



Granulozytenimmunologie

RI



Dr. med. Angelika Reil
Labor für Leukozytenimmunologie DRK-Blutspendedienst West,
Institut Hagen

Ausgabe 4
2005

hämotherapie

Granulozytenantigene

Derzeit unterscheidet man fünf Antigengruppen auf neutrophilen Granulozyten. Das erste granulozytenspezifische Antigen (NA1, heute HNA-1a) wurde 1960 im Zusammenhang mit einem Fall von Neonataler Immuneutropenie (NIN) von Lalezari beschrieben. Dieses Antigen liegt auf dem klinisch bedeutendsten immunogenen Granulozyten-Glykoprotein, dem Fc γ -Rezeptor IIIb (CD16b). Auf dem Rezeptor liegen noch zwei weitere Antigene (HNA-1b und HNA-1c). Autoantikörper gegen Granulozyten erkennen häufig Epitope der HNA-1a-Variante.

HNA-2a (früher NB1) ist auf einem granulozytenspezifischen Glykoprotein lokalisiert, dessen genaue Funktion noch unbekannt ist. Eine Besonderheit dieses Glykoproteins ist seine heterogene Expression, d. h. in einem Individuum existieren nebeneinander zwei Subpopulationen von neutrophilen Granulozyten, solchen, die HNA-2a tragen und anderen, die es nicht tragen.

Granulozytenantigene

Antigen	alte Bezeichnung	Lokalisation	Häufigkeit %
HNA-1a	NA1	Fc γ Rezeptor IIIb = CD16b	58
-1b	NA2		88
-1c	SH		5
HNA-2a	NB1	NB1 GP = CD177	97
HNA-3a	5b	GP 70-95	97
HNA-4a	Mart	CD11b	99
HNA-5a	Ond	CD11a	92

Antikörper gegen das Antigen HNA-3a (früher 5b) werden oft im Zusammenhang mit schweren Fällen von transfusionsassoziiierter akuter Lungeninsuffizienz (TRALI) gefunden. Die molekulare Grundlage dieses Antigens ist noch nicht geklärt.

HNA-4a und HNA-5a sind hochfrequente Antigene, die auf Integrinen lokalisiert sind. Sie sind jeweils das Resultat einer Punktmutation. Antikörper gegen die antithetischen Allele sind bisher nicht beschrieben.

Literatur:

Bux J: *Granulocyte immunology.*
Wien Klin Wochenschr 2001; 113: 799-805

Nachweismethoden für Granulozytenantikörper

Zum Nachweis von Granulozytenantikörpern hat sich in internationalen Workshops eine Kombination mehrerer Methoden als Goldstandard durchgesetzt.

Beim **Granulozytenagglutinationstest (GAT)** nutzt man die Fähigkeit granulozytärer Antikörper, (Test-)Granulozyten direkt zu aggregieren, d. h. „Agglutination“ ist eigentlich nicht die korrekte, jedoch historisch gewachsene Bezeichnung. In diesem Test werden Test-



granulozyten mit dem zu untersuchenden Serum auf einer Mikrotiterplatte inkubiert. Die Aggregation benötigt einige Stunden und wird an einem Umkehrmikroskop beurteilt. Insbesondere Antikörper gegen das Antigen HNA-3a, das eine bedeutende Rolle bei der Auslösung einer TRALI-Reaktion spielt, lassen sich in diesem Test am besten nachweisen.

Andererseits induzieren nicht alle Granulozytenantikörper eine Aggregation. Im **Granulozytenimmunfluoreszenztest (GIFT)** werden daher mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers membrangebundene Antikörper nachgewiesen. Die Auswertung erfolgt mittels Durchflussszytometer oder im Fluoreszenzmikroskop. Die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop ist zwar aufwändiger und benötigt viel Erfahrung, ist aber nach den Ergebnissen der Internationalen Workshops für Granulozytenimmunologie vorzuziehen. Die Mikroskopie ermöglicht es nämlich im Gegensatz zur Durchflussszytometrie, falsch positive Fluoreszenzsignale, die von zerstörten Zellen stammen, als solche zu erkennen. Ferner kann man im Mikroskop durch das Fluoreszenzmuster häufig membrangebundene Granulozytenantikörper von einer unsp-

zifischen Anlagerung von Immunkomplexen über Fc γ -Rezeptoren unterscheiden. Der GIFT lässt durch die Wahl des Sekundärantikörpers auch die Unterscheidung zwischen IgG-, IgM- und IgA-Antikörpern zu.

Um schließlich granulozytenspezifische Antikörper von HLA-Antikörpern unterscheiden zu können, wird noch ein **Lymphozytenimmunfluoreszenztest (LIFT)** durchgeführt. Der Testaufbau ist dem GIFT analog, die Auswertung erfolgt hier mittels Durchflussszytometer, da die Lymphozyten sehr stabil sind und in der Mehrzahl keine Fc-Rezeptoren tragen.

Die hierzu notwendigen typisierten Testzellen müssen wegen ihrer kurzen Haltbarkeit in vitro für die Untersuchungen jeweils frisch aus Spenderblut isoliert werden.

Die Antigenespezifität der in den Suchtests identifizierten Antikörper wird, wenn möglich, in einem glykoproteinspezifischen ELISA (**Monoclonal Antibody Immobilization of Granulocyte Antigens = MAIGA**) bestimmt. Dies ist prinzipiell mit allen Antigenen bzw. zugrundeliegenden Proteinen möglich, für die monoklonale Antikörper zur Immobilisation des Antigens an die Mi-

krotiterplatte zur Verfügung stehen (HNA-1, -2a, -4a, -5a). Lediglich HNA-3a-Antikörper können nicht nachgewiesen werden, weil keine monoklonalen Antikörper zur Verfügung stehen. Da der ELISA sehr aufwändig ist, eignet er sich nicht als Antikörpersuchtest.

Literatur:

Bux J: Challenges in the determination of clinically significant granulocyte antibodies and antigens. *Transf Med Rev* X No. 3 : 222-232, 1996; Bux J, Kober B, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal antibody-spec. immobilization of granulocyte antigens (MAIGA). *Transf Med* 1993; 3:157-162

Autoimmunneutropenie (= Autoimmungranulozytopenie)

Primäre Autoimmunneutropenie

Im Gegensatz zur sekundären Form tritt die primäre Autoimmunneutropenie (AIN) nicht im Gefolge einer bereits bestehenden Grunderkrankung auf. Am häufigsten wird sie bei Kindern im Alter von 5-15 Monaten diagnostiziert, kann jedoch schon bei ein Monat alten Säuglingen auftreten. Mit zunehmendem Lebensalter tritt die AIN seltener



Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Saarland

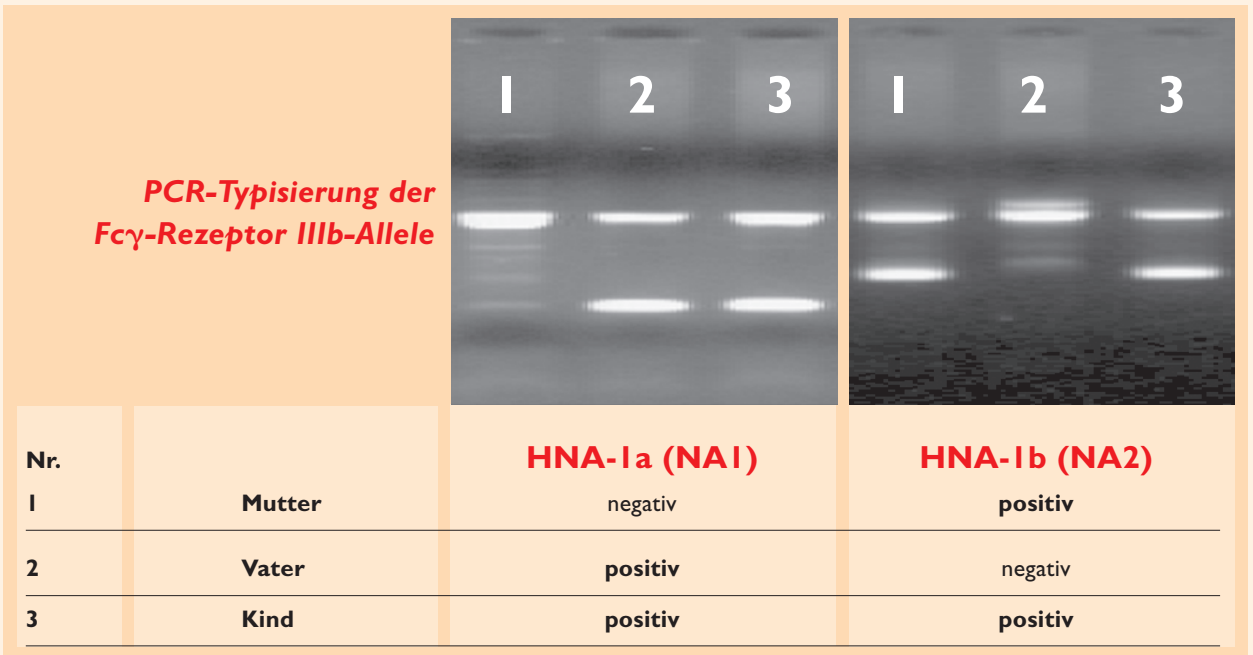
REGIO-NEWS ++ REGIO-NEWS ++ REGIO-NEWS ++ REGIO-NEWS ++ REGIO-NEWS ++ REGIO-NEWS ++ REGIO-NEWS ++ RE

R6

Im glykoproteinspezifischen ELISA (MAIGA) können diese Antikörper näher spezifiziert werden: sie reagieren mit dem auf dem Fcγ-Rezeptor IIIb lokalisierten Antigen HNA-

1a und HLA Klasse I-Molekülen. Die schwach positiven Reaktionen im GIFT mit den HNA-1b-homozygoten Granulozyten sind auf die zusätzlich vorhandenen HLA-Antikörper zurück-

zuführen. Die Bestimmung der Fcγ-Rezeptor IIIb-Allele in der Familie ergibt folgende Konstellation:



Damit ist die bestimmte Antikörperspezifität schlüssig, die Mutter hat sich an ihrem Kind gegen das Merkmal HNA-1a, das sie selbst nicht trägt, immunisiert. Die Konstellation ist typisch für eine Neonatale Immunneutropenie. Das Wiederholungsrisiko liegt in diesem Falle bei 100%, da der Vater homozygot für das Merkmal HNA-1a ist.

Therapievorschlag: durch Gabe von G-CSF die kindliche Granulozytenproduktion anregen, dadurch wird eine beschleunigte Elimination der mütterlichen Antikörper erreicht.

In weniger gravierenden Fällen ist die prophylaktische Gabe von Antibiotika ausreichend.

Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI)

Die transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz ist eine seltene, jedoch oft lebensbedrohlich verlaufende Transfusionsreaktion. Die typische TRALI-Reaktion ist gekennzeichnet durch eine während oder innerhalb von 6 Stunden nach Trans-



fusion akut auftretende Atemnot sowie ein beidseitiges in der Röntgenthoraxaufnahme nachweisbares Lungenödem. Eine den Befund erklärende kardiogene Ursache oder Volumenüberladung liegt nicht vor. Etwa 80 % der typischen TRALI-Reaktionen werden durch granulozytenreaktive Antikörper (HLA-Antikörper, granulozytenspezifische Antikörper) ausgelöst: immunogene TRALI-Reaktion. Die Antikörper liegen in der Regel beim Spender vor und wurden dem Patienten mit Plasma- oder Thrombozytenpräparaten transfundiert. Die transfundierten Antikörper aktivieren und/oder agglutinieren die Granulozyten des Empfängers, die im Kapillarbett der Lungenstrombahn hängen bleiben. Dort setzen die aktivierten Granulozyten toxische Enzyme und Sauerstoffradikale frei, die das Kapillarendothel schädigen mit der Folge eines Plasmaübertritts in das Inter-

stitium. In seltenen Fällen wird der ursächliche Antikörper vom Patienten gebildet, der dann mit den transfundierten Granulozyten reagiert, z.B. bei Granulozytentransfusionen oder bei Transfusion nicht-leukozytendepletierter Blutprodukte. In etwa 20 % der typischen TRALI-Fälle kann man keine leukozytären Antikörper nachweisen: nicht-immunogene TRALI-Reaktion. Man nimmt an, dass diese Fälle durch Zytokine, biologisch aktive Lipide und andere Mediatoren hervorgerufen werden, wie sie bei Lagerung von zellulären Blutprodukten entstehen können. Dass TRALI-Reaktionen nicht regelmäßig bei Vorliegen von leukozytären Antikörpern oder granulozytenaktivierenden Mediatoren auftreten, liegt daran, dass die Patienten für die Entwicklung der TRALI-Reaktionen disponiert sein müssen („two hit model“). Dabei entspricht dem „first hit“ ein schweres Trauma, eine

Operation, eine Infektion oder eine fortgeschrittene chronische Erkrankung. Der „second hit“ besteht dann in der Transfusion eines Blutproduktes, das Antikörper gegen Leukozyten enthält. So treten TRALI-Reaktionen zumeist bei transfundierten Unfallverletzten, intra- oder postoperativ sowie auf Intensivstationen auf.

Immunhämatologische Diagnostik:

10 ml Nativblut („Serumröhrchen“) und mindestens 5 ml EDTA-Blut vom Patienten sowie allen involvierten Blutspendern bzw. Proben von allen involvierten Blutprodukten.

Literatur:

Bux J. Transfusion-related acute lung injury: a neglected but life-threatening transfusion reaction. Infusion Therapy and Transfusion Medicine. 2002;29:271-276; Popovsky MA. Transfusion-related acute lung injury. Current Opinion in Hematology. 2000;7:402-407.

Fallbeispiel

Ein 45-jähriger Patient, aktiver Sportler, erhält nach einer Operation mehrere Blutprodukte, darunter Frischplasma, transfundiert. Noch während der Transfusion sinkt die Sauerstoffsättigung im Blut stark und der Patient muss künstlich beatmet werden. Er entwickelt ein beidseitiges Lungenödem, und das Blutbild zeigt einen starken Abfall der zuvor normalen Leukozyten- und Thrombozytenzahlen. Eine kardiogene Ursache für das Lungenödem kann nicht nachgewiesen werden. Unter künstlicher Beatmung und Gabe von Katecholaminen und Kortikosteroiden normalisiert sich sein Zustand innerhalb von 2 Tagen.

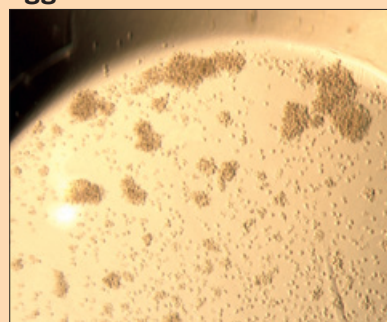


Da das klinische Bild typisch für eine TRALI-Reaktion ist, wird eine Untersuchung auf granulozytenreaktive Antikörper veranlasst.

Der Patient und die Spender der Frischplasmen werden untersucht. Beim Patienten werden keine Antikörper gefunden, aber einer der Plasmaspender, eine Mutter von 3 Kindern, weist starke Antikörper auf, die mit Granulozyten und Lymphozyten reagieren. Eine Kreuzprobe mit den Granulozyten und Lymphozyten des Patienten ergibt ebenfalls starke Reaktionen, insbesondere im Granulozytenagglutinationstest.

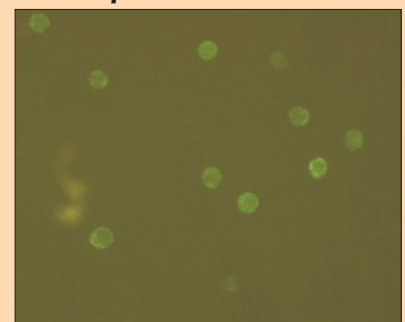
**Kreuzprobe:
Patientengranulozyten
mit Spenderplasma**

Granulozyten- agglutinationstest



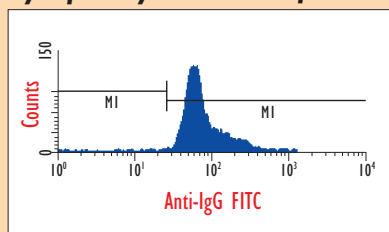
stark positiv

Granulozyten- immunfluoreszenztest

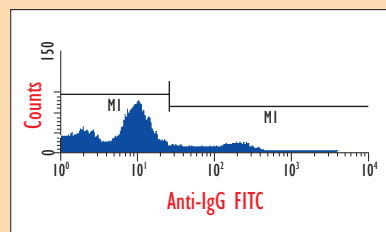


stark positiv

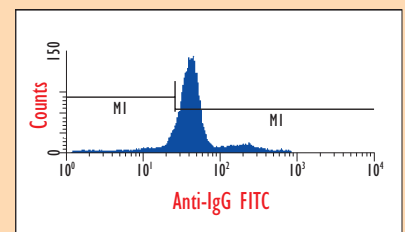
Lymphozytenimmunfluoreszenztest



Kreuzprobe



Negativ-Kontrolle



Positiv-Kontrolle

Im glykoproteinspezifischen ELISA (MAIGA) können diese Antikörper eindeutig als HLA-Klasse I-Antikörper identifiziert werden.

Zusammenfassend ist dieser Fall typisch für eine immunogene TRALI-Reaktion: Spenderin des auslösenden Blutproduktes ist eine Frau, die nach mehreren Schwangerschaften HLA-Antikörper gebildet hat. Da in

diesem Fall die HLA-Antikörper auch in der Lage sind, Granulozyten zu aggregieren (das ist nicht regelhaft bei HLA-Antikörpern so), sind sie dann gefährlich, wenn sie auf das dazu passende Antigen, das der Pati-

ent in diesem Fall hat, stoßen. Die Aggregate bleiben im Kapillarbett der Lunge hängen, wo sie ein Lungengedem hervorrufen.