

# Immunhämatologische Diagnostik bei einer Patientin mit bekannten multiplen Alloantikörpern

## Zusammenfassung

Bei einer Patientin mit bekannten erythrozytären Antikörpern (Anti-Jk(a), Anti-K und Anti-E) erfolgte in unserem Labor eine Abklärung des aktuellen Antikörperbefundes. Mit kommerziell erhältlichen Testmethoden konnte in der Antikörperdifferenzierung nur ein panreaktives Ergebnis ermittelt werden. Erst unter Verwendung von speziellen Untersuchungsansätzen (Adsorptions-Elutions-Techniken, neutralisierende Proteine und Spezialtestzellen mit fehlenden hochfrequenten Antigenen) konnte die zusätzliche Spezifität eruiert werden. Dabei handelte es sich um einen Antikörper mit der Allospezifität Anti-LW(a), der einen Titer von über 64.000 aufwies. Die molekulargenetische Sequenzierung des zugehörigen Gens *LW* (= *ICAM4*) mit dem Nachweis des Allels *LW\*07* in homozygoter Ausprägung unterstützte unsere Annahme eines zusätzlich gebildeten Alloantikörpers.

## Summary

In a patient with known red blood cell antibodies (anti-Jk(a), anti-K and anti-E), an investigation of the current antibody findings should be performed in our laboratory. With commercially available test methods for antibody identification, only a panreactive result could be determined. By using special assay approaches, i.e. a combination of adsorption-elution techniques and both neutralizing proteins and special test cells lacking high frequency antigens, an additional allospecificity could be elicited: anti-LW(a) with a titer > 64,000. Genotyping of the corresponding gene *LW* (= *ICAM4*) revealed *LW\*07* in homozygous expression. This finding supported our assumption of an additionally formed alloantibody.

## EINLEITUNG

Die Abklärung eines Antikörperbefundes bei Patienten mit multiplen Antikörpern oder Antikörpern gegen hochfrequente Antigene stellt immer wieder eine hohe Herausforderung für das immunhämatologische Labor dar. Kommerzielle Testmethoden kommen in dieser Situation schnell an ihre Grenzen. Dieses betrifft vor allem die Abklärung von Antikörpern, die gegen Strukturen gerichtet sind, welche nicht die polymorphen Antigene aus dem Duffy-, Kidd- oder MNS-Blutgruppensystem betreffen. Dennoch ist in den meisten Fällen die Bestimmung der Antikörperspezifität wichtig, um eine Aussage zur klinischen Relevanz vornehmen zu können. Nur so kann die Versorgung mit kompatiblen Erythrozytenkonzentraten sichergestellt werden.

## FALLVORSTELLUNG

Hier berichten wir über eine 84-jährige Patientin, die aufgrund einer iatrogenen Koronararterien-dissektion bei bekannter koronarer Herzkrankheit in einem für kardiovaskuläre Erkrankungen spezialisierten Krankenhaus aufgenommen wurde. Die Patientin habe bereits in der zuvor behandelnden Einrichtung eine Vielzahl an Blutprodukten

erhalten; die genaue Anzahl an Erythrozytenkonzentraten konnte jedoch nicht mehr eruiert werden. Aufgrund des nun stark positiven Antikörpersuchtests leitete das zu diesem Zeitpunkt zuständige immunhämatologische Labor entsprechende Blutproben der Patientin zu unserem Labor zur weiteren Abklärung. Die Blutgruppe der Patientin war aus Altdaten (aus dem Jahr 2018) mit 0 Rh CCD.ee, K- bekannt. Ebenfalls waren irreguläre erythrozytäre Antikörper vorbeschrieben, diese wiesen die Allospezifitäten Anti-Jk(a), Anti-K und Anti-E auf. Eine erweiterte Typisierung ergab bereits zum damaligen Zeitpunkt den Phänotyp Fy(a+b+), Jk(a-b+) und S-neg., s-pos. Unter Verwendung von In-House-Methoden konnte beim aktuellen stationären Aufenthalt ein zusätzlicher Antikörper bestimmt werden (siehe unten). Antigen-negative Präparate lagen zu dem Zeitpunkt nicht vor und bevor eine Entscheidung zum weiteren möglichen Transfusionsvorgehen besprochen werden konnte, verstarb die Patientin an den Komplikationen der Grunderkrankung.

## METHODEN

Eine ausführliche Darstellung sämtlicher Untersuchungsansätze finden Sie im Internet zum Download unter: [www.drk-haemotherapie.de](http://www.drk-haemotherapie.de). Für manuelle Ansätze wur-

den Reagenzien der Fa. BioRad verwendet, für Neutralisationsversuche nutzen wir rekombinante Blutgruppenantigene (rBGA) der Fa. Imusyn. Adsorptions-Elutions-Ansätze wurden nach der Empfehlung des AABB Technical Manual durchgeführt. Für die Sequenzierung von LW (= ICAM) wurde ein Taq-Cycle-Verfahren unter Verwendung von vier fluoreszenzmarkierten Amplifikationssternminatoren verwendet.

## ERGEBNISSE

Die ABD-Kurzbestimmung bestätigte die aus Altdaten bekannte Blutgruppe mit 0 RhD positiv. Die Erythrozyten der Patienten waren stark vermehrt mit IgG beladen (3+). Das nach Säure-Elution gewonnene Eluat reagierte mit allen Testzellen, wobei stärkere Reaktionen mit Jk<sup>a</sup>-positiven Erythrozyten auszumachen waren. Daraufhin wurde von uns der Verdacht auf eine – zumindest serologische – verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion durch den bekannten Alloantikörper Anti-Jk(a) geäußert.

Das Plasma der Patientin reagierte im AHG-Milieu mit allen Testzellen gleichstark (3+). Mit jeweils Ficin- und DTT-vorbehandelten Testzellen zeigten sich jedoch schwächere Reaktionen für jene Testzellen, die als D-negativ deklariert waren. Unter Verwendung von Spezialtestzellen, denen hochfrequente Antigene wie zum Beispiel k, Kp(b), Lu(b), Lu8, Au(a), Yt(a), Co(a), Vel, Sd(a), Kn(a) oder Yk(a) fehlen,

konnte keine zusätzliche Allospezifität ausgemacht werden. Die Titerbestimmung ergab, dass es sich um einen sehr hochtitrigen Antikörper (Titer > 64.000) handelte. Neutralisationsansätze mit rekombinanten Blutgruppenantigenen, die z. B. für Ch(a), Rd(a), Kn(a)/DACY, Sc1, JMH, LW(a), Lu(b), Do(a), Do(b), In(b) oder Xg(a) exprimieren, waren trotz angepasster Verdünnungsstufe des Patientenplasmas nicht eindeutig, so dass wir uns für einen Adsorptions-Elutions-Ansatz entschieden. Hiermit sollten die bei der Patientin bekannten Alloantikörper bei der Diagnostik ausgeschlossen werden. Das auf diese Weise gewonnene Säure-Eluat, welches aufgrund des ausgewählten Erythrozytensediments als frei von Anti-Jk(a), Anti-K und Anti-E betrachtet wurde, konnte nun mit dem LW-Protein eindeutig neutralisiert werden (siehe **Abb. 1**).

Auch unter Verwendung von kryokonservierten Spezialtestzellen reagierte das Adsorptions-Eluat zwar sowohl mit solchen, die als K-Null, Ge:-2,-3, I-neg. und Kx-negativ typisiert waren, jedoch nicht mit LW(a)-negativen und Rh-Null-Erythrozyten (siehe **Abbildung 2**). Aufgrund dieser Befunde wurde die Diagnose eines zusätzlichen Antikörpers mit der Allospezifität Anti-LW(a) gestellt.

Die molekulargenetische Untersuchung ergab im MALDI-ToF den abgeleiteten Phänotyp LW(a-b+). Die Sequenzierung des zugehörigen Gens LW (= ICAM4) bestätigte diesen Befund mit dem Nachweis des Allels LW\*07 in homozygoter Ausprägung: An Basenposition 299 konnte dabei

Neutralisation mit rekombinanten Antisera										
genutzter Titer:						Testzelle/EK:				
Eluat - 8						KPA				
Rg(a)	Ch(a)	Kn(a) / Dacy	Sc1	JMH	Lu(b)	Crom / DAF	Do(a)	Do(b)	Yt(a)	In(b)
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
LW	Xg(a)	Cell / Kp(b) / Js(a)	YCAD	Fy(a)	Fy(b)	Lu(a) / Au(a)				Kontrolle
0	A	A	/	/	/	/				A

**Abbildung 1:** Neutralisation mit verschiedenen rekombinanten Blutgruppenantigenen (rBGA) Abgesehen vom LW-Protein war eine Neutralisation mit den rBGA nicht erfolgreich. Nur das die Antigene LW(a) und LW(ab) exprimierende LW-Protein bewirkte eine Aufhebung der Agglutination der Testzellen durch das Adsorptions-Eluat.

		SVP		Konserveninfo	Coombs-Rö		Ausstattung						
		1 Abt	2 Abt		1 + 2 Abt	CK							
1	W4	Rh null	0	0	Ø Typ. bekannt								
2	668	-D.-	/		Häm.								
3	785	LW <sup>a</sup> -	0	0	(+Dekolok: M+N-S+S-; CoD. 22, Jk (a+b), K-, Kp(a-)								
4	622	Ge- (2,3)	+++	+++									
5	231	Cs <sup>a</sup> -	+++	+++									
6	304	I-neg.	+++	+++									
7	344	K <sub>0</sub>	+++	+++									
8	252	KX neg.	+++	+++									

Abbildung 2: Probekreuzungen mit kryokonservierten Spezialtestzellen

Unter Verwendung von Spezial-Erythrozyten (Zeile 1–8) reagierte das Adsorptions-Eluat nicht mit jenen, die als Rh-Null (Zeile 1) oder LW(a-) (Zeile 3) typisiert waren. Die erste Spalte gibt die ID der Spezialzellen an, die zweite den speziellen Phänotyp und Spalte 3 und 4 die Agglutinationsstärke in Erst- und Zweitablesung (Geltkartentechnik, ID-System BioRad); Spezialtestzelle 2 konnte aufgrund des hämolytischen Verhaltens nicht ausgewertet werden.

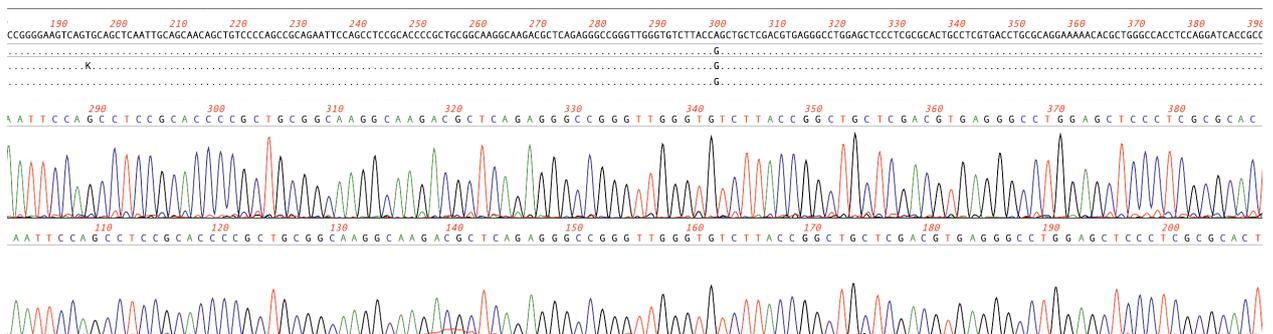


Abbildung 3: Sequenzierung von LW (= ICAM4)

Wie im oberen Teil der Abbildung zu sehen, konnte an Basenposition 299 bei der Patientin im Vergleich zum Referenzallel (LW\*05) Guanosin (G) statt Adenosin (A) nachgewiesen werden (grauer Balken). Dieses entspricht dem Allel LW\*07, welches für den Phänotyp LW(a-b+) kodiert. Im unteren Bereich ist die Verschiebung der Basenposition technisch bedingt.

nur das Nukleotid mit der Base Guanin gefunden werden (siehe **Abbildung 3**), welches auf Proteinebene an Position 100 zum Aminosäureaustausch Arginin statt Glutamin und damit zum LW(a)-negativen Phänotyp führt. Bei dem im Plasma der Patientin gefundenen Anti-LW(a) handelt es sich somit mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um einen Alloantikörper. Die rein hypothetische Möglichkeit eines Autoantikörpers mit Alloantikörper-Charakter und auch die weitere Spezifizierung des im Eluats gefundenen Antikörpermisches konnte aufgrund des Versterbens der Patientin leider nicht weiter abgeklärt werden.

## DAS LW-BLUTGRUPPENSYSTEM

Das Landsteiner-Wiener-Blutgruppensystem (abgekürzt LW, ISBT-Nummer: 016) beschäftigt die Transfusionsmediziner bereits seit den 40er-Jahren des letzten Jahrhunderts: Landsteiner und Wiener immunisierten zu der Zeit Kaninchen (und später Meerschweinchen) mit den Erythrozyten von Rhesusaffen und konnten so einen Antikörper gewinnen, den sie zunächst Anti-Rhesus nannten<sup>1</sup>. Dieser schien die gleiche Spezifität wie ein humaner Antikörper aufzuweisen, den zuvor Levine und Stetson beschrieben, aber nicht benannt hatten. Fortan wurden

beide Antikörper unter der Bezeichnung Anti-Rh zusammengefasst. Ein paar Jahre später konnten Fisk und Foord jedoch zeigen, dass es Unterschiede zwischen diesen beiden Antikörpern gab<sup>2</sup>, das „humane Anti-Rh“ wurde nun Anti-D genannt. Da zu diesem Zeitpunkt bereits eine Vielzahl an Publikationen erschienen war, die neben D auch die Antigene C, E und c und korrespondierende Antikörper beschrieben, hatte man sich dazu entschieden, das zugehörige Blutgruppensystem nicht neu zu benennen, man blieb bei der Bezeichnung Rh-Blutgruppensystem (ISBT-Nummer: 004). Der Begriff Rhesus wurde jedoch verlassen und sollte in diesem Zusammenhang nicht mehr verwendet werden. Dennoch werden Ausdrücke wie *Rhesusformel*, *Rhesusmerkmal* oder auch *Rhesusprophylaxe* wohl auch in Zukunft in unserem Sprachgebrauch verankert bleiben.

Es brauchte nochmals zwei Jahrzehnte, bis man die eigentliche Antigenstruktur des tierischen Anti-Rh herausgefunden hatte<sup>3</sup>. Im Laufe der Zeit ist auch der genetische Hintergrund aufgeklärt worden: Das zugehörige Gen *LW* (auch *ICAM4* genannt) auf dem kurzen Arm von Chromosom 19 kodiert für ein Glykoprotein namens ICAM-4, welches als interzelluläres Adhäsionsmolekül die Antigene des LW-Blutgruppensystems trägt. Zum aktuellen Zeitpunkt umfasst es vier Antigene: das hochfrequente Antigen LW(a) (= LW5) und das antithetische, niederfrequente Antigen LW(b) (= LW7) und darüber hinaus die sehr hochfrequenten Antigene LW(ab) (= LW6) und das erst vor kurzem beschriebene LWEM (= LW8)<sup>4,5</sup>. Nullphänotypen, bei denen keines dieser Antigene exprimiert werden, sind ebenfalls beschrieben worden, jedoch extrem selten. Um Verwechslungen mit historischen und heutzutage nicht mehr korrekten Bezeichnungen der LW-Antigene zu vermeiden, werden die Namen LW1 bis LW4 nicht mehr verwendet, die Nomenklatur beginnt folglich mit LW5.

Es besteht darüber hinaus ein enger räumlicher Zusammenhang zwischen dem RhD-Protein und ICAM-4, welche beide zum Bande-3-Makrokomplex gezählt werden. Durch immunochemische Untersuchungen konnte man zeigen, dass D-negative Erythrozyten deutlich weniger ICAM-4 besitzen und damit auch deutlich weniger LW-Antigene exprimieren als D-positive. Dieser Umstand führt dazu, dass auch heute noch Antikörper gegen LW-Antigene oft als Anti-D fehlinterpretiert werden. Eine Unterscheidung zwischen Anti-D und z. B. Anti-LW(a) ist zum Beispiel durch die Verwendung von speziellen vorbehandelten Testzellen möglich: Das Enzym Pronase zerstört die Antigene aus dem LW-System, jedoch nicht das Antigen D aus dem Rh-System<sup>6</sup>. Außerdem führt auch Dithiothreitol (DTT) zu einer deutlichen Reduktion der LW-

Antigenstärke. Königshaus konnte mit seiner im Jahre 1984 erschienenen Publikation jedoch zeigen, dass dieser Effekt bei höherwertigen LW-Antikörpern deutlich geringer ausfällt<sup>7</sup>. Dieses könnte erklären, warum in unserem Fallbeispiel das Anti-LW(a) mit einem Titer von größer 64.000 noch mit DTT-behandelten Testzellen reagierte. Rh-Null-Zellen, also Erythrozyten, die kein einziges Antigen aus dem Rh-System exprimieren, besitzen kein ICAM-4 auf der Zellmembran und exprimieren somit auch keine LW-Antigene<sup>3,6</sup>.

Bis zum heutigen Tage wurde kein einziger Fall einer hämolytischen Transfusionsreaktion oder eines *Morbus haemolyticus neonatorum* (MHN) durch LW-Alloantikörper beschrieben. Viele Patienten mit Anti-LW(a) oder Anti-LW(ab) wurden erfolgreich mit RhD-negativen Präparaten transfundiert, obwohl die serologischen Verträglichkeitsproben in diesen Fällen oft positiv waren. Gegen LW-gerichtete Autoantikörper können hingegen bei vielen Patienten mit einer autoimmunhämolytischen Anämie vom Wärmetyp nachgewiesen werden<sup>8</sup>. Es wurde in der Literatur auch bereits ein Fall eines durch ein Autoanti-LW(a) verursachten MHN beschrieben, der erfolgreich mit Fototherapie behandelt wurde<sup>9</sup>.

## SCHLUSSFOLGERUNGEN

Unser Fall konnte eindrucksvoll zeigen, dass die immunhämatologische Abklärung von Antikörpern bei Patienten mit einem Antikörpergemisch und zusätzlichem Antikörper gegen ein hochfrequentes Antigen eine große Herausforderung darstellt. Der mit Hilfe von Adsorption-Elutionsverfahren „aufgereinigte“ Antikörper konnte im Anschluss durch die Verwendung von rekombinanten Blutgruppenantigenen und kryokonservierten Spezialtestzellen identifiziert werden. Das so gefundene Anti-LW(a) wird in der Literatur als klinisch nicht relevant angegeben, eine Versorgung mit RhD-negativen Präparaten wird empfohlen, da diese nur eine geringe Antigendichte von LW(a) aufweisen. Darunter sind bis zum heutigen Tage keine hämolytischen Transfusionsreaktionen beschrieben worden. Bei einer Titerhöhe von über 64.000 und positiven serologischen Verträglichkeitsproben mit RhD-negativen Präparaten ist es rein spekulativ, ob in unserem Falle auch eine gute Verträglichkeit vorgelegen hätte. Erschwerend kam hinzu, dass aufgrund des Blutgruppenbefundes der Patientin prinzipiell nur Rhc-negative Präparate (Rh-Formel CCddee) in Frage gekommen wären, um eine zusätzliche Immunisierung gegen das Antigen c zu vermeiden. Da die hierfür nötige Haplotypen-Kombination Cde/Cde in Deutschland eine Frequenz von etwa 0,01 % aufweist,

sind passende Präparate selten<sup>10</sup>. Die Berücksichtigung der anderen Alloantikörperspezifitäten reduzierte die Auswahl an kompatiblen Erythrozytenkonzentraten nochmals. Aufgrund der doch sehr eingeschränkten Präparateauswahl war in dem hier vorgestellten Fall geplant, mit Hilfe eines Monozyten-Monolayer-Assays eine Aussage zur klinischen Relevanz des hochtitrigen Anti-LW(a) zu erzielen. Aufgrund des plötzlichen Ablebens der Patientin konnte diese Untersuchung jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

## DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Franz F. Wagner für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und Fr. Dr. Döscher für die molekulargenetischen Untersuchungen.

## Der Autor



### **Nico Greger**

Facharzt für Transfusionsmedizin  
Patientendiagnostik – Erythrozytenserologie  
Institut Springe, DRK-Blutspendedienst NSTOB  
gemeinnützige GmbH  
nico.greger@bsd-nstob.de

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum Download unter: [www.drk-haemotherapie.de](http://www.drk-haemotherapie.de)