

Der direkte Antiglobulintest

C. Canellini, Zentralinstitut der Spitäler, Spital Wallis, Sitten

Einleitung

Der direkte Antiglobulintest (DAT), früher direkter Coombs-Test genannt, ist vor über 70 Jahren entwickelt worden und stellt immer noch ein Schlüsselement im Bereich der Transfusion und der Untersuchung der autoimmunhämolytischen Anämien (AIHA) dar. Der DAT identifiziert die Sensibilisierung der Erythrozyten *in vivo* durch Immunglobuline (Ig) und/oder Komplementfaktoren. Die Mehrheit der Reagenzien weisen das Vorhandensein von IgG und von C3d nach, welche an die roten Blutkörperchen gebunden sind, nicht jedoch die IgA oder die IgM.

Leistung des DAT

Die Entnahme muss in einem durch EDTA antikoagulierten Röhrchen erfolgen, um die Aktivierung des Komplements *in vitro* zu verhindern. Es bestehen 2 Hauptmethoden: Röhrchen und Gelkarte. Die Gelkarten-Methode (Sensibilität 65%, Spezifität 70%), welche aktuell empfohlen wird, ist sensibler, da kein Waschvorgang benötigt wird.

Falsch negative Ergebnisse

Beim Vorhandensein von IgA, IgM, Antikörpern geringer Affinität oder eines Gehalts an IgG und C3d unterhalb der Nachweischwelle, ergibt der DAT ein falsch negatives Ergebnis. Für ein positives Ergebnis sind nämlich mindestens 200 bis 500 IgG-Moleküle pro Erythrozyt nötig. Sensiblere Techniken wie die Durchflussszytometrie oder enzymatische Tests können IgG nachweisen, die durch den klassischen Test nicht entdeckt werden. Diese Techniken sind in den Routinelabors jedoch selten verfügbar. Der Elutionstest, mit dem die gebundenen Antikörper freigesetzt werden, erreicht beinahe dieselbe Sensibilität wie die Durchflussszytometrie.

Bei 5-10% der Patienten mit AIHA bleibt der DAT negativ. In diesem Fall muss vorerst der DAT wiederholt werden, um ein technisches Problem auszuschliessen. Dann ist ein DAT durchzuführen, bei dem die IgG und die IgM nachweist, und anschliessend muss eine Elution erfolgen. Wenn kein Antikörper nachweisbar ist, wird nach Ausschluss der übrigen Ursachen der Hämolyse und der Reaktion auf eine Behandlung mit Steroiden (Abbildung 1) die Diagnose einer AIHA gestellt.

Falsch positive Ergebnisse

Die roten Blutkörperchen gesunder Personen können IgG-Moleküle oder Komplemente enthalten, die auf nicht spezifische Art und Weise gebunden oder am physiologischen Prozess der Vergrößerung beteiligt sind. Bei rund 0.1% der Blutspender und bei 1-15% der hospitalisierten Patienten ohne Anzeichen einer Hämolyse ist der DAT positiv. Die Nachkontrolle bei Blutspendern mit positivem DAT zeigt, dass 3-10% eine AIHA entwickeln, 20-25% einen DAT aufweisen, der negativ wird, und 60-70% einen positiven DAT ohne Erkrankung beibehalten.

Eine nicht spezifische Bindung von IgG oder von C3d auf den Erythrozyten sowie Kreuzreaktionen sind insbesondere bei hepatologischen Erkrankungen, Hypergammaglobulinämie, Neoplasie, systemischem Lupus, Antiphospholipid-Syndrom, Nierenerkrankungen, Igs und antilymphozytärem Serum zu beobachten. Die Entnahme auf Nabelschnurblut kann aufgrund der Wharton-Sulze ebenfalls zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Der prädiaktive Wert des DAT ist also nur in Korrelation mit einer Hämolyse solid.

Klinische Anwendung

Die Bestimmung des DAT ist in folgenden klinischen Situationen nützlich: Prätransfusionstests, Hämolyse nach Transfusion, hämolytische Anämie, neonatale Hämolyse. Ein positiver DAT zeigt an, dass eine hämolytische Anämie wahrscheinlich immunen Ursprungs ist (Abbildung 1).

• AIHA: Die häufigste Ursache bilden Wärmeautoantikörper. Der DAT verfügt über eine Spezifität IgG +/- C3d. Eine Elution ist notwendig, wenn die Autoantikörper im Plasma nicht nachweisbar sind. Die Korrelation zwischen der Intensität des DAT und des Schweregrads der Hämolyse ist schlecht und der DAT kann trotz der Auflösung der Hämolyse nach einer Behandlung positiv bleiben. Bei Kälteagglutinin verfügt der DAT über eine Spezifität C3d, indirektes Zeichen der Aktivierung des Komplements durch IgM, die sich von der Oberfläche der Erythrozyten gelöst haben. Ein negativer DAT kann vernünftigerweise die Diagnose von Kälteagglutinin ausschliessen, da sich dies nur in 2% der Fälle vorfindet. Für die Diagnose von Kälteautoantikörpern muss eine Bilanz der Kälteagglutinine realisiert werden. Dazu müssen die Entnahmen in einer Thermosflasche mit 37°C transportiert werden.

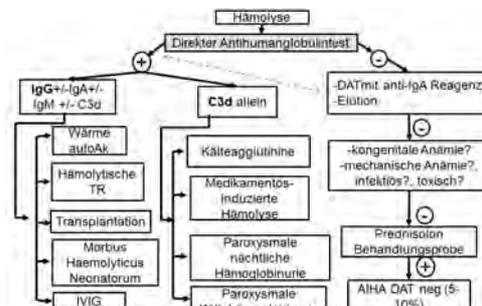


Abbildung 1 : Nützlichkeit des DAT bei einer Hämolyse (AIHA= autoimmunhämolytische Anämie; AutoAk=Autoantikörper; Ig=Immunglobulin; IVIG=intravenöses Immunglobulin, neg=negativ; TR=Transfusionsreaktion; DAT=direkter Antiglobulintest)

- Hämolytische Anämie aufgrund von Medikamenten: mehr als 150 Medikamente sind mit dem Entstehen einer Hämolyse assoziiert worden. Es handelt sich vor allem um Cephalosporine, Penicilline und ihre Derivate, nicht-steroidale Entzündungshemmer, Chinin/Chinidin. Der DAT ist positiv vom Typ C3d, mit oder ohne IgG, oder manchmal negativ. Die Elution bleibt negativ. Spezialisierte Tests (internationales Referenzlabor) ermöglichen bei Vorhandensein des Medikaments oder dessen Metaboliten die Bestätigung der Diagnose, werden aber selten durchgeführt.
- Alloimmunisierung nach Transfusion: ein DAT, der innerhalb von 14 Tagen nach einer Infusion mit geringer Intensität positiv wird, lässt eine Alloimmunisierung vermuten, die mit dem Elutionstest nachgewiesen werden kann.
- Fetomaternale Immunisierung: ein DAT mit der Spezifität IgG, mit geringer Intensität, wird bei einer Inkompatibilität ABO zwischen der Mutter und dem Baby oder bei einer Injektion von Rhophylac® (Anti-D-Prophylaxe) beobachtet. In diesen Fällen ist die Hämolyse im Allgemeinen nicht schwerwiegend. Ein positiver DAT ermöglicht also keine Prädiktion des Schweregrads der neonatalen Hämolyse oder der Notwendigkeit einer Phototherapie. Ein stark positiver DAT ($\geq 2+$) bei einem Neugeborenen, ohne nachgewiesene Antikörper im Plasma der Mutter, muss hingegen zur Suche nach einer Alloimmunisierung durch einen anti-privaten Antikörper führen, indem ein Kompatibilitätstest zwischen den roten Blutkörperchen des Vaters und dem Plasma der Mutter durchgeführt wird.

Empfehlungen für die Praxis

Bei einem neu positiven DAT muss der Arzt beim Patienten eine Bilanz der Hämolyse (Bestimmung des Hämoglobins, der Retikulozyten, des Haptoglobins, des gesamten und konjugierten Bilirubins, der LDH) und eine Suche nach irregulären Antikörpern durchführen.

Bei einer Hämolyse:

- Die Art der für die Hämolyse verantwortlichen Antikörper (Abbildung 1) wird durch den klinischen Kontext, die Spezifität des DAT, das Ergebnis der Suche nach irregulären Antikörpern und allenfalls den Elutionstest ermittelt. Je nach Ursprung der Hämolyse wird der Patient an einen Hämatologen verwiesen, der die Indikation für eine ätiologische Bilanz beurteilt.

Bei fehlender Hämolyse:

- Die Signifikanz eines positiven DAT ohne Hämolyse ist nicht gesichert. Studien legen nahe, dass bei fehlenden Symptomen oder Anzeichen einer Pathologie das Risiko für das Entstehen einer Autoimmunkrankheit oder einer zugrundeliegenden Neoplasie relativ gering ist. Ohne besondere Elemente bei der Anamnese und bei der klinischen Untersuchung wird eine neue Kontrolle des DAT nach 6 Monaten empfohlen.

Literatur

- [1] Jäger U, Barcellini W, Broome CM, et al. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults : Recommendations from the First International Consensus Meeting. Blood Rev. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100648>
- [2] Parker V, Tormey CA. The Direct Antiglobulin Test: Indications, Interpretation and Pitfalls. Arch Pathol Lab Med. 2017; 141:305-310.
- [3] Canellini G. Les anémies hémolytiques auto-immunes. Labmag 2019 ; 5 : 92-8

Kontaktperson

Dr. med. Giorgia Canellini

giorgia.canellini@hopitalvs.ch