

Dr. med. Jessica Busse

# Kälte(auto)antikörper – oder it's cold inside

**ZUSAMMENFASSUNG** Kälte(auto)antikörper sorgen selten für Begeisterungstürme in der immunhämatologischen Diagnostik, da diese durch die Antikörper in unterschiedlichem Maße beeinflusst wird und teilweise auch so massiv gestört sein kann, dass die Bestimmung der Blutgruppen oder auch das Detektieren potenziell vorhandener Alloantikörper erschwert ist. Die dann erforderlichen Testansätze und die Ergebnisinterpretation sind meist herausfordernd. Dieser Artikel soll durch den Überblick über die verschiedenen Ausprägungen von Kälte(auto)antikörpern und das diagnostische Vorgehen im Labor im wahrsten Sinne ein bisschen Wärme in die immunhämatologische Diagnostik bringen.

**SUMMARY** Cold(auto)antibodies rarely cause storms of enthusiasm in immunohaematological diagnostics, as this is influenced to varying degrees and can sometimes be so massively disturbed that the determination of blood groups or the detection of potentially present alloantibodies is more difficult. The test approaches and the interpretation of results are usually challenging. This article is intended to bring a bit of warmth to immunohaematological diagnostics in the truest sense of the word by providing an overview of the different forms of cold(auto)antibodies and the diagnostic procedure in the laboratory.

## Definitionen

### Kälteantikörper

**K**älteantikörper sind anti-erythrozytäre Auto- bzw. Alloantikörper, die meist der IgM-Klasse angehören, gegen erythrozyteneigene Glykostrukturen gerichtet sind und ein Reaktionsoptimum bei 0–4 °C aufweisen. Die Bindung an das Zielantigen wird ab +20 bis +25 °C zunehmend schwächer<sup>1</sup>.

Eine Assoziation zwischen Kälteautoantikörpern und Infektionen ist beschrieben, wobei ein molekulares Mimikry von antigenen Strukturen auf den Pathogenen mit körpereigenen Strukturen auf den Erythrozyten als ursächlich für die Bildung der Kälteautoantikörper diskutiert wird<sup>1</sup>.

Kälteautoantikörper sind bei niedrigen Antikörpertitern in der Regel klinisch unbedeutend, können jedoch insbe-

sondere bei Kälteexposition eine schwere Form der Autoimmunhämolyse, die Kälteagglutininkrankheit (CAD), verursachen<sup>1</sup>.

### Kälteagglutininkrankheit (CAD) und Kälteagglutinin-syndrom (CAS)

Die Kälteagglutininkrankheit (Erkrankung mit Kälteantikörpern) wird durch Autoantikörper verursacht, die bei Temperaturen < 30 °C reagieren. Einige Kälteantikörper weisen jedoch eine höhere thermische Amplitude auf, was am ehesten klinische Manifestationen verursacht. Hierbei ist für die klinische Praxis wichtig, dass die thermische Amplitude der Antikörper wichtiger als ihr Titer ist<sup>2</sup>. Das bedeutet je höher die Temperatur (d.h. je näher an der normalen Körpertemperatur) ist, bei der diese Antikörper mit dem Erythrozyten reagieren, desto stärker ist die Hämolyse.

Die Spezifität der Kälteagglutinine ist fast immer Anti-I, selten Anti-i. Die Bestimmung der Spezifität hat klinisch jedoch keine wesentliche Bedeutung<sup>3,4</sup>.

Unterschieden wird zwischen der primären Kälteagglutinin-Krankheit (CAD) und dem sekundären Kälteagglutinin-Syndrom (CAS)<sup>5</sup>.

- Im Fall einer CAD sind keine anderen Erkrankungen feststellbar<sup>5,6</sup>.
- Bei einem Nachweis von Kälteagglutininen im Rahmen einer Grunderkrankung, wie z. B. einer Infektion mit *Mycoplasma pneumoniae*, dem Epstein-Barr-Virus, einer SARS-CoV2-Infektion, einer Autoimmunerkrankung oder eines malignen Lymphoms, spricht man hingegen von CAS<sup>5,6</sup>.

Infektionen neigen dazu, eine akute Hämolyse (häufig als CAS im Rahmen einer Mykoplasmen- oder EBV-Infektion) zu verursachen, wohingegen die idiopathische Form (CAD, häufige Form bei Erwachsenen) meist chronisch verläuft. Weitere Ursachen für die chronische Form sind beispielsweise Autoimmunerkrankungen oder maligne Lymphome<sup>5</sup>.

Die chronische Hämolyse findet größtenteils im extravasculären mononukleären Phagozytensystem der Leber und

der Milz statt, doch kann eine intravaskuläre Hämolyse auftreten, wenn eine komplementverstärkende Erkrankung wie eine Infektion vorliegt<sup>1</sup>. Die Anämie ist meist nur schwach ausgeprägt (Hämoglobin > 7,5 g/dl [70,5 g/l]). Autoantikörper bei der Kälteagglutinin-Krankheit sind fast immer vom IgM-Typ<sup>4</sup>.

### Mischautoantikörper (Wärme- und Kälteantikörper)

Bei der Mischform der autoimmunhämolytischen Anämie liegen Wärmeantikörper vom IgG-Typ und entweder bei Raumtemperatur reagierende IgM-Antikörper oder Kälteagglutinine vor<sup>2,4</sup>.

### Paroxysmale Kältehäoglobulinurie (Donath-Landsteiner-Hämolyse)

Dies ist die seltenste Form der DAT-positiven autoimmunhämolytischen Anämie. Ursprünglich wurde die Erkrankung mit Lues assoziiert. Heutzutage tritt die Erkrankung sekundär im Rahmen viraler Infekte bei Kindern auf oder idiopathisch als chronische Erkrankung bei älteren Erwachsenen<sup>2,7</sup>.

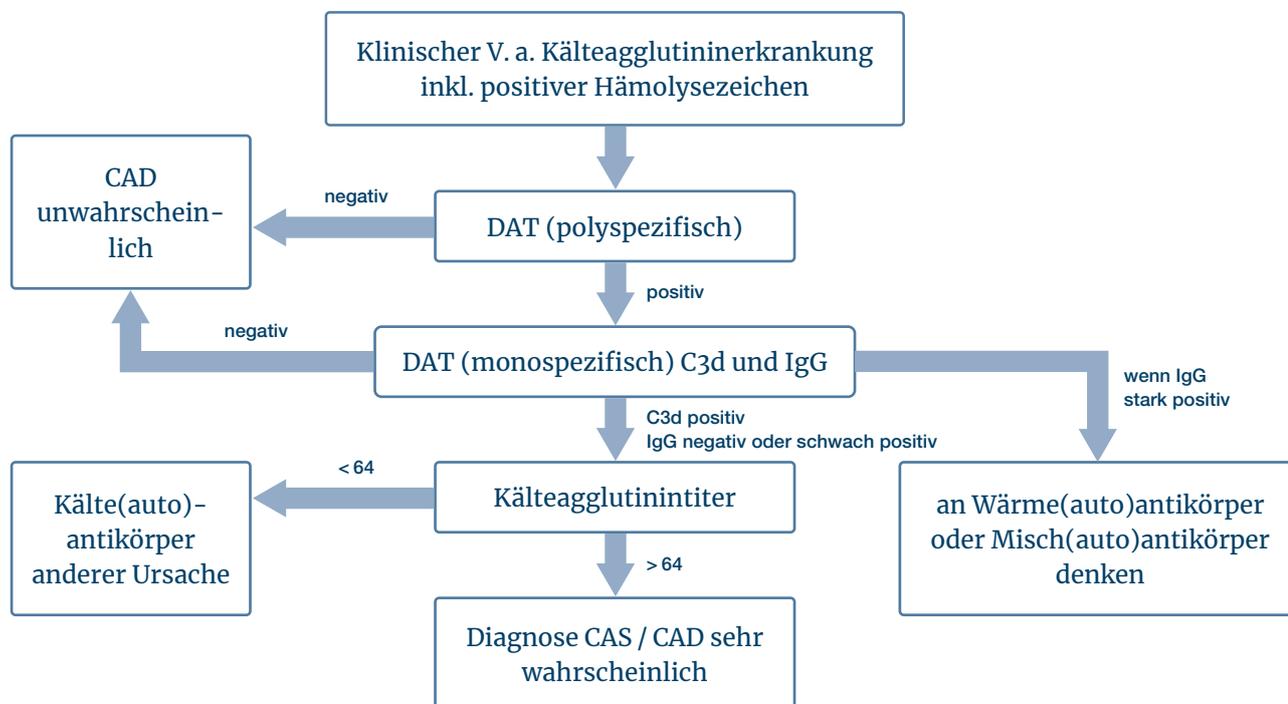
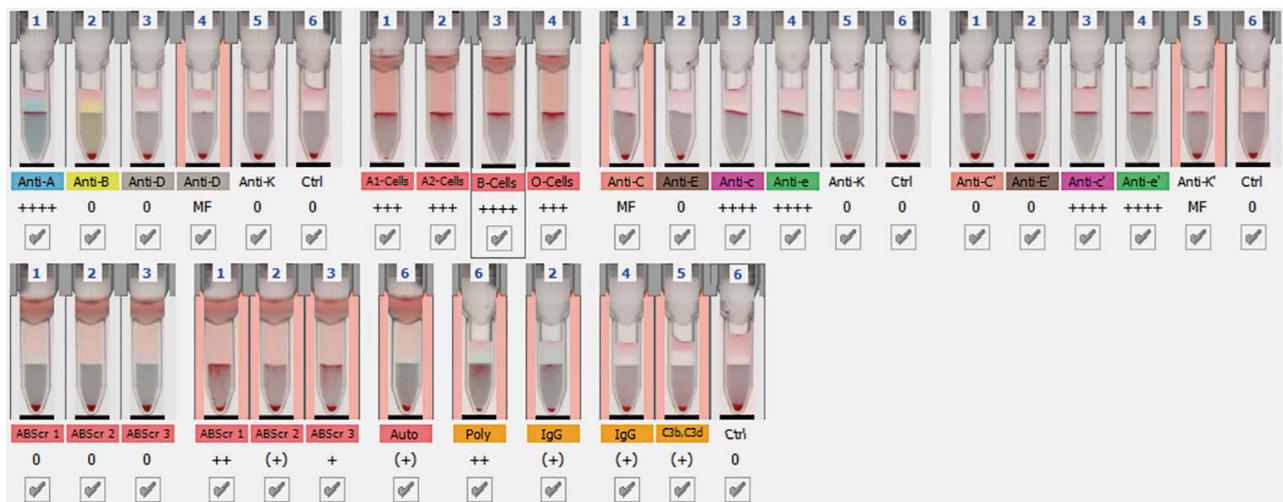


Abbildung 1: Mögliches stufenweises Vorgehen bei der Diagnostik von Kälte(auto)antikörpern bzw. CAS / CAD



**Abbildung 2:** Ansätze Blutgruppenautomat Vision Max: A1-, A2-, O-Zelle positiv, Antikörpersuche (AHG negativ und Ficin positiv), Monospezifischer DAT IgG und C3d positiv

## Diagnostik

### Herausforderungen in der immunhämato- logisch-serologischen Diagnostik

Die Diagnostik bei Kälteantikörpern kann herausfordernd sein, da die Bandbreite von einzelnen leichteren Störungen bis hin zu massiv gestörten Testergebnissen reicht.

Probleme bei der Blutgruppenbestimmung oder anderen serologischen Testverfahren sind bei Kälteantikörpern nicht ungewöhnlich<sup>2</sup>. Häufiges Phänomen ist die zusätzlich positiv reagierende o-Zelle bei der Isoagglutininbestimmung (s. **Abbildung 2**).

Wenn eine erweiterte Wärmeamplitude vorliegt, können außerdem im indirekten Coombs-Test sowohl im AHG-Milieu und (verstärkt) im Enzymmilieu positive Reaktionen auftreten, die sowohl die Diagnostik bezüglich der Antikörpersuche/Antikörperdifferenzierung zur Identifizierung eines Alloantikörpers als auch die Beurteilung der Kreuzprobe im indirekten Coombs-Test auf der Karte erschweren<sup>2</sup>.

### Mögliche Herangehensweisen zur Verringerung der Störeinflüsse durch Kälte(auto)antikörper

Hilfreich zur Verringerung der Autoagglutination und damit Verbesserung der Diagnostik ist das Waschen des Probenmaterials mit 37 °C vorgewärmter physiologischer NaCl-Lösung sowie das Arbeiten mit vorgewärmten Reagenzien und Materialien<sup>2</sup>.

Sollte es dennoch Probleme durch Autoagglutination geben, kann eine Behandlung der eingesetzten roten Blutzellen mit Sulfhydrylreagenzien wie z.B. Dithiothreitol (DTT) hilfreich sein. Da es sich bei kältereaktiven Autoagglutininen fast immer um IgM-Moleküle handelt, und die hierin vorhandenen Disulfidbrücken von Sulfhydrylreagenzien reduziert werden, können hierbei Reagenzien (wie z. B. DTT) verwendet werden, um die Autoagglutination aufzuheben<sup>2</sup>.

Außerdem können Verfahren zur Autoadsorption genutzt werden<sup>2,8</sup>. Hierbei werden die störenden Kälteautoantikörper aus dem Patientenserum an die Patientenerozyten adsorbiert, welche dann durch Zentrifugation entfernt werden und das Adsorbat zur weiteren Diagnostik eingesetzt werden kann<sup>2,8</sup>.

### Eingesetzte Testassays zur Diagnostik bei Kälte(auto)antikörpern und CAS / CAD

In der Literatur sind in der Diagnostik bei Kälteantikörpern und/oder CAS / CAD eingesetzte Tests der direkte Antihumanglobulintest (DAT / direkter Coombs-Test), der Kälteagglutinin-Titer, die thermische Amplitude und die Antikörperspezifisierung. Hierbei ist zu bedenken, dass eine Positivität oder Negativität dieser Tests nicht gleichbedeutend mit der Diagnosestellung CAS / CAD sind<sup>9,10</sup>.

In der Literatur wird zur Diagnostik von Kälte(auto)antikörpern insbesondere bei CAD ein stufenweises Vorgehen empfohlen, um ressourcenschonend zu arbeiten<sup>9-11</sup>. Dies ist im nachfolgenden Schema (**Abbildung 1**) einmal dargestellt.

Im Folgenden (**Tabelle 1**) werden die möglichen serologischen Ergebnisse bei verschiedenen Konstellationen bei kälteassoziierten Autoantikörpern dargestellt<sup>2</sup>.

### Direkter Coombs-Test bei Kälte(auto)antikörpern

Zum Nachweis von Kälteantikörpern wird ein direkter Antihumanglobulintest (DAT/direkter Coombs-Test) durchgeführt<sup>5</sup>:

Ein polyspezifischer DAT wird positiv ausfallen und der direkte monospezifische DAT ist positiv für die Komplementkomponente C3d und im Allgemeinen negativ oder

nur schwach positiv für IgG<sup>5,12,13</sup> (s. **Abbildung 2**).

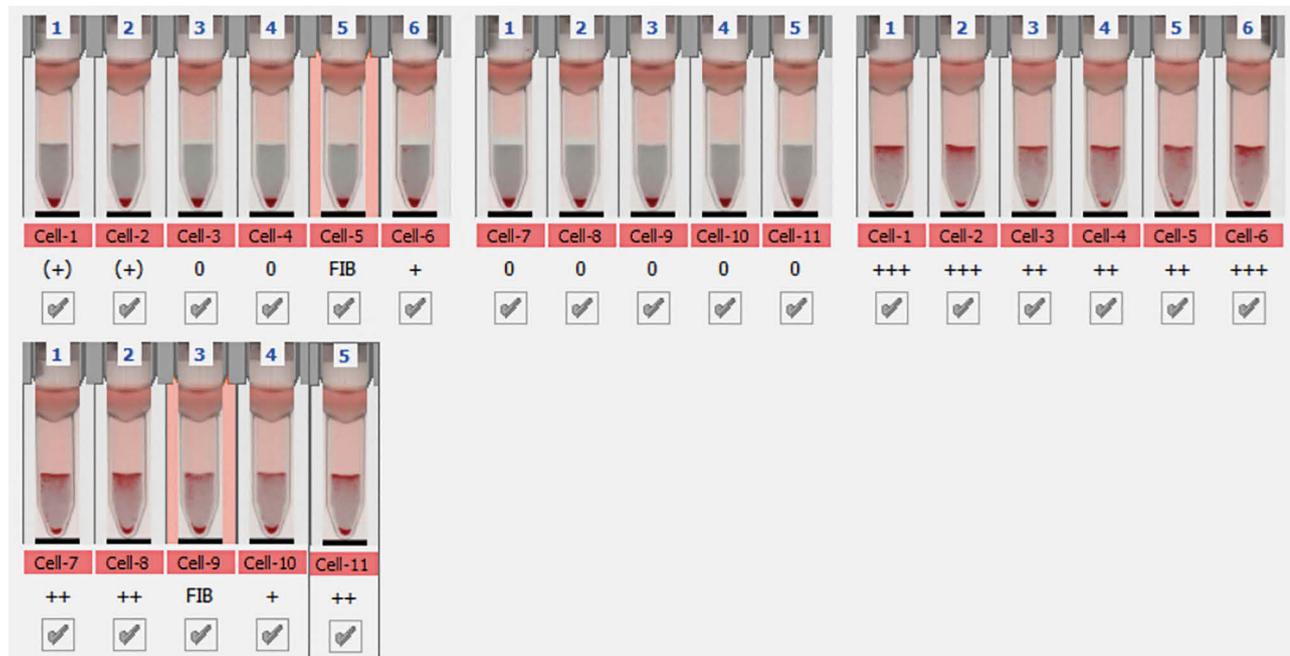
Der Antikörpersuchtest (unter anderem auch verstärkt im Enzym)/ die Antikörperdifferenzierung bei 37 °C ohne zuvor vorgewärmtes Material können positiv ausfallen (**Abbildungen 2 und 3**).

Der Antikörpersuchtest bei 4 °C zeigt sich panreaktiv (**Abbildung 4**).

Die manuellen Ansätze auf BioRad-ID-Karte bzw. im Röhrchen mit vorgewärmten Reagenzien und Materialien verringern die Störeinflüsse der Kälteautoantikörper (**Abbildungen 5-8**).

	CAD/CAS	Misch-Autoantikörper	Paroxysmale Kältehämolysine
DAT	C3d	IgG und C3d	C3d
Ig Typ	IgM	IgG und IgM	IgG
Eluat	Keine Reaktivität	IgG-Antikörper	Keine Reaktivität
Serum	IgM-Antikörper-Titer > 64	IgG-Antikörper mit Reaktivität im indirekten Coombs-Test	Nachweis bithermischer Hämolyse

**Tabelle 1:** Adaptiert nach AABB Technical Manual



**Abbildung 3:** Ansätze Blutgruppenautomat Vision Max: Antikörperdifferenzierung (AHG und Ficin)



Abbildung 4: 4 °C AKS



Abbildung 5: ABD Karte



Abbildung 6: Isoagglutinine (A1-, A2-, 0-Zelle) im Röhrchen bis 20 °C noch positiv

## Serologische Diagnostik bzw. Ergebnisse bei Verdacht auf CAD / CAS

Zur Diagnose der Kälteagglutinin-Krankheit (CAD) wird, ein monospezifischer direkter Coombs-Test (direkter Antihumanglobulintest; DAT) durchgeführt, der positiv für den Komplementfaktor C3d, negativ für IgG ist (Abbildungen 9–11) und einen Kälteagglutinin-Titer bei 4 °C >1:64 aufweist (Abbildungen 12–14)<sup>5</sup>.

Ein positiver DAT in Abwesenheit von Hämolysezeichen reicht für die Diagnose der CAD jedoch allein nicht aus<sup>14</sup>.

Zeichen einer erhöhten Hämolyse sind u.a. erhöhte Bilirubin-, LDH- und erniedrigte Haptoglobinwerte. Außerdem sollten eine Retikulozytose sowie freies Hämoglobin im Serum und Hämosiderin im Urin geprüft werden<sup>5</sup>. Zwar ist bei der intravasalen Hämolyse besonders der LDH-Wert und bei der extravasalen Hämolyse das unkonjugierte Bilirubin erhöht, beide Parameter sind jedoch nicht spezifisch und erhöhte Werte kommen auch bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen vor<sup>5</sup>.

Kälteagglutinine binden in einem bestimmten Temperaturbereich an das Erythrozyten-Antigen. Die sogenannte Thermalamplitude ist die höchste Temperatur, bei der die Antikörper an das Antigen binden. Sie liegt bei den meisten klinisch bedeutsamen Kälteagglutininen über 28 °C und kann sich auch im Bereich der Körpertemperatur befinden<sup>12</sup>. Wichtig für den Nachweis von Kälteagglutininen bzw. die Bestimmung des Kälteagglutinin-Titers und der Thermalamplitude ist, die Blutprobe nach der Blutentnahme bei 37 °C bis 38 °C zu halten und warm abzuseren, ansonsten wird ein falsch-niedriger Kälteautoantikörper-Titer gemessen<sup>3</sup>.

## Kälteagglutinin-Titer zur Bestätigung der Diagnose CAD / CAS

Um die Diagnose einer Kälteagglutinin-Krankheit (CAD) zu bestätigen, sollte bei allen Patienten mit Verdacht auf CAD auch die Menge der Kälteagglutinine (durch Kälteantikörper agglutinierte Erythrozyten) bestimmt werden. Bei Patienten mit Kälteagglutinin-Krankheit (CAD) liegt der Kälteagglutinin-Titer bei 4 °C bei >1:64 (Abbildungen 12–14). In seltenen Fällen kann er jedoch auch <1:64 betragen<sup>5</sup>. Bei niedrigem Titer ist an Donath-Landsteiner-Autoantikörper und bei Kälteagglutininen mit hoher Temperaturamplitude an Wärmeautoantikörper zu denken.

Die Spezifität I/i lässt sich durch Verwendung von Patientenerythrozyten, o-Zellen (welche jeweils mehr I-Antigen besitzen) und Nabelschnurzellen (welche mehr i-Antigen tragen) zeigen (Abbildungen 12–14)<sup>4</sup>. Die Bestimmung der Spezifität hat, wie bereits erwähnt, klinisch jedoch keine wesentliche Bedeutung.

## Schwierigkeiten in der Definition der CAS / CAD aus serologischer Sicht – die BEST-Studie

Die BEST-Studie von Jalink et al. (2024) gibt einen Überblick über die oben genannten verschiedenen eingesetzten serologischen Testassays (DAT, Kälteagglutinin-Titer, thermische Amplitude) in der Diagnostik der CAS / CAD. Hierbei wurde die Studienlage hinsichtlich der Testparameter und deren Relevanz zur Definition der CAS / CAD betrachtet und insbesondere, ob es auf dieser Basis möglich ist eine Therapieentscheidung zu treffen<sup>9</sup>. Die Studie stellte fest, dass die Literatur bzw. die Studienlage bei der Definition der Merkmale von Kälteagglutininen bei CAD / CAS nicht

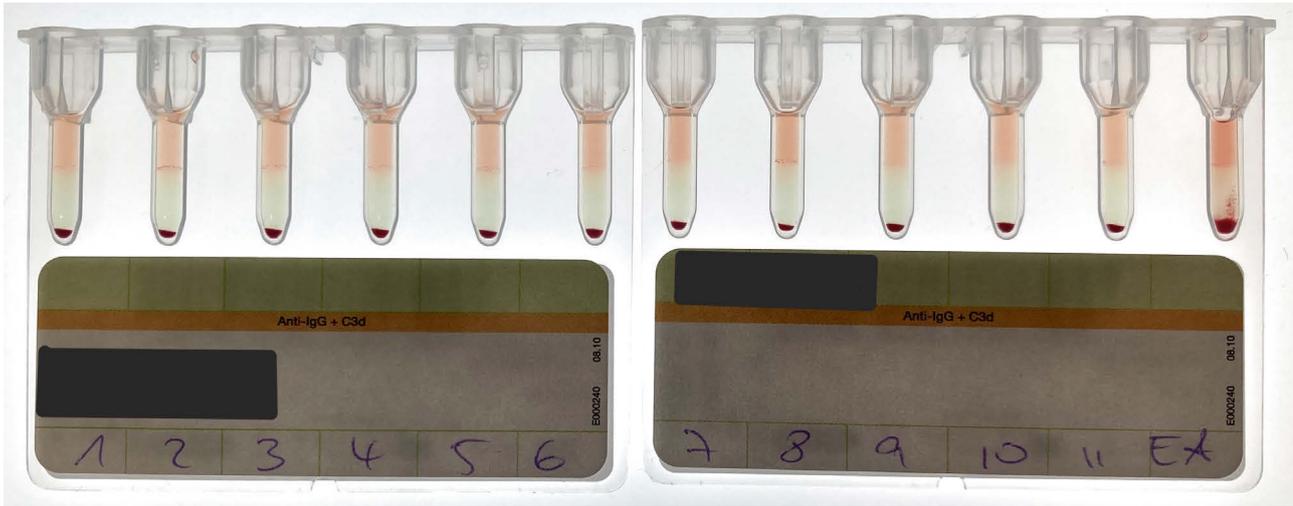


Abbildung 7: BioRad-ID-Karte Identifizierung mit vorgewärmten Materialien und Reagenzien



Abbildung 8: BioRad-ID-Karte Serologische Verträglichkeitsproben mit vorgewärmten Materialien und Reagenzien



Abbildung 9: DCT Polyspezifisch



Abbildung 10: DCT IgG

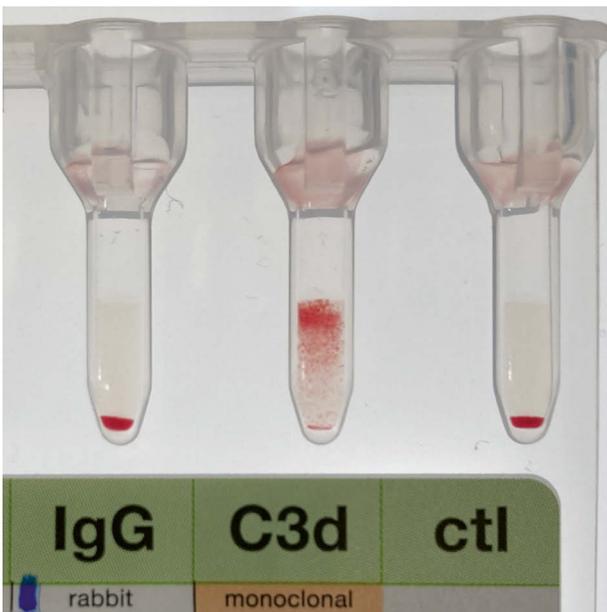


Abbildung 11: Mono DCT

einheitlich ist<sup>9</sup>. Dies entspricht den Ergebnissen einer weiteren veröffentlichten systematischen Übersicht, in der ebenfalls die Heterogenität der in der Literatur verwendeten Definition von CAD hervorgehoben wurde<sup>15</sup>. Dies hat anscheinend mehrere Ursachen: Entweder sind in den zugrunde liegenden Studien Assoziationen zwischen Testergebnissen und klinischen Ergebnissen oft nicht untersucht oder berichtet worden oder aber es handelt sich um vereinzelte Case Reports ohne systematische Zusammenführung der Datenergebnisse<sup>9</sup>.

Letztlich geben die Testergebnisse Hinweise auf das Vorliegen oder eben auch Nichtvorhandensein einer CAS/CAD, müssen jedoch nicht mit einer behandlungsbedürftigen Klinik des Patienten korrelieren, weswegen diese immer in die Entscheidungsfindung mit einbezogen werden muss.

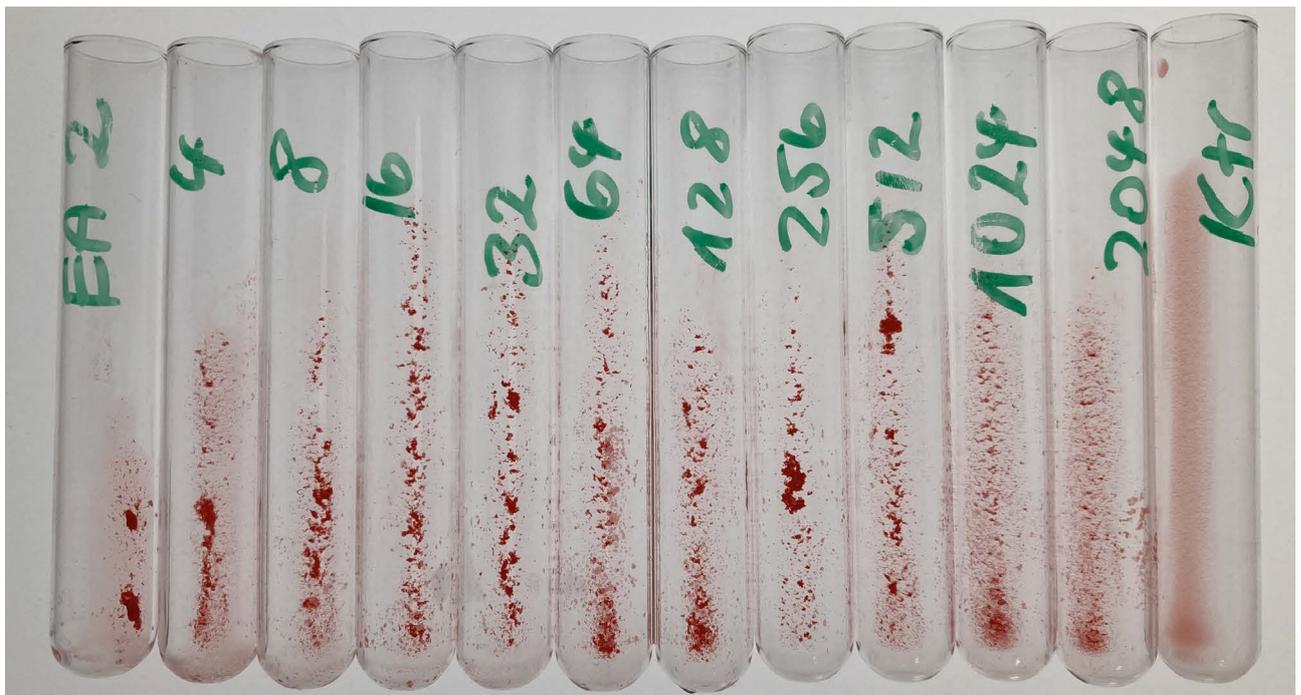


Abbildung 12: Patienten-Erythrozyten Titer 2048

### Mischautoantikörper (Wärme- und Kälteantikörper)

Bei der Mischform der autoimmunhämolytischen Anämie mit Wärmeantikörpern und Kälteantikörpern ist der monospezifische DAT sowohl für IgG als auch C3d positiv. In der Antikörperdifferenzierung und im Eluat lassen sich IgG-Antikörper mit breiter Spezifität nachweisen, wobei hier nicht selten die Wärmeautoantikörper Präferenzen im Rh-Bereich aufweisen. Im Ansatz bei 4 °C lassen sich Kälteantikörper nachweisen.

### Paroxysmale Kältehämglobulinurie (Donath-Landsteiner-Hämolyse)

Der DAT ist mit C3d stark positiv, das Eluat negativ und es handelt sich um relativ schwache Kälteagglutinine (Titer < 128) vom IgG-Typ<sup>16</sup>. Diese werden als bithermische Hämolysine bezeichnet, was bedeutet, dass die Bindung der Antikörper an die Erythrozyten bei niedrigen Temperaturen erfolgt, die Hämolysen der komplementbeladenen Erythrozyten jedoch erst bei Erwärmung auf 37 °C erfolgt<sup>2,7</sup>.

### Nachweis spezifischer Kälteantikörper

Neben den Kälte(auto)antikörpern können auch kälte-wirksame Alloantikörper auftreten.

Diese können ebenfalls bei der Isoagglutininbestimmung

sowie dem Kartenansatz bei +4 °C auffallen. Durch das Ansetzen des Plasmas mit jeweils drei unterschiedlichen Testzellen (A1, A2, B, 0) mit Inkubation in einer aufsteigenden Temperaturreihe und Zwischenablesung ist beispielsweise eine Unterscheidung eines Anti-A1, Anti-HI und nicht ABO-phänotypabhängigen Antikörpern (zum Beispiel Anti-M, Anti-P1) möglich, wobei bei Verdacht auf letztere dann eine Identifizierung stattfinden sollte.

Ein positiv ausfallender Antikörpersuchtest im NaCl-Milieu bei 4 °C kann ebenfalls auf einen spezifischen kälte-wirksamen Alloantikörper (Anti-M, Anti-P1) hinweisen. Da ein positives Ergebnis jedoch sowohl bei Kälte(auto)antikörpern als auch durch kälte-wirksame Alloantikörper verursacht werden kann, ist hier eine entsprechende Differenzierung zur Klärung einer ggf. vorliegenden Allospezifität vorzunehmen.

Hier ein Beispiel bei einem Patienten mit einem Anti-A1.

Ein Hinweis ergab sich bereits in der Blutgruppenbestimmung durch die „überschüssige“ positive A1-Zelle in der Isoagglutininbestimmung (s. **Abbildung 15**).

Ein Ansatz zur Identifizierung spezifischer Kälteantikörper ergab eindeutig das Vorliegen eines Anti-A1 bei 4 °C (siehe **Abbildung 16**). Bei Raumtemperatur war das Anti-A1 nicht mehr nachweisbar (s. **Abbildung 17**).

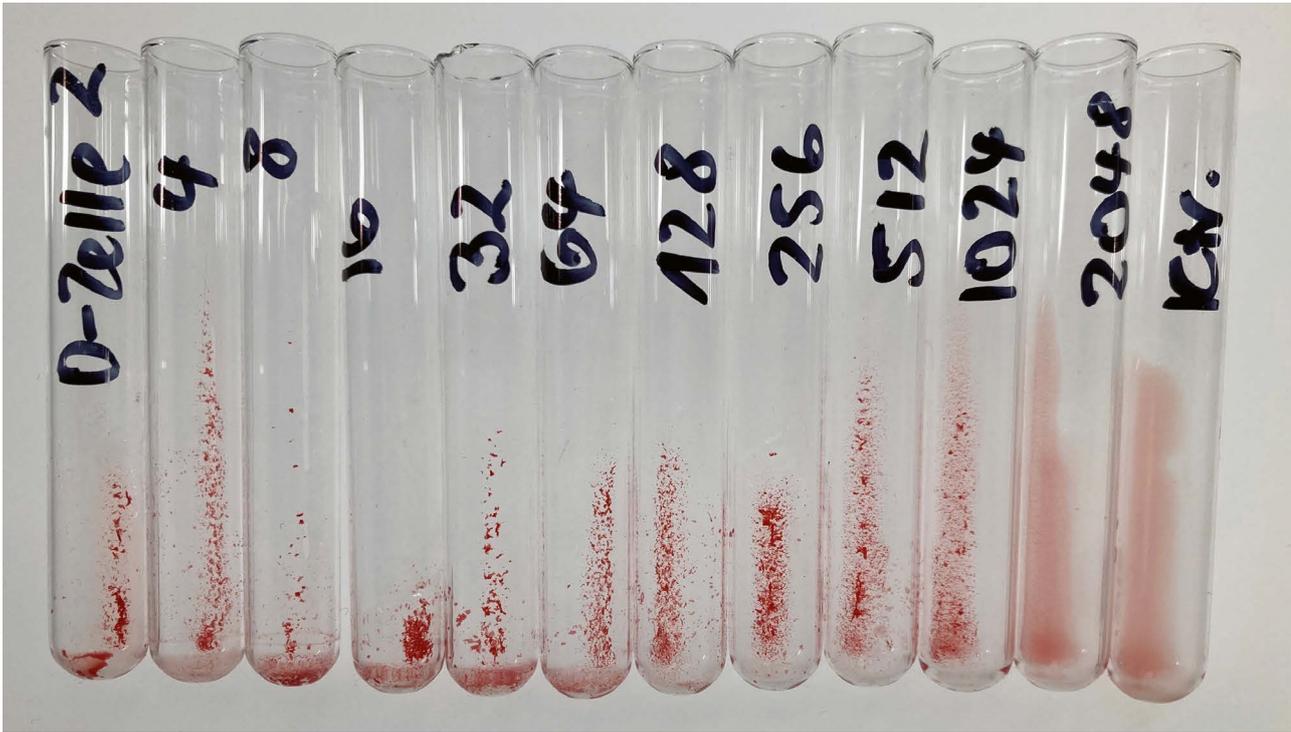


Abbildung 13: O-Zelle Titer 1024

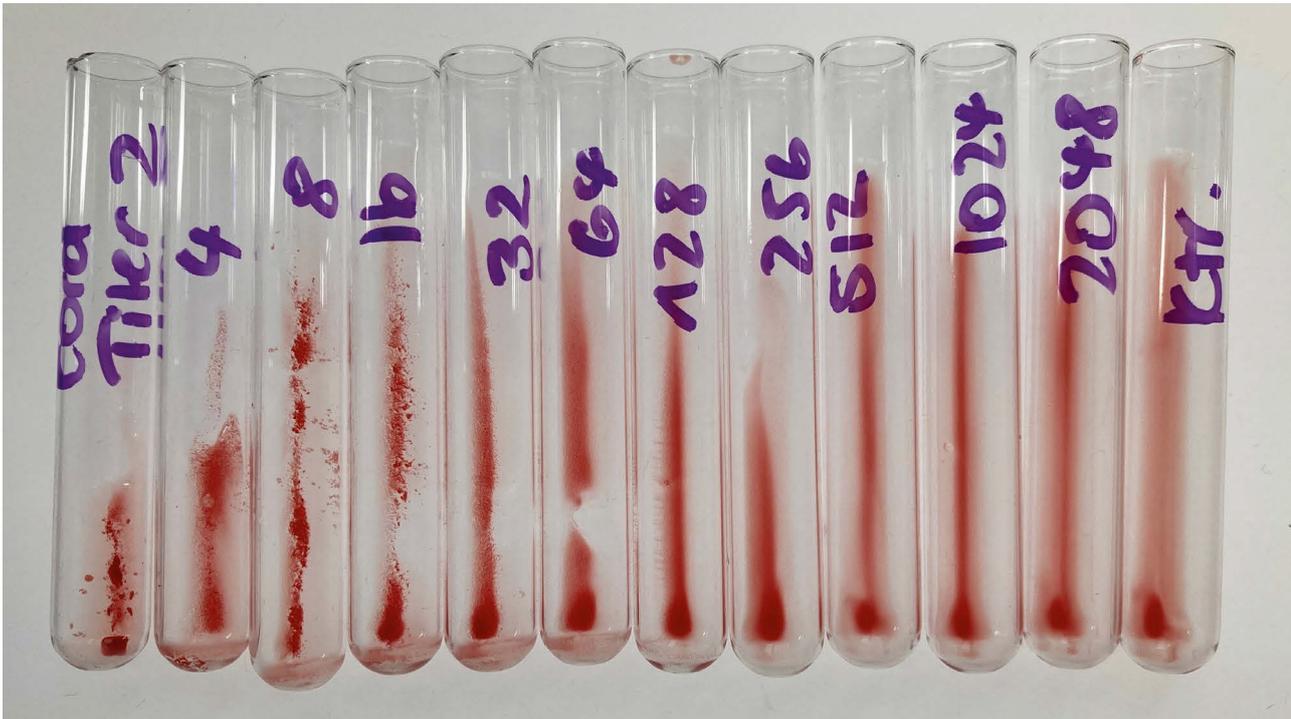


Abbildung 14: Cordzellen-Titer 32

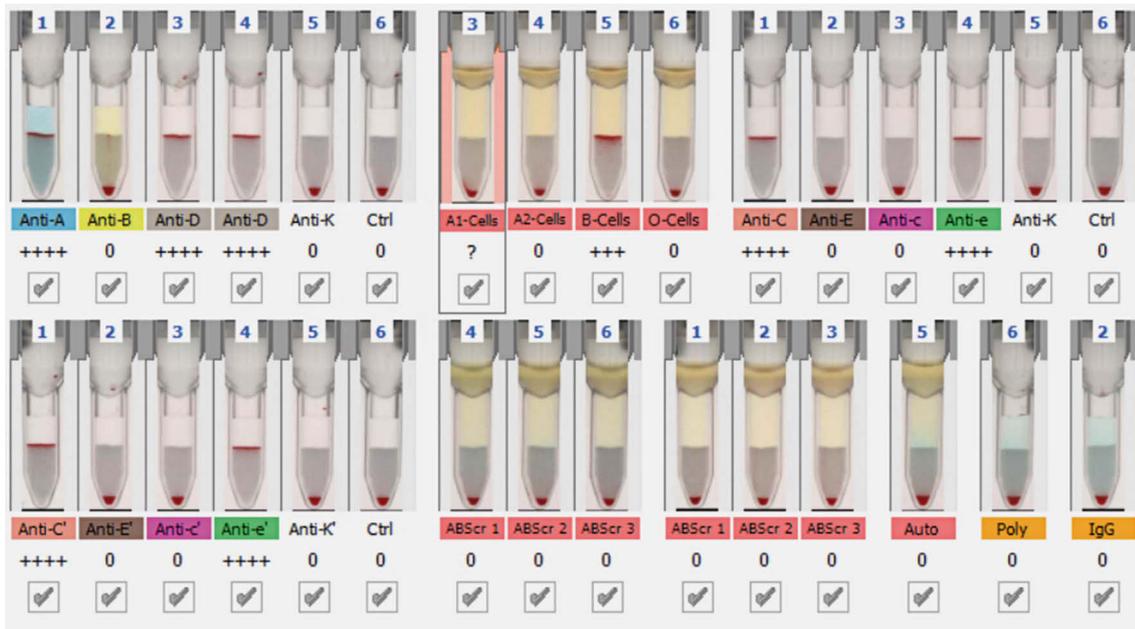


Abbildung 15: Ansätze Blutgruppenautomat Vision Max, A1 Zelle fraglich positiv



Abbildung 16: Ansatz zur Identifizierung spezifischer Kälteantikörper bei 4 °C

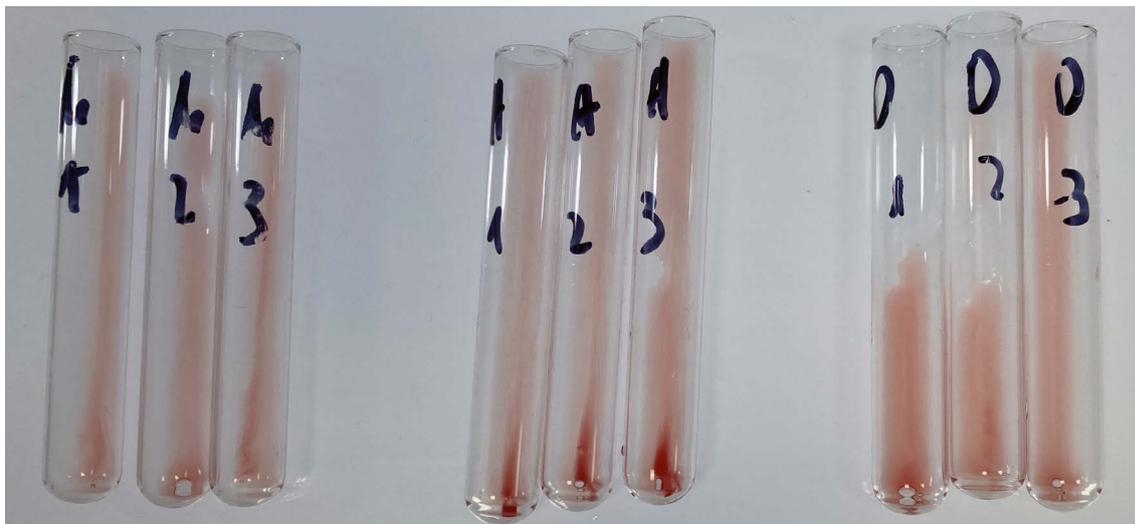


Abbildung 17: Gleicher Ansatz bei 20 °C

## Zusammenfassung und immunhämato- logische Relevanz

Kälte(auto)antikörper gehen in der Regel mit einem für C3d-positivem DAT einher und im Fall einer CAD ist diese mit einem Titer > 64 definiert. Allerdings müssen für Diagnosestellung sowie Therapieentscheidungen weitere Kriterien wie auffällige Hämolyseparameter und die klinische Symptomatik des Patienten mit einbezogen werden.

Die genaue Antigenspezifität vieler Kälte(auto)antikörper ist mittlerweile bekannt, jedoch wird deren Differenzierung in der immunhämatologischen Praxis angesichts fehlender klinischer Konsequenzen in der Regel nicht durchgeführt<sup>3,4</sup>.

Die Differenzierung bei Verdacht auf spezifische kälte-wirksame Alloantikörper hingegen ist insofern relevant, da hier eine klinische Relevanz bei Nachweisbarkeit dieser Antikörper im indirekten Coombs-Test oder über 30 °C besteht und diese bei Transfusionsbedarf bei der Präparatenauswahl berücksichtigt werden müssen.

Durch die positiven Reaktionen können je nach Ausprägung der Kälteantikörper sowohl der indirekte Coombs-Test als auch die serologische Verträglichkeitsprobe nicht / nicht sicher beurteilbar sein. Hierunter liegende Alloantikörper könnten somit übersehen werden. Sollten trotz vorgewärmten Materialien oder ergänzend eingesetzter Diagnostik weitere Alloantikörper nicht sicher ausgeschlossen werden können, sollten zur Erhöhung der Transfusionsicherheit soweit möglich erweiterantigenkompatible Präparate ausgewählt werden. In jedem Fall sollten Erythrozytenkonzentrate bei starker Komplementbeladung streng körperwarm transfundiert werden. ■

## Die Autorin



### Dr. med. Jessica Busse

Weiterbildungsassistentin für Transfusionsmedizin  
Blutspendedienst der Landesverbände des DRK in  
Niedersachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Oldenburg,  
Mecklenburg-Vorpommern und Bremen gGmbH  
[Jessica.busse@bsd-nstob.de](mailto:Jessica.busse@bsd-nstob.de)



Hilfreiche Downloads und weitere Informationen zu diesem Beitrag finden Sie in der hämo-App, z. B.

-  Literaturhinweise
-  Weitere Beiträge zu diesem Thema
-  Weitere Infos zu den Autoren



Direkt zum Beitrag:  
[www.drk-haemotherapie.de/  
beitraege/44-cadcas](http://www.drk-haemotherapie.de/beitraege/44-cadcas)