24.

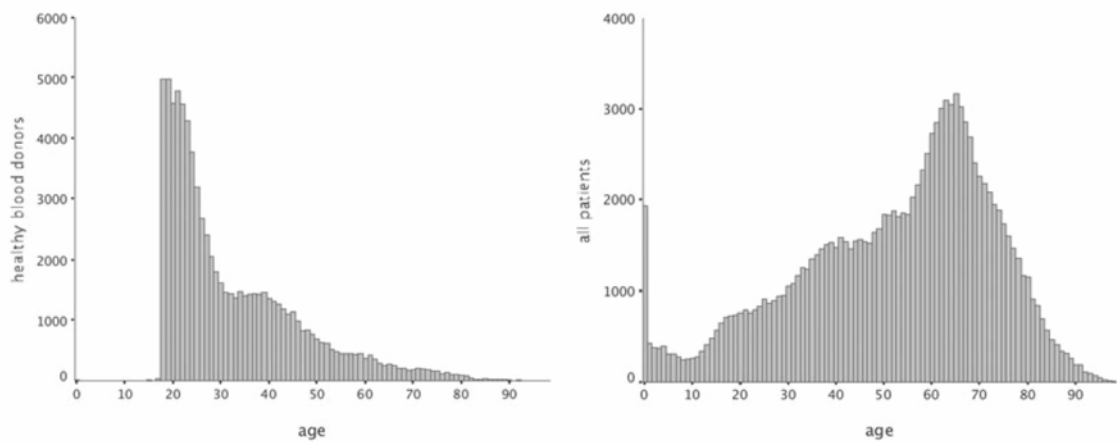


Fig. 1. Number of patients and donors investigated in relation to age.

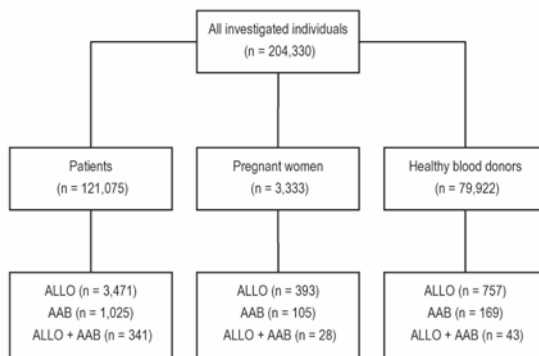


Fig. 2. Auto- and alloimmunization in investigated subjects.

Hierarchical cluster analysis was performed with the analysis of variance-like Ward method.

RESULTS

A total of 124,408 patients and 79,922 blood donors were investigated (Fig. 1). ALLOs were detected in 3,864 patients (3.1%) and 757 blood donors (0.9%). AABs were present in 1,130 patients and 169 blood donors (Fig. 2). Among these antibodies, anti-S with a normalized OR of 2.9 was overrepresented (Table 1). This association was much more pronounced in pregnant women (normalized OR, 15.1; Table 2). The relationship between AAB and antibodies to S and s antigens that are located on glycoprotein B could be confirmed by cluster analysis (Fig. 3). To a lesser degree, associations with AAB were also found for antibodies to the RHCE protein (Table 1; normalized OR, 1.6 for Cw, C, c, E, e, or f). This includes all allelic forms of the protein (i.e., Ce, cE, ce, and CE). No association with AAB was found for antibodies to glycoprotein A (anti-M,

anti-N), the Kell glycoprotein, Duffy protein, Lewis, P1, and various others. As expected, high associations were found for naturally occurring antibodies against antigens of lower prevalence such as anti-Wr^a, anti-Di^a, anti-Vw, and anti-Mit.

DISCUSSION

There is increasing evidence that blood transfusion occasionally leads to the production of ALLOs and AABs.^{4,8,9} Although the pathogenesis of alloimmunization is largely known, there remains no explanation for the occurrence of autoimmunization in these cases. In this study, we found significant associations between the specificity of some ALLOs and AABs. The most predominant association appeared to be related to anti-S and, to a lesser degree, to Rh antibodies. In addition, the association between anti-S and AAB was most pronounced in pregnant women (normalized OR, 15.1).

We have previously demonstrated that pregnant women infrequently develop RBC AABs that did not seem to cause any significant hemolysis either in the mothers or in the newborns.¹⁰ The mechanism of this phenomenon might be similar to that observed in autoimmunization against RBCs after blood transfusion. In both cases, the host is confronted with foreign antigens that may stimulate an immune response. The reason as to why the immune response could also be directed against self-antigens is obscure. A possible explanation for this phenomenon might be via epitope spreading (ES). Various studies have demonstrated that ES contributes to the chronic pathogenesis of T-cell-mediated and antibody-mediated autoimmune diseases.¹¹⁻¹⁴ The term ES refers to the development of immune responses to epitopes distinct from and non-cross-reactive with the dominant epitope.^{15,16} The response may spread to epitopes on the

TABLE 1. ALLOs with and without AABs*

Specificity†	Cases with ALLOs		Normalized OR
	And AABs	Without AABs	
Anti-D	64	1036	0.5
Anti-C	97	404	1.8
Anti-c	31	231	1.0
Anti-C ^w	59	268	1.6
Anti-E	143	800	1.4
Anti-e	5	47	0.8
Anti-f	4	13	2.2
Anti-K	52	595	0.6
Anti-k	0	3	
Anti-Kp ^a	19	61	2.3
Anti-Kp ^b	0	3	
Anti-Ku	0	2	
Anti-Fy ^a	21	233	0.7
Anti-Fy ^b	3	37	0.6
Anti-Jk ^a	38	247	1.1
Anti-Jk ^b	9	63	1.0
Anti-Lu ^a	23	217	0.8
Anti-Lu ^b	0	17	
Anti-Lu4	0	4	
Anti-Lu6	0	1	
Anti-Lu8	0	5	
Anti-M	9	311	0.2
Anti-N	2	16	0.9
Anti-S	35	88	2.9
Anti-s	3	16	1.3
Anti-U	0	2	
Anti-Vw	2	3	4.8
Anti-Mt ^a	0	3	
Anti-Mit	1	2	3.6
Anti-M1	0	1	
Anti-He	0	1	
Anti-Le ^a	9	237	0.3
Anti-Le ^b	2	85	0.2
Anti-Xg ^a	0	1	
Anti-P ₁	4	125	0.2
Anti-P	0	3	
Anti-Wr ^a	61	59	7.7
Anti-Di ^a	3	6	3.6
Anti-Co ^a	0	5	
Anti-Co ^b	3	11	1.9
Anti-Do ^b	0	1	
Anti-Ge	0	6	
Anti-Yt ^a	0	16	
Anti-Yt ^b	2	7	2.0
Anti-Sc2	1	0	
Anti-In ^b	0	1	
Anti-AnWj	0	1	
Anti-LW ^a	0	8	
Anti-Ch	1	61	0.1
Anti-Fg	1	8	0.9
Anti-Kn ^a	0	21	
Anti-KnMcC	0	19	
Anti-McC ^a	0	2	
Anti-Si ^a	0	1	
Anti-Yk ^a	0	11	
Anti-Cs ^a	2	6	2.4
Anti-JMH	0	5	
Anti-Vel	0	12	
Anti-Lan	0	2	
Anti-Jr ^a	0	2	
Anti-MAM	0	1	
Any ALLO	412	4209	1.0

* A total of 204,330 patients and healthy donors were investigated.
 † Antibodies were observed either alone or in combination with other antibodies.

causative antigen (intramolecular ES) or to epitopes on other antigens (intermolecular ES). These epitopes are often cryptic epitopes on the same molecule or dominant epitopes on neighboring molecules. In addition, regardless of the initial antigenic stimulus, the specificity of the immune response spreads to include self-epitopes other than those that initiate the immune response.¹⁷⁻¹⁹

It has been previously demonstrated that the Rh proteins are directly associated with Band 3, and glycophorin B is associated with the Rh proteins.^{20,21} In this context, immunization against an alloantigen would spread to neighboring, common structures that would normally not be exposed to the immune system. This is supported by the correlation of alloimmunization and autoimmunization after blood transfusion and, less commonly, after pregnancy. In fact, the majority of associated ALLOs and AABs appear to be directed against neighboring antigens, which are the Rh antigens and glycophorin B (for, e.g., S antigen) that are jointly located within a supramolecular complex.^{21,22} Most importantly, Rh antigens that are lacking on Rh_{null} cells represent the most immunogenic and clinically relevant blood group antigens. The majority of all immune ALLOs are directed against Rh antigens, and the majority of AABs do not react with Rh_{null} RBCs.²⁰ It is of importance to note that the target structures for RBC AABs are abundant on the RBC membrane.^{23,24} Accordingly, the coincidence of AABs and ALLOs is, if the theory of ES is correct, not surprising. One of the alternate interpretations might be that the S phenotype is linked to immune-regulatory genes that predispose to autoimmunization. This is supported by the fact that anti-s is less associated to AABs than anti-S.

In the case of antibodies associated with RBC transfusion, the primary immune response is directed against foreign antigens and may spread to self-antigens. Similarly, in circumstances of antibodies related to pregnancy, the primary reaction could be against the S antigen and may spread to self-antigens. The question as to how pregnancy can also lead to the production of AABs without ALLOs cannot be definitively answered. Roughly 25 percent of all pregnancies are ABO-mismatched, however, and mismatched fetal cells are repeatedly destroyed by the immune system of the affected pregnant women. This long-lasting inflammatory response may result in a secondary immune response against antigens presented on fetal RBCs as well as on the mother's RBCs, that is, autoantigens.

ES has been suggested to occur, if the immune system fails to immediately clear the target. In such cases, a more diversified inflammatory response might be observed.¹⁶ The lasting antigenic exposure in pregnancy, in contrast to that after blood transfusion, could explain why anti-S and AAB are predominantly identified in prenatal investigations.

TABLE 2. Subgroup analysis of antibody combinations

Specificity	Normalized OR			
	All patients and donors	Healthy blood donors	Local patients	Prenatal screening
Anti-C + AAB	1.8	2.1	2.0	1.4
Anti-E + AAB	1.4	1.1	1.4	1.8
Anti-Fy ^a + AAB	0.7	1.5	0.6	
Anti-Jk ^a + AAB	1.1	1.5	1.3	
Anti-S + AAB	2.9	2.9	2.9	15.1

Dendrogram using Ward Method

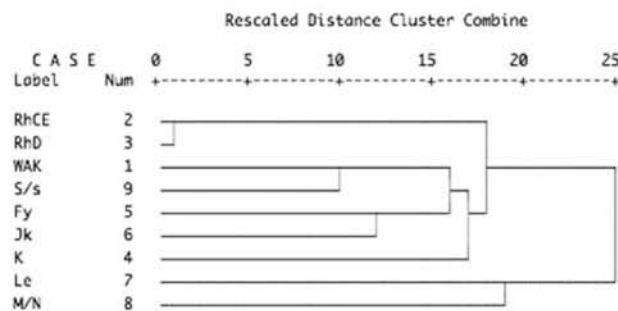


Fig. 3. Blood group similarity dendrogram. Hierarchical cluster analysis of patients and donors ($n = 204,330$) of blood group antibody similarity. Close associations are marked by linking bars on the left-hand side of the graph. The looser an association is, the more it appears as a linkage to the right (i.e., left = similar; right = unequal). Owing to the hierarchical procedure, only the first linkage and closest association can be interpreted.

Other causes for this association such as biasing by referring laboratories are unlikely, because methodologically similar complicated antibody combinations such as anti-C and/or anti-E together with AABs were comparably overrepresented in prenatal cases (Table 2). Furthermore, anti-Fy^a or anti-Jk^a in combination with AABs did not occur in a single prenatal case, despite being equally difficult to investigate when compared with anti-S and AAB.

The association between anti-S and AABs can be explained neither by cross-reactivity nor by mimicking allospecificity as described by Issitt and coworkers.²⁵ Anti-S and AAB bind to different structures: anti-S to glycophorin B and AABs to Rh proteins. The S antigen on glycophorin B is destroyed by treating RBCs with suitable enzymes, whereas the Rh proteins become easily accessible via this modification. As a result, anti-S does not react with these cells, whereas AABs react considerably stronger. This illustrates that anti-S cannot be explained by AAB pseudoalloreactivity (mimicking specificity).

Surprisingly, anti-D was found to be inversely associated with AABs. The difference in the association between antibodies to the RHCE protein compared to those of the RHD protein might be explained by the different

immunologic structure. Antibodies to antigens on the RHCE protein recognize a single-amino-acid difference, whereas anti-D is directed against the entire RHD protein with all its epitopes. The production of specific antibodies against antigens similar to self-antigens is more difficult than the production of antibodies to antigens that less resemble autoantigens. Thus, further cases resulting in accidental cross-reactive AAB production in the preceding case are more likely to occur.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank S. Kamhieh for grammatical corrections. The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

- Hoeltge GA, Domen RE, Rybicki LA, Schaffer PA. 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; 119:42-5.
- Winters JL, Pineda AA, Gorden LD, Bryant SC, Melton LJ 3rd, Vamvakas EC, Moore SB. RBC alloantibody specificity and antigen potency in Olmsted County, Minnesota. *Transfusion* 2001;41:1413-20.
- Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M, Jones J. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10th ed. Oxford: Blackwell Science; 1997. p. xxiii, 754.
- Ahrens N, Pruss A, Kähne A, Kiesewetter H, Salama A. Coexistence of autoantibodies and alloantibodies to red blood cells due to blood transfusion. *Transfusion* 2007;47: 813-6.
- King K, Shirey R, Lankiewicz M, Young-Ramsaran J, Ness P. Delayed hemolytic transfusion reactions in sickle cell disease: simultaneous destruction of recipients' red cells. *Transfusion* 1997;37:376-81.
- Zumberg MS, Procter JL, Lottenberg R, Kitchens CS, Klein HG. Autoantibody formation in the alloimmunized red

- blood cell recipient: clinical and laboratory implications. *Arch Intern Med* 2001;161:285-90.
7. Garratty G. Autoantibodies induced by blood transfusion. *Transfusion* 2004;44:5-9.
 8. Young PP, Uzieblo A, Trulock E, Lublin DM, Goodnough LT. Autoantibody formation after alloimmunization: are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia? *Transfusion* 2004;44:67-72.
 9. Salama A, Mueller-Eckhardt C. Delayed hemolytic transfusion reactions. Evidence for complement activation involving allogeneic and autologous red cells. *Transfusion* 1984;24:188-93.
 10. Hoppe B, Stibbe W, Bielefeld A, Pruss A, Salama A. Increased RBC autoantibody production in pregnancy. *Transfusion* 2001;41:1559-61.
 11. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 1992;358:155-7.
 12. Lehmann PV, Sercarz EE, Forsthuber T, Dayan CM, Gammon G. Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. *Immunol Today* 1993;14:203-8.
 13. McCluskey J, Farris AD, Keech CL, Purcell AW, Rischmueller M, Kinoshita G, Reynolds P, Gordon TP. Determinant spreading: lessons from animal models and human disease. *Immunol Rev* 1998;164:209-29.
 14. Farris AD, Keech CL, Gordon TP, McCluskey J. Epitope mimics and determinant spreading: pathways to autoimmunity. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:569-78.
 15. Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 1996;8:831-6.
 16. Dai YD, Carayanniotis G, Sercarz E. Antigen processing by autoreactive B cells promotes determinant spreading. *Cell Mol Immunol* 2005;2:169-75.
 17. Torres BA, Kominsky S, Perrin GQ, Hobeika AC, Johnson HM. Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226:164-76.
 18. Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002;2:85-95.
 19. Mackay IR, Rowley MJ. Autoimmune epitopes: autoepitopes. *Autoimmun Rev* 2004;3:487-92.
 20. Cartron JP. RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999;12:655-89.
 21. Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delaunay J, Mohandas N, Anstee DJ, Tanner MJ. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 2003;101:4180-8.
 22. Van Kim CL, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev* 2006;20:93-110.
 23. Pierce SW, Victoria EJ, Masouredis SP. Red cell autoantibodies characterized by competitive inhibition of iodine 125 Rh alloantibody binding and by immunoprecipitation of membrane proteins. *J Lab Clin Med* 1990;116:805-13.
 24. Victoria EJ, Pierce SW, Branks MJ, Masouredis SP. 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;115:74-88.
 25. Issitt PD, Combs MR, Bumgarner DJ, Allen J, Kirkland A, Melroy-Carawan H. Studies of antibodies in the sera of patients who have made red cell autoantibodies. *Transfusion* 1996;36:481-6. ■

3.3 Begleitende Autoantikörper bei Medikamenten-Antikörpern

Mit der vorangestellten Arbeit konnte die Bedeutung des räumlichen Aspekts für die Antigenität aufgezeigt werden. Der Einfluß einer Alteration von Antigenen wird bei der Bildung von Neoantigenen deutlich, die zur Bildung von Medikamenten-abhängigen Antikörpern führen können. In den nachfolgenden drei Publikationen werden diese Zusammenhänge für Rifampicin und Diclofenac näher untersucht.

3.3.1 Rifampicin

Ahrens N, Genth R, Salama A. Belated diagnosis in three patients with rifampicin-induced immune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2002;117(2):441-443

Zusammenfassung

Rifampicin wird in der Tuberkulosebehandlung eingesetzt und verursacht bei hochdosierter, niedrig-frequenter Gabe grippeähnliche Symptome. Diese können bei bis zu 40% der Patienten auftreten, wenn 1800 mg einmal wöchentlich gegeben werden.⁹³ Einige dieser Patienten weisen eine Hämolyse auf, die in der Regel auf Rifampicin-abhängige Antikörper zurückzuführen ist. Zusätzlich kann Rifampicin die Bildung von Autoantikörpern induzieren.⁶ Für das zusätzliche Vorliegen von Autoantikörpern spricht in diesen Fällen der Nachweis von IgG auf autologen Erythrozyten und ein positives Eluat. Für diese Untersuchung wurden die Zellen ohne Rifampicin mehrfach gewaschen, und das Eluat wurde ohne Rifampicin getestet.

In pathophysiologischer Hinsicht bedeutsam ist eine Blutgruppenspezifität der Rifampicin-abhängigen Antikörper für das Rh-Antigen C.⁶ Andere Blutgruppenspezifitäten von Rifampicin-abhängigen Antikörpern sind für die Blutgruppensysteme Lutheran und I bekannt.^{6,206}

Diese Arbeit zeigt, daß Rifampicin eine Immunhämolyse verursachen kann, die auf unterschiedliche Antikörper zurückzuführen ist. Parallel zu Rifampicin-abhängigen Antikörpern können Autoantikörper auftreten. Die beobachtete Blutgruppenspezifität zeigt, daß erythrozytäre Antigene primär am Immunisierungsprozeß beteiligt sind und legt eine ähnliche Pathophysiologie für Medikamenten-abhängige Antikörper und medikamentös induzierte Autoantikörper nahe.

Belated diagnosis in three patients with rifampicin-induced immune haemolytic anaemia

NORBERT AHRENS, RAMONA GENTH AND ABDULGABAR SALAMA *Institute of Transfusion Medicine, Campus Virchow-Klinikum, University Hospital Charité, Humboldt-University, Berlin, Germany*

Received 20 August 2001; accepted for publication 8 November 2001

Summary. We report three patients who developed haemolysis following rifampicin treatment. Initially, autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) of the warm type and/or an acute haemolytic transfusion reaction (AHTR) was suggested. The direct antiglobulin tests (DAT) were strongly positive for IgG and C3d, and tests for rifampicin-dependent antibodies were positive in all three cases, featuring C-specificity in one case. The outcome was fatal in two out of the three cases, presumably due to belated diagnosis. This

shows that rifampicin may stimulate the production of autoantibodies (aab) and/or drug-dependent antibodies (ddab), and that the resulting haemolytic syndrome bears similarities with AIHA and AHTR.

Keywords: drug-induced haemolysis, drug-dependent antibodies, rifampicin, tuberculosis, immune haemolytic anaemia.

Rifampicin has been reported to cause haemolysis due to the production of drug-dependent antibodies (ddab). The coincidence of ddab and warm-reactive autoantibodies (aab) to red blood cells (RBCs) has not yet been described (Lakshminarayan *et al.* 1973; Worledge, 1973; Girling, 1977; Tahan *et al.* 1985; Govoni *et al.* 1990). In this study, we report on three patients exhibiting the simultaneous development of aab and ddab in response to rifampicin treatment.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Patient no. 1. This 46-year-old man with pulmonary tuberculosis and alcohol-toxic hepatopathy, blood group O ccD.Ee, was admitted for tuberculostatic therapy (rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and streptomycin). Then, 10 days later, he developed somewhat acute, but not abrupt haemolysis and his haemoglobin dropped from 12.1 g/dl to 5.8 g/dl within a few days. Lactate dehydrogenase rose from 516 U/l to 1152 U/l, and bilirubin rose from 8.55 µmol/l to 120 µmol/l (conjugated bilirubin 99.2 µmol/l). The direct antiglobulin test (DAT) was strongly positive for IgG and C3d, and autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) of the warm type was suggested. Consequently, treatment with

prednisolone was started. Unfortunately, the drugs were continuously administered, and the subsequent haemolysis resulted in death. There was no evidence for clinically significant impairment of liver.

Patient no. 2. This 23-year-old woman with pulmonary tuberculosis, blood group AB CcD.Ee, was treated with ethambutol, pyrazinamide, rifampicin and isoniazid. Some weeks later, drug-induced hepatitis was suspected, and the drugs were temporarily discontinued, then later re-administered. The patient subsequently developed severe haemolytic anaemia, her haemoglobin dropped to 5.3 g/dl, and lactate dehydrogenase rose to 1533 U/l. The DAT was strongly positive for IgG and C3d, and AIHA was suggested. Therefore, treatment with prednisolone was started. Although the correct diagnosis was belated, the patient survived and haemolysis ceased after discontinuation of rifampicin. There was no evidence for hepatitis as had initially been assumed.

Patient no. 3. This 47-year-old man with pulmonary atypical mycobacteriosis and carcinoma of the larynx, blood group O CCD.ee, was treated with rifampicin, pyrazinamide, ethambutol and, initially, with isoniazid. Eight months later, he was admitted to hospital and anaemia (presumably tumour-associated) was found. After the transfusion of two packed RBC units, acute haemolysis was observed. The DAT became strongly positive for IgG and C3d. Therefore, AIHA or acute haemolytic transfusion reaction (AHTR) was suspected. The patient ultimately developed acute renal failure and died.

Correspondence: Dr Norbert Ahrens, Charité Campus Virchow-Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. E-mail: norbert.ahrens@charite.de

Methods

Serological tests, including identification of ddab, were performed as described previously (Salama *et al.* 1996), using the Micro-Typing-System (DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland). Samples that appeared to contain residual drugs were dialysed and re-tested in the absence and presence of rifampicin (Salama *et al.* 1996). The following commercially available reagents were used: Anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA (Biotest, Dreieich, Germany), anti-C3d (Dako, Hamburg, Germany), acid elution reagents (Immucon, Roedermark, Germany) and rifampicin (Fatol, Schiffweiler, Germany).

RESULTS

Based on the clinical and initial serological findings, the doctors at the local hospitals initially suspected AIHA in two cases and/or AHTR in the third case. Indeed, serological re-examination at our laboratory revealed DATs that were strongly positive for IgG and C3d in all three cases (Table I). The indirect antiglobulin test (IAT) was somewhat positive in all patients using undialysed serum. In contrast, dialysis of serum samples resulted in completely negative reactions in two cases (patients nos. 1 and 3), but not in patient no. 2 whose serum remained reactive only with C-positive RBCs. This indicated that all three serum samples still contained the drug and/or its reactive metabolites. The reactions related to the serum of patient no. 2 were thus reflected by ddab and free aab (autoanti-C). The eluate obtained from the RBCs of patient no. 2 was IAT-positive, with both C-positive and negative RBCs. Unfortunately, no eluate could be tested in the remaining two cases owing to the shortage of RBCs.

In the presence of rifampicin, there were strong reactions with RBCs. None of the samples exhibited direct reactivity with untreated RBCs (Table II). The IAT was not performed in the presence of rifampicin because of the direct RBC agglutination in all three cases. This finding may indicate that the ddab were, at least partly, of the IgM class. Investigations for ddab in the presence of the other prescribed drugs were negative. Interestingly, ddab in patient no. 3 reacted only with C-positive RBCs.

Table I. Results obtained upon routine testing and using undialysed serum.

Patient no.	IAT*		DAT*	
	C-neg.	C-pos.	IgG	C3d
1	1†	1†	4	4
2	1†	3	3	4
3	–	1–2†	3	4

*Agglutination score, ranging from: –, negative; 1, weak; 2, moderate; 3, strong; 4, very strong.

†Reactions abolished if the serum was dialysed before testing.

IAT and DAT, indirect and direct antiglobulin tests respectively.

Table II. Results of drug-dependent antibody testing using dialysed patients' serum samples.

Patient no.	Drug-dependent antibody test	RBC	
		C-neg.	C-pos.
1	PS + RBC + NaCl	–	–
	AB + RBC + Rifampicin	–	–
2	PS + RBC + Rifampicin	3	3
	PS + RBC + NaCl	–	–
	AB + RBC + Rifampicin	–	–
3	PS + RBC + Rifampicin	3	3
	PS + RBC + NaCl	–	–
	AB + RBC + Rifampicin	–	–
	PS + RBC + Rifampicin	–	2

PS, patients' serum; AB, donor serum.

DISCUSSION

Rifampicin has been implicated as the causative drug for immune haemolysis in several reports (Lakshminarayan *et al.* 1973; Worlledge, 1973; Girling, 1977; Tahan *et al.* 1985; Govoni *et al.* 1990). Although the patients described in this study had been receiving the drug when haemolysis developed, AIHA was diagnosed in two cases and suspected in the third. This assumption was based on the clinical and serological findings. The onset of haemolysis was not abrupt, and the DAT was strongly positive not only or predominantly for C3d, but also for IgG. This constellation is more typical of AIHA than drug-induced immune haemolysis of the so-called immune-complex type.

The possibility that the haemolysis and/or DAT positivity could be attributed to the underlying diseases is unlikely as (i) the haemolysis was largely intravascular (haemoglobinuria and reddish serum samples); (ii) the patients were receiving drugs, including rifampicin; and (iii) the haemolysis seemed to be refractory to treatment with steroids in patients nos. 1 and 2.

Most intriguingly, the findings in patient no. 3 appeared, at first glance, to be largely typical for AHTR. Haemolysis was observed during a RBC transfusion only by chance. His serum contained anti-C, and the DAT was strongly positive after the blood transfusion. However, the assumption of AHTR cannot be supported because of the following reasons: (i) the patient's RBCs were C-positive before the blood transfusion; (ii) it is absolutely unlikely that undetectable alloantibodies would become to be strongly detectable immediately after a transfusion of two packed units of RBCs; and (iii) the patient had received rifampicin intravenously directly before the RBC-transfusion. Altogether, the most likely explanation is that the patient must have developed drug-induced immune haemolytic anaemia.

The finding that ddab reacted only with C-positive RBCs in patient no. 3 is not surprising. Many drugs (Salama & Mueller-Eckhardt, 1992) have been shown to induce the production of ddab that recognize well known RBC antigens. Rifampicin-dependent antibodies have so far been

described with Lutheran- or I-specificity (Durán-Suárez *et al.* 1981; Habibi & Bretagne, 1983; Pereira *et al.* 1991).

Antibodies, associated with drug, which react with RBCs, without drug being present, may not be autoantibodies but rather circulating immune drug-anti drug immune complexes that attach to RBCs *in vitro* and appear to be autoantibodies (Garratty *et al.* 1981; Sosler *et al.* 1984). The IgG-DAT positivity in the presented cases seems, however, to be related to 'true' aab instead of drug-antibody complexes because of a number of reasons. First, patients' RBCs were washed three times before testing, and the IgG-DAT positivity did not change. Second, the reactivity of the ddab was reflected by direct RBC agglutination, whereas patients' RBCs in absence of rifampicin became agglutinable only with the addition of antiglobulin serum. Third, the eluate obtained from washed RBCs from patient no. 2 was reactive without adding the drug to the incubation mixture, and the reactivity of the serum was not abolished after dialysis as could be demonstrated by the other two cases.

There is one brief report on one patient who appears to have also simultaneously developed rifampicin-dependent and drug-independent antibodies (Govoni *et al.* 1990). In that case, the *in vitro* reactions with RBCs, without rifampicin, disappeared after five plasma exchanges, but the drug-dependent reactions remained. Although this finding may indicate the presence of circulating drug-antidrug immune complexes, the possibility that the reactions might be reflected by low affinity aab could not be completely excluded. Whatever the nature of such reactions may be, serological re-examinations should be performed after the drug has been eliminated from the circulation to avoid misdiagnosis and inappropriate treatment.

REFERENCES

- Durán-Suárez, J.R., Martín-Vega, C., Argelagués, E., Massuet, L., Ribera, A. & Triginer, J. (1981) Red cell I antigen as immune complex receptor in drug-induced hemolytic anemias. *Vox Sanguinis*, **41**, 313–315.
- Garratty, G., Houston, M., Petz, L.D. & Webb, M. (1981) Acute immune intravascular hemolysis due to hydrochlorothiazide. *American Journal of Clinical Pathology*, **76**, 73–78.
- Girling, D.J. (1977) Adverse reactions to rifampicin in antituberculosis regimens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **3**, 115–132.
- Govoni, M., Moretti, M., Menini, C. & Focchi, F. (1990) Rifampicin-induced immune hemolytic anemia: therapeutic relevance of plasma exchange. *Vox Sanguinis*, **59**, 246–247.
- Habibi, B. & Bretagne, Y. (1983) Blood group antigens may be the receptors for immunoallergic drug complexes reacting with erythrocytes. *Comptes-Rendus Des Seances de l'Académie Des Sciences. Série III. Sciences de la Vie*, **296**, 693–696.
- Lakshminarayan, S., Sahn, S.A. & Hudson, L.D. (1973) Massive haemolysis caused by rifampicin. *British Medical Journal*, **2**, 282–283.
- Pereira, A., Sanz, C., Cervantes, F. & Castillo, R. (1991) Immune hemolytic anemia and renal failure associated with rifampicin-dependent antibodies with anti-I specificity. *Annals of Hematology*, **63**, 56–58.
- Salama, A. & Mueller-Eckhardt, C. (1992) Immune-mediated blood cell dyscrasias related to drugs. *Seminars in Hematology*, **29**, 54–63.
- Salama, A., Kroll, H., Wittmann, G. & Mueller-Eckhardt, C. (1996) Diclofenac-induced immune haemolytic anaemia: simultaneous occurrence of red blood cell autoantibodies and drug-dependent antibodies. *British Journal of Haematology*, **95**, 640–644.
- Sosler, S.D., Behzad, O., Garratty, G., Lee, C.L., Postaway, N. & Khomo, O. (1984) Acute hemolytic anemia associated with a chlorpropamide-induced apparent auto-anti-I_ka. *Transfusion*, **24**, 206–209.
- Tahan, S.R., Diamond, J.R., Blank, J.M. & Horan, R.F. (1985) Acute hemolysis and renal failure with rifampicin-dependent antibodies after discontinuous administration. *Transfusion*, **25**, 124–127.
- Worledge, S. (1973) Hong Kong Treatment Services-Royal Postgraduate Medical School-British Medical Research Council Co-operative Study of rifampicin plus ethambutol in daily and intermittent regimens. The detection of rifampicin-dependent antibodies. *Scandinavian Journal of Respiratory Diseases (Supplementum)*, **84**, 60–63.

3.3.2 Diclofenac

Ahrens N, Schewior L, Garbe E, Kieseewetter H, Salama A. Massive haemolysis after intramuscular diclofenac in a patient who apparently tolerated oral medication. *Vox Sang* 2004; 86(1): 71–74

Ahrens N, Genth R, Kieseewetter H, Salama A. Misdiagnosis in patients with diclofenac-induced hemolysis: new cases and a concise review. *Am J Hematol* 2006; 81(2): 128–131

Zusammenfassung

Diclofenac ist ein weitverbreitetes nicht-steroidales Antiphlogistikum, das mit dem Bekanntwerden des Nebenwirkungsspektrums COX2-spezifischer Inhibitoren (Rofecoxib, Celecoxib, Valdecoxib) wieder vermehrt eingesetzt wird. Diclofenac ist für die orale, intravenöse und intramuskuläre Verwendung zugelassen.

Diclofenac kann Medikamenten-abhängige Antikörper vom „Immunkomplex“-Typ und Autoantikörper gegen Erythrozyten und auch Thrombozyten verursachen.¹⁵⁵ Die resultierende Immunhämolyse ist in der Regel abrupt und in vielen Fällen mit akutem Nierenversagen assoziiert, d.h. bei 23 von 46 Fällen (50%). Der Verlauf war in 7 von diesen fatal (15%).^{18,204} – Weitere 15 Fälle wurden ohne klinische Angaben publiziert.

Die vorgestellten Arbeiten erlauben erstmals eine Einschätzung der Inzidenz systemischer Komplikationen bei Diclofenac-abhängigen Antikörpern und beschreiben erstmals die Bedeutung der Applikationsform für die klinische Manifestation dieser Antikörper.

Zudem erlauben diese Arbeiten eine Verallgemeinerung der bei Rifampicin gemachten Beobachtungen. Medikamenten-abhängige Antikörper mit partieller Blutgruppenspezifität für das Rh-Antigen C konnten ebenfalls für Diclofenac in einigen Fällen nachgewiesen werden. Zudem wurden Autoantikörper parallel zu Medikamenten-abhängigen Antikörpern beobachtet.

ORIGINAL PAPER

Massive haemolysis after intramuscular diclofenac in a patient who apparently tolerated oral medication

N. Ahrens,¹ L. Schewior,² E. Garbe,³ H. Kiesewetter¹ & A. Salama¹

¹Institute for Transfusion Medicine, Charité – University Medicine Berlin, Berlin, Germany

²Department of Nephrology and Internal Intensive Care Medicine, Charité – University Medicine Berlin, Berlin, Germany

³Institute of Clinical Pharmacology, Charité – University Medicine Berlin, Berlin, Germany

Vox Sanguinis

Background and Objectives Administration of diclofenac may lead to immune haemolytic anaemia (IHA) owing to the presence of drug-dependent antibodies and/or autoantibodies. A relationship with oral or intramuscular drug administration is unknown. Here, we describe a patient who apparently tolerated oral diclofenac but developed severe IHA following intramuscular injection of the drug.

Patients and Methods A 66-year-old-female was admitted to hospital because of jaundice and nausea, which were initially presumed to be manifestations of a postcholecystectomy syndrome. The patient soon developed haemolysis and renal failure. Although the symptoms and signs were suggestive of autoimmune haemolytic anaemia (AIHA), the patient had diclofenac-induced IHA.

Results Serological testing, including detection of drug-dependent antibodies, was performed using standard techniques. The patient's serum was found to contain a highly reactive diclofenac-dependent red cell antibody of the immune complex type (titre 256 000). She recovered after 7 weeks of treatment with prednisolone, blood transfusions, haemodialysis and plasma exchange.

Conclusions Diclofenac-induced IHA should always be considered when a patient on diclofenac develops haemolysis.

Key words: diclofenac, drug-dependent antibodies, drug-induced haemolysis, immune haemolytic anaemia.

Received: 8 September 2003,
revised 20 October 2003,
accepted 3 November 2003

Introduction

Diclofenac is a widely used non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that is available in oral, intravenous and intramuscular dosage forms. It can lead to the formation of drug-dependent antibodies of the immune complex type and/or to autoantibodies to red blood cells (RBCs) [1]. There are several reports of this syndrome in the literature [2–5]. The clinical and serological findings are extremely variable, leading to confusion in many cases. In addition to haemolytic anaemia, affected patients may also develop life-threatening complications

[1,2,6] that could possibly have been alleviated or prevented if the diagnosis had been correctly estimated immediately.

Case Report

A 66-year-old-female with a history of mild hypertension, anamnestic allergy to penicillin, and lower back pain had taken oral diclofenac, as required, for several years. In addition, had received an intramuscular injection of diclofenac 6 years previously, and 1 day prior to admission (75 mg), because of sudden pain in her right leg. One day after the latter injection, she was admitted to hospital with jaundice and nausea. This was initially thought to be related to a cholecystectomy that had been carried out 5 weeks previously.

On admission (day 1), the patient was obviously jaundiced, but investigations using abdominal ultrasound, abdominal computerized tomography (CT) and retrograde

Correspondence: Dr Norbert Ahrens, Institut für Transfusionsmedizin, Charité Campus Virchow-Klinikum, Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin, Germany
E-mail: norbert.ahrens@charite.de

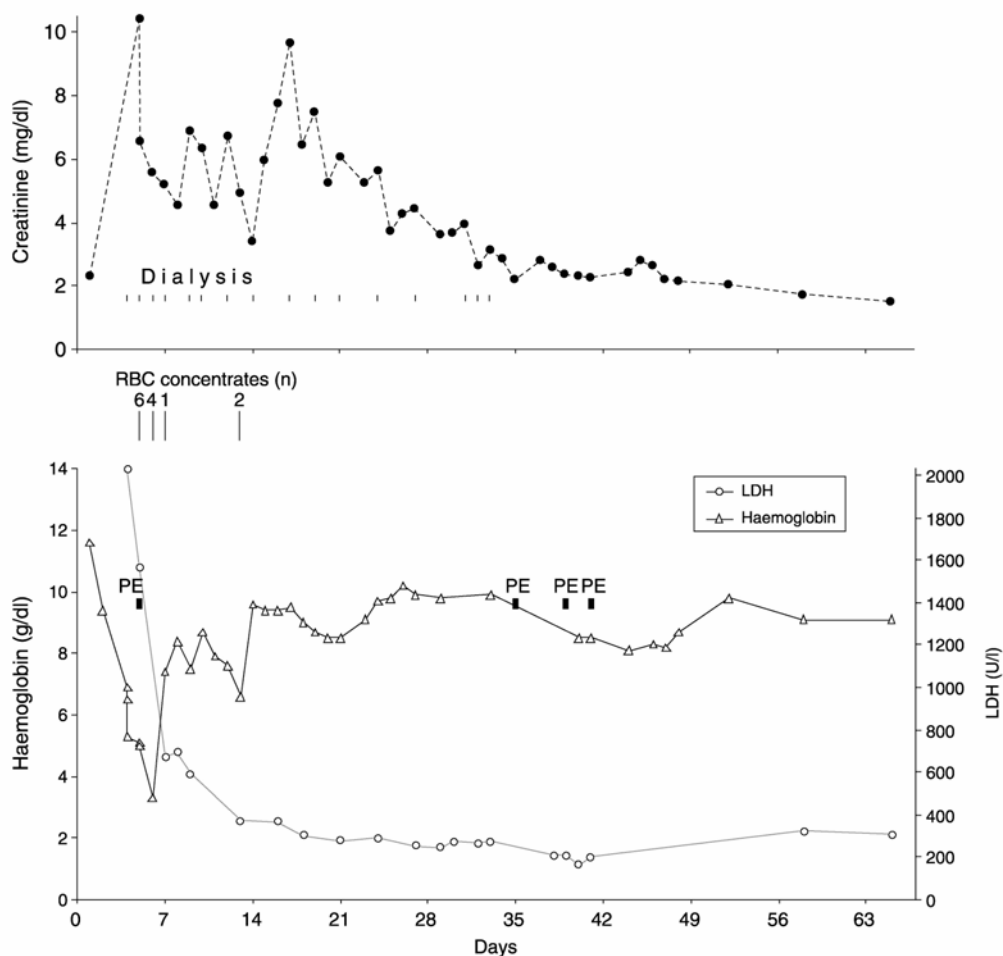


Fig. 1 Treatment and course of haemolysis and renal failure after intramuscular diclofenac application (day 0). LDH, lactate dehydrogenase; PE, plasma exchange; RBC, red blood cell.

cholangio-pancreatography, revealed no underlying abnormality. The patient's initial haemoglobin and creatinine levels were 11.6 g/dl and 2.3 mg/dl, respectively. Her haemoglobin decreased to 3.3 g/dl after 7 days. Evidence for haemolysis was derived from lactate dehydrogenase (LDH, 2028 U/l), haptoglobin (6 mg/dl) and plasma haemoglobin (12 mg/dl) measurements. In addition, the patient developed acute prerenal failure and required haemodialysis (Fig. 1).

During hospitalization, the patient received a total of 13 RBC units and four plasma exchanges (3 l each) in addition to dialysis (Fig. 1). Plasma exchange was initially applied to rapidly reduce the antibody load. In fact, haemolysis decreased and her general condition improved. Three additional plasma exchanges were applied to improve the renal function. After 7 weeks of treatment, the patient was discharged from the

hospital without signs of haemolysis and with recompensated renal function (calculated creatinine clearance 37 ml/min; method by Cockcroft).

Methods

Immunohaematological investigations were carried out using gel cards for direct and indirect antiglobulin testing (ID-System; DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland). The tube technique with low ionic strength solution (LISS) was used for cross-matching [8]. Tests for drug-dependent antibodies were performed by using the gel card technique, as described previously [1,9,10]. Briefly, untreated pooled panel cells were incubated with serum and diclofenac (Ratiopharm, Ulm, Germany) or with *ex vivo* antigen (urine from other patients who received

diclofenac). A commercial acid technique kit (Immuco, Rödermark, Germany) was used for elution.

If not indicated, investigations were performed with samples on day 4 of hospitalisation.

Results

The direct antiglobulin test (DAT) was strongly positive for immunoglobulin G (IgG) and weakly positive for C3d. The indirect antiglobulin test (IAT), performed using the gel card technique, was initially strongly positive with e-positive RBCs and weakly positive with e-negative RBCs. The eluate from autologous RBCs agglutinated all RBCs tested. As these findings were suggestive of autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) of the warm type, treatment with steroids (100 mg/day prednisolone) was started. Surprisingly, crossmatching by the tube technique was negative. The discrepancy with the gel card results led us to assume that the positivity of the latter test might be caused by the presence of drug-dependent antibodies, as drugs may be removed by washing included in the tube technique, but not in the gel card system. On direct questioning, the patient revealed that she was indeed on diclofenac and that she had received an intramuscular injection of diclofenac 1 day prior to admission. Retesting of the patient's serum samples in the presence of diclofenac or its *ex vivo* metabolites (gel card system) showed that the serum contained a highly reactive diclofenac-dependent antibody of the immune-complex type (Table 1). In addition, undialysed eluate showed somewhat stronger reactions than dialysed eluate, indicating that the drug was attached onto the cell membranes.

Although the active haemolysis persisted for a relatively long period of time, no diclofenac was detected in the blood samples when tested using high-performance liquid chromatography (HPLC) (kindly performed by Dr Lampe, Berlin, on four samples from days 4, 9, and 13), presumably because of the short half-life (< 2 h) of diclofenac and its removal by haemodialysis.

Table 1 Reactivity of the patient's samples with screening red blood cells (RBCs), in the presence and absence of diclofenac or *ex vivo* metabolites, on antiglobulin gel cards

Test procedure	IAT (maximum titre)
Pooled RBCs + patient's serum (day 13) + saline	512
Pooled RBCs + patient's serum (day 27) + diclofenac	256 000
Pooled RBCs + patient's serum (day 27) + <i>ex vivo</i> antigen	256 000
Pooled RBCs + donor serum + diclofenac	Negative
Pooled RBCs + donor serum + <i>ex vivo</i> antigen ^a	Negative

^a*Ex vivo* antigen, urine (containing the drug and its metabolites) from other patients receiving diclofenac.

Discussion

Diclofenac is a widely used NSAID. The relatively large number of patients on diclofenac who develop immune haemolytic anaemia (IHA) and/or immune thrombocytopenia [1–5,11] reflects the immunogenicity of the drug. As in the vast majority of allergic reactions, it is absolutely impossible to predict which patients will be affected or to determine when immunization and clinical manifestation will take place [12]. The reaction may develop during continuous and intermittent therapy, or immediately following re-exposure to the causative drug [13].

From an immunological viewpoint, the time of occurrence of the primary immunization remains unclear. In the present case, the patient had frequently used the drug for several years. A primary immune response following the intramuscular injection of diclofenac prior to admission can be excluded because the reaction became apparent on the following day. Thus, it seems probable that the patient was already immunized, but the antibody was clinically insignificant during the oral medication. In contrast, the acute and life-threatening haemolysis occurred after administration of the intramuscular injection. Concerning yet-insignificant drug-dependent antibodies, we recently described a case of immune thrombocytopenia in a patient without apparent haemolysis whose serum contained a diclofenac-dependent red cell antibody [11].

In many patients with diclofenac-induced IHA, haemolysis is frequently confused with idiopathic AIHA and may be overshadowed by life-threatening complications [1,2]. The patient described here was also initially suspected of having AIHA of the warm type; the correct diagnosis could only be established because of her abnormal serological test results. Based on our experience, we suspect that many cases may be overlooked and that serious complications could be prevented or diminished in many patients if the correct diagnosis was established without a significant delay [6]. If diclofenac-induced IHA is suspected, all efforts should be made to prevent shock and/or renal failure.

Finally, diclofenac appears to be responsible for the long-lasting haemolysis detected while the patient was under observation. However, neither diclofenac nor its metabolites could be detected in the serum samples, presumably because it had been removed or its levels had been strongly reduced by plasma exchanges and dialysis. It seems therefore that trace amounts of the drug were deposited in tissues and gradually released into the circulation or complexed by antibodies. The latter hypothesis may also provide an explanation for the discrepancy between a positive test result using the gelcard system and a negative crossmatch by the tube system. In addition, a contribution of metabolites with long half-lives to the lasting haemolysis cannot be excluded. It is also possible that part of the haemolysis was related to diclofenac-induced autoantibodies.

Whatever the mechanism for this type of IHA, drug-induced haemolysis should invariably be considered in all patients on diclofenac who develop signs or complications of haemolysis, including anaemia, jaundice, shock and/or renal failure.

Acknowledgements

We are indebted to Ramona Genth, Katrin Halle, Angela Herziger, Elena Pouchkina and Beata Reetz for their excellent technical assistance and would like to thank Dr Dagmar Lampe for providing HPLC data. This work was supported by the German Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte.

References

- 1 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**:640–644
- 2 Jürgensen JS, Seltsam A, Jörres A: Fatal acute diclofenac-induced immune hemolytic anemia. *Ann Hematol* 2001; **80**: 440–442
- 3 Bougie D, Johnson ST, Weitekamp LA, Aster RH: Sensitivity to a metabolite of diclofenac as a cause of acute immune hemolytic anemia. *Blood* 1997; **90**:407–413
- 4 de Quiros JF, Pinto V, Hevia S, Vigon R: Immune complex-mediated haemolytic anaemia and Evans syndrome induced by diclofenac. *Vox Sang* 1997; **72**:121–123
- 5 Kramer MR, Levene C, Hershko C: Severe reversible autoimmune haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with diclofenac therapy. *Scand J Haematol* 1986; **36**:118–120
- 6 Salama A, Ahrens N, Kiesewetter H: Serological and clinical aspects of autoimmune hemolytic anemias. *Infusionstherapie Transfusionsmedizin* 2002; **29**:206–217
- 7 Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; **16**:31–41
- 8 AABB: *Technical Manual*. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks, 2002
- 9 Ahrens N, Genth R, Salama A: Belated diagnosis in three patients with rifampicin-induced immune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2002; **117**:441–443
- 10 Salama A, Berghofer H, Mueller-Eckhardt C: Detection of cell-drug (haptens)-antibody complexes by the gel test. *Transfusion* 1992; **32**:554–556
- 11 Meyer O, Hoffmann T, Aslan T, Ahrens N, Kiesewetter H, Salama A: Diclofenac-induced antibodies to red blood cells and platelets: two case reports and a concise review. *Transfusion* 2003; **43**: 345–349
- 12 Parker CW: Allergic reactions in man. *Pharmacol Rev* 1982; **34**:85–104
- 13 Salama A, Mueller-Eckhardt C: Immune-mediated blood cell dyscrasias related to drugs. *Semin Hematol* 1992; **29**:54–63

Misdiagnosis in Patients With Diclofenac-Induced Hemolysis: New Cases and a Concise Review

Norbert Ahrens,* Ramona Genth, Holger Kiesewetter, and Abdulgabar Salama

Institute for Transfusion Medicine, Charité—University Medicine Berlin, Berlin, Germany

Diclofenac has been implicated in many cases of life-threatening immune hemolytic anemia (IHA). Nevertheless, confusion still occurs at the bedside and in the laboratory. Herein we report nine new patients and summarize all published cases (total, $n = 61$). Direct and indirect antiglobulin tests were performed according to standard procedures. Tests for drug-dependent antibodies were performed in the presence and absence of the target drugs and their ex vivo antigens (in the urine of patients treated with the drug). Diclofenac- and/or ex-vivo-antigen-dependent red cell antibodies were detected in all new cases. We identified nine new cases with diclofenac-dependent IHA. All cases were initially suspected to have an abdominal illness and/or autoimmune hemolytic anemia of warm type. Acute renal failure was present in three of the 9 new patients and in 20 of 37 published patients. Seven of the 46 patients died (15%), and clinical information is lacking in 15 other published cases. Diclofenac-dependent and/or ex-vivo-antigen-dependent IHA should always be considered when a patient on diclofenac develops acute renal failure and/or IHA. *Am. J. Hematol.* 81:128–131, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

Key words: drug-induced hemolysis; drug-induced acute renal failure; drug-dependent antibodies; diclofenac; immune hemolytic anemia

INTRODUCTION

Diclofenac is a widely used nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that has regained acceptance following the debate on cardiovascular side effects of COX-2-specific inhibitors (rofecoxib, celecoxib, valdecoxib) [1]. Diclofenac is available for oral, intravenous, and intramuscular use and as suppositories. Evidence has shown that the drug or its metabolites may lead to the production of drug-dependent antibodies (ddab) and/or autoantibodies (aab) to red blood cells (RBC) [2,3]. The resulting immune hemolytic anemia (IHA) is usually acute, and often associated with renal failure. Nevertheless, there are no cardinal symptoms, and the diagnosis must be established based on sound serologic investigations [4]. 52 cases of diclofenac-induced IHA have been published in the literature to date (Table I).

We found that diagnostic confusion at onset is extremely high. Many of the affected patients develop life-threatening complications, which are sometimes fatal. During the last few years, we identified nine

new cases that have not been published yet. The data on these and all previously published patients will be presented and discussed in this article.

PATIENTS AND METHODS

The patients were admitted to various hospitals in Germany during the last few years. Blood samples were sent to our laboratory because of unclear serologic findings. For tests in the laboratory, diclofenac for intravenous use (Ratiopharm, Ulm, Germany) was diluted (1 mg/mL) in phosphate-buffered saline. Urine containing the drug and its metabolites (ex vivo

*Correspondence to: Dr. Med. Norbert Ahrens, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Institut für Transfusionsmedizin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany.
E-mail: Norbert.Ahrens@Charite.De

Received for publication 21 April 2005; Accepted 7 June 2005

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
DOI: 10.1002/ajh.20494

TABLE I. Reported Cases With Diclofenac-Induced Hemolysis

No. of patients	Renal failure	Death	Ref.
2	0/2	0	[15]
1	0/1	0	[16]
1	1/1	0	[17]
1	1/1	0	[18]
1	1/1	1	[2]
1	1/1	0	[19]
2	1/2	0	[3]
1	0/1	0	[20]
1	1/1	0	[21]
1	1/1	0	[22]
15 ^a	9/15	2	[5]
1	1/1	0	[23]
1	1/1	0	[24]
1	0/1	0	[25]
3	NA	NA	[26]
1	0/1	0	[27]
1	1/1	1	[28]
2	0/2	0	[8]
2 ^b	0/2	0	[9]
12	NA	NA	[14]
1	1/1	0	[29]
9	3/9	3	This study
61	23/46	7/23	Total

^aTwo of the 17 reported patients were previously described [3].
^bThis report includes one patient with asymptomatic diclofenac-dependent red-cell antibodies.

antigen) was collected from patients receiving 150 mg of the drug daily, as described previously [5]. Antibody screening and direct (DAT) and indirect antiglobulin tests (IAT) were performed by the standard gel technique (DiaMed, Cressier sur Morat, Switzerland) [6]. All antiglobulin reagents used were from commercial sources (anti-C3d—Dako, Copenhagen, Denmark; anti-IgG, anti-IgA, and anti-IgM—Bio-test, Dreieich, Germany). RBC-bound antibodies

were eluted by the acid method (Immucor, Rödermark, Germany). Drug-dependent antibodies were assessed by the tube and/or the gel technique, as described previously [5,7], i.e., IAT-negative patient sera (25 µL) were incubated with donor RBCs (50 µL of a 1% v/v suspension) in the absence (25 µL of saline, controls) or presence of diclofenac (25 µL) or its ex vivo antigen (50 µL). Sera that were positive in the IAT before the addition of diclofenac were dialyzed to eliminate residual drug and/or metabolites and then tested. Drug-dependent antibodies were separated from autoantibodies as has been described earlier [5].

RESULTS

Diclofenac-dependent IHA was not suspected on admission in any of the nine new cases (Table II). Initially, acute abdomen and later AIHA (nos. 3 and 4) or a transient ischemic attack (no. 9) were suspected in three patients, all of whom died shortly after the onset of hemolysis (42, 20, and 72 hr after the last diclofenac application, respectively). The remaining six patients (nos. 1, 2, 5–8) developed jaundice, and were initially thought to have AIHA due to warm-reactive autoantibodies. These patients recovered after discontinuation of diclofenac and inpatient glucocorticoid treatment (12–20 days).

The serologic test results at our laboratory suggested drug-induced IHA. Further investigation revealed that all patients had been treated with diclofenac. Drug-dependent antibodies against diclofenac and/or its metabolites were identified in all patients (Table III). In addition, the indirect antiglobulin test was positive in the absence of diclofenac and its metabolites in six cases, indicating the presence of

TABLE II. Clinical Data on Newly Diagnosed Patients With Diclofenac-Dependent Red Cell Antibodies

Patient no.	Age (years)	Sex	Initial symptom(s)	Initial diagnosis ^a	Treatment	Complications	Outcome
1	79	F	Shock	AIHA	Unknown	None	Full recovery
2	60	M	Jaundice	AIHA	Glucocorticoids, iv IgG, RBCs	None	Full recovery
3	71	F	Itching rash, abdominal pain, vomiting	Aortal aneurysm, myocardial infarction, gastric ulcer bleeding	Glucocorticoids, plasma exchange, RBCs	Multiorgan failure	Fatal
4	82	F	Lumbar pain, jaundice, vomiting	Mesenteric infarction and paralytic ileus	Glucocorticoids	Multiorgan failure	Fatal
5	63	F	Jaundice	AIHA	Unknown	Unknown	Full recovery
6	75	M	Jaundice	AIHA	RBCs	None	Full recovery
7	74	M	Jaundice	AIHA	Glucocorticoids	None	Full recovery
8	78	F	Weakness, palor	AIHA	Unknown	None	Full recovery
9	78	F	Somnolence	TIA	Unknown	Multiorgan failure	Fatal

^aAIHA, autoimmune hemolytic anemia; TIA, transitory ischemic attack.

TABLE III. Serological Data on Newly Diagnosed Patients With Diclofenac-Dependent Red Cell Antibodies*

Patient no.	Hb (g/dL)	DAT		aab		ddab
		C3d	IgG	Eluate	IAT	
1	6.9	+	+	+	-	+
2	5.0	+	+	NA	+	+
3	6.9	+	+	+	+	+
4	9.1	+	+	+	+ ^a	+
5	7.3	-	+	+	+ ^a	+
6	7.1	+	+	+	+	+
7	7.9	+	+	+	-	+
8	7.0	+	+	+	+	+
9	NA	+	+	-	-	+

*Abbreviations: aab, autoantibodies; DAT, direct antiglobulin test; ddab, drug-dependent antibodies reactive with testing RBCs in the presence of the drug or its metabolites; Hb, lowest hemoglobin value measured during hemolysis; IAT, indirect antiglobulin test; NA, not available.

^aAutoantibodies in patients no. 4 and 5 had partial C specificity.

drug-induced autoantibodies in addition to the drug-dependent antibodies.

A summary of most relevant findings in all published cases ($n = 61$) is given in Table I. Unfortunately, clinical data were lacking in 15 patients. Of the remaining 46 patients, 23 developed shock and/or renal failure, and 7 of these patients died. The remaining patients appear to have survived the hemolysis without life-threatening complications.

DISCUSSION

In this study, we report nine new cases of diclofenac-induced IHA and we have summarized the data on all previously published cases (Table I). Although the clinical and serological findings were well-characterized in some of the reported cases, diagnostic confusion seemed to occur in almost all instances. Of greatest concern, some patients died because of a belated diagnosis. The clinical symptoms were variable and did not lead directly to the correct diagnosis in any of our nine new patients. In most cases, clues as to the nature of the disorder—ddab with RBC specificity—came from the serological reassessment. In our opinion, there is a general lack of awareness that diclofenac can cause this severe side effect, complicated further by limited access to quality serological testing at some local hospitals. Before learning that these patients had drug-dependent IHA due to diclofenac, AIHA due to warm-reactive autoantibodies was the usual diagnosis. Without a doubt, this diagnostic confusion is extremely dangerous for the patients, since they may receive the drug again. Moreover, the failure to administer adequate treatment to patients because of a late or wrong diagnosis can lead

to even more complications, such as acute renal failure (ARF). The outcome was fatal in 7 of 46 cases (15%), and ARF occurred in 16 additional patients.

Based on these observations, we believe that explicit information about this complex problem is absolutely necessary to avoid or reduce life-threatening complications. First of all, patients receiving diclofenac must be advised that hemolysis can occur as a side effect of the drug, and they must be educated about the symptoms and clinical findings that may develop during or following diclofenac administration. In addition, all physicians involved with these patients should be familiar with the serological findings relevant to the hemolytic potential of diclofenac. Most importantly, physicians should know that diclofenac may lead to the production of autoantibodies and drug/metabolite-dependent antibodies and that the hemolysis may develop gradually or abruptly. The initial symptoms are usually characteristic of acute immune hemolytic anemia (fatigue, jaundice or pallor, back and/or abdominal pain), whereas the late symptoms may be characterized by complications normally related to decompensated hemolysis, i.e., shock and/or renal failure. Finally, the presence of autoantibodies should not invariably exclude testing for drug-dependent antibodies.

According to the Uppsala Monitoring Center, at least 82 cases of diclofenac-induced hemolytic anemia are currently known [8], indicating a higher incidence than is generally believed. Diclofenac-induced immune thrombocytopenia has also been reported in isolated cases [9], reflecting the immunogenicity of the drug. Unfortunately, it is absolutely impossible to predict which patients will be affected or to determine when immunization will take place. The reaction may develop during continuous or intermittent therapy and immediately following re-exposure to the causative drug [10].

The high frequency of acute renal failure in patients with diclofenac-induced IHA (23 of 46 = 50%) is not uncommon in drug-dependent IHA [4,10–13]. The reason for this phenomenon and why it only affects some of the patients is unclear. Apart from hemolysis, anemia, and shock, other factors seem to be involved in some cases. Therapy such as plasmapheresis, hemodialysis, and/or glucocorticoid-treatment may play a determinant role. In addition, the target antigen might be expressed on both RBCs and renal cells [11]. Products of the complement cascade and cytokines may also contribute to renal damage [12]. However, deposition of immune complexes was not found in some reported cases [13].

From our experience, we surmise that diclofenac-induced immune hemolytic anemia is far more common than has been previously assumed and that the

incidence is increasing due to the greatly reduced use of COX-2-specific inhibitors.

Misdiagnosis of diclofenac-induced IHA may be due to limited awareness of drug-dependent hemolysis and/or to oversimplification of serologic investigations. False-negative results may be obtained when the drug metabolites are omitted from testing [14]. The true incidence of diclofenac-dependent antibodies must be determined by means of controlled studies in cooperation with all manufacturers of the drug.

REFERENCES

- Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 2001;286:954–959.
- Heuft HG, Postels H, Hoppe I, et al. Eine tödlich verlaufene immunhämolytische Anämie nach Applikation von Diclofenac. *Beitr Infusionsther* 1990;26:412–414.
- Salama A, Götttsche B, Mueller-Eckhardt C. Autoantibodies and drug- or metabolite-dependent antibodies in patients with diclofenac-induced immune haemolysis. *Br J Haematol* 1991;77:546–549.
- Ahrens N, Genth R, Salama A. Belated diagnosis in three patients with rifampicin-induced immune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2002;117:441–443.
- 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;95:640–644.
- Lapierre Y, Rigal D, Adam J, et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen–antibody reactions. *Transfusion* 1990;30:109–113.
- Salama A, Berghöfer H, Mueller-Eckhardt C. Detection of cell–drug (hapten)–antibody complexes by the gel test. *Transfusion* 1992;32:554–556.
- van der Molen-Eyengraam M. Hemolytische anemie door diclofenac. *Geneesmiddelenbulletin* 2001;35:79.
- Meyer O, Hoffmann T, Aslan T, Ahrens N, Kiesewetter H, Salama A. Diclofenac-induced antibodies to red blood cells and platelets: two case reports and a concise review. *Transfusion* 2003;43:345–349.
- Salama A, Mueller-Eckhardt C. Immune-mediated blood cell dyscrasias related to drugs. *Semin Hematol* 1992;29:54–63.
- De Vriese AS, Robbrecht DL, Vanholder RC, Vogelaers DP, Lameire NH. Rifampicin-associated acute renal failure: pathophysiologic, immunologic, and clinical features. *Am J Kidney Dis* 1998;31:108–115.
- Rossert J. Drug-induced acute interstitial nephritis. *Kidney Int* 2001;60:804–817.
- Muthukumar T, Jayakumar M, Fernando EM, Muthusetupathi MA. Acute renal failure due to rifampicin: a study of 25 patients. *Am J Kidney Dis* 2002;40:690–696.
- Sachs UJ, Santoso S, Röder L, Smart E, Bein G, Kroll H. Diclofenac-induced antibodies against red blood cells are heterogeneous and recognize different epitopes. *Transfusion* 2004;44:1226–1230.
- Ciucci AG. A review of spontaneously reported adverse drug reactions with diclofenac sodium (Voltarol). *Rheumatol Rehabil* 1979;(Suppl 2):116–121.
- Salvarini C, Iori I, Rossi F, Macchioni P, Filippi G. Hypersensitivity to diclofenac with acute hepatitis, immune-haemolytic anaemia, thrombocytopenia and renal involvement. *Ital J Gastroenterol* 1984;16:54–58.
- Kramer MR, Levene C, Hershko C. Severe reversible autoimmune haemolytic anaemia and thrombocytopenia associated with diclofenac therapy. *Scand J Haematol* 1986;36:118–120.
- Diggory P, Golding RL, Lancaster R. Renal and hepatic impairment in association with diclofenac administration. *Postgrad Med J* 1989;65:507–508.
- Bondeson J, Berglund S. Diclofenac-induced thrombocytopenic purpura with renal and hepatic involvement. *J Intern Med* 1991;230:543–547.
- Jick H, Derby LE, Garcia Rodriguez LA, Jick SS, Dean AD. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and certain rare, serious adverse events: a cohort study. *Pharmacotherapy* 1993;13:212–217.
- Okada H, Suzuki H, Awaya N, et al. Serious adverse effects induced by simultaneous administration of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *South Med J* 1993;86:1266–1268.
- Lopez A, Linares M, Sanchez H, Blanquer A. Autoimmune hemolytic anemia induced by diclofenac. *Ann Pharmacother* 1995;29:787.
- Bougie D, Johnson ST, Weitekamp LA, Aster RH. Sensitivity to a metabolite of diclofenac as a cause of acute immune hemolytic anemia. *Blood* 1997;90:407–413.
- de Quiros JF, Pinto V, Hevia S, Vigon R. Immune complex-mediated haemolytic anaemia and Evans syndrome induced by diclofenac. *Vox Sang* 1997;72:121–123.
- Laidlaw ST, Stamps R, Booker DJ, Brown MJ, Sokol RJ. Immune hemolytic anemia due to diclofenac. *Immunohematology* 1997;13:9–11.
- Wittmann G, Hahn U, Poley S, Mempel W. Relative frequency of diclofenac-induced immune hemolytic anemia. *Transfusion* 1999;39:S177-P (abstract).
- Mazzone M, Siciliano M, Carella G. Multiple diclofenac-induced adverse effects. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2988–2989.
- Jürgensen JS, Seltsam A, Jörres A. Fatal acute diclofenac-induced immune hemolytic anemia. *Ann Hematol* 2001;80:440–442.
- Ahrens N, Schewior L, Garbe E, Kiesewetter H, Salama A. Massive haemolysis after intramuscular diclofenac in a patient who apparently tolerated oral medication. *Vox Sang* 2004;86:71–74.

3.4 Kostimulatorische Proteine bei AIHA: CD47

Ahrens N, Pagenkopf C, Kiesewetter H, Salama A. CD47 is expressed at normal levels in patients with autoimmune haemolytic anaemia and/or immune thrombocytopenia. *Transfus Med* 2006; 16(6): 397–402

Mit den vorangestellten Arbeiten wurde die Bedeutung der Antigenstruktur für den Immunisierungsprozeß dargestellt. Oft sind für den Ablauf von verschiedenen Immunisierungen kostimulatorische oder inhibitorische Proteine von wesentlicher Bedeutung. Bei Antikörpern speziell stellt sich die Frage nach der Bedeutung von erythrozytärem CD47, da NOD-Mäuse ohne dieses Glykoprotein eine letale AIHA entwickeln.

Zusammenfassung

Bei AIHA-Patienten, gesunden Blutspendern und einem Patienten vom Rh_{null}-Phänotyp wurde mit quantitativer Durchflußzytometrie die CD47-Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Rh_{null}-Erythrozyten erwartungsgemäß eine deutlich verminderte CD47-Expression aufwiesen. Hingegen war bei AIHA Patienten die CD47-Expression nicht reduziert.

Die These einer Bedeutung von CD47 für die Pathophysiologie der AIHA konnte somit nicht bestätigt werden.

ORIGINAL ARTICLE

CD47 is expressed at normal levels in patients with autoimmune haemolytic anaemia and/or immune thrombocytopenia

N. Ahrens, C. Pagenkopf, H. Kieseewetter and A. Salama *Institute for Transfusion Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany*

Received 27 February 2006; accepted for publication 05 April 2006

SUMMARY. CD47 deficiency results in lethal autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) and mild spontaneous thrombocytopenia in non-obese diabetic mice. It is unknown whether CD47 has an impact on AIHA of the warm type or autoimmune thrombocytopenia (ITP) in humans.

Healthy blood donors ($n = 11$), patients with AIHA ($n = 13$), patients with ITP ($n = 18$) and one patient with Rh_{null} phenotype were investigated. CD47 expression on red blood cells (RBC), platelets, granulocytes and lymphocytes and in plasma was determined by quantitative flow cytometry.

All types of blood cells studied were found to carry CD47. Although CD47 expression on Rh_{null} RBCs was decreased, there was no significant difference between CD47 expression on RBCs of healthy blood donors and on those of patients with AIHA or ITP. Similarly, CD47 was detectable in the plasma of the studied subjects.

No evidence for a pathogenetic role of CD47 in autoimmune haemolysis or thrombocytopenia in humans could be demonstrated.

Key words: AIHA, CD47, ITP.

For diagnosis of autoimmune cytopenias, detection of characteristic autoantibodies is still regarded as the 'gold standard'. However, their prognostic value is limited and does not allow for a precise prediction of the severity of autoimmune haemolytic anaemia (AIHA) or autoimmune thrombocytopenia (ITP) (Salama *et al.*, 2002).

CD47 (integrin-associated protein) is a ubiquitously expressed 50-kDa transmembrane glycoprotein that has been suggested to act as a 'marker of self', since murine red blood cells (RBCs) and platelets lacking this protein are rapidly eliminated by macrophages of wild-type mice (Oldenburg *et al.*, 2000; Olsson *et al.*, 2005). CD47 is not only expressed on all types of blood cells, including RBCs, platelets and leukocytes, epithelial and endothelial cells, fibroblasts and mesenchymal cells, but also on various tumour cell lines. It has been found to bind to signal regulatory protein (SIRP) α , SIRP β 2 and thrombospondin (Oldenburg,

2004; Piccio *et al.*, 2005). Furthermore, it interacts with several integrins (Oldenburg, 2004), and is involved in cell migration and phagocytosis. In mice, the binding of RBC CD47 to SIRP α on macrophages contributes to the inhibition of phagocytosis, and CD47-deficient non-obese diabetic (NOD) mice develop severe AIHA (Oldenburg *et al.*, 2002). On human RBCs, CD47 is part of the Rh complex (Cartron, 1999; Dahl *et al.*, 2003), which is the target of warm-reactive autoantibodies (Salama *et al.*, 2002). In addition, patients of the Rh_{null} phenotype may exhibit mild compensated haemolytic anaemia. Haemolysis is also typical for protein 4-2-deficient human RBCs that express low levels of CD47, suggesting a causal relationship between haemolysis and CD47 expression (Bruce *et al.*, 2002).

In this study, we measured CD47 expression in various blood cell types in patients with AIHA or ITP in comparison to healthy blood donors.

Correspondence: Dr. med. Norbert Ahrens, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Transfusionsmedizin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany.
Tel.: +49/30/450-553357; fax: +49/30/450-7553357;
e-mail: norbert.ahrens@charite.de

METHODS AND PATIENTS

Citrate-anticoagulated blood samples were obtained from healthy blood donors, consecutive patients with

AIHA of warm type and/or ITP as well as from one patient with the Rh_{null} phenotype. All donors and patients gave their informed consent. The samples were processed immediately, and all incubation steps were performed at room temperature. Although some protocols (RBC, plasma) were available for all patients, platelets and leukocytes could only be tested during the second phase of this study.

Patients with serologically detectable RBC auto-antibodies were regarded as having active disease if they required medical treatment, and as having AIHA in remission if they did not. None of the patients were transfused within the last 6 months prior to investigation.

Red blood cells

Blood samples were centrifuged at $1710 \times g_{\max}$ for 5 min. In order to reduce background staining by nonspecific antibody attachment, 10 μL of washed RBCs (suspended to $10\,000\ \mu\text{L}^{-1}$) was pre-incubated with 20 μL human IgG (5% w/v Venimmun, Aventis Behring, Marburg, Germany) for 15 min and subsequently stained with 20 μL anti-CD47 phycoerythrin (PE) (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany) for 30 min. Before measuring CD47, 500 μL phosphate-buffered saline (PBS) was added.

Platelets

Blood samples were centrifuged at $120 \times g_{\max}$ for 25 min. The supernatant (platelet-rich plasma) was transferred to a second tube and centrifuged at $1710 \times g_{\max}$ for 5 min. The pellet was resuspended in Hanks' solution to a concentration of 5000 platelets μL^{-1} , 50 μL was blocked with IgG as described for RBCs and stained with 10 μL anti-CD41 fluorescein isothiocyanate (FITC) (Becton-Dickinson) and 10 μL anti-CD47 PE. Following incubation for 30 min, 500 μL Hanks' solution was added to each sample.

Leukocytes

Two hundred microlitres of whole blood was lysed by the addition of 200 μL OptiLyse (Immunotech, Marseille, France) for 10 min, and 4 mL distilled water for an additional 10 min, according to the manufacturer's instructions. The leukocytes were washed once with 2 mL PBS ($615 \times g_{\max}$, 10 min). Fifty microlitres of resuspended cells ($2000\ \text{leukocytes}\ \mu\text{L}^{-1}$) was blocked with IgG and stained with 10 μL anti-CD45 FITC (Becton-Dickinson) and 20 μL anti-CD47 PE. After a 30-min incubation, 500 μL PBS was added.

Plasma CD47

The following anti-CD47 clones were investigated pairwise in fluorescence quenching assays: BRIC126 (Serotec, Düsseldorf, Germany), miap301 that cross-reacts with human CD47 and B6H12 (Becton-Dickinson) and BRIC125 (IBGRL, Bristol, UK). Non-competitive binding was found for no pair of the clones. Pre-incubation of RBCs with any of the clones decreased the RBC fluorescence intensity of every other clone.

Therefore, the amounts of soluble CD47 in plasma were measured indirectly by a consumption assay. Ten microlitres of microfiltered plasma (0.45 μm , Mini-Sart, Sartorius, Göttingen, Germany) was pre-incubated with 20 μL anti-CD47 PE (12.5% in PBS) for 30 min, and unbound anti-CD47 PE was captured by a standard sample of healthy donor RBCs as described above. Following a 30-min incubation, 500 μL PBS was added. The remaining fluorescence intensity was subtracted from the fluorescence intensity of negative controls using PBS instead of plasma in order to acquire values that directly correlate with the quantity of soluble CD47.

Flow cytometry

All samples were analysed by FACScan flow cytometry (Becton-Dickinson) and CellQuest software. The flow cytometer settings and output for RBC, platelet and leukocyte were calibrated using isotype controls and standardized beads with four defined levels of PE molecules (QuantiBrite, Becton-Dickinson). The calculated regression (Excel, Microsoft, Redmond, WA) for each setting was used to estimate the units of fluorescence intensity (U) from the cells' geometric mean.

Cell types were identified according to forward and side light scatter qualities. Platelets and leukocytes were additionally stained with and gated for anti-CD41 and anti-CD45, respectively (Fig. 1), and 20 000 events were analysed for CD47. After the labelling, quantitative flow cytometry was done without further washing.

Statistical analysis

Data were processed using the statistical package for social sciences (SPSS version 11, Chicago, IL). The fluorescent intensity units (U) of the donor, AIHA and ITP groups are reported as medians, and normal distribution was calculated with the one-sample Kolmogorov-Smirnov test. Groups with equal variances (Levene's $P > 0.05$) were compared with Tukey's honestly significant difference test. In all other cases, Tamhane's T2 test was performed.

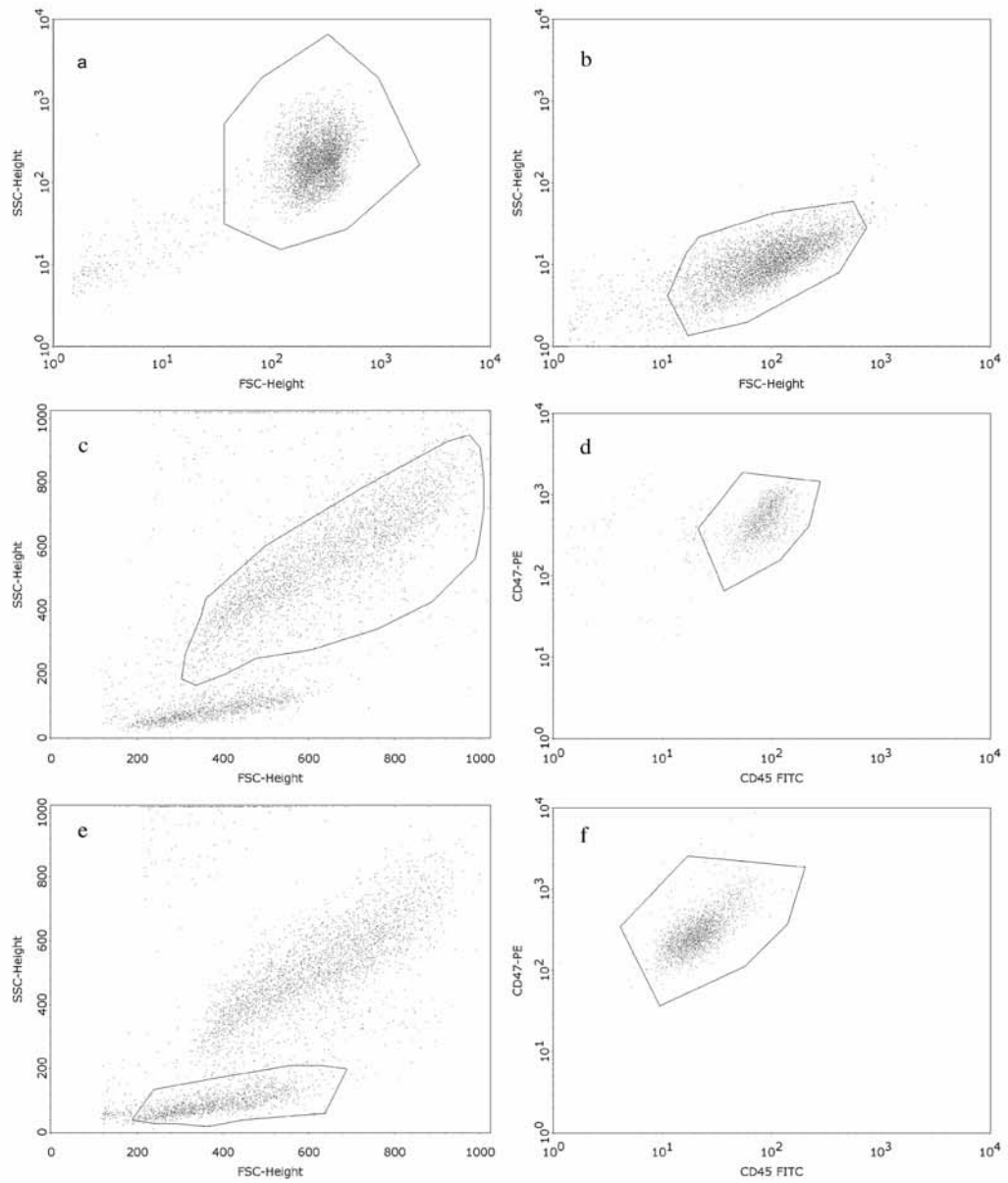


Fig. 1. Flow cytometric CD47 quantification. RBCs (a), platelets (b), granulocytes (c + d) and lymphocytes (e + f) were gated as described in Methods. An appropriate percentage of the events was chosen to display the distribution.

RESULTS

Red blood cells

Unlike Rh_{null} RBCs that were observed to express very small quantities of CD47 (2017 U, Fig. 2a),

RBCs from patients with AIHA were found to express CD47 with the same strong intensity as normal RBCs (25 069 and 23 493 U, respectively, $P = 0.55$). CD47 was detectable on RBCs independent of disease activity and did not change

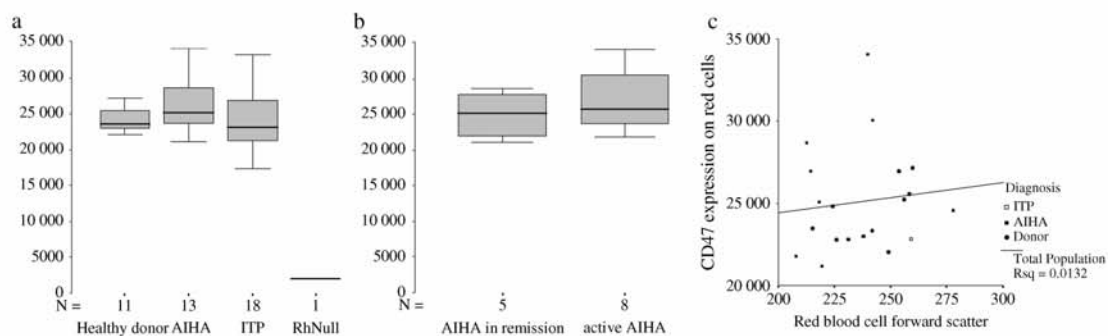


Fig. 2. (a and b) Box plots of fluorescence intensity units of CD47 on RBCs from healthy blood donors, patients with AIHA in remission or active disease, patients with ITP and from one patient of Rh_{null} phenotype. (c) CD47 expression on RBCs and forward scatter properties.

significantly during follow-up in samples from 10 patients (Fig. 2b, $P = 0.53$).

As indicated by the interquartile distances in Fig. 2, CD47 expression on RBCs from patients with AIHA was variable. Though the RBCs of patients with AIHA were somewhat smaller than donor RBCs as indicated by the forward scatter (geometric mean fluorescence 219 and 242, respectively), a difference in size does not correlate with CD47 expression (Fig. 2c).

Platelets

CD47 expression on platelets was predominantly identical in healthy blood donors (1977 U) and ITP patients (2129 U), with no significant difference observed (Fig. 3a, $P = 0.86$).

Lymphocytes

CD47 was also detectable on lymphocytes of donors (38 916 U), patients with AIHA and patients with ITP (38 141 and 34 044 U, respectively; Fig. 3b, $P = 1.0$). However, the expression levels in ITP lymphocytes were observed to be slightly decreased ($P = 0.065$).

Granulocytes

There was considerable variation in CD47 expression on the cells in the granulocyte gate (Fig. 3c). Patients with AIHA and/or ITP had slightly higher levels of CD47 expression than healthy donors (17 629 and 16 785 U vs 13 687 U, respectively), although a statistically significant difference was not observed for AIHA ($P = 0.066$) and ITP patients ($P = 0.58$).

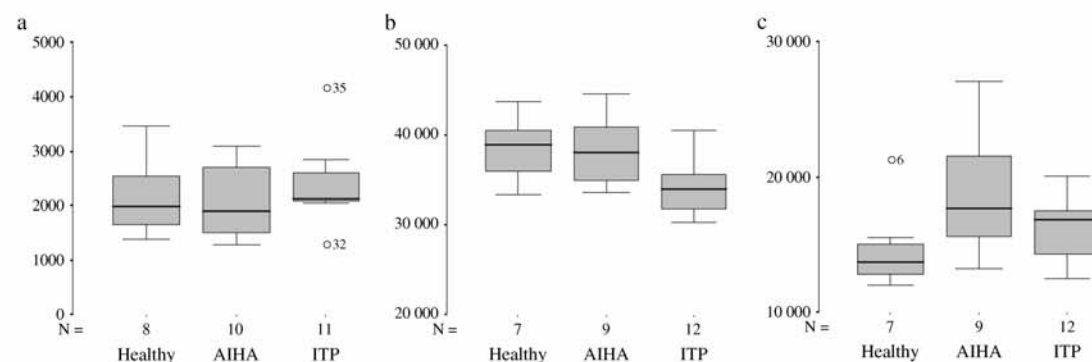


Fig. 3. Box plots of fluorescence intensity units of CD47 on platelets (a), lymphocytes (b) and granulocytes (c) from healthy blood donors and patients with AIHA or ITP.

Plasma

CD47 was detectable in the plasma of healthy donors (4517 U) as well as in that of AIHA patients (4550 U). Significantly higher levels of CD47 were observed in the plasma of patients with ITP (4946 U; Fig. 4, $P = 0.0026$).

DISCUSSION

There is good evidence to suggest that CD47 may play a role in AIHA and ITP in mice (Oldenberg *et al.*, 2002). In this study, we analysed the expression of CD47 on various blood cells of different patients with AIHA and/or ITP. A significant difference between the expression of CD47 on RBCs and platelets in these patients in comparison to healthy donors was not observed. This finding does not support the hypothesis that CD47 may be involved in AIHA and ITP but on the contrary, is in agreement with results from *in vitro* experiments demonstrating that Rh_{null} RBCs with reduced CD47 expression do not show increased interaction with peripheral blood monocytes (Arndt & Garratty, 2004). In addition, patients with weak CD47 expression may exhibit some haemolysis but, unlike NOD mice, do not develop AIHA, i.e. Rh_{null} phenotype and protein 4.2 deficiency (Avent *et al.*, 1988; Rybicki *et al.*, 1993; Cartron, 1999; Bruce *et al.*, 2002; Dahl *et al.*, 2003; Mouro-Chanteloup *et al.*, 2003). It is

possible that these patients have sufficient residual CD47 to prevent autoimmunization. A dosage effect, as seen with murine platelets (Olsson *et al.*, 2005), has not been observed with RBCs (Oldenberg *et al.*, 2000). Thus, a preventive contribution of CD47 to AIHA and ITP cannot be completely excluded. Furthermore, opsonized RBCs lacking CD47 are much more rapidly cleared by macrophages than opsonized normal RBCs (Oldenberg *et al.*, 2001). The same phenomenon has been demonstrated using opsonized and non-opsonized platelets lacking CD47 (Olsson *et al.*, 2005). A possible explanation for the apparent difference between the rapid elimination of CD47-negative murine red cells *in vivo* (Oldenberg *et al.*, 2001; Olsson *et al.*, 2005) and survival of human CD47 weak RBCs (Arndt and Garratty, 2004) might lie in the origin of the involved antibodies and macrophages. The antibodies used for opsonization may have a higher avidity, thus not being comparable to human autoantibodies. In addition, the CD47–SIRP α interaction has been shown to be both species and cell-type specific (Subramanian *et al.*, 2006). Its affinity in humans may be low and therefore not as significant as in mice. The cell-type specificity is also demonstrated by the fact that only splenic macrophages have been shown to phagocytose CD47-deficient cells (Oldenberg *et al.*, 2000). However, a contribution of CD47 in the development of AIHA in humans cannot be completely excluded. It is possible that functional alterations or isoforms of CD47 may exist.

CD47 inhibits not only antibody-dependent phagocytosis but also unspecific phagocytosis. Clearance of CD47-deficient RBCs in CD47-positive mice has been observed in strains that are C3 or antibody deficient (Oldenberg *et al.*, 2000). Moreover, it has been shown that the phagocytosis of perfluorocarbon particles is markedly reduced by co-infusion of recombinant CD47 molecules (Hsu *et al.*, 2003). Interestingly, this study has demonstrated CD47 expression not only on blood cells but also in plasma. It is unclear whether plasma CD47 stems from microparticles and/or from shedding or secretion. Microparticles are small membrane fragments from platelets and other cells that can be detected in all plasma samples and are known to be present at higher concentrations in patients with ITP (Jy *et al.*, 1992; Morel *et al.*, 2004). This is in agreement with our observation of higher CD47 levels in ITP patient samples. CD47 of cellular origin has also been observed in the supernatant of old RBC units (Annis & Sparrow, 2002). Whether the loss of RBC-bound CD47 and the increase in microparticle CD47 has an impact on transfusions (Bessos & Seghatchian, 2005; Stewart *et al.*, 2005), AIHA or ITP has yet to be elucidated.

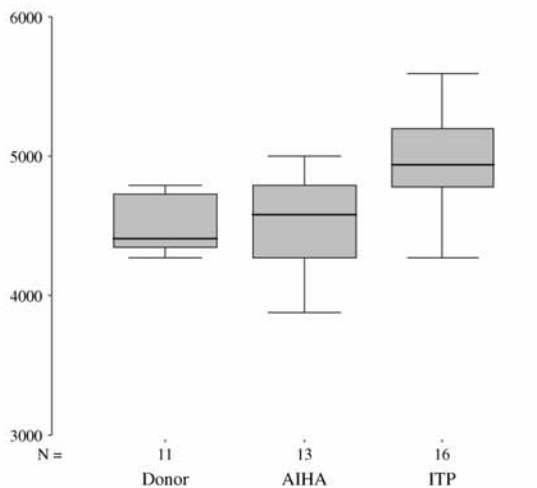


Fig. 4. Plasma CD47 expressed as degree of fluorescence reduction by plasma from healthy blood donors or patients with AIHA or ITP in a consumption assay with anti-CD47 PE and donor red cells.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank Rosey Mushens from the International Blood Group Reference Laboratory Bristol for anti-CD47.

REFERENCES

- Annis, A.M. & Sparrow, R.L. (2002) Expression of CD47 (integrin-associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfusion and Apheresis Science*, **27**, 233–238.
- Arndt, P.A. & Garratty, G. (2004) Rh(null) red blood cells with reduced CD47 do not show increased interactions with peripheral blood monocytes. *British Journal of Haematology*, **125**, 412–414.
- Avent, N., Judson, P.A., Parsons, S.F. et al. (1988) Monoclonal antibodies that recognize different membrane proteins that are deficient in Rhnull human erythrocytes. One group of antibodies reacts with a variety of cells and tissues whereas the other group is erythroid-specific. *The Biochemical Journal*, **251**, 499–505.
- Bessos, H. & Seghatchian, J. (2005) Red cell storage lesion: the potential impact of storage-induced CD47 decline on immunomodulation and the survival of leucofiltered red cells. *Transfusion and Apheresis Science*, **32**, 227–232.
- Bruce, L.J., Ghosh, S., King, M.J. et al. (2002) Absence of CD47 in protein 4-2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex. *Blood*, **100**, 1878–1885.
- Cartron, J.P. (1999) RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Baillière's Best Practice & Research. Clinical Haematology*, **12**, 655–689.
- Dahl, K.N., Westhoff, C.M. & Discher, D.E. (2003) Fractional attachment of CD47 (IAP) to the erythrocyte cytoskeleton and visual colocalization with Rh protein complexes. *Blood*, **101**, 1194–1199.
- Hsu, Y.C., Acuna, M., Tahara, S.M. & Peng, C.A. (2003) Reduced phagocytosis of colloidal carriers using soluble CD47. *Pharmaceutical Research*, **20**, 1539–1542.
- Jy, W., Horstman, L.L., Arce, M. & Ahn, Y.S. (1992) Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **119**, 334–345.
- Morel, O., Toti, F., Hugel, B. & Freyssinet, J.M. (2004) Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Current Opinion in Hematology*, **11**, 156–164.
- Mouro-Chanteloup, I., Delaunay, J., Gane, P. et al. (2003) Evidence that the red cell skeleton protein 4-2 interacts with the Rh membrane complex member CD47. *Blood*, **101**, 338–344.
- Oldenborg, P.A. (2004) Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity. *Leukemia and lymphoma*, **45**, 1319–1327.
- Oldenborg, P.A., Gresham, H.D., Chen, Y. et al. (2002) Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood*, **99**, 3500–3504.
- Oldenborg, P.A., Gresham, H.D., Lindberg, F.P. (2001) CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcγ and complement receptor-mediated phagocytosis. *Journal of Experimental Medicine*, **193**, 855–862.
- Oldenborg, P.A., Zheleznyak, A., Fang, Y.F. et al. (2000) Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, **288**, 2051–2054.
- Olsson, M., Bruhns, P., Frazier, W.A. et al. (2005) Platelet homeostasis is regulated by platelet expression of CD47 under normal conditions and in passive immune thrombocytopenia. *Blood*, **105**, 3577–3582.
- Piccio, L., Vermi, W., Boles, K.S. et al. (2005) Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRP{beta}2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood*, **105**, 2421–2427.
- Rybicki, A.C., Qiu, J.J., Musto, S. et al. (1993) Human erythrocyte protein 4-2 deficiency associated with hemolytic anemia and a homozygous 40glutamic acid→lysine substitution in the cytoplasmic domain of band 3 (band 3Montefiore). *Blood*, **81**, 2155–2165.
- Salama, A., Ahrens, N. & Kiesewetter, H. (2002) Serological and clinical aspects of autoimmune hemolytic anemias. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin*, **29**, 206–217.
- Stewart, A., Urbaniak, S., Turner, M. & Bessos, H. (2005) The application of a new quantitative assay for the monitoring of integrin-associated protein CD47 on red blood cells during storage and comparison with the expression of CD47 and phosphatidylserine with flow cytometry. *Transfusion*, **45**, 1496–1503.
- Subramanian, S., Parthasarathy, R., Sen, S. et al. (2006) Species- and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRPalpha. *Blood*, **107**, 2548–2556.

4 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Nach der Darstellung der Untersuchungen zur Antikörperbildung gegen Erythrozyten werden diese Ergebnisse hinsichtlich methodisch-diagnostischer Aspekte sowie ihrer pathophysiologischen Bedeutung diskutiert.

4.1 Methodisch-diagnostische Aspekte

Die Ergebnisse zur Antikörperbildung beruhen zum einen auf einer epidemiologischen Methodologik, zum anderen entstammen sie Beobachtungen auf Einzelfallniveau, deren Methoden in den einzelnen Arbeiten publiziert sind. Die retrospektive Auswertung aller untersuchten Patienten bedeutet zwangsläufig, daß keine definierten Einschlusskriterien angewendet worden sind. Die ungesteuerte Zusammensetzung der Patienten wird durch die diagnostisch-therapeutischen Schwerpunkte des Hauses und die großstädtische Zusammensetzung des Clientels bestimmt. Da die Frequenzen der verschiedenen Blutgruppenantigene in Abhängigkeit von der Ethnität variieren, ist hier eine höhere Prävalenz irregulärer Antikörper als in homogenen Kollektiven möglich. Die beobachteten 2,3% bestätigen frühere Untersuchungen anderer Autoren, die große Kollektive untersucht haben,¹¹² so daß sich die Annahme eines ethnischen Einflusses von dieser Seite nicht bestätigen läßt.

Die Antikörperprävalenz wird weiterhin von lokalen logistischen Aspekten beeinflusst. Insbesondere die angestrebte Antigen-Kompatibilität bei der Auswahl von Erythrozytenkonzentraten kann einen Einfluß auf die Frequenz der Bildung von Antikörpern haben. Die Begrenzung aller vorgestellter Untersuchungen auf ein Zentrum sichert in diesem Aspekt einheitliche Bedingungen in diesem Aspekt. Gleiches gilt für eventuelle Einflüsse durch lokale diagnostisch-therapeutische Schwerpunkte.

Die Ergebnisse werden weiterhin von den verwendeten diagnostischen Methoden im immunhämatologischen Labor beeinflusst. Alle Untersuchungen erythrozytärer Antikörper sind in den vorgestellten Arbeiten primär im Gelkartensystem durchgeführt wie in den jeweiligen Publikationen erwähnt. Gegenüber historischen Untersuchungen ergibt sich somit eine Diskrepanz, die auf Ergebnissen mit dem Röhrchensystem beruhen. Das Gelkartensystem ist sensitiver als das Röhrchensystem, und es ist anzunehmen, daß die gesteigerte Sensitivität sich nicht gleichmäßig auf alle Antikörperspezifitäten bezieht.

4.2 Autoimmunisierung durch Kreuzreaktivität bei Alloimmunisierung

Eine typische Konstellation für das Auftreten von Autoantikörpern ist die Immunisierung gegen fremde Antigene. Wir fanden eine erhöhte Prävalenz von Autoantikörpern bei Patienten, die Alloantikörper gebildet hatten (8,9 vs. 0,6%).²⁴ Dabei konnten wir zeigen, daß die Immunisierung gegen erythrozytäre Alloantigene die häufigste Ursache für das Auftreten von Autoantikörpern in Gegenwart von Alloantikörpern darstellt (81%).²² Charakteristisch für diese begleitende Autoimmunisierung ist das Auftreten zum Beginn der Immunisierung und nicht als deren späte Folge. Antikörper der frühen Immunität unterscheiden sich von ausgereiften Antikörpern durch die geringere Spezifität und niedrigere Avidität. Diesem Unterschied liegen somatische Mutationen der B-Zellen in den Keimzentren zugrunde, beispielsweise kann die

Bildung eines Anti-D bis zu 30 Mutationsschritte umfassen.⁶³ Der Mechanismus der Reifung von Antikörpern, die schließlich hochspezifisch für ihr Antigen sind, impliziert, daß die Spezifität zu Beginn der Immunisierung eine gewisse Kreuzreaktivität mit ähnlichen Strukturen zulassen kann. In der Tat weisen Alloantikörper, deren Bildung von Autoantikörpern begleitet wird, häufig eine Autoreaktivität auf, die serologisch durch Adsorption an Antigen-negative Strukturen demonstriert werden kann.^{118,199}

Der Grad an demonstrierbarer Autoreaktivität von Alloantikörpern kann methodenabhängig ausgeprägt sein.¹⁷⁶ Mittels Phage-display Technologie und bakterieller Expression des V-Gen Repertoires kann bei ausgereiften Antikörpern gegen die Blutgruppenantigene D, E, Kp^b, HI und andere eine niedrig-affine Kältereaktivität demonstriert werden.^{151,169} Bei diesen Fällen kann eine Unterscheidung zwischen Alloantikörpern mit kreuzreagierender, autoreaktiver Komponente und pseudoalloreaktiven Autoantikörpern („mimicking type“) schwierig sein.¹¹⁸ Die Panreaktivität kann sich auf weitere als erythrozytäre Strukturen erstrecken. Beispielsweise können viele der monoklonalen Blutgruppen-Antikörper (A, c, C, D, e, E, G, Jk^a und Jk^b) vom IgM- oder IgG-Typ eine Autoreaktivität gegen unterschiedlichste Strukturen aufweisen, die über das erythrozytäre Antigenspektrum hinausreichen (DNA, Thyreoglobulin, Hämoglobin, Kaninchen- und Rattengewebe, Rheumafaktor).²⁴⁰

Nicht nur bei primären Immunisierungen, auch bei sekundären Immunisierungen können Antikörperkonstellationen beobachtet werden, die mit Autoantikörpern vereinbar sind. Bei verzögerten hämolytischen Transfusionsreaktionen ist der Nachweis von Komplement auf allen Erythrozyten typisch, nicht nur auf den transfundierten.¹⁹⁹ Die Inzidenz der transfusionsinduzierten Autoimmunisierung hängt von der Sensitivität der verwendeten Diagnostik ab.¹⁶² Bei Anwendung restriktiver Autoantikörper-Kriterien, d.h. Ausschluß von schwächeren Autoantikörper (Reaktionen < 2+) läßt sich eine Transfusionsursache noch bei 34% der Patienten (12 von 41) mit Autoantikörpern und Alloantikörpern darstellen.²⁶³

Autoantikörper durch kreuzreagierende Alloantikörper sind zudem von Hyperimmunisierungen bekannt. D-negative, gesunde Personen können nach Immunisierung mit D-positiven Erythrozyten neben dem erwarteten Anti-D zusätzliche Reaktionen auch mit fermentierten, D-negativen Erythrozyten entwickeln. Auch für diese begleitende Autoimmunisierung ist, ungeachtet der mit 32% verhältnismäßig hohen Inzidenz, ein nur passageres Auftreten (Monate) typisch sowie das Fehlen von Hämolysezeichen.⁶⁷

Insofern ein therapeutisches Eingreifen erforderlich ist, läßt sich eine vollständige Remission bereits mit der initialen Therapie erzielen.¹⁷⁶ Schwere oder persistierende Verläufe sind selten.^{73,180} Differentialdiagnostisch sind in diesen Fällen Alloantikörper gegen hochprävalente Antigene abzugrenzen, die zusammen mit Autoantikörpern auftreten können, Parvovirus B19-Infektionen, die aufgrund der Virusreplikation in Erythroblasten als aplastische Anämie imponieren können, und hämolytische Transfusionsreaktionen, die mit einer AIHA verwechselt werden können.²⁶³

Der Mechanismus einer begleitenden Autoimmunisierung im Rahmen der Bildung eines Alloantikörpers ist zudem von Thrombozyten bekannt. Bei einer posttransfusionellen Purpura (PTP) tritt im Rahmen einer sekundären Immunisierung meist gegen das humane Plättchenantigen (HPA)-1a etwa eine Woche nach einer Transfusion eine ausgeprägter Thrombopenie auf.²⁰ Der Plättchenabbau beschränkt sich nicht auf die transfundierten Thrombozyten. Durch

teils nur schwach reaktive, aber bei PTP relevante Autoantikörper werden autologe Thrombozyten ebenfalls abgebaut.¹⁷⁶

Tabelle 5: Häufigkeit von Alloantikörpern bei Patienten mit Autoantikörpern

<i>Untersucher</i>	<i>Frequenz der Auto- und Alloantikörperkoinkidenz</i>
Wallhermfechtel et al. (1984) ²⁵⁴	15% (19 von 125 Patienten)
Laine und Beattie (1985) ¹³⁷	38% (41 von 109)
James et al. (1988) ¹²²	32% (13 von 41)
Issitt et al. (1996) ¹¹⁹	39% (49 von 127)
Leger und Garratty (1999) ¹⁴⁴	47% (194 von 411)*
Sokol et al. (2000) ²³⁰	25% (191 von 759)
Winters et al. (2001) ²⁶¹	31% (51 von 167)
Shirey et al. (2002) ²²⁰	40% (8 von 20)
Wheeler et al. (2004) ²⁶⁰	53% (53 von 100)
Young et al. (2004) ²⁶³	34% (41 von 121)
Maley et al. (2005) ¹⁵⁰	31% (39 von 126)
Ahrens et al. (2007) ²²	28% (200 von 717)
Σ	32%

*mit Polyethylenglykol (PEG) wurden Alloantikörpern in 47% und ohne PEG in 40% detektiert.

Alloimmunisierungen gegen Erythrozyten prädisponieren für das Auftreten von Autoantikörpern, und Patienten mit Autoantikörpern weisen eine hohe Prävalenz von Alloantikörpern auf. Während transfundierte Patienten im allgemeinen mit einer Prävalenz von etwa 5% alloimmunisiert sind, liegt die Prävalenz von Alloantikörpern bei Patienten mit Autoantikörpern wesentlich höher (32%, Tabelle 5).²² Diese Koinkidenz ist nicht auf eine besondere Immunisierbarkeit von Patienten mit AIHA zurückzuführen, sondern in den meisten Fällen durch die Entwicklung von Autoantikörpern in Begleitung von Alloantikörpern begründet.²² Nicht bei allen Patienten mit Autoantikörpern läßt sich eine ursächliche Alloimmunisierung darstellen. Alloantikörper könnten beispielsweise zum Untersuchungszeitpunkt unter der Nachweisgrenze liegen, oder Immunisierungen gegen andere Strukturen als Erythrozyten könnten eine Rolle spielen.

4.3 Begleitende medikamentös induzierte Autoantikörper bei Medikamenten-abhängigen Antikörpern

Wir konnten zeigen, daß mehrere Arten von Medikamentenantikörpern gleichzeitig auftreten können.^{6,13,18} Rifampicin und insbesondere Diclofenac führten zur Bildung von sowohl Medikamenten-abhängigen Antikörpern und von medikamentös induzierten Autoantikörpern. So hatten 8 von 9 Patienten mit Diclofenac-abhängigen Antikörpern zusätzliche Autoantikörper. Diese Form begleitender Autoantikörper ist bei verschiedenen anderen Medikamenten zusammen mit Medikamenten-abhängigen Antikörpern bekannt (Tabelle 4, S. 21).¹⁷⁵

Das gleichzeitige Auftreten von Medikamenten-abhängigen Antikörpern und medikamentös induzierten Autoantikörpern spricht für eine gemeinsame Pathophysiologie der Antikörperbildung. Medikamente können aufgrund ihrer Größe, meist unter 1000 Da, nicht direkt am B- oder T-Zellrezeptor binden, und sie sind auch für eine MHC-Präsentation zu klein.²⁰⁸ Diese Substanzen müssen zunächst an ein Protein oder Glykoprotein als Hapten binden.^{1,2} Das Medikament bildet diesem Konzept zufolge eine diskrete oder stabilere Interaktion mit der Zelloberfläche oder dem präsentierten Antigen aus (Abbildung 3, S. 59).²⁰⁸ Das resultierende Neoantigen kann dann die Bildung von Medikamenten-abhängigen Antikörpern oder medikamentös induzierten Autoantikörpern provozieren, indem an diese Gruppe natürliche Antikörper mit schwacher und unter gewöhnlichen Umständen nicht relevanter Affinität für autologe Strukturen binden können, deren Affinität durch die Substanz gesteigert wird. Wenn B-Zellen, die solche Antikörper produzieren, T-Zellhilfe erfahren und reifen, kann eine Medikamenten-abhängige Immnhämolyse entstehen.³¹ Unklar ist, ob die Medikamentenanlagerung und Neoantigenbildung im wesentlichen „in-situ“ am intakten Erythrozyten erfolgt, oder ob der pathophysiologisch entscheidende Schritt die Bildung von Neoantigenen bei der Präsentation im MHC-Kontext und der Involvierung von T-Helferzellen ist (Abbildung 3, S. 59).

Für einen klassischen Immunisierungsablauf mit T-Helferzellstimulation spricht zudem die Beobachtung, daß die erste Substanzapplikation nie zur Immnhämolyse führt, und nach oft vielfacher, intermittierender Substanzapplikation zunächst eine milde Symptomatik auftreten kann, bevor nach erneuter Gabe eine (sub)letalen Hämolyse auftritt.

Die Pathophysiologie der Medikamentenantikörper wurde initial teils substanzspezifisch gesehen, da gegen die verschiedenen Substanzen vornehmlich jeweils bestimmte Typen von Medikamentenantikörpern gebildet werden. Es wäre nicht unplausibel, wenn die unterschiedlichen Arten von Medikamentenantikörpern unterschiedlichen Interaktionstypen von Substanzen mit der Erythrozytenoberfläche oder ihrer präsentierten Teile repräsentiert und nicht unterschiedliche Arten der Antikörperbildung. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die klinische Relevanz von Medikamentenantikörpern einen gewissen Gruppentypus aufweist.

Im Neoantigen-Konzept werden die von Fall zu Fall und von Substanz zu Substanz unterschiedlichen Arten von Medikamentenantikörpern durch eine variierende Position des Neoantigens bei der Antikörperbindung erklärt. Zentrale Positionen würden als Medikamenten-abhängige Antikörper erscheinen, und eine entfernte Lage des Neoantigens bei der Antigenbindung würde bis zur anscheinenden Autoreaktivität reichen (Abbildung 3, S. 59). In diesem Konzept ähneln Autoantikörper bei Medikamenten-abhängigen Antikörpern somit begleitenden Autoantikörpern bei Immunisierungen gegen allogene Blutgruppenmerkmale, die durch Kreuzreaktivität erklärt werden kann.

Die essentielle Beteiligung von erythrozytären Membranproteinen bei der Bildung von Medikamenten-abhängigen Antikörpern konnten wir insbesondere in den Fällen einer Blutgruppenspezifität demonstrieren, die wir in allen Fällen gegen des Antigen C aus dem Rh-Blutgruppensystem fanden.^{6,18} Blutgruppenspezifische Medikamenten-abhängige Antikörper sind von verschiedenen anderen Fällen bekannt, u.a. gegen Antigene aus den Blutgruppensystemen Lutheran und I.

Für Medikamenten-abhängige Antikörper vom sogenannten „Immunkomplextyp“ fanden wir häufig akute Verläufe mit Niereninsuffizienz und einer Mortalität durch Multiorganversagen

von 30%.¹⁸ Erfahrungen mit anderen Medikamenten konnten somit bestätigt werden.^{6,194,207} Die Ursache dieser systemischen Komplikationen ist unklar. Pathophysiologisch können neben der Hämolyse, Anämie und Schock andere Faktoren involviert sein. Erythrozytäre Antigene, an die Medikamentenantikörper binden, könnten ebenfalls auf Nierenzellen exprimiert werden.⁷⁸ Produkte der Komplementkaskade und Zytokine können ebenfalls zum Nierenschaden beitragen.¹⁹⁴ Dies wird durch die klinische Erfahrung unterstützt, daß die betroffenen Patienten oft von Plasmapheresen und Glukortikoidgaben profitieren.^{13,18}

Es ist unklar, warum der Verlauf oft prolongiert ist und stationäre Aufenthalte über mehrere Wochen erfordert, obwohl die Halbwertszeiten der involvierten Substanzen im Stundenbereich liegen. Ob eine Speicherung von Medikamenten in Immunkomplexen oder in bradytrophen Geweben erfolgt, ist unbekannt. Alternativ ist vorstellbar, daß (Spur-)Metaboliten mit langer Halbwertszeit eine Rolle spielen. Schließlich können auch Diclofenac-induzierte Autoantikörper zu einem prolongierten Verlauf beitragen.¹³

Autoantikörper können zur Fehldiagnose führen, indem Medikamenten-abhängige Antikörper übersehen werden.⁶ Sie können bei der immunhämatologischen Untersuchung weitere Antikörper maskieren, so daß Antikörper mit einer größeren klinischen Relevanz übersehen werden und eine Verwechslung der Hämolyseursache mit serologischen Transfusionsreaktionen oder einer AIHA möglich ist.¹⁸ Dies ist von klinischer Bedeutung, weil diese Patienten eine ungleich intensivere Therapie erfordern und das verursachende, meist regelmäßig verabreichte Medikament abgesetzt werden muß.

Fehldiagnosen sind zudem möglich, da für die Reaktion von Medikamenten-abhängigen Antikörpern geringste Spuren der betreffenden Substanz ausreichen können. Der sichere Nachweis von medikamentös induzierten Autoantikörpern in Abgrenzung zu Medikamenten-abhängigen Antikörpern ist nur aus dem Eluat mehrfach gründlich gewaschener autologer Erythrozyten möglich, wenn das letzte Waschwasser zu keiner Reaktionsverstärkung im Test auf Medikamenten-abhängige Antikörper führt. Dieser Test erfordert geeignete Kontrollseren, die für die betreffende Substanz spezifische Medikamenten-abhängige Antikörper und keine Autoantikörper enthalten.

Aufgrund der technisch anspruchsvollen Diagnostik ist eine erhebliche Dunkelziffer unerkannter Fälle mit Medikamenten-abhängigen Antikörpern wahrscheinlich. Dies wird von der Beobachtung unterstützt, daß die bekanntgewordenen Fälle, von Ausnahmen abgesehen, nur in wenigen Zentren beobachtet worden sind.

In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß diese begleitende Autoimmunisierung unter Antigenkarenz ebenso wie die Nachweisbarkeit von Medikamenten-abhängigen Antikörpern in der Regel im Verlauf von Monaten rückläufig ist. Sie ist damit der Immunisierung bei der Heparin-induzierten Thrombozytopenien vom Typ II ähnlich.²⁵⁵

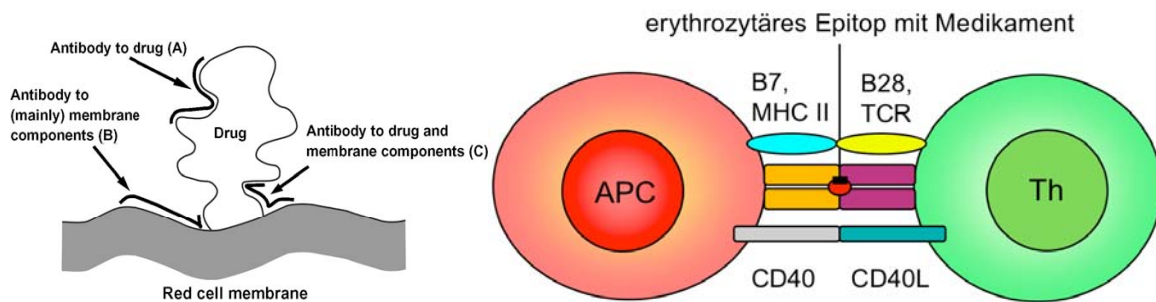


Abbildung 3: durch Medikamentenbindung veränderte erythrozytäre Oberfläche (links)⁸⁷ und veränderte Antigenpräsentation im kostimulatorischen Kontext (rechts)

4.4 Epitop-Ausbreitung bei der Immunisierung gegen Erythrozyten-Antigene

Immunisierungen gegen mehr als ein Antigen auf Erythrozyten kann auf Epitop-Ausbreitung zurückzuführen sein (epitope / determinant spreading).²⁴⁷ Dieser Prozeß bezeichnet die Immunisierung gegen Epitope, die nicht die initiale Immunisierung ausgelöst haben, und die mit den initialen Epitopen nicht kreuzreaktiv sind (Abbildung 4 S. 61). Die Immunisierung kann sich dabei auf Epitope auf dem gleichen Antigen ausbreiten (intramolekulare Epitop-Ausbreitung), oder zu Epitopen auf anderen Antigenen (intermolekulare Epitop-Ausbreitung). Epitop-Ausbreitung ist für die Ausbreitung und Vergrößerung einer Immunantwort gegen Pathogene von Bedeutung. Die (räumliche) Assoziation der Antigene kann dafür pathophysiologisch relevant sein. Oft sind kryptische Epitope auf dem gleichen Molekül oder immunodominante Epitope auf benachbarten Molekülen betroffen. Epitop-Ausbreitung ist ein verbreiteter pathophysiologischer Mechanismus der Immunantwort, der zur Häufigkeit von Mehrfachimmunisierungen beitragen kann.

Die Ausbreitung einer Immunisierung kann, ungeachtet der primären Immunisierungsursache, autologe Strukturen involvieren, welche durch Zell- und Gewebeschaden verfügbar werden.^{129,147,248} Epitop-Ausbreitung trägt zur chronischen Pathogenese von Autoimmunerkrankungen auf T-Zell- und Antikörperbasis bei.⁷²

Wir konnten zeigen, daß bei Erythrozyten die Bildung von Antikörpern gegen das Merkmal S auf Glykophorin B mit dem Auftreten von Autoantikörpern stark assoziiert war. Autoantikörper sind in der Regel gegen allgemeine Strukturen auf den Rh-Proteinen gerichtet. Diese Assoziationen legen einen Immunisierungszusammenhang nahe, der eventuell auf intermolekuläre Epitop-Ausbreitung zurückzuführen ist, und bei dem die Immunisierung gegen ein Alloantigen sich auf benachbarte, nicht-polymorphe Strukturen ausbreitet, die ansonsten nicht präsentiert werden, d.h. auf Autoantigene. Beobachtungen bei Immunisierungen durch EK-Transfusionen, die durch Alloimmunisierung eine häufige Ursache von Autoantikörpern sind,²² stützen diese Vermutung.

Die Rh-Proteine sind u.a. zusammen mit Bande 3 und Glykophorin B, dem Träger des S/s-Polymorphismus, in einem supramolekularen Komplex assoziiert.^{55,58,245} Rh-Proteine, die beim Rh_{null}-Phänotyp nicht exprimiert werden, sind die immunogensten und klinisch relevantesten Blutgruppenantigene. Die Mehrzahl der alloreaktiver Immunantikörper ist gegen Rh-Antigene gerichtet, und die Mehrzahl der Autoantikörper reagieren nicht mit Rh_{null}-Erythrozyten.^{37,142} Es ist in diesem Zusammenhang interessant, daß die Zielstruktur von Au-

toantikörpern auf Erythrozyten häufig vorkommt.^{179,250} Daher sind die beobachteten Assoziationen, wenn die Theorie der Epitop-Ausbreitung korrekt ist, nicht überraschend.²⁴

Alternativ kann die Assoziation von Anti-S und Autoantikörpern, die wir fanden, auf immunoregulatorische Gene zurückzuführen sein, die mit *GYPB**s assoziiert sind, und die zur Autoimmunisierung prädisponieren. Diese Hypothese wird durch die schwächere Assoziation von Anti-s mit Autoantikörpern gestützt.

Andere Gründe für die o.g. Assoziation wie z.B. Kreuzreaktivität oder pseudoalloreaktive Autoantikörper, d.h. Allospezifitäten vom „mimicking“ Typ¹¹⁹ sind weniger wahrscheinlich. Anti-S und Autoantikörper binden mit Glykophorin B und meist Rh-Proteinen unterschiedliche Strukturen. Der Unterschied läßt sich mit papainisierten Erythrozyten darstellen, die die Antigene S/s nicht mehr, aber besser zugängliche Rh-Proteine haben. Mit diesen reagiert Anti-S nicht, Autoantikörper dagegen verstärkt.²⁴

Bei Anti-D überraschte die inverse Assoziation mit Autoantikörpern. Der Unterschied zwischen Antikörpern gegen das RHCE-Protein, die mit Autoantikörpern assoziiert sind, kann mit der immunologischen Struktur zusammenhängen. Antikörper gegen Antigene des RHCE-Proteins erkennen einen einzigen Aminosäurenunterschied, während Anti-D gegen das gesamte RHD-Protein mit allen Epitopen gerichtet ist, welches bei kaukasischen D-negativen Individuen fehlt. Die Bildung spezifischer Antikörper gegen Antigene, die den eigenen ähnlicher sind, mag schwieriger sein als die Bildung gegen Antigene, die Autoantigenen weniger ähneln.²⁴

Im Rahmen der Epitop-Ausbreitung können weiterhin nicht-extrazelluläre Polymorphismen zur Pathophysiologie der Autoimmunisierung beitragen. Es wird diskutiert, daß die APC-Präsentation allogener Peptide, die im transmembranären oder intrazellulären Bereich von den autologen verschieden sind, zur Stimulation von T-Zellen führen kann, die ihrerseits autoreaktive B-Zellen stimulieren.²⁶⁵ Gegen dieses Konzept spricht, daß es Autoantikörper ohne Alloimmunisierung nicht erklären kann. Es kann zudem nicht erklären, warum nicht-extrazelluläre Polymorphismen, die regelhaft bei schwachen D auftreten, nicht zur posttransfusionalen Immunisierung führen.

Die Bildung eines Alloantikörpers gegen S war insbesondere bei Schwangeren oft von Autoantikörpern begleitet. Die Frage, wie in Fällen ohne Alloantikörpernachweis eine Schwangerschaft zur Autoimmunisierung ohne Alloantikörperbildung führen kann, ist unklar. Eventuell sind ABO-Inkompatibilitäten von Bedeutung. Etwa 25% der Schwangerschaften sind ABO-inkompatibel, und inkompatible fetale Zellen werden wiederkehrend vom mütterlichen Immunsystem abgebaut. Dieser Vorgang kann zu Aktivierung des mütterlichen Immunsystems beitragen.²⁴

Epitop-Ausbreitung ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn das Immunsystem Pathogene nicht unmittelbar abbauen kann. In diesen Fällen ist eine Diversifikation der Immunantwort typisch.⁷² Die dauerhafte Antigen-Konfrontation bei Schwangerschaften, im Gegensatz zum auf etwa 58 Tage begrenzten Antigenkontakt nach EK-Transfusion,¹⁵⁷ kann, wenn die Theorie der Epitop-Ausbreitung korrekt ist, zur Erklärung der auffälligen Assoziation von Anti-S und Autoantikörpern bei Schwangeren beitragen.²⁴

Eines der am besten charakterisierten Modelle für die Epitopausbreitung ist die murine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, die der humanen multiplen Sklerose ähnelt, und die auf eine Immunisierung gegen das basische Myelin-Protein (MBP), Proteolipid-Protein (PLP) und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) zurückzuführen ist.¹⁵³ Im Krankheitsverlauf nimmt sowohl die Anzahl der erkannten Epitope zu als auch die MHC-Restriktion ab. Beispielsweise läßt durch Immunisierung geeigneter Mäuse mit PLP eine T-Zellimmunität erzeugen, die im Verlauf MBP mit erfaßt. Umgekehrt läßt sich mit MBP eine Immunität gegen PLP erzeugen.^{246,247}

Zudem läßt sich mit Peptidsequenzen beobachten, daß eine Ausbreitung der T-Zellantwort von einem immunodominanten MBP-Epitop zu anderen, kryptischen MBP-Epitopen stattfindet. Dies bedeutet, daß der durch die initiale Immunisierung verursachte Entzündungsprozeß ausreicht, um T-Zellen Epitope verfügbar zu machen, die von APC vorher nicht präsentiert worden sind.¹⁵³

Die Bedeutung des initialen Immunisierungsprozesses wird zudem durch Beobachtungen an non-obese diabetic (NOD)-Mäusen belegt, die spontan einen Diabetes mellitus Typ 1 durch eine Immunisierung initial gegen die Glutamatdecarboxylase (GAD) entwickeln. Wird diese durch Toleranzinduktion blockiert, unterbleibt die Ausbreitung der T-Zellreaktivität gegen andere Betazellantigene wie Carboxypeptidase H, Insulin und Hitzeschockprotein (HSP) 65.²⁴²

Analoge Beobachtungen wurden für B-Zellimmunisierungen gemacht, so z.B. bei Kaninchen, die nach Immunisierung mit alteriertem Thyreoglobulin Antikörper auch gegen normales, eigenes Thyreoglobulin entwickelten.²⁵⁷ Ähnlich dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) führte die Immunisierung von Mäusen mit Sm B-Peptiden zur Entwicklung von anti-nukleären Antikörpern (ANA), Thrombozytopenie, Krampfanfällen und Proteinurie.¹²¹ Epitop-Ausbreitung konnte auch durch die Bildung von Antikörpern gegen Ro nach Immunisierung von Mäusen mit murinem oder humanem La erzeugt werden.²⁴³ Eine Auswahl von Krankheiten, die mit Epitop-Ausbreitung progredieren, ist in Tabelle 6 zusammengefaßt (S. 62).

Abbildung 4: Pathophysiologisches Modell der Epitop-Ausbreitung^{72,248}

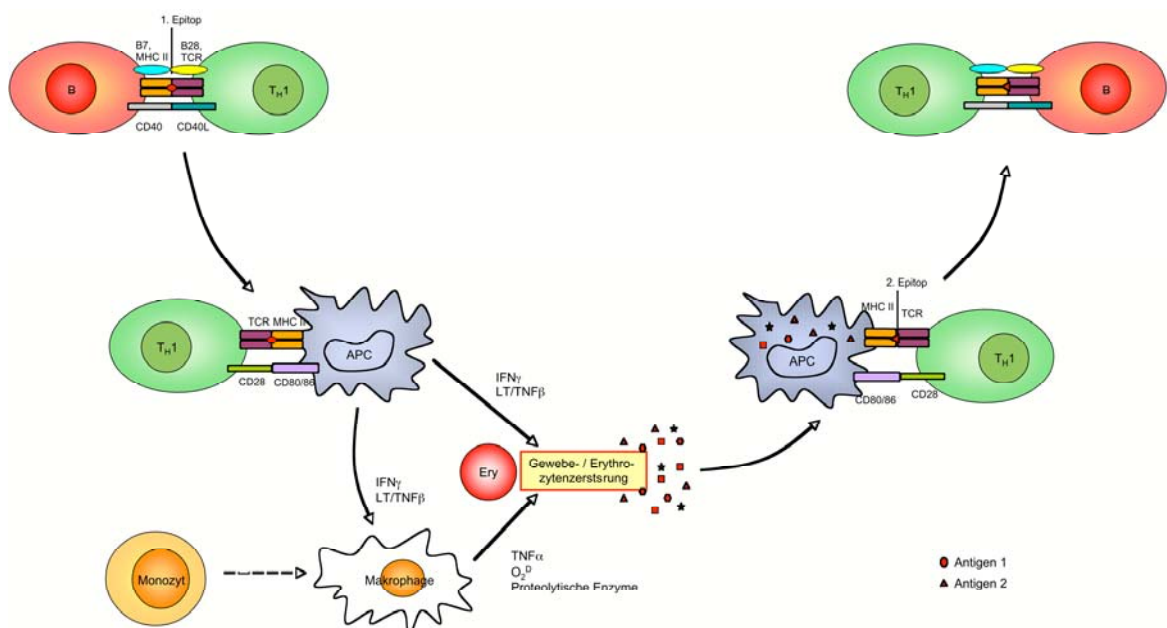


Tabelle 6: Epitop-Ausbreitung in ausgewählten Krankheiten und deren Tiermodellen^{72,84,153}

<i>Tiermodell</i>	<i>Krankheit</i>	<i>Typ</i>	<i>Strukturen</i>
Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	Multiple sklerose	T	MBP, PLP, MOG
Non-obese diabetic (NOD) Maus	Diabetes mellitus Typ 1	T, B	GAD, Insulin, IA-2, Ganglioside, Peripherin, HSP 65, Carboxypeptidase H
Oophoritis	autoimmune Infertilität	T, B	ZP3
Experimentelle autoimmune Gastritis	atrophische Gastritis	T, B	H ⁺ /K ⁺ -ATPase (α- und β-Untereinheiten)
Sm / nRNP	SLE	B, T	Sm (B, B', D), U1 nRNP (70K, A C)
Ro / La	Sjögren-Syndrom	B	Ro52, Ro60, La
Experimentelle autoimmune Thyreoiditis	Autoimmune Thyreoiditis	B, T	Thyreoglobulin, Thyreoperoxidase
Erythrozytäre Autoantikörper	AIHA	B	RHCE, Bande 3, Glykophorin B

GAD, Glutaminsäure-Decarboxylase; IA-2, Tyrosin-Phosphatase; MBP, basisches Myelin-Protein; MOG, Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; PLP, Proteolipid Protein; SLE, systemischer Lupus erythematodes

4.5 Kostimulation und Inhibition. CD47-Expression und AIHA

Die Rolle kostimulatorischer Moleküle für den Immunisierungsprozeß ist bekannt. Die T-Zellstimulation ist auf die Bindung von CD80/86 an CD28 angewiesen. CD80/86 werden ausschließlich von sog. professionellen APC exprimiert, so daß die T-Zellregulation ausschließlich durch professionelle APC erfolgt.⁵⁶ Wenn diese Kostimulation fehlt, oder wenn die Bindung mit CTLA-4 (CD152) erfolgt, reagieren T-Zellen mit Anergie.^{95,128,253} CTLA-4 wird von T-Zellen zeitversetzt nach Aktivierung exprimiert und ist für das immunologische Gleichgewicht wesentlich.⁵⁶ Ein gewisser Beleg dafür sind Beobachtungen bei *CTLA-4* Polymorphismen. Der 49A>G Polymorphismus ist mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus Typ 1 assoziiert.¹⁷³ Ein A>G Polymorphismus in der 3' untranslated region (UTR) ist mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen und Diabetes mellitus Typ 1 assoziiert.⁵⁶ Der gering ausgeprägte Polymorphismus von *CTLA-4* kann als Konservierungs-Beleg für die essentielle Bedeutung dieses Gens angesehen werden.

Im Gegensatz zur Bedeutung kostimulatorischer Moleküle ist die Bedeutung inhibitorischer Moleküle in der immunologischen Endstrecke bei der Interaktion zwischen immunologischen Effektorzellen und den Zielantigenen nur teils bekannt. Im murinen Modell kann die Expression von CD47 auf opsonierten Zellen die Phagozytose hemmen.¹⁶⁴

CD47 ist ein ubiquitär exprimiertes, transmembranäres Glykoprotein, das an das Signal Regulatory Protein (SIRP) α , das von Makrophagen exprimiert wird, an SIRP β 2 und an Thrombospondin bindet. Zudem interagiert es mit verschiedenen Integrinen.^{166,178} Dadurch ist es in die Zellmigration und Phagozytoseprozesse involviert. Die Bindung von CD47 an SIRP α führt zur Hemmung der Phagozytose, und CD47⁻ Erythrozyten und Thrombozyten werden von CD47⁺ Makrophagen rasch eliminiert.^{164,167} CD47-defiziente Mäuse entwickeln eine schwere AIHA.¹⁶⁵

Auf menschlichen Erythrozyten ist CD47 Bestandteil des Rh-Komplexes,^{58,71} der die überwiegende Zielstruktur wärmereaktiver Autoantikörper darstellt.^{37,142} Protein 4.2-defiziente Patienten oder solche mit dem Phänotyp Rh_{null}, die nur geringe Mengen CD47 exprimieren, haben in der Regel eine moderate hämolytische Anämie nicht immunologischer Ursache.^{19,54}

AIHA-Patienten hingegen wiesen in unserer Untersuchung keine reduzierte CD47-Expression auf.¹⁹ Dies spricht zunächst gegen eine pathophysiologische Rolle von menschlichem CD47 und stützt Immunphagozytose-Untersuchungen, die keine Abhängigkeit von der CD47-Expression nachweisen konnten; Rh_{null}-Erythrozyten weisen keine gesteigerte Monozyten-Interaktion auf.³⁰ Zudem führen CD47 schwach exprimierende Erythrozyten wie z.B. beim Rh_{null}-Phänotyp oder Protein 4.2-Defizienz nicht zur Ausbildung einer autoimmunhämolytischen Anämie.^{54,159} Die reduzierte Haltbarkeit dieser Erythrozyten ist zytoskelettal-mechanisch bedingt.

Die Immunphagozytostest-Ergebnisse sprechen nicht vollständig gegen eine Bedeutung von CD47, da die erhöhte Phagozytose im Mausmodell im wesentlichen mit Milz-Makrophagen zu sehen ist, während der Immunphagozytose-Test mit peripheren Monozyten angesetzt wird.^{164,236} Zudem reichen geringe Mengen von CD47 möglicherweise, um eine erhöhte Phagozytose zu verhindern. Ein Dosiseffekt wie bei Mäuse-Thrombozyten läßt sich mit menschlichen Erythrozyten jedoch nicht nachweisen.^{164,167} Die CD47-SIRP α -Interaktion könnte beim Menschen im Gegensatz zum Mausmodell eine niedrigere Affinität und weniger signifikante Bedeutung haben.¹⁹ Ausschließen läßt sich eine Bedeutung von CD47 dennoch nicht, da CD47 polymorph sein und in funktionell unterschiedliche Isoformen existieren kann. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, daß CD47 in unterschiedlichen Konformationen vorkommen kann.¹⁹ Schließlich kann die Tatsache, daß eine CD47-Defizienz beim Menschen nicht bekannt ist, als Ausdruck der essentiellen Bedeutung einer CD47-Expression verstanden werden.

Von Bedeutung scheint CD47 bei der unspezifischen Phagozytose zu sein. Perfluorocarbon-Partikel werden langsamer eliminiert, wenn sie zusammen mit löslichem CD47 infundiert werden.¹¹⁴ Dies kann für Patienten mit idiopathischer autoimmuner Thrombozytopenie relevant sein, bei denen wir CD47 im Plasma nachweisen konnten.¹⁹ Zudem kann eine transfusionsmedizinische Relevanz möglich sein, da Erythrozyten im Verlauf der Lagerung CD47 in den Überstand freisetzen.^{26,44,49,233}

Weitere immunregulatorische Moleküle sind die AIHA-Entstehung pathophysiologisch ähnlich unbedeutend. Zwar führt die Defizienz von CD55 (Decay-accelerating factor, DAF) und CD59 (Membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL) zur paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH), aber nicht zur Entstehung einer AIHA. Vom Komplement Rezeptor 1 (CD35) wird angenommen, daß er die Entstehung einer exzessiven Komplementaktivierung hemmt und Ery-

throzyten somit vor einer Immunhämolyse schützt.¹⁴⁸ Patienten mit stark reduzierter Expression der Blutgruppenantigene auf diesem Molekül (Knops, u.a. beim In(Lu)-Phänotyp)¹²⁰ weisen jedoch keine obligate AIHA auf. Dies spricht bei CD55, CD59 und CD35 nicht für eine pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung der AIHA.

Von ähnlich untergeordneter Bedeutung sind HLA-Antigene. Assoziationen von bestimmten HLA-Typen, die bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen bekannt sind, z.B. HLA-B27 mit M. Bechterew, einige Klasse II-Antigene mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen oder mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen,^{41,60} sind bei der AIHA nur in schwacher Form bekannt (HLA-DQ6).²¹⁷

4.6 Autoantikörper durch Toleranzdurchbrechung

Bei der Entstehung von Autoantikörpern sind neben den bislang diskutierten Komponenten immunregulatorische Mechanismen von Bedeutung, deren Rolle insbesondere im postinfektiösen Kontext verdeutlicht werden kann. Autoantikörper können nach Infektionen mit einem weiten Spektrum an Pathogenen auftreten (Einleitung 1.3.1.2, S. 11). Die erythrozytäre Spezifität der Autoantikörper bei einer breiten antigenen Vielfalt der infektiösen Erreger legt Mechanismen von allgemeiner Bedeutung nahe. Der Pathomechanismus wird im folgenden näher erläutert.

B- und T-Zellen

Antikörper gegen autologe Erythrozyten werden von B-Zellen gebildet. Während der B-Zellreifung werden Zellen mit hoher Affinität für Selbstantigene eliminiert, und Lymphozyten mit niedriger Affinität werden funktionell inaktiviert.^{95,128} Dennoch verbleiben 5–20% autoreaktive B-Zellen unter den zirkulierenden, reifen B-Zellen, ohne daß regelhaft Autoimmunerkrankungen entstehen.²⁵¹ Bei Gesunden ist daher von einer funktionierenden Kontrolle der potentiellen Autoreaktivität auszugehen.

Die Aktivierung von B-Zellen wird durch das Zytokinmilieu sowie durch antigenspezifische zelluläre Interaktion mit T-Zellen gesteuert. Diese Interaktion wird u.a. für einen Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM zu IgG als erforderlich angesehen.¹³⁰ Da Autoantikörper zumeist vom IgG-Typ sind, wird von einem Klassenwechsel durch T-Zellhilfe ausgegangen. Weitere Hinweise auf die T-Zellabhängigkeit erythrozytärer Autoantikörper ergeben sich durch den Nachweis autoreaktiver zytotoxischer T-Zellen bei Patienten nach multiplen Transfusionen,¹²⁷ durch die verzögerte Autoimmunisierung bei New Zealand Black (NZB)-Mäusen nach Elimination von T-Helferzellen und durch die Verhinderung der Autoimmunisierung bei T-zelldepletierten Mäusen, die gegen Rattenerthrozyten immunisiert werden.³⁹

Die Bildung von T-Zellen führt obligat zu potentiell autoreaktiven Zellen. Im Thymus ist die Ausreifung nur von T-Zellen möglich, die eine mittlere T-Zellrezeptoraffinität für MHC-präsentierte autologe Peptide haben.^{128,215} Dies macht verständlich, warum bei gesunden Personen naive, autoreaktive T-Zellen gegen beispielsweise Inselzellen oder Erythrozyten nachweisbar sein können.^{38,193} Eine manifeste Autoreaktivität entwickelt sich nur in seltenen Fällen, u.a. aufgrund einer Kompartiment-Isolierung. Das Vorkommen naiver T-Zellen ist im wesentlichen auf Lymphorgane begrenzt, sie kommen daher mit vielen Autoantigenen nicht in Kontakt.^{25,253}

Einen weiteren Schutz vor Autoimmunisierungen stellt die erforderliche Epitopkongruenz dar. Die erfolgreiche B- und T-Zellinteraktion setzt voraus, daß native Epitope, die Antikörpern zugänglich sind (B-Epitope), im gleichen Kontext wie MHC Klasse II-präsentierbare Peptidfragmente (T-Epitope) verfügbar sind.²⁷ Diese erforderliche Kongruenz begrenzt die Anzahl immunodominanter Peptide²³⁵ und ist bei autologen Strukturen nicht in jedem Fall gegeben.¹⁸⁵

Eine Subpopulation der T-Zellen ist aktiv der Aufrechterhaltung der Toleranz vor autologen Strukturen beteiligt. Neben B-zellstimulierenden Zellen (T-Helferzellen) gibt es regulatorische T-Zellen, die CD25 exprimieren und antigenspezifisch supprimieren.³⁹ Etwa 5–10% der peripheren CD4⁺ Zellen sind regulatorische T-Zellen.¹⁹⁶ Sie können unterschiedlicher Genese sein und entweder als regulatorische T-Zellen gebildet worden sein (natürliche T_{reg}), oder sie können peripher oder mukosaständig induziert worden sein.^{126,191} Regulatorische T-Zellen bilden sich unter dem Einfluß von TGFβ und sezernieren IL-10 bzw. TGFβ.³

Regulatorische T-Zellen, die für Rh Autoantigene spezifisch sind, können im peripheren Blut und in der Milz von Patienten mit AIHA nachweisbar sein. Diese Zellen lassen sich spezifisch durch immunodominante Peptide stimulieren, sind in-vitro zur IL-10 Sekretion und Hemmung einer Th1 Stimulation fähig.^{39,104} Bei Patienten mit AIHA sind bislang lediglich induzierte regulatorische T-Zellen (Tr1), aber keine natürlichen regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) nachgewiesen worden.³⁹ Für eine Bedeutung von regulatorischen T-Zellen bei der Pathophysiologie der AIHA spricht die Beobachtung, daß sich im Mausmodell ohne oder mit nicht-funktionalen CD4⁺ CD25⁺ Zellen fatale Autoimmunerkrankungen entwickeln.¹⁹⁷ Zudem ist die Bildung erythrozytärer Alloantikörper nach CD25-Depletion gesteigert.²⁶⁴

Die Aktivität der regulatorischen T-Zellen ist unter physiologischen Bedingungen mit der von helfenden und zytotoxischen T-Zellen balanciert,⁴¹ somit können autoreaktive Zellen kontrolliert werden. Das Gleichgewicht dieser T-Zellen wird im Detail von APC-Aktivierungen gelenkt (s.u.). Auf systemischem Niveau steht dieses Gleichgewicht unter dem Einfluß von Kortisol, vasoaktivem, intestinalen Peptid (VIP) und α-Melanozyten-stimulierendem Hormon (MSH), die tolerogen wirken, sowie von Melatonin, Prolaktin und Östrogenen, in deren Gegenwart vermehrt mit Autoimmunisierungen zu rechnen ist.^{95,221,222}

Für Autoimmunisierungen kann weiterhin das Verhältnis der T-Helferzell-Subpopulationen von Bedeutung sein. T-Helferzellen werden in Th1- und Th2-Zellen unterschieden. Th1-Zellen entstehen unter dem Einfluß von Interleukin (IL)-12 und produzieren u.a. Interferon (IFN)_γ. Th2-Zellen entstehen unter dem Einfluß von IL-4 und produzieren u.a. IL-10.^{3,108} Das Verhältnis von IFN_γ zu IL-10 ist bei AIHA und anderen Autoimmunerkrankungen in Richtung Th1 verschoben.^{39,83}

Schließlich können von den beschriebenen T-Zellen Th17-Zellen abgegrenzt werden, die IL-17 produzieren.¹⁰⁸ Die Bedeutung dieser neuen Zellsorte für die Pathophysiologie der Autoimmunisierung ist noch nicht klar.

Antigenpräsentation

Die Aktivierung naiver T-Zellen erfordert eine Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen (APC), welche prozessierte Antigene im MHC Klasse II-Kontext zusammen mit kostimulatorischen Molekülen präsentieren.^{135,146,232} Nicht alle Antigene werden gleich prozessiert. Autologe Strukturen werden von APC unter physiologischen Bedingungen nur ineffektiv prozessiert

und präsentiert. Sie stellen somit Kryptantigene dar und können Epitope beinhalten, die Spaltstellen der prozessierenden Enzyme von APC überspannen und zerstörend prozessiert werden, oder Epitope, die MHC-Moleküle zu schwach binden, um mit anderen Peptiden effektiv um die Präsentation kompetieren zu können. T-Zellen mit autoreaktiver Spezifität für diese Epitope können durch APC unter physiologischen Umständen somit nicht stimuliert werden.⁸²

Für die T-Zellstimulation ist eine vorherige APC-Aktivierung und -Reifung erforderlich. Diese erfolgt durch APC-Stimulation mit sog. „Gefahrensignalen“. Dazu zählen inflammatorische Zytokine wie IL-12, Fibronectin, Fibrinogen, Hyaluronsäure, Surfactant, vermutlich HSP (HSP70, grp96, HSP90 u.a.) und bakterielle Oberflächenstrukturen mit Lipopolysacchariden.^{146,186,191,192} Diese Signale wirken, zumindest teils, als Toll-like receptor (TLR)-Agonisten.^{139,141} APC verfügen zusätzlich über Nukleotid-Bindung-Oligomerisations-Domänen Proteine (NOD) und können durch ATP und UTP aktiviert werden.¹⁸⁶ Schließlich ist eine Aktivierung durch konzentriertes Urat möglich, das beispielsweise aus nekrotischen Zellen stammen kann.¹⁸⁶ Somit steuern APC T-Zellen durch Aktivierung bei Prozessen, die zur Nekrose und Gewebeerstörung führen.^{186,192,219}

Antigenpräsentierende Zellen unterscheiden nicht eigentlich zwischen autologen Proteinen und solchen von Pathogenen. Durch Aktivierung im Inflammationszusammenhang können, wenn autologe Proteine verfügbar sind, APC daher autoreaktive T-Zellen stimulieren. Im Tiermodell kann dieser Prozeß durch die Immunisierung mit autologen Antigenen zusammen mit einem potenten Adjuvans dargestellt werden, der zur autoimmunen Gewebeschädigung führt.¹¹⁶ Zudem gibt es Beobachtungen vom Diabetes mellitus Typ 1, bei dem TLR-Liganden für den Manifestationszeitpunkt der Autoimmunerkrankung entscheidend sein können.¹³⁹

Die Aktivierung von APC beeinflusst zudem das Gleichgewicht der T-Zellpopulationen. Die TLR- oder NOD-Aktivierung dendritischer Zellen u.a. durch IL-6 oder CD28-Aktivierung führt allgemein und unspezifisch zur Hemmung regulatorischer T-Zellen, so daß autoreaktive T-Zellen weniger effektiv supprimiert werden können.^{35,172}

Zu dieser als „bystander“ bekannten Aktivierung autoreaktiver Zellen¹⁷⁶ kann im Rahmen von Infekten zusätzlich eine B-Zellaktivierung durch bakterielle Polysaccharide und TLR-Liganden von Mikroorganismen beitragen, die T-zellunabhängig IgM- oder IgA-Bildung möglich machen kann.²⁵¹

Zusammenfassend sprechen diese pathophysiologischen Beobachtungen für eine allgemeine Begrenzung von Immunisierungsvorgängen auf Situationen, in denen eine Triggerung durch APC erfolgt. Wenn sie für Immunisierungen gegen erythrozytäre Antigene erforderlich sind, ist die Beobachtung verständlich, daß nur ein Teil der Antigen-ungleich transfundierten Patienten Alloantikörper entwickelt. Durch die Begrenzung von effektiven Immunisierungsvorgängen auf die antigenspezifische Interaktion von APC, T- und B-Zellen ist zudem verständlich, warum ein Teil der Patienten Autoantikörper entwickelt. Schließlich kann dieses Konzept für Medikamentenantikörper von Bedeutung sein, wenn die Neoantigenbildung an unterschiedlichen Stellen der Zellinteraktionen erfolgt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Autoantikörper gegen Erythrozyten können einfach zu diagnostizieren sein. Zumeist sind Techniken ausreichend, deren Grundprinzip seit über 60 Jahren bekannt ist. Die Pathophysiologie der Autoimmunisierung hingegen ist weniger bekannt. Klinische Erfahrungen legen nahe, daß Autoantikörper gegen Erythrozyten ätiologisch keine einheitliche Entität darstellen und in Autoantikörper bei autoimmunhämolytischer Anämie unterschieden werden können sowie in begleitende Autoantikörper, die im Rahmen unterschiedlicher Immunisierungen beobachtet werden können.

Die vorgestellten Arbeiten zeigen, daß die Immunisierung gegen fremde Antigene mit der Bildung von Alloantikörpern der wesentliche Risikofaktor für die Entstehung dieser Autoantikörper ist. Erythrozytäre Alloantikörper sind bei Patienten mit erythrozytären Autoantikörpern 22-fach prävalenter, und die Alloimmunisierung erklärt die Autoimmunisierung bei 81% dieser Patienten. Für diese begleitenden Autoantikörper kann eine niedrige Antigenspezifität und Kreuzreaktivität zu Beginn der Alloimmunisierung erklärend sein.

Autoantikörper sind mit bestimmten Alloantikörpern assoziiert. Anhand der normalisierten Odds ratio (NOR) läßt sich dies für das RHCE-Protein (NOR 1,6) und für Glykophorin B mit dem S/s-Polymorphismus zeigen, das mit ersterem in einem Komplex assoziiert ist (NOR 2,7). Dieser Zusammenhang ist plausibel, wenn während der Immunisierung Epitopausbreitung stattfindet.

Für die erythrozytäre Autoimmunisierung sind Veranlagung und konstitutive Kostimulation wie die SIRP α -CD47-Interaktion nur von untergeordneter Bedeutung. Vielmehr können bei der kontextgebundenen Toleranzüberwindung bei begleitenden Autoantikörpern im Rahmen von Allo- oder Medikamentenimmunisierungen triggerende „Gefahrensignale“ von Bedeutung sein, die bei medizinischen Eingriffen vorliegen können, die zur Transfusion führen, oder bei Infektionen, die antibiotisch behandelt werden.

LITERATUR

1. Ackroyd JF. The cause of thrombocytopenia in sedormid purpura. *Clin Sci (Lond)* 1949;8(4):269-289
2. Ackroyd JF. The pathogenesis of thrombocytopenic purpura due to hypersensitivity to sedormid. *Clin Sci* 1949;7:249
3. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007;148(1):32-46
4. Ahrens N, Kingreen D, Seltsam A, Salama A. Treatment of refractory autoimmune haemolytic anaemia with anti-CD20 (rituximab). *Br J Haematol* 2001;114(1):244-245
5. Ahrens N, Salama A, Haas J. Mycophenolate-mofetil in the treatment of refractory multiple sclerosis. *J Neurol* 2001;248(8):713-714
6. Ahrens N, Genth R, Salama A. Belated diagnosis in three patients with rifampicin-induced immune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2002;117(2):441-443
7. Ahrens N, Heymann G, Genth R, Halle K, Pruß A, Kiesewetter H, Salama A. RBC alloantibodies masked by antibodies to high-incidence antigens. *Transfusion Medicine* 2002;12(Suppl. 1):29
8. Ahrens N, Heymann G, Hoppe B, Pruß A, Kiesewetter H, Salama A. New aspects to allo- and autoimmunization in pregnancy. *Vox sang* 2002;83(Suppl. 2):207
9. Ahrens N, Heymann G, Meyer O, Kiesewetter H, Salama A. Results of Treatment with Rituximab (anti-CD20) in three patients with autoimmune hemolytic anemia and/or immune thrombocytopenia and a concise review of reported cases. *Infus Ther Transfus Med* 2002;29(5):277-281
10. Ahrens N, Pruß A, Genth R, Herziger A, Kiesewetter H, Salama A. Immune hemolysis following intramuscular diclofenac administration. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2003;30(Suppl. 1):16
11. Ahrens N, Salama A. Diagnostik erythrozytärer Antikörper (2). *MTA Dialog* 2004;5(7):518-520
12. Ahrens N, Salama A. Diagnostik erythrozytärer Antikörper (1). *MTA Dialog* 2004;5(6):440-443
13. Ahrens N, Schewior L, Garbe E, Kiesewetter H, Salama A. Massive haemolysis after intramuscular diclofenac in a patient who apparently tolerated oral medication. *Vox Sang* 2004;86(1):71-74
14. Ahrens N, Tormin A, Paulus M, Roosterman D, Salama A, Krenn V, Neumann U, Scheduling S. Vertebral body bone marrow is an excellent source for mesenchymal stem cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2004;31(Suppl. 3):14
15. Ahrens N, Tormin A, Paulus M, Roosterman D, Salama A, Krenn V, Neumann U, Scheduling S. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. *Transplantation* 2004;78(6):925-929
16. Ahrens N, Pruss A, Kiesewetter H, Salama A. Bedside testing is now the most important step in preventing ABO-incompatible transfusions. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2005;32(S1):67
17. Ahrens N, Pruss A, Kiesewetter H, Salama A. Failure of bedside ABO testing is still the most common cause of incorrect blood transfusion in the Barcode era. *Transfus Apher Sci* 2005;33(1):25-29
18. Ahrens N, Genth R, Kiesewetter H, Salama A. Misdiagnosis in patients with diclofenac-induced hemolysis: new cases and a concise review. *Am J Hematol* 2006;81(2):128-131
19. Ahrens N, Pagenkopf C, Kiesewetter H, Salama A. CD47 is expressed at normal levels in patients with autoimmune haemolytic anaemia and/or immune thrombocytopenia. *Transfus Med* 2006;16(6):397-402
20. Ahrens N, Salama A: Zellhaltige Hämotherapeutika: Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentrate; in: Hellstern P (ed): Rationelle Therapie mit Blut und Blutprodukten (Hämotherapie). Bremen, Uni-Med Verlag, 2006
21. Ahrens N, Salama A: Supportive Therapie mit Blut und Blutkomponenten; in: Link H, Boke-meyer C and Feyer P (ed): Supportivtherapie bei malignen Erkrankungen. Köln, Deutscher Ärzteverlag, 2006

22. Ahrens N, Pruss A, Kähne A, Kiesewetter H, Salama A. Coexistence of autoantibodies and alloantibodies to red blood cells due to blood transfusion. *Transfusion* 2007;47(5):813-816
23. Ahrens N, Höflich C, Bombard S, Lochs H, Kiesewetter H, Salama A. Immune tolerance induction in patients with IgA anaphylactoid reactions following long-term intravenous IgG treatment. *Clin Exp Immunol* 2008;151(3):455-458
24. Ahrens N, Pruss A, Mayer B, Genth R, Kiesewetter H, Salama A. Association between alloantibody specificity and autoantibodies to red blood cells. *Transfusion* 2008;48(1):20-24
25. Anderton SM, Wraith DC. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* 2002;2(7):487-498
26. Anniss AM, Sparrow RL. Expression of CD47 (integrin-associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfus Apheresis Sci* 2002;27(3):233-238
27. Ansart-Pirenne H, Rouger P, Noizat-Pirenne F. L'allo-immunisation anti-érythrocytaire: mécanismes cellulaires. *Transfus Clin Biol* 2005;12(2):135-141
28. Antonelli G. Effetti della splenectomia di una particolare forma di ittero emolitico acquisito con anemia a tipo pernicioso. *Polyclinico (med)* 1913;13:193-222
29. Argioli F, Diana G, Arnone M, Batzella MG, Piras P, Cao A. High-dose intravenous immunoglobulin in the management of autoimmune hemolytic anemia complicating thalassemia major. *Acta Haematol* 1990;83(2):65-68
30. Arndt PA, Garratty G. Rh(null) red blood cells with reduced CD47 do not show increased interactions with peripheral blood monocytes. *British Journal of Haematology* 2004;125(3):412-414
31. Aster RH, Bougie DW. Drug-induced immune thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2007;357(6):580-587
32. AuBuchon JP, de Wildt-Eggen J, Dumont LJ. Reducing the variation in performance of antibody titrations. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132(7):1194-1201
33. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95(2):375-387
34. Aygun B, Padmanabhan S, Paley C, Chandrasekaran V. Clinical significance of RBC alloantibodies and autoantibodies in sickle cell patients who received transfusions. *Transfusion* 2002;42(1):37-43
35. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4(+)/CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol* 2002;169(11):6210-6217
36. Banks J, Poole J, Ahrens N, Seltsam A, Salama A, Hue-Roye K, Storry JR, Palacajornsuk P, Ma BW, Lublin DM, Reid ME. SERF: a new antigen in the Cromer blood group system. *Transfus Med* 2004;14(4):313-318
37. Barker RN, Casswell KM, Reid ME, Sokol RJ, Elson CJ. Identification of autoantigens in autoimmune haemolytic anaemia by a non-radioisotope immunoprecipitation method. *Br J Haematol* 1992;82(1):126-132
38. Barker RN, Elson CJ. Multiple self epitopes on the Rhesus polypeptides stimulate immunologically ignorant human T cells in vitro. *Eur J Immunol* 1994;24(7):1578-1582
39. Barker RN, Vickers MA, Ward FJ. Controlling autoimmunity--Lessons from the study of red blood cells as model antigens. *Immunol Lett* 2007;108(1):20-26
40. Bauer MP, Wiersum-Osselton J, Schipperus M, Vandenbroucke JP, Briët E. Clinical predictors of alloimmunization after red blood cell transfusion. *Transfusion* 2007;47(11):2066-2071
41. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369(9573):1627-1640
42. Bellia M, Georgopoulos J, Tsevrenis V, Nomikou E, Vgontza N, Kontopoulou-Griva I. The investigation of the significance of a positive direct antiglobulin test in blood donors. *Immunohematol* 2002;18(3):78-81
43. Benraad CE, Scheerder HA, Overbeeke MA. Autoimmune haemolytic anaemia during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1994;55(3):209-211
44. Bessos H, Seghatchian J. Red cell storage lesion: the potential impact of storage-induced CD47 decline on immunomodulation and the survival of leucofiltered red cells. *Transfus Apheresis Sci* 2005;32(2):227-232
45. Blackall DP, Wheeler CA. Contemporaneous autoantibodies and alloantibodies. *Transfusion* 2007;47(7):1332
46. Blumberg N, Heal JM, Gettings KF. WBC reduction of RBC transfusions is associated with a decreased incidence of RBC alloimmunization. *Transfusion* 2003;43(7):945-952

47. dbRBC - Blood Group Antigen Gene Mutation Database (30.11.2008)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/home>
48. Blumenfeld OO, Patnaik SK. Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database. *Hum Mutat* 2004;23(1):8-16
49. Bosman GJ, Lasonder E, Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Novotny VM, Bos H, De Grip WJ. The proteome of red cell membranes and vesicles during storage in blood bank conditions. *Transfusion* 2008;48(5):827-835
50. Bournérias F, Nabibi B. Nomifensine-induced immune haemolytic anaemia and impaired renal function. *Lancet* 1979;2(8133):95-96
51. Bowell PJ, Allen DL, Entwistle CC. Blood group antibody screening tests during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93(10):1038-1043
52. Briones M, Abshire T. Lupus anticoagulants in children. *Curr Opin Hematol* 2003;10(5):375-379
53. Brodeur GM, O'Neill PJ, Willimas JA. Acquired inhibitors of coagulation in nonhemophiliac children. *J Pediatr* 1980;96(3 Pt 1):439-441
54. Bruce LJ, Ghosh S, King MJ, Layton DM, Mawby WJ, Stewart GW, Oldenburg PA, Delaunay J, Tanner MJ. Absence of CD47 in protein 4.2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex. *Blood* 2002;100(5):1878-1885
55. Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, Peters LL, Chasis JA, Delaunay J, Mohandas N, Anstee DJ, Tanner MJ. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 2003;101(10):4180-4188
56. Brunner-Weinzierl MC, Hoff H, Burmester GR. Multiple functions for CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 during different phases of T cell responses: implications for arthritis and autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* 2004;6(2):45-54
57. Buyon JP. The effects of pregnancy on autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 1998;63(3):281-287
58. Cartron JP. RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 1999;12(4):655-689
59. Castellino SM, Combs MR, Zimmerman SA, Issitt PD, Ware RE. Erythrocyte autoantibodies in paediatric patients with sickle cell disease receiving transfusion therapy: frequency, characteristics and significance. *Br J Haematol* 1999;104(1):189-194
60. Caturegli P, Kimura H, Rocchi R, Rose NR. Autoimmune thyroid diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19(1):44-48
61. Cervera R, Asherson RA. Clinical and epidemiological aspects in the antiphospholipid syndrome. *Immunobiology* 2003;207(1):5-11
62. Chan D, Poole GD, Binney M, Hamon MD, Copplestone JA, Prentice AG. Severe intravascular hemolysis due to autoantibodies stimulated by blood transfusion. *Immunohematol* 1996;12(2):80-83
63. Chang TY, Siegel DL. Genetic and immunological properties of phage-displayed human anti-Rh(D) antibodies: implications for Rh(D) epitope topology. *Blood* 1998;91(8):3066-3078
64. Chaplin H, Jr., Cohen R, Bloomberg G, Kaplan HJ, Moore JA, Dorner I. Pregnancy and idiopathic autoimmune haemolytic anaemia: a prospective study during 6 months gestation and 3 months post-partum. *Br J Haematol* 1973;24(2):219-229
65. Chaplin H, Jr., Zarkowsky HS. Combined sickle cell disease and autoimmune hemolytic anemia. *Arch Intern Med* 1981;141(8):1091-1093
66. Chen RT, Pless R, Destefano F. Epidemiology of autoimmune reactions induced by vaccination. *J Autoimmun* 2001;16(3):309-318
67. Cook IA. Primary rhesus immunization of male volunteers. *Br J Haematol* 1971;20(4):369-375
68. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and 'incomplete' Rh agglutinins. *Br J Exp Pathol* 1945;26:255-266
69. Cornish C, Flower R. Factors influencing antibody detection with the DiaMed gel antiglobulin test. *Transfus Med* 2003;13(4):243-244
70. Cox KO, Keast D. Erythrocyte autoantibodies induced in mice immunized with rat erythrocytes. *Immunology* 1973;25(3):531-539

71. Dahl KN, Westhoff CM, Discher DE. Fractional attachment of CD47 (IAP) to the erythrocyte cytoskeleton and visual colocalization with Rh protein complexes. *Blood* 2003;101(3):1194-1199
72. Dai YD, Carayanniotis G, Sercarz E. Antigen processing by autoreactive B cells promotes determinant spreading. *Cell Mol Immunol* 2005;2(3):169-175
73. Dameshek W, Levine P. Isoimmunization with Rh factor in acquired hemolytic anemia. *N Engl J Med* 1943;228:641-644
74. Dameshek W. Autoimmunity: theoretical aspects. *Ann N Y Acad Sci* 1965;124(1):6-28
75. International Society for Blood Transfusion. Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens (30.11.2008)
<http://ibgrl.blood.co.uk/ISBT%20Pages/ISBT%20Terminology%20Pages/Terminology%20Home%20Page.htm>
76. Daniels G. Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang* 2007;93(4):331-340
77. Daniels G, Flegel WA, Fletcher A, Garratty G, Levene C, Lomas-Francis C, Moulds JM, Moulds JJ, Olsson ML, Overbeeke MA, Poole J, Reid ME, Rouger P, van der Schoot CE, Scott M, Sistonen P, Smart E, Storry JR, Tani Y, Yu LC, Wendel S, Westhoff CM, Zelinski T. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens: Cape Town report. *Vox Sang* 2007;92(3):250-253
78. De Vriese AS, Robbrecht DL, Vanholder RC, Vogelaers DP, Lameire NH. Rifampicin-associated acute renal failure: pathophysiologic, immunologic, and clinical features. *Am J Kidney Dis* 1998;31(1):108-115
79. Downing I, Templeton JG, Mitchell R, Fraser RH. A chemiluminescence assay for erythrophagocytosis. *J Biolumin Chemilumin* 1990;5(4):243-250
80. Dührsen U, Augener W, Zwingers T, Brittinger G. Spectrum and frequency of autoimmune derangements in lymphoproliferative disorders: analysis of 637 cases and comparison with myeloproliferative diseases. *Br J Haematol* 1987;67(2):235-239
81. Ehrlich P. Die Schutzstoffe des Blutes. *Verh. Ges. Dtsch. Naturforsch. Aerzte* 1902;1:250-275
82. Elson CJ, Barker RN, Thompson SJ, Williams NA. Immunologically ignorant autoreactive T cells, epitope spreading and repertoire limitation. *Immunol Today* 1995;16(2):71-76
83. Elson CJ, Barker RN. Helper T cells in antibody-mediated, organ-specific autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12(6):664-669
84. Farris AD, Keech CL, Gordon TP, McCluskey J. Epitope mimics and determinant spreading: pathways to autoimmunity. *Cell Mol Life Sci* 2000;57(4):569-578
85. Filbey D, Hanson U, Wesström G. The prevalence of red cell antibodies in pregnancy correlated to the outcome of the newborn: a 12 year study in central Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995;74(9):687-692
86. Frohn C, Dumbgen L, Brand JM, Gorg S, Luhm J, Kirchner H. Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. *Transfusion* 2003;43(7):893-898
87. Garratty G: Target antigens for red cell-bound autoantibodies.; in: Nance SJ (ed): *Clinical and serological aspects of immunohematology*. Arlington, VA, American Association of Blood Banks, 1991
88. Garratty G. Autoantibodies induced by blood transfusion. *Transfusion* 2004;44(1):5-9
89. Garratty G, Arndt PA. An update on drug-induced immune hemolytic anemia. *Immunohematology* 2007;23(3):105-119
90. Genty I, Michel M, Hermine O, Schaeffer A, Godeau B, Rochant H. Caractéristiques des anémies hémolytiques auto-immunes de l'adulte: analyse rétrospective d'une série de 83 patients. *Rev Med Interne* 2002;23(11):901-909
91. Giannadaki E, Potamianos S, Roussomoustakaki M, Kyriakou D, Fragkiadakis N, Manousos ON. Autoimmune hemolytic anemia and positive Coombs test associated with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92(10):1872-1874
92. Giblett ER. Blood group alloantibodies: an assessment of some laboratory practices. *Transfusion* 1977;17(4):299-308
93. Girling DJ. Adverse reactions to rifampicin in antituberculosis regimens. *J Antimicrob Chemother* 1977;3(2):115-132.
94. Gold WR, Jr., Queenan JT, Woody J, Sacher RA. Oral desensitization in Rh disease. *Am J Obstet Gynecol* 1983;146(8):980-981

95. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 2007;7(1):52-63
96. Goodman SR, Kurdia A, Ammann L, Kakhniashvili D, Daescu O. The human red blood cell proteome and interactome. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232(11):1391-1408
97. Gorst DW, Rawlinson VI, Merry AH, Stratton F. Positive direct antiglobulin test in normal individuals. *Vox Sang* 1980;38(2):99-105
98. Gottvall T, Hilden JO, Selbing A. Evaluation of standard parameters to predict exchange transfusions in the erythroblastotic newborn. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1994;73(4):300-306
99. Greene D, Khan S. A phenomenon of delayed hemolytic transfusion reaction. *Transfusion* 1991;31(Suppl.):23
100. Grey D, Connolly M, Erber WN. Comparison of low ionic diluents for use with the Diamed antiglobulin gel test. *Transfus Med* 2002;12(1):63-69
101. Gronbaek K, D'Amore F, Schmidt K. Autoimmune phenomena in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1995;18(3-4):311-316
102. Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 2004;4(1):24-34
103. Hadley A, Wilkes A, Poole J, Arndt P, Garratty G. A chemiluminescence test for predicting the outcome of transfusing incompatible blood. *Transfus Med* 1999;9(4):337-342
104. Hall AM, Ward FJ, Vickers MA, Stott LM, Urbaniak SJ, Barker RN. Interleukin-10-mediated regulatory T-cell responses to epitopes on a human red blood cell autoantigen. *Blood* 2002;100(13):4529-4536
105. Hall AM, Vickers MA, McLeod E, Barker RN. Rh autoantigen presentation to helper T cells in chronic lymphocytic leukemia by malignant B cells. *Blood* 2005;105(5):2007-2015
106. Hall AM, Ward FJ, Shen CR, Rowe C, Bowie L, Devine A, Urbaniak SJ, Elson CJ, Barker RN. Deletion of the dominant autoantigen in NZB mice with autoimmune hemolytic anemia: effects on autoantibody and T-helper responses. *Blood* 2007;110(13):4511-4517
107. Hamblin TJ, Oscier DG, Young BJ. Autoimmunity in chronic lymphocytic leukaemia. *J Clin Pathol* 1986;39(7):713-716
108. Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 2006;18(3):349-356
109. Heddle NM, Klama L, Frassetto R, O'Hoski P, Leaman B. A retrospective study to determine the risk of red cell alloimmunization and transfusion during pregnancy. *Transfusion* 1993;33(3):217-220
110. Heddle NM, Soutar RL, O'Hoski PL, Singer J, McBride JA, Ali MA, Kelton JG. A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion. *Br J Haematol* 1995;91(4):1000-1005
111. Herklotz R, Lüthi U, Ottiger C, Huber AR. Referenzbereiche in der Hämatologie. *Ther Umsch* 2006;63(1):5-24
112. Hoeltge GA, Domen RE, Rybicki LA, Schaffer PA. 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):42-45
113. Hoppe B, Stibbe W, Bielefeld A, Pruss A, Salama A. Increased RBC autoantibody production in pregnancy. *Transfusion* 2001;41(12):1559-1561
114. Hsu YC, Acuna M, Tahara SM, Peng CA. Reduced phagocytosis of colloidal carriers using soluble CD47. *Pharm Res* 2003;20(10):1539-1542
115. Inada Y, Kamiyama M, Kanemitsu T, Ikegami H, Watanabe K, Clark WS, Asai Y. In vivo binding of circulating immune complexes by C3b receptors (CR1) of transfused erythrocytes. *Ann Rheum Dis* 1989;48(4):287-294
116. Iruretagoyena M, Lezana JP, Kalergis A. Interactions at the dendritic cell / T-cell interface define the balance between immunity and tolerance. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2005;32(6):373-383
117. Issaragrisil S, Kruatrachue M. An association of pregnancy and autoimmune haemolytic anaemia. *Scand J Haematol* 1983;31(1):63-68
118. Issitt PD, Zellner DC, Rolih SD, Duckett JB. Autoantibodies mimicking alloantibodies. *Transfusion* 1977;17(6):531-538
119. Issitt PD, Combs MR, Bumgarner DJ, Allen J, Kirkland A, Melroy-Carawan H. Studies of antibodies in the sera of patients who have made red cell autoantibodies. *Transfusion* 1996;36(6):481-486

120. Issitt PD, Anstee DJ: Applied blood group serology. Durham, N.C. Montgomery Scientific Publications, 1998
121. James JA, Gross T, Scofield RH, Harley JB. Immunoglobulin epitope spreading and auto-immune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce spliceosome autoimmunity. *J Exp Med* 1995;181(2):453-461
122. James P, Rowe GP, Tozzo GG. Elucidation of alloantibodies in autoimmune haemolytic anaemia. *Vox Sang* 1988;54(3):167-171
123. Janney FA, Lee LT, Howe C. Cold hemagglutinin cross-reactivity with *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 1978;22(1):29-33
124. Jonsson V, Svendsen B, Vorstrup S, Krarup C, Schmalbruch H, Thomsen K, Heegaard NH, Wiik A, Hansen MM. Multiple autoimmune manifestations in monoclonal gammopathy of undetermined significance and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1996;10(2):327-332
125. Judd WJ. How I manage cold agglutinins. *Transfusion* 2006;46(3):324-326
126. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. *Allergy* 2006;61(7):796-807
127. Kaminski ER, Hows JM, Goldman JM, Batchelor JR. Lymphocytes from multi-transfused patients exhibit cytotoxicity against autologous cells. *Br J Haematol* 1992;81(1):23-26
128. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001;344(9):655-664
129. Kamradt T, Goggel R, Erb KJ. Induction, exacerbation and inhibition of allergic and autoimmune diseases by infection. *Trends Immunol* 2005;26(5):260-267
130. Kelsoe G. The germinal center reaction. *Immunol Today* 1995;16(7):324-326
131. King KE. Review: pharmacologic treatment of warm autoimmune hemolytic anemia. *Immunohematology* 2007;23(3):120-129
132. Koelewijn JM, Vrijkotte TG, van der Schoot CE, Bonsel GJ, de Haas M. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion* 2008;48(5):941-952
133. Körmöczy GF, Wagner T, Jungbauer C, Vadon M, Ahrens N, Moll W, Mühlbacher A, Özgül-Gülce S, Kleinrath T, Kilga-Nogler S, Schönitzer D, Gassner C. Genetic diversity of KELnull and KELel: a nationwide Austrian survey. *Transfusion* 2007;47(4):703-714
134. Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, Holers VM. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 2006;116(4):961-973
135. Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1975;53(1):27-42
136. Lai M, d'Onofrio G, Visconti E, Tamburrini E, Cauda R, Leone G. Aetiological factors related to a positive direct antiglobulin test result in human immunodeficiency virus-infected patients. *Vox Sang* 2006;90(4):325-330
137. Laine ML, Beattie KM. Frequency of alloantibodies accompanying autoantibodies. *Transfusion* 1985;25(6):545-546
138. Lalezari P, Talleyrand NP, Wenz B, Schoenfeld ME, Tippet P. Development of direct antiglobulin reaction accompanying alloimmunization in a patient with Rhd (D, category III) phenotype. *Vox Sang* 1975;28(1):19-24
139. Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, Odermatt B, Conrad C, Ittner LM, Bauer S, Luther SA, Uematsu S, Akira S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* 2005;11(2):138-145
140. Larché M, Wraith DC. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med* 2005;11(4 Suppl):S69-76
141. Leadbetter EA, Rifkin IR, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors and activation of autoreactive B cells. *Curr Dir Autoimmun* 2003;6:105-122
142. Leddy JP, Falany JL, Kissel GE, Passador ST, Rosenfeld SI. Erythrocyte membrane proteins reactive with human (warm-reacting) anti-red cell autoantibodies. *J Clin Invest* 1993;91(4):1672-1680
143. Lee CK, Ma ES, Tang M, Lam CC, Lin CK, Chan LC. Prevalence and specificity of clinically significant red cell alloantibodies in Chinese women during pregnancy--a review of cases from 1997 to 2001. *Transfus Med* 2003;13(4):227-231
144. Leger RM, Garratty G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. *Transfusion* 1999;39(1):11-16

145. Leger RM. In vitro cellular assays and other approaches used to predict the clinical significance of red cell alloantibodies: a review. *Immunohematology* 2002;18(3):65-70
146. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002;82(1):97-130
147. Mackay IR, Rowley MJ. Autoimmune epitopes: autoepitopes. *Autoimmun Rev* 2004;3(7-8):487-492
148. Makrides SC. Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev* 1998;50(1):59-87
149. Male C, Lechner K, Eichinger S, Kyrle PA, Kapiotis S, Wank H, Kaider A, Pabinger I. Clinical significance of lupus anticoagulants in children. *J Pediatr* 1999;134(2):199-205
150. Maley M, Bruce DG, Babb RG, Wells AW, Williams M. The incidence of red cell alloantibodies underlying panreactive warm autoantibodies. *Immunohematol* 2005;21(3):122-125
151. Marks JD, Ouwehand WH, Bye JM, Finnern R, Gorick BD, Voak D, Thorpe SJ, Hughes-Jones NC, Winter G. Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library. *Biotechnology (N Y)* 1993;11(10):1145-1149
152. 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(9):2786-2792
153. McCluskey J, Farris AD, Keech CL, Purcell AW, Rischmueller M, Kinoshita G, Reynolds P, Gordon TP. Determinant spreading: lessons from animal models and human disease. *Immunol Rev* 1998;164(209-229)
154. Meyer O, Stahl D, Beckhove P, Huhn D, Salama A. Pulsed high-dose dexamethasone in chronic autoimmune haemolytic anaemia of warm type. *Br J Haematol* 1997;98(4):860-862
155. Meyer O, Hoffmann T, Aslan T, Ahrens N, Kiesewetter H, Salama A. Diclofenac-induced antibodies against RBCs and platelets: two case reports and a concise review. *Transfusion* 2003;43(3):345-349
156. Mohandas N, Narla A. Blood group antigens in health and disease. *Curr Opin Hematol* 2005;12(2):135-140
157. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M, Jones J: *Blood transfusion in clinical medicine*. Oxford Blackwell Science, 1997
158. Moncharmont P, Juron Dupraz F, Vignal M, Rigal D, Meyer F, Debeaux P. Haemolytic disease of the newborn infant. Long term efficiency of the screening and the prevention of alloimmunization in the mother: thirty years of experience. *Arch Gynecol Obstet* 1991;248(4):175-180
159. Mouro-Chanteloup I, Delaunay J, Gane P, Nicolas V, Johansen M, Brown EJ, Peters LL, Van Kim CL, Cartron JP, Colin Y. Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47. *Blood* 2003;101(1):338-344
160. Mühlbacher A, Michl U. Prevalence rate of red blood cell antibodies during gravidity in the Federal Province of Salzburg. A comparison between D-positive and D-negative women. *Infusionsther Transfusionsmed* 1999;26(6):348-352
161. Nance SJ, Arndt P, Garratty G. Predicting the clinical significance of red cell alloantibodies using a monocyte monolayer assay. *Transfusion* 1987;27(6):449-452
162. Ness PM, Shirey RS, Thoman SK, Buck SA. The differentiation of delayed serologic and delayed hemolytic transfusion reactions: incidence, long-term serologic findings, and clinical significance. *Transfusion* 1990;30(8):688-693
163. Oehlecker F. Der Sinn und Wert der biologischen Probe bei der Bluttransfusion. *Chirurg* 1950;21(5):261-266
164. Oldenburg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000;288(5473):2051-2054
165. Oldenburg PA, Gresham HD, Chen Y, Izui S, Lindberg FP. Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood* 2002;99(10):3500-3504
166. Oldenburg PA. Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity. *Leuk Lymphoma* 2004;45(7):1319-1327
167. Olsson M, Bruhns P, Frazier WA, Ravetch JV, Oldenburg PA. Platelet homeostasis is regulated by platelet expression of CD47 under normal conditions and in passive immune thrombocytopenia. *Blood* 2005;105(9):3577-3582
168. Oudin S, Liby MT, Goossens D, Dervillez X, Philbert F, Réveil B, Bougy F, Tabary T, Rouger P, Klatzmann D, Cohen JH. 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):1505-1513
169. Ouwehand WH, Bye JM, Glorick BD. The humoral immune response against blood group antigens at the molecular level. *Vox Sang* 1994;67(Suppl. 3):7-12
 170. Østensen M, Villiger PM. The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Semin Immunopathol* 2007;29(2):185-191
 171. Packman CH. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies. *Blood Rev* 2008;22(1):17-31
 172. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003;299(5609):1033-1036
 173. Pavkovic M, Georgievski B, Cevreska L, Spiroski M, Efremov DG. CTLA-4 exon 1 polymorphism in patients with autoimmune blood disorders. *Am J Hematol* 2003;72(2):147-149
 174. Petz LD. A physician's guide to transfusion in autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 2004;124(6):712-716
 175. Petz LD, Garratty G: Immune hemolytic anemias. Philadelphia, PA C. Livingstone, 2004
 176. Petz LD. Bystander immune cytolysis. *Transfus Med Rev* 2006;20(2):110-140
 177. Petz LD. Cold antibody autoimmune hemolytic anemias. *Blood Rev* 2008;22(1):1-15
 178. Piccio L, Vermi W, Boles KS, Fuchs A, Strader CA, Facchetti F, Cella M, Colonna M. Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRP{beta}2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood* 2005;105(6):2421-2427
 179. Pierce SW, Victoria EJ, Masouredis SP. Red cell autoantibodies characterized by competitive inhibition of iodine 125 Rh alloantibody binding and by immunoprecipitation of membrane proteins. *J Lab Clin Med* 1990;116(6):805-813
 180. Polesky HF, Bove JR. A Fatal Hemolytic Transfusion Reaction with Acute Autohemolysis. *Transfusion* 1964;4(285-292)
 181. Poole J, Tilley L, Warke N, Banks J, Ahrens N, Armstrong D, Williams M, Daniels G. Molecular basis of two novel high incidence antigens on CD44 (Indian blood group system). *Transfusion Medicine* 2005;15(S1):30
 182. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev* 2007;21(1):58-71
 183. Poole J, Tilley L, Warke N, Spring FA, Overbeeke MA, van der Mark-Zoet JA, Ahrens N, Armstrong D, Williams M, Daniels G. Two missense mutations in the CD44 gene encode two new antigens of the Indian blood group system. *Transfusion* 2007;47(7):1306-1311
 184. Pruss A, Salama A, Ahrens N, Hansen A, Kiesewetter H, Koscielny J, Dörner T. Immune hemolysis-serological and clinical aspects. *Clin Exp Med* 2003;3(2):55-64
 185. Pruss A, Ahrens N: Immunhämatologie (Blutgruppen-Antigene und -Antikörper); in: Sinha P (ed): Laborbefunde und ihre klinischen Interpretationen. Balingen, Spitta-Verlag, 2005
 186. Pulendran B. Immune activation: death, danger and dendritic cells. *Curr Biol* 2004;14(1):R30-32
 187. Redman M, Regan F, Contreras M. A prospective study of the incidence of red cell alloimmunisation following transfusion. *Vox Sang* 1996;71(4):216-220
 188. Reid ME, Storry JR, Hue-Roye K, Powell V, Banks J, Poole J, Ahrens N, Salama A, Ma B-W, Lublin DM. SERF: A new high prevalence antigen in the Cromer blood group system. *Transfusion* 2003;43(9s):6A
 189. Reid ME, Mohandas N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin Hematol* 2004;41(2):93-117
 190. Reinagel ML, Gezen M, Ferguson PJ, Kuhn S, Martin EN, Taylor RP. 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):1068-1077
 191. Reipert BM, van Helden PM, Schwarz HP, Hausl C. Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Br J Haematol* 2007;136(1):12-25
 192. Rock KL, Hearn A, Chen CJ, Shi Y. Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26(3):231-246
 193. Roep BO, Kallan AA, Duinkerken G, Arden SD, Hutton JC, Bruining GJ, de Vries RR. T-cell reactivity to beta-cell membrane antigens associated with beta-cell destruction in IDDM. *Diabetes* 1995;44(3):278-283
 194. Rossert J. Drug-induced acute interstitial nephritis. *Kidney Int* 2001;60(2):804-817

195. Rous P, Robertson OH. Free antibody and antibody circulating together in large amounts (hemagglutinin and agglutinin in the blood of transfused rabbits). *J Exp Med* 1918;27(509-517)
196. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155(3):1151-1164
197. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182(8):18-32
198. Salama A, Kiefel V, Amberg R, Mueller-Eckhardt C. Treatment of autoimmune thrombocytopenic purpura with rhesus antibodies (anti-Rh0(D)). *Blut* 1984;49(1):29-35
199. Salama A, Mueller-Eckhardt C. Delayed hemolytic transfusion reactions. Evidence for complement activation involving allogeneic and autologous red cells. *Transfusion* 1984;24(3):188-193
200. Salama A, Mueller-Eckhardt C. The role of metabolite-specific antibodies in nomifensine-dependent immune hemolytic anemia. *N Engl J Med* 1985;313(8):469-474
201. Salama A, Mueller-Eckhardt C. Rh blood group-specific antibodies in immune hemolytic anemia induced by nomifensine. *Blood* 1986;68(6):1285-1288.
202. 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(4):1006-1010
203. Salama A, Northoff H, Burkhardt H, Müller-Eckhardt C. Carbimazole-induced immune haemolytic anaemia: role of drug-red blood cell complexes for immunization. *Br J Haematol* 1988;68(4):479-482.
204. Salama A, Göttische B, Mueller-Eckhardt C. Autoantibodies and drug- or metabolite-dependent antibodies in patients with diclofenac-induced immune haemolysis. *Br J Haematol* 1991;77(4):546-549
205. Salama A, Berghöfer H, Mueller-Eckhardt C. Red blood cell transfusion in warm-type autoimmune haemolytic anaemia. *Lancet* 1992;340(8834-8835):1515-1517
206. Salama A, Berghöfer H, Mueller-Eckhardt C. Detection of cell-drug (hapten)-antibody complexes by the gel test. *Transfusion* 1992;32(6):554-556
207. Salama A, Mueller-Eckhardt C. Immune-mediated blood cell dyscrasias related to drugs. *Semin Hematol* 1992;29(1):54-63
208. Salama A, Ahrens N, Kiesewetter H. Serological and clinical aspects of autoimmune hemolytic anemias. *Infus Ther Transfus Med* 2002;29(4):206-217
209. Saverimuttu J, Greenfield T, Rotenko I, Crozier J, Jalaludin B, Harvey M. Implications for urgent transfusion of uncrossmatched blood in the emergency department: The prevalence of clinically significant red cell antibodies within different patient groups. *Emerg Med (Fremantle)* 2003;15(3):239-243
210. Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion* 1999;39(7):763-771
211. Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. RBC antibody persistence. *Transfusion* 2000;40(9):1127-1131
212. Schonewille H, van de Watering LM, Brand A. 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):630-635
213. Schonewille H, Brand A. Does an alloimmune response to strong immunogenic red blood cell antigens enhance a response to weaker antigens? *Transfusion* 2008;48(5):958-963
214. Schönitzer D. Die blutgruppenserologische Schwangerschaftsüberwachung und Neugeborenen-serologie in Tirol. *Infusionstherapie* 1988;15(2):64-77
215. Schwartz RS. Shattuck lecture: Diversity of the immune repertoire and immunoregulation. *N Engl J Med* 2003;348(11):1017-1026
216. Seltam A, Shukry-Schulz S, Salama A. Vaccination-associated immune hemolytic anemia in two children. *Transfusion* 2000;40(8):907-909.
217. Semple JW, Freedman J. Autoimmune pathogenesis and autoimmune hemolytic anemia. *Semin Hematol* 2005;42(3):122-130

218. Shen CR, Youssef AR, Devine A, Bowie L, Hall AM, Wraith DC, Elson CJ, Barker RN. Peptides containing a dominant T-cell epitope from red cell band 3 have in vivo immunomodulatory properties in NZB mice with autoimmune hemolytic anemia. *Blood* 2003;102(10):3800-3806
219. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425(6957):516-521
220. Shirey RS, Boyd JS, Parwani AV, Tanz WS, Ness PM, King KE. Prophylactic antigen-matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management. *Transfusion* 2002;42(11):1435-1441
221. Shoenfeld Y, Gilburd B, Abu-Shakra M, Amital H, Barzilai O, Berkun Y, Blank M, Zandman-Goddard G, Katz U, Krause I, Langevitz P, Levy Y, Orbach H, Pordeus V, Ram M, Sherer Y, Toubi E, Tomer Y. The mosaic of autoimmunity: genetic factors involved in autoimmune diseases--2008. *Isr Med Assoc J* 2008;10(1):3-7
222. Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G, Stojanovich L, Cutolo M, Amital H, Levy Y, Abu-Shakra M, Barzilai O, Berkun Y, Blank M, de Carvalho JF, Doria A, Gilburd B, Katz U, Krause I, Langevitz P, Orbach H, Pordeus V, Ram M, Toubi E, Sherer Y. The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases--2008. *Isr Med Assoc J* 2008;10(1):8-12
223. Silvergleid AJ, Wells RF, Hafleigh EB, Korn G, Kellner JJ, Grumet FC. Compatibility test using 51chromium-labeled red blood cells in crossmatch positive patients. *Transfusion* 1978;18(1):8-14
224. Singer ST, Wu V, Mignacca R, Kuypers FA, Morel P, Vichinsky EP. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. *Blood* 2000;96(10):3369-3373
225. Singh AK, Rao KP, Kizer J, Lazarchick J. Lupus anticoagulants in children. *Ann Clin Lab Sci* 1988;18(5):384-387
226. Sirchia G, Morelati F, Rebulli P. The sickle cell hemolytic transfusion reaction syndrome. *Transfusion* 1997;37(10):1098-1102
227. Söhngen D, Specker C, Wehmeier A, Kiefel V, Rathmer L, Söhngen R, Schneider W. Prävalenz von Lupusantikoagulans, Autoimmunhämolyse, Thrombozytopenie und Plättchenfunktionsstörungen bei unselektionierten Patienten mit SLE. *Beitr Infusionsther* 1992;30:469-473
228. Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK. Erythrocyte autoantibodies, autoimmune haemolysis and pregnancy. *Vox Sang* 1982;43(4):169-176
229. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R. The pathology of autoimmune haemolytic anaemia. *J Clin Pathol* 1992;45(12):1047-1052
230. Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R. The detection of alloantibodies against red cells in patients with warm-type autoimmune haemolytic anaemia. *Vox Sang* 2000;78(3):205
231. Sosler SD, Perkins JT, Saporito C, et al. Severe autoimmune hemolytic anemia induced by transfusion in two autoimmunized patients with sickle cell disease. *Transfusion* 1989;29(49S):
232. Steinman RM. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris)* 2003;51(2):59-60
233. Stewart A, Urbaniak S, Turner M, Bessos H. The application of a new quantitative assay for the monitoring of integrin-associated protein CD47 on red blood cells during storage and comparison with the expression of CD47 and phosphatidylserine with flow cytometry. *Transfusion* 2005;45(9):1496-1503
234. Storry JR. Review: the function of blood group-specific RBC membrane components. *Immunohematology* 2004;20(4):206-216
235. Stott LM, Barker RN, Urbaniak SJ. Identification of alloreactive T-cell epitopes on the Rhesus D protein. *Blood* 2000;96(13):4011-4019
236. Subramanian S, Parthasarathy R, Sen S, Boder ET, Discher DE. Species- and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRPalpha. *Blood* 2006;107(6):2548-2556
237. Sultan SM, Begum S, Isenberg DA. Prevalence, patterns of disease and outcome in patients with systemic lupus erythematosus who develop severe haematological problems. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(2):230-234
238. Swisher SN. Acquired hemolytic disease. *Postgrad Med* 1966;40(4):378-386
239. Taleghani BM, Meyer O, Fontana S, Ahrens N, Novak U, Borner MM, Salama A. Oxaliplatin-induced immune pancytopenia. *Transfusion* 2005;45(5):704-708

240. Thompson KM, Sutherland J, Barden G, Melamed MD, Wright MG, Bailey S, Thorpe SJ. Human monoclonal antibodies specific for blood group antigens demonstrate multispecific properties characteristic of natural autoantibodies. *Immunology* 1992;76(1):146-157
241. Thompson RA, Rowe DS. Reactive haemolysis--a distinctive form of red cell lysis. *Immunology* 1968;14(5):745-762
242. Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 1993;366(6450):72-75
243. Topfer F, Gordon T, McCluskey J. Intra- and intermolecular spreading of autoimmunity involving the nuclear self-antigens La (SS-B) and Ro (SS-A). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(3):875-879
244. Valent P, Lechner K. Diagnosis and treatment of autoimmune haemolytic anaemias in adults: a clinical review. *Wien Klin Wochenschr* 2008;120(5-6):136-151
245. Van Kim CL, Colin Y, Cartron JP. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Rev* 2006;20(2):93-110
246. Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 1996;8(6):831-836
247. Vanderlugt CL, Begolka WS, Neville KL, Katz-Levy Y, Howard LM, Eagar TN, Bluestone JA, Miller SD. The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules. *Immunol Rev* 1998;164(1):63-72
248. Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002;2(2):85-95
249. Varoczy L, Gergely L, Zeher M, Szegedi G, Illes A. Malignant lymphoma-associated autoimmune diseases--a descriptive epidemiological study. *Rheumatol Int* 2002;22(6):233-237
250. Victoria EJ, Pierce SW, Branks MJ, Masouredis SP. 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):74-88
251. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2005;5(11):853-865
252. Vipan W. Quinine as a cause of purpura. *Lancet* 1865;2:37
253. Walker LSK, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2002;2(1):11-19
254. Wallhermfecht MA, Pohl BA, Chaplin H. Alloimmunization in patients with warm autoantibodies. A retrospective study employing three donor alloabsorptions to aid in antibody detection. *Transfusion* 1984;24(6):482-485
255. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21(4):589-607
256. Wayne AS, Kevy SV, Nathan DG. Transfusion management of sickle cell disease. *Blood* 1993;81(5):1109-1123
257. Weigle WO. The Induction of Autoimmunity in Rabbits Following Injection of Heterologous or Altered Homologous Thyroglobulin. *J Exp Med* 1965;121(2):289-308
258. Weiner AS. Hemolytic reactions following transfusion of blood of the homolog group. *Arch Pathol* 1941;32:227-250
259. Wenzel C, Stoiser B, Locker GJ, Laczika K, Quehenberger P, Kapiotis S, Frass M, Pabinger I, Knöbl P. Frequent development of lupus anticoagulants in critically ill patients treated under intensive care conditions. *Crit Care Med* 2002;30(4):763-770
260. Wheeler CA, Calhoun L, Blackall DP. Warm reactive autoantibodies: clinical and serologic correlations. *Am J Clin Pathol* 2004;122(5):680-685
261. Winters JL, Pineda AA, Gorden LD, Bryant SC, Melton LJ, 3rd, Vamvakas EC, Moore SB. RBC alloantibody specificity and antigen potency in Olmsted County, Minnesota. *Transfusion* 2001;41(11):1413-1420
262. Yazdanbakhsh K. Controlling the complement system for prevention of red cell destruction. *Curr Opin Hematol* 2005;12(2):117-122
263. Young PP, Uziblo A, Trulock E, Lublin DM, Goodnough LT. Autoantibody formation after alloimmunization: are blood transfusions a risk factor for autoimmune hemolytic anemia? *Transfusion* 2004;44(1):67-72
264. Yu J, Heck S, Yazdanbakhsh K. Prevention of red cell alloimmunization by CD25 regulatory T cells in mouse models. *Am J Hematol* 2007;82(8):691-696

265. Zimring JC, Spitalnik SL, Roback JD, Hillyer CD. Transfusion-induced autoantibodies and differential immunogenicity of blood group antigens: a novel hypothesis. *Transfusion* 2007;47(12):2189-2196
266. Zmijewski CM. The Production of Erythrocyte Autoantibodies in Chimpanzees. *J Exp Med* 1965;121(5):657-670
267. Zumberg MS, Procter JL, Lottenberg R, Kitchens CS, Klein HG. Autoantibody formation in the alloimmunized red blood cell recipient: clinical and laboratory implications. *Arch Intern Med* 2001;161(2):285-290

Abkürzungsverzeichnis

AIHA – autoimmunhämolytische Anämie
APC – Antigen-präsentierende Zellen
CCR – CC-chemokine receptor
CTLA – zytotoxisches, T-Zell-assoziiertes Protein
CVID – Common variable immunodeficiency
CXCR – CXC-chemokine receptor
DAF – Decay accelerating factor
DAT – direkter Antiglobulintest
EK – Erythrozytenkonzentrat
FOXP3 – forkhead box P3
Fy^a – Duffy a
HPA – humane Plättchenantigene
HSP – Hitzeschock-Protein
HTR – hämolytische Transfusionsreaktion
IFN – Interferon
IL – Interleukin
ITP – Immunthrombozytopenie
Jk^a – Kidd a
MHC – major histocompatibility complex
NOR – normalisierte Odds ratio
PNH – paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
SIRP – Signal regulatory protein
SLE – systemischer Lupus erythematosus
TCR – T-Zellrezeptor
TGF – transforming growth factor
TLR – Toll-like Receptors

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die mich bisher in meinem Leben gefördert und unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Abdulgabar Salama für die Themen bedanken. Mein herzlicher Dank gebührt seiner Förderung, seinen inhaltlichen Anregungen und kritischen Diskussionen. Ohne seine Aufmerksamkeit wäre vieles nicht möglich gewesen. Ihm als meinem akademischen Lehrer verdanke ich die immunhämatologische, transfusionsmedizinische und wissenschaftliche Ausbildung und Fachkompetenz.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Holger Kiesewetter, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité.

Ich möchte Herrn PD Dr. Axel Pruß für seine vermittelnde Unterstützung mit konstruktiven Anregungen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Ramona Genth, der leitenden MTA des Instituts für Transfusionsmedizin mit einer großen Kompetenz und zurückhaltenden Souveränität. Von ihr konnte ich wesentliche Teile der Immunhämatologie lernen. Ihrer steten, ehrlichen und uneingeschränkten Unterstützung gilt mein großer Dank. Zudem gilt mein Dank dem Team des Antikörperlabors der Transfusionsmedizin, deren fröhliche Kompetenz unerreicht ist.

Mein persönlicher Dank gilt nicht nur allen hier noch nicht genannten Kollegen* und Mitarbeitern* des Instituts für Transfusionsmedizin und den von mir betreuten Doktoranden Dr. Claudia Pagenkopf und Andreas Kähne.

Bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Tauber bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung in meinem Engagement im Studentenunterricht.

Ich bedanke mich bei den Kollegen* des Labor 28 für die Unterstützung.

Vor allem danke ich meiner Familie für ihre langjährige, vorbehaltlose Unterstützung, insbesondere meiner Frau Dr. Sabine Semrau und ihrer vorbildlichen, außerordentlichen Kompetenz und Tüchtigkeit. Ohne ihre klaren, aufmunternden Worte wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. Ich danke meinen Eltern und meinen Schwiegereltern, denen ich großen Dank nicht nur für die umfangreiche zeitliche Unterstützung zolle, sondern auch für die ganz selbstverständlich gute Strukturiertheit und Organisation von Manfred Semrau.

*Die Nennung der Form schließt beide Geschlechter gleichberechtigt ein.

ERKLÄRUNG

§4 Abs. 3(k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

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

*die Nennung der Form schließt beide Geschlechter gleichberechtigt ein