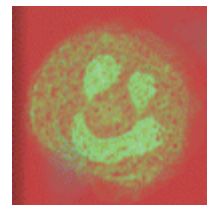
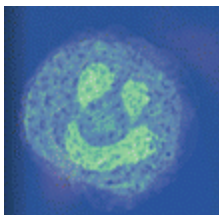


Labordiagnostik der Autoimmunneutropenie (AIN)

Angelika Reil

DRK-Blutspendedienst West
Hagen



Labor für Leukozyten -und Thrombozytenimmunologie

Nachweis von Allo- und Autoantikörpern gg. Granulozyten und Thrombozyten

Immunhämatologie

- Autoimmunzytopenien (AIN, ITP)
- Mutter-Kind-Unverträglichkeiten (NIN, NAIT)

Transfusionsmedizin

- Refraktärzustände gg. Thrombozytentransfusion
- Vorbereitung zu Granulozytentransfusion
- Granulozytenantikörper-Screening zur TRALI-Prophylaxe



Primäre Autoimmunneutropenie

- Typische Erkrankung des Kleinkindesalters
- Häufigste Ursache für eine chronische Neutropenie im Kindesalter
- Kann schon intrauterin beginnen
- Inzidenz 1:100.000, nach Erfahrungen aus unserem Labor deutlich häufiger
- 2015: 50 Kinder mit Autoantikörpernachweis
- Mädchen und Jungen etwa gleich häufig betroffen
- Klinisches Bild: häufig symptomlos
typische bakterielle Infektionen: Otitis media,
Tonsillitis, Hautabszesse
Aphthen

Fallbericht, Teil 1

A 15-month-old girl presented with fever and a subcutaneous abscess of 1,5 cm diameter in the right axilla.

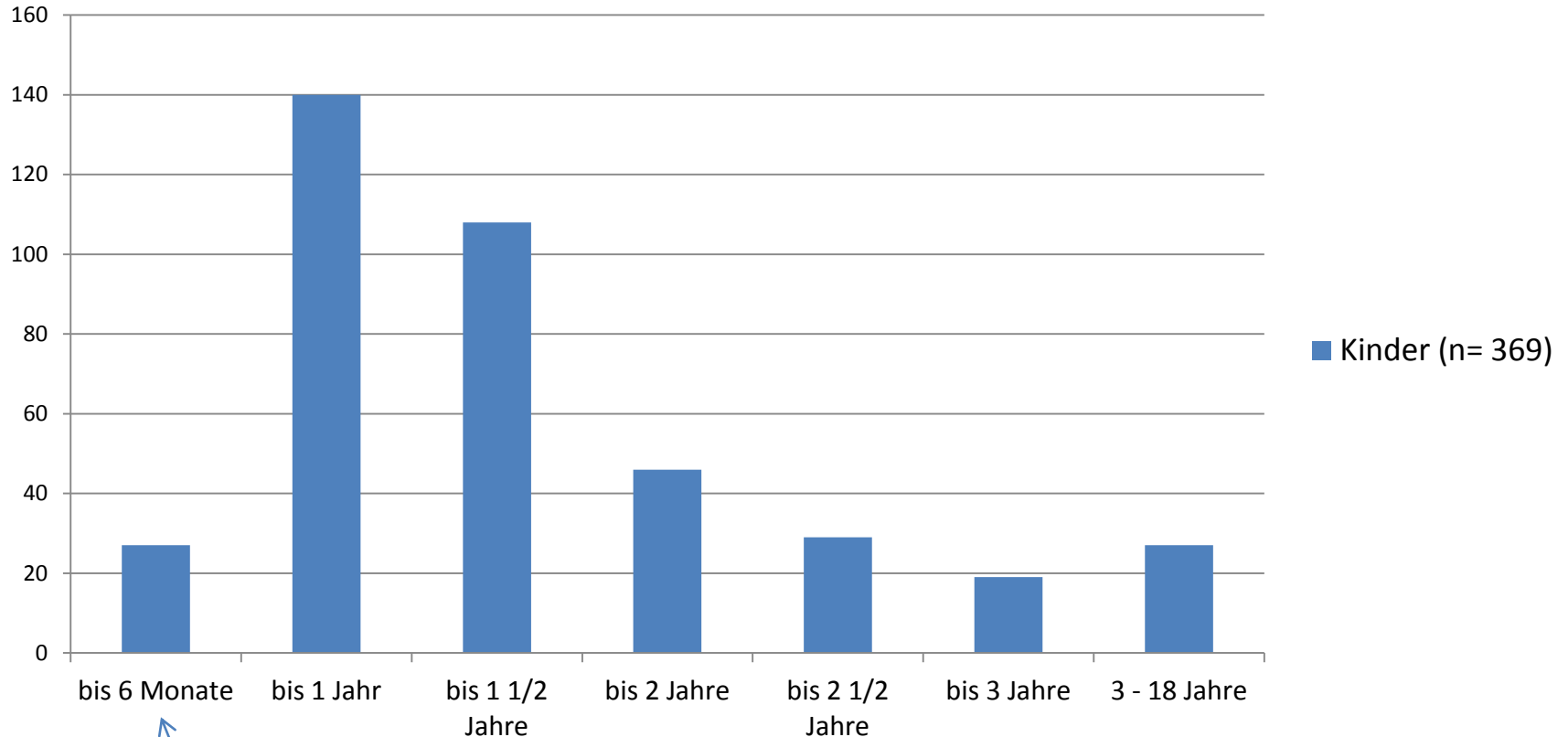
Blood count showed haemoglobin 105 g/l, WBC $6,57 \cdot 10^9/l$, platelets $446 \cdot 10^9/l$.

Differential count revealed neutrophils 6%, eosinophils 5%, monocytes 19% and lymphocytes 79%; absolute neutrophil count (ANC) was $0,39 \cdot 10^9/l$. C-reactive protein (CRP) was elevated to 98 mg/l. After surgical incision and antibiotic therapy the patient recovered quickly. The family history, past medical history and physical examination of the patient were unremarkable. During the following months the ANC remained low, between 0 and $0,4 \cdot 10^9/l$; there were no severe infections.

....

Präanalytik: Typisches Erkrankungsalter

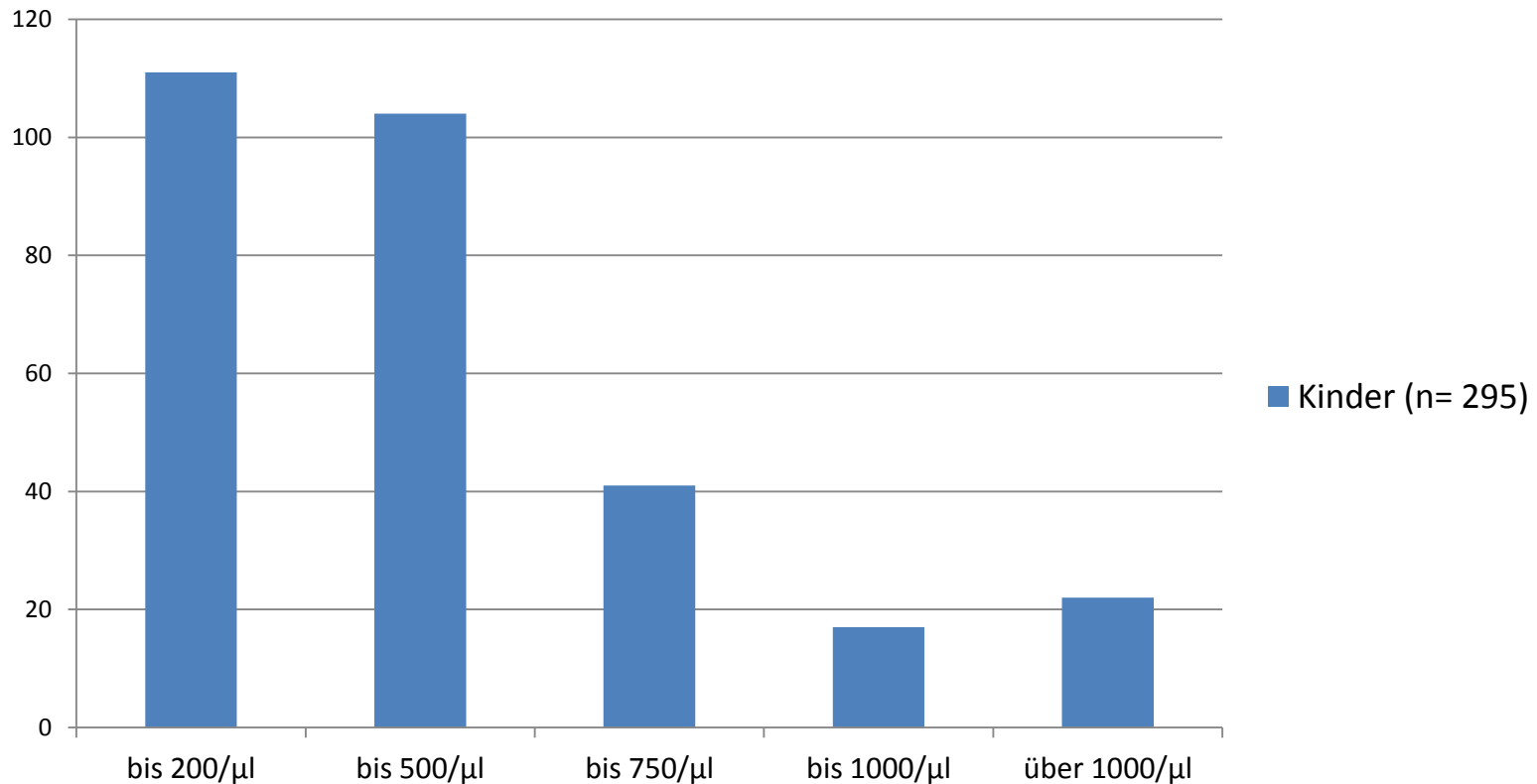
Alter bei erstmaligem Nachweis von Autoantikörpern



↑
physiologisch niedrigere Immunglobulin-Spiegel erschweren evtl. Nachweis

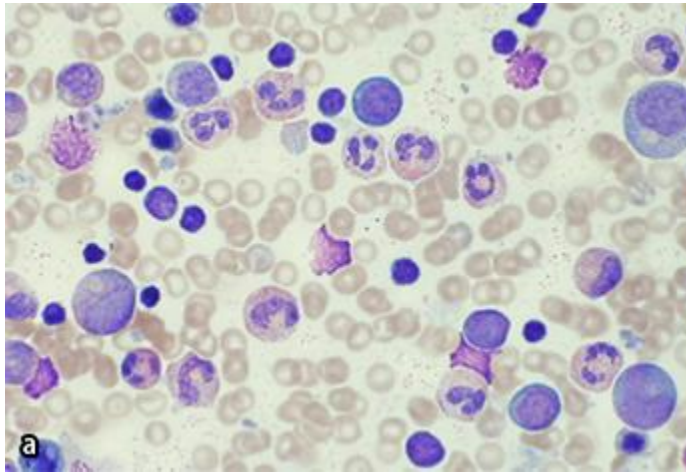
Präanalytik: Absolute Neutrophilenzahl

ANC bei erfolgreichem Autoantikörper-Nachweis

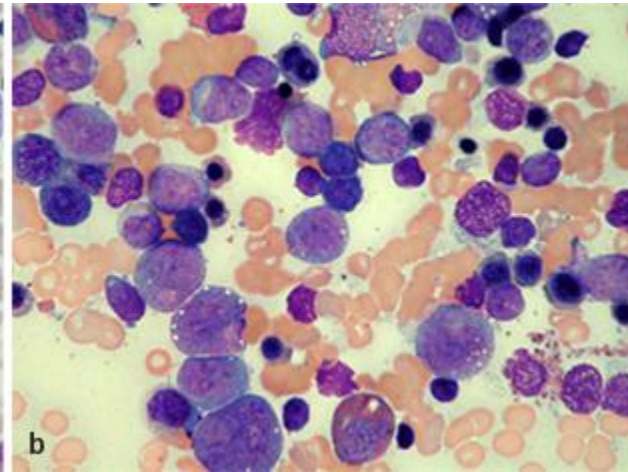


Knochenmark

- Normal oder hyperzellulär
- Linksverschiebung
- Kein Reifungsstop



Autoimmunneutropenie (AIN)



Kostmann-Syndrom

Reifungsstop !

Fallbericht, Teil 2

Repeated testing for granulocyte antibodies (PR3, MPO, cANCA, pANCA) and antinuclear antibodies (ANA) was negative.

After 5 months of persistent neutropenia, bone marrow aspiration and biopsy were performed, which shows a **slightly hypercellular** bone marrow with normal erythro- and megakaryopoiesis.

Granulopoiesis was **hyperplastic with a shift to the left** maturing up to the level of band forms.

The age of the patient and the benign course of the disease despite the profound neutropenia make the most likely diagnosis chronic benign neutropenia, which is usually autoimmune in origin, even if circulating neutrophil antibodies are not always detected.

Granulozytenantigene

	Protein	Alloantigen	Alter Name	Autoantigen
CD16b	Fcγ-Rezeptor IIIb	HNA-1a, -1b, -1c, -1d	NA1, NA2, SH, --	ja
CD177	NB1-GP	HNA-2	NB1	ja
CTL2	Cholin-Transporter	HNA-3a, -3b	5b, 5a	---
CD11b	MAC-1 (Integrin)	HNA-4a, -4b	Mart	ja
CD11a	LFA-1 (Integrin)	HNA-5a, -5bw	Ond	---

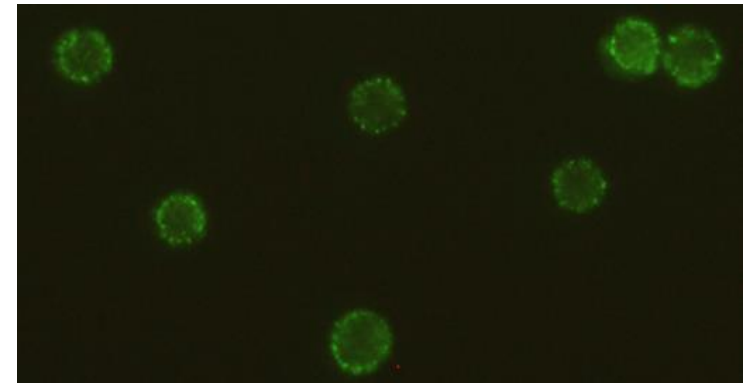
Die große Mehrheit der Autoantikörper reagiert mit HNA-1a-positiven Granulozyten.

cANCA, pANCA und ANA haben mit Autoimmunneutropenie nichts zu tun!

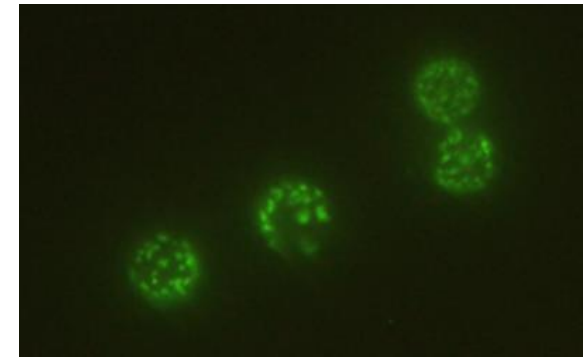
Granulozytenimmunfluoreszenztest

Frische, fixierte Granulozyten
+
Patientenplasma (freie Auto-Ak?)
↓
30 min bei 37°C inkubieren
↓
+ Rabbit-anti-human-IgG-FITC
↓
30 min bei 37°C inkubieren
↓
am Fluoreszenzmikroskop auswerten

Fluoreszenzmuster gibt Hinweis auf die Spezifität

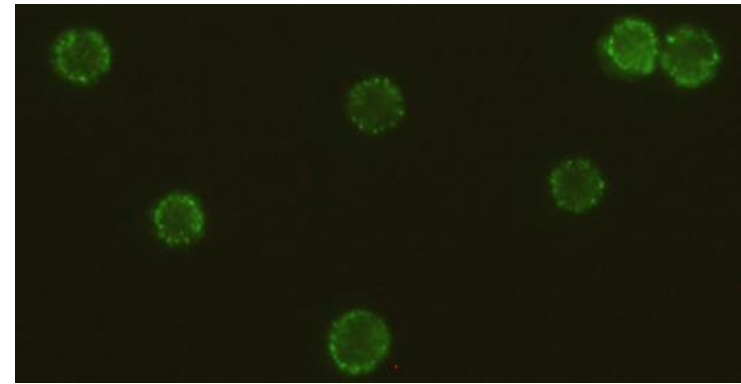
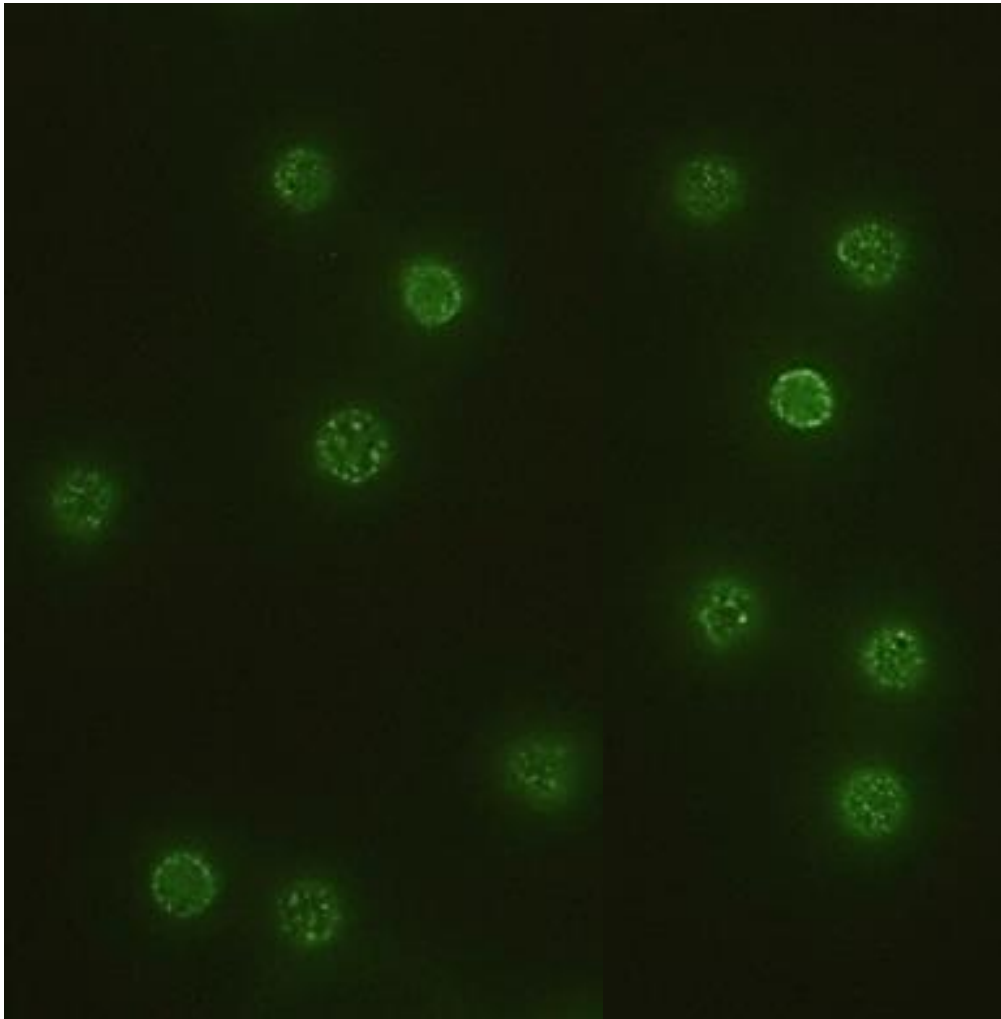


transmembrane Moleküle (fixiert):
CD11b, CTL-2, HLA KI. I

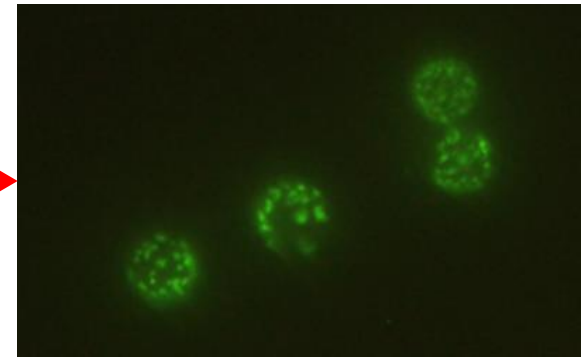


GPI-verankerte Moleküle
(mobil): Fcγ-Rezeptor IIIb,
CD177

Granulozytenimmunfluoreszenztest



transmembrane Moleküle (fixiert):
CD11b, CTL-2, HLA KI. I



GPI-verankerte Moleküle
(mobil): Fcγ-Rezeptor IIIb,
CD177

21.03.2016: K., S. ♀ *30.05.2015, ANC 134/μl

Granulozytenimmunfluoreszenztest

Warum kein direkter Test mit Patientengranulozyten?

Kurze Lebensdauer => apoptotisch bei Ankunft im Labor

Niedrige Zellzahl, dafür maximal aktiviert
=> hohe Autofluoreszenz

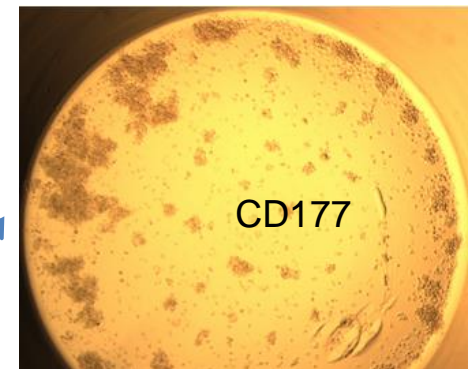
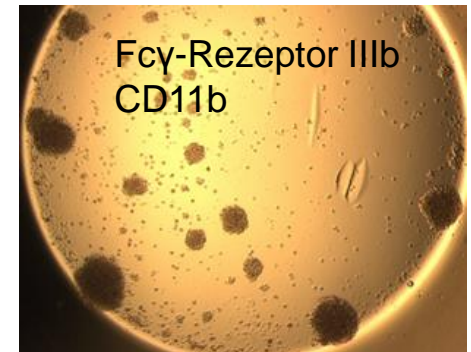
Viele Fcγ-Rezeptoren => binden Immunkomplexe
=> starkes Hintergrundsignal

=> Direkter Granulozytenimmunfluoreszenztest ist praktisch nicht sinnvoll durchführbar

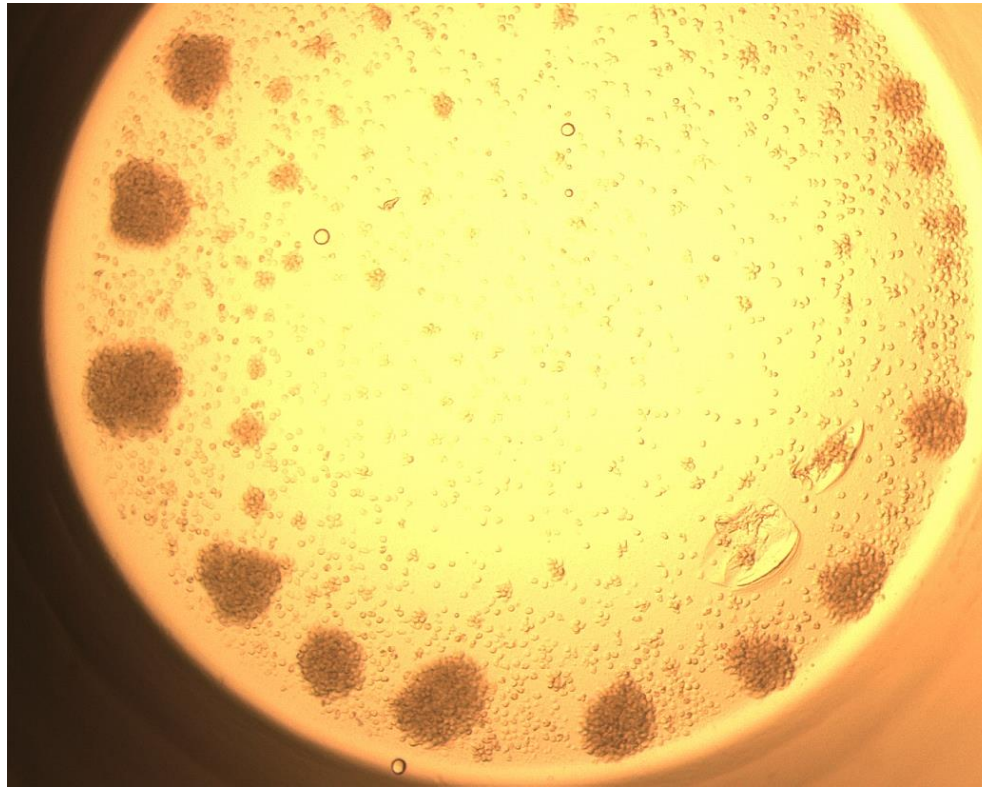
Granulozytenagglutinationstest

Frische, unfixierte Granulozyten
+
Patientenplasma (freie Auto-Ak?)
↓
2 h bei 37°C inkubieren
↓
am Mikroskop auswerten

Form der Aggregate gibt Hinweis auf die Spezifität



Granulozytenagglutinationstest

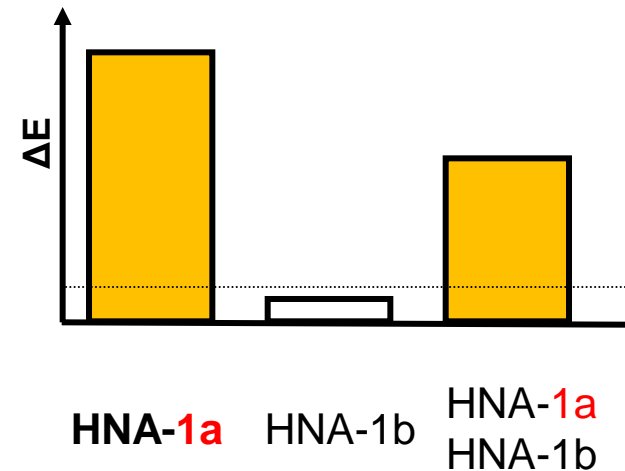
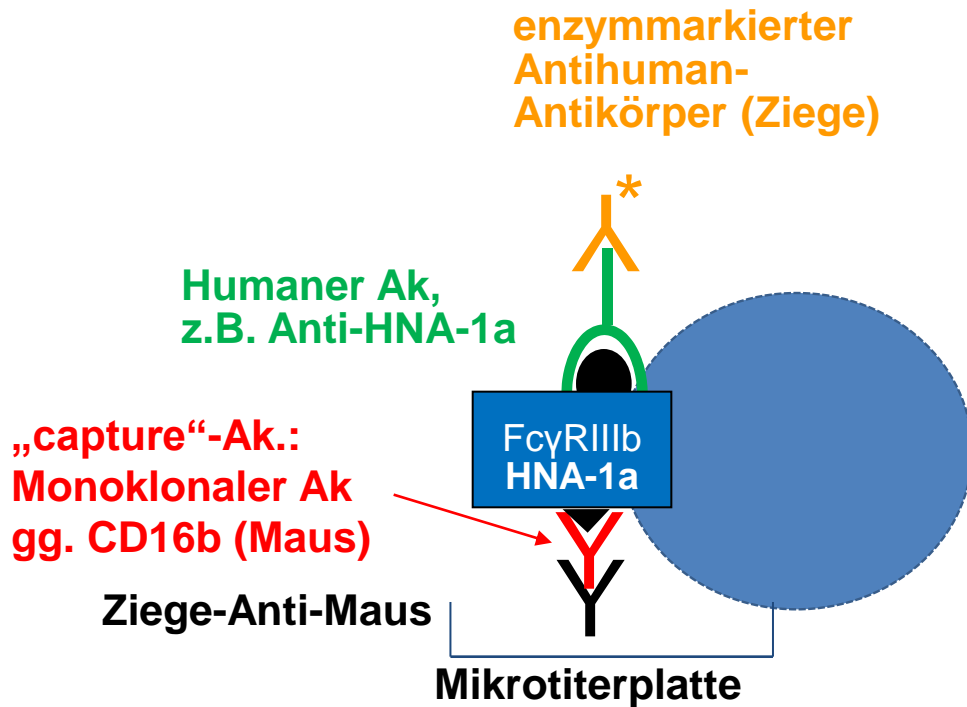


21.03.2016: K., S. ♀ *30.05.2015, ANC 134/ μ l

Antigen-spezifischer Enzymimmunoassay (MAIGA)

K., S. ♀ *30.05.2015

FcγRIIIb: 2,181	Pos.-K.: 2,612
CD177: 0,119	Neg.-K.: 0,076
CD11b: 0,083	



Zeitbedarf: ca. 7 h

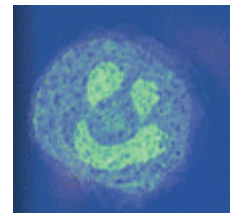
(Bux et al., Transfus Med 1993)

Genetische Prädisposition

Koinzidenz bei Zwillingen und unter Geschwistern

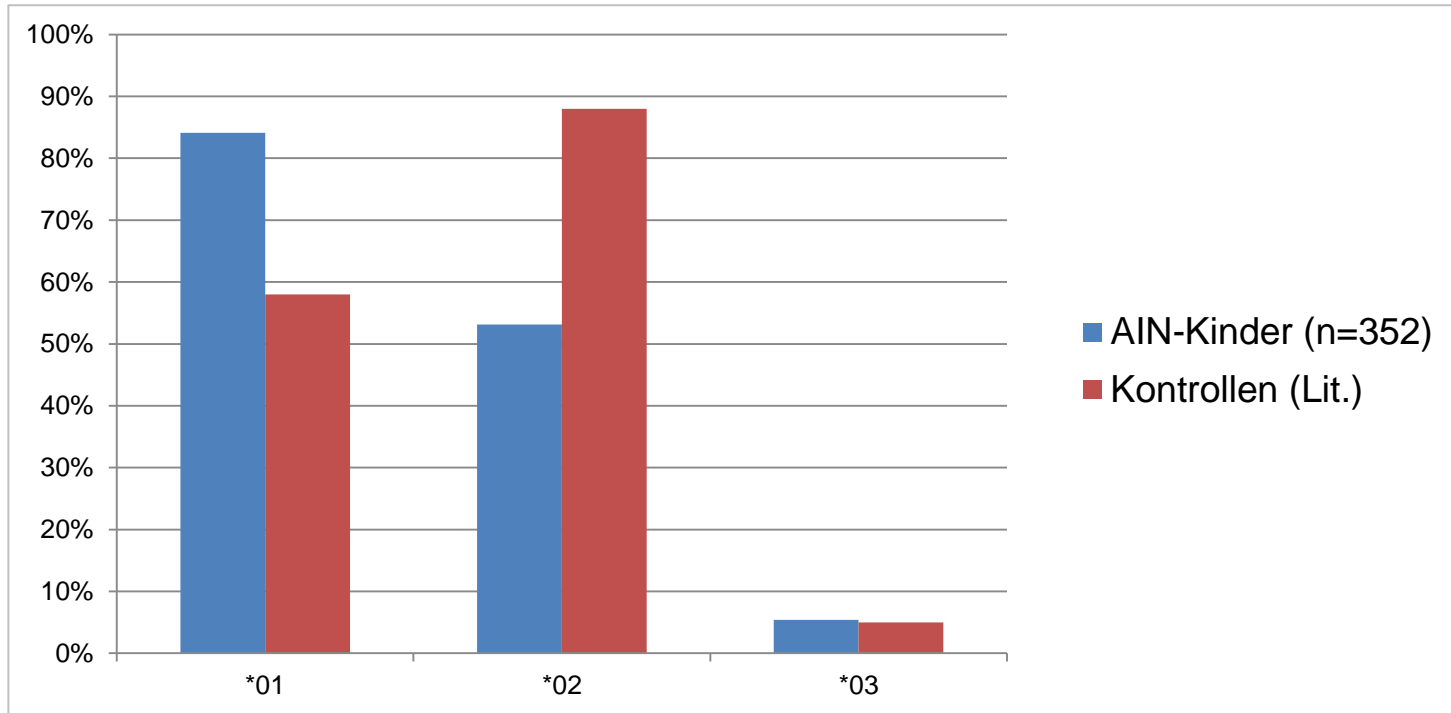
Kandidatengene:

- Fc gamma-Rezeptor IIIb (Autoantigen) ist polymorph
- Autoimmunerkrankung => HLA-Assoziation?



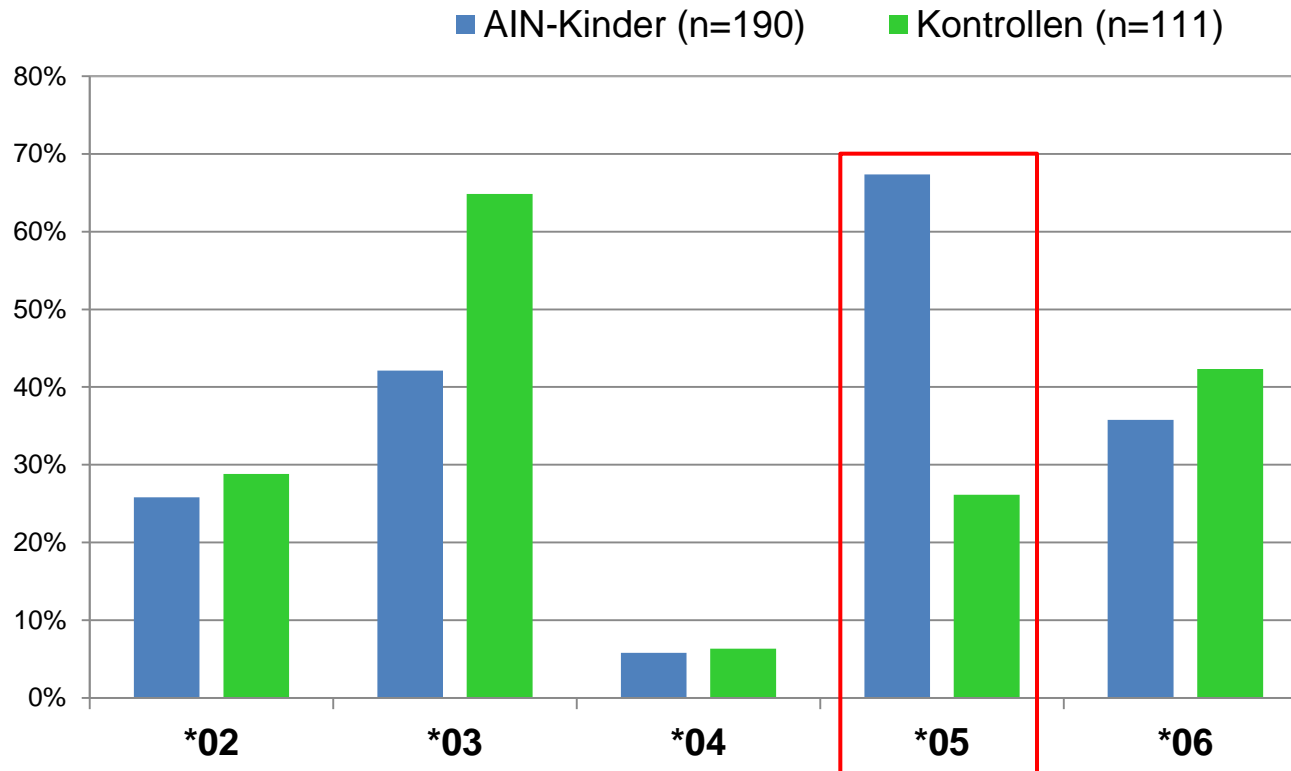
Phänotyp-Frequenzen der FCGR3B-Allele

FCGR3B*01 => HNA-1a, FCGR3B*02 => HNA-1b



47% der AIN-Kinder sind homozygot für FCGR3B*01
(nur ca. 8 % unserer Blutspender)

Phänotyp-Frequenzen der DQB1-Allele



Wang et al., Primary autoimmune neutropenia in children in Taiwan,
Transfusion 2009;49:1003-6 **AIN ist assoziiert mit HLA-DQB1*0503**



**Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit!**

a.reil@bsdwest.de

http://www.blutspendedienst-west.de/ueber_uns/zentren_einrichtungen/leukozytenimmunologie/main.php