

## *Kasuistiken / Casuistics*

# **Immuncytochemische Identifizierung AB0-inkompatibler Erythrocyten nach einem tödlichen Transfusionszwischenfall**

**I. Pedal<sup>1</sup>, B. Madea<sup>2</sup> und M. Oehmichen<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen, Nägelestr. 5, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

<sup>2</sup>Institut für Rechtsmedizin der Universität Köln, Melatengürtel 60–62, D-5000 Köln 30, Bundesrepublik Deutschland

### **Immunocytochemical Identification of AB0-Incompatible Red Cells in a Fatal Transfusion Reaction**

**Summary.** A patient with blood group 0 died 8 h after an accidental transfusion of one unit of A<sub>1</sub> erythrocytes. The admixture of group A red cells was not detected during postmortem serology. Paraffin-embedded autopsy material was studied by the indirect immunoperoxidase technique using monoclonal antibodies. Group A red cells were easily identified (a) as circulating agglutinates in the larger vessels, (b) in the capillary vessels of all organs examined, and (c) as closely packed cell aggregations in the sinuses of the spleen. However, there was no clear evidence of erythrophagocytosis in the spleen or in liver.

**Key words:** Blood group incompatibility, AB0 – Transfusion reaction, hemolytic – Immunohistochemistry (indirect immunoperoxidase technique)

**Zusammenfassung.** Eine Patientin der Blutgruppe 0 starb acht Stunden nach der versehentlichen Transfusion einer A<sub>1</sub>-Erythrocyten-Konserven. Serologisch ließ sich eine Beimengung von A-Erythrocyten im Leichenblut nicht nachweisen. Am paraffineingebetteten Sektionsmaterial wurden Untersuchungen mit der indirekten Immunperoxidasetechnik unter Verwendung monoklonaler Antikörper durchgeführt. Die selektive Darstellung A-positiver Erythrocyten gelang ohne Schwierigkeit. Die inkompatiblen Erythrocyten fanden sich a) als zirkulierende Agglutinate in größeren Blutgefäßen, b) in den Blutkapillaren sämtlicher Organe, c) als dicht gepackte Zellan-

sammlungen in den Sinus der Milz. Eine Erytrophagie von A-Erythrocyten war allerdings weder in der Leber noch in der Milz eindeutig erkennbar.

**Schlüsselwörter:** Blutgruppenunverträglichkeit, AB0 – Transfusionsreaktion, hämolytische – Immunhistochemie (indirekte Immunperoxidasetechnik)

Fast allen heute vorkommenden hämolytischen Transfusionszwischenfällen liegt eine Inkompatibilität vom Major-Typ zugrunde, bei der transfundierte Erythrocyten von Antikörpern des Empfängers zerstört werden (Pineda et al. 1978; Hoppe 1983). Zwei Drittel der tödlichen Zwischenfälle beruhen auf Verwechslungen bei der Infusion korrekt typisierter Konserven; ungleich seltener liegen Laborfehler vor. Nach einer Untersuchung von Myhre (1980), die sich auf Daten der Food and Drug Administration stützt, ist mit einer tödlichen Verwechslung auf 800 000 Transfusionen zu rechnen; dagegen geben Pineda et al. (1978) einen Todesfall auf 33 500 Transfusionen an. Die Letalität klinisch relevanter hämolytischer Zwischenfälle wird von verschiedenen Arbeitsgruppen auf etwa 40% beziffert (vgl. Pineda et al. 1978). Am häufigsten kommen tödliche Transfusionszwischenfälle bei Inkompatibilitäten im AB0-System vor (Hoppe 1983), dabei sind Empfänger der Blutgruppe 0 überrepräsentiert (Myhre 1980).

Ist im zeitlichen Zusammenhang mit einer Bluttransfusion ein plötzlicher Todesfall eingetreten, so besteht zunächst der Verdacht, daß AB0-inkompatibles Blut transfundiert worden sein könnte. Wenn von den beteiligten Ärzten eine Verwechslung bestritten wird und die kriminalistischen Ermittlungen zu keinem eindeutigen Ergebnis führen, muß versucht werden, gruppenfremde Erythrocyten im Blut oder in den Organen des Empfängers nachzuweisen.

Die konventionell-serologische Erfassung AB0-inkompatibler Erythrocyten macht Schwierigkeiten, wenn nur geringe Blutmengen transfundiert wurden und wenn nach längerem Überleben ein Großteil der Fremderythrocyten durch Liegenbleiben in der Endstrombahn oder durch Sequestration in Leber und/oder Milz aus dem zirkulierenden Blut eliminiert wurde. In solchen Fällen führen Methoden zum Erfolg, die eine individuelle Typisierung einzelner Erythrocyten ermöglichen:

In Paraffinschnitten aus den Organen eines Patienten der Gruppe B, der zwei Tage nach der Transfusion von 4500 ml (!) A-Blut gestorben war, konnten mit der Mischzellagglutinationstechnik sowohl A- als auch B-Erythrocyten dargestellt werden (Ishiyama et al. 1977; Chang et al. 1977); auch die Serologie lieferte in diesem Falle eindeutige Befunde. Von Keil et al. (1983) werden entsprechende Beobachtungen mitgeteilt.

Floyd et al. (1982) konnten experimentell zeigen, daß in gemischten Erythrocytenpopulationen mit der PAP-Methode (Sternberger et al. 1970) noch die 0,5%ige Beimischung von Erythrocyten eines abweichenden AB0-Typs quantitativ erfaßt werden kann.

Mit derselben Methode gelingt in Placentagewebe eine getrennte AB0-Typisierung kindlicher und mütterlicher Erythrocyten (Pedal et al. 1985).

In der immunhistochemischen Blutgruppendiagnostik liefert die indirekte Immunperoxidasetechnik (Zwei-Schritt-Technik) ebenso gute Ergebnisse wie

die PAP-Methode (Pedal und Baedeker 1986). Wir berichten über die erfolgreiche Anwendung dieser Methode nach einem tödlichen Transfusionszischenfall.

## Fallschilderung

### Klinischer Verlauf

Die 65jährige Patientin mit der Blutformel 0, Rh+ erhielt im Anschluß an einen operativen Eingriff mehrere Bluttransfusionen, darunter wahrscheinlich ein für einen anderen Patienten bestimmtes Erythrocytenkonzentrat mit der Blutformel A, Rh+. Die Konserven wurde zunächst ohne erkennbare Reaktion vertragen. Drei Stunden nach Transfusionsbeginn kam es zu einem Blutdruckabfall; 1 Std später wurden im hämatologischen Labor die Zeichen einer Hämolyse und einer Gerinnungsstörung festgestellt. Acht Stunden nach Transfusionsbeginn trat der Tod ein.

### Sektionsbefunde, Histologie

Durch die Gerichtliche Leichenöffnung konnte die Todesursache nicht geklärt werden. Als Ausdruck der Gerinnungsstörung fanden sich etwas verstärkte Einblutungen in dem abdominellen Operationsbereich. Im übrigen wurden eine globale Herzhypertrophie und eine ausgeprägte, allgemeine Arteriosklerose festgestellt.

Histologisch fanden sich neben der in verschiedenen Organen nachweisbaren, ausgeprägten Arteriosklerose die unspezifischen Zeichen eines finalen, schockartigen Kreislaufversagens. Nur die Untersuchung der Milz lieferte mit dem Nachweis dicht gepackter, abgeblaßter Erythrocyten in den erweiterten Sinus der roten Pula sowie einer gelegentlichen Eryphagie Indizien für einen möglichen hämolytischen Zwischenfall.

### Serologie

Die Blutformel der Patientin 0, Rh+ war nach Agglutinationstest und Serumgegenprobe zu bestätigen. Der Antikörpersuchtest verlief negativ. Ein Rest der mutmaßlich der Patientin transfundierten Erythrocytenkonserven wies die Formel A<sub>1</sub>, Rh+ auf.

## Material und Methode

### Immunhistochemie

Untersucht wurden 4 µ dicke Paraffinschnitte der Organe Lunge, Trachea, Schilddrüse, Herzmuskel, Leber, Milz, Pankreas, Nebenniere, Niere, Aortenwand und Gehirn. In getrennten, parallelen Arbeitsgängen wurden die Antigene A, B und H nach der indirekten Immunperoxidasetechnik (Zwei-Schritt-Technik) dargestellt:

Nach Entparaffinierung, Hemmung der endogenen Peroxidase mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Methanol (1%) und Digestion mit Trypsin (0,1%) folgten folgende Inkubations schritte:

1. Unmarkierter primärer Antikörper:
  - a) Anti-A, Anti-B Seraclone® der Fa. Biotest, Offenbach. Kat. Nr. 801315 bzw. 801340 (1:10).
  - b) UEA1 der Fa. Medac, Hamburg. Kat. Nr. L-2201 (1:40000, bezogen auf die Trockensubstanz).

2. Peroxidase-markierter sekundärer Antikörper:
  - a) Anti-Maus-Ig (gesamt) vom Kaninchen, Peroxidase-markiert. Fa. Dakopatts, Hamburg. Kat. Nr. P161 (1:20).
  - b) Anti-UEA 1 vom Kaninchen, Peroxidase-markiert. Fa. Dakopatts, Hamburg. Kat. Nr. P 289 (1:100).

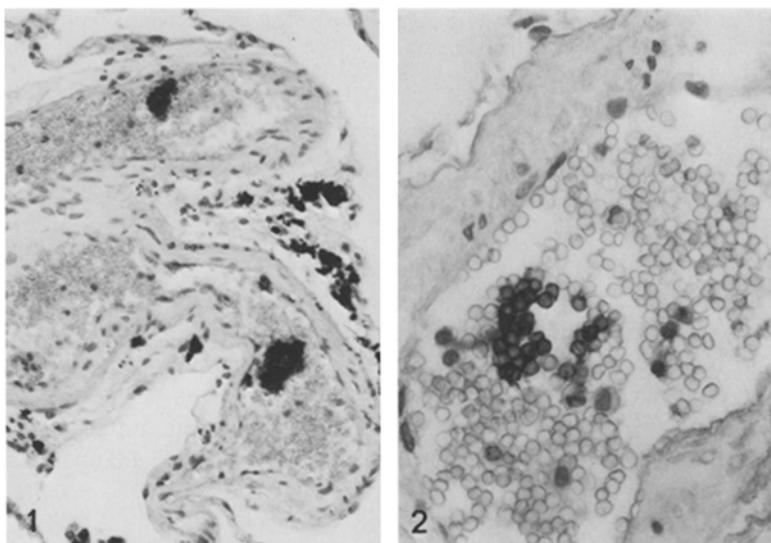
Die in Klammern genannten Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit 2,5% igem unspezifischen Schweineserum in Tris-Saline erreicht. Inkubiert wurde jeweils 30 Min lang bei Zimmertemperatur. Den spezifischen Inkubationsschritten gingen jeweils eine Spülung mit Tris-Saline und eine Vorinkubation mit 5% igem Schweineserum voraus.

Zur Entwicklung der Peroxidase verwendeten wir 3-Amino-9-Äthylcarbazol (Fa. Sigma, Deisenhofen. Kat. Nr. A-5754), das ein rotbraunes Reaktionsprodukt liefert; die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin.

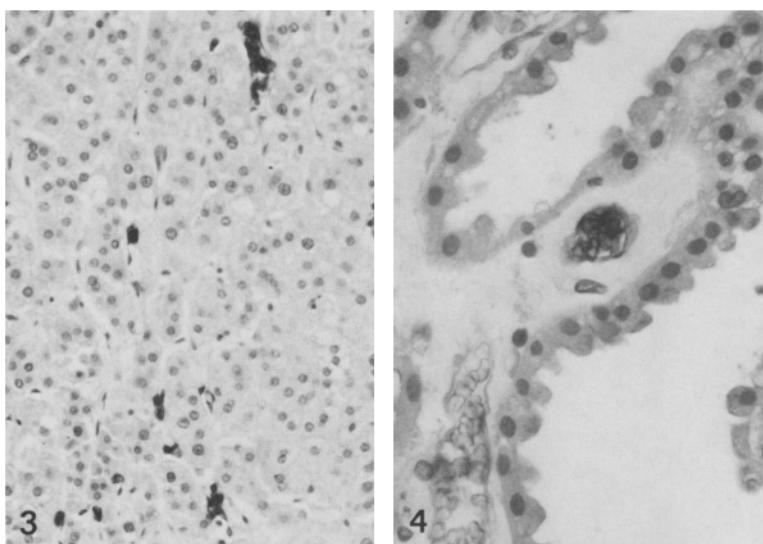
## Ergebnisse

Anti-B lieferte erwartungsgemäß in keinem der Präparate einen positiven Reaktionsausfall.

UEA 1 ergab – abgesehen von den in diesem Zusammenhang nicht interessierenden Endothel- und Epithelmarkierungen (Pedal und Hülle 1984; Pedal und Baedeker 1986) – eine intensive Markierung der Erythrocytenmembranen. Unmarkierte oder schwach markierte Fremderythrocyten ließen sich von der Masse der stark markierten O-Erythrocyten nicht eindeutig unterscheiden.



**Abb. 1, 2.** Zirkulierende Agglutinate transfundierter A-Erythrocyten in einem größeren Blutgefäß der Lunge; daneben unmarkierte, reguläre O-Erythrocyten. Indirekte Immunperoxidase-technik mit monoklonalem Anti-A, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Abb. 1:  $\times 170$ ; Abb. 2:  $\times 425$



**Abb. 3.** Agglutinate von A-Erythrocyten in den Sinus der Nebennierenrinde. Darstellung wie in Abb. 1, 2;  $\times 170$

**Abb. 4.** A- und O-Erythrocyten in den Kapillaren des Plexus chorioideus. Darstellung wie in Abb. 1, 2;  $\times 425$

Auf den Versuch, durch höhere UEA 1-Verdünnung eine Differenzierung zwischen den beiden Populationen zu erzielen, wurde verzichtet.

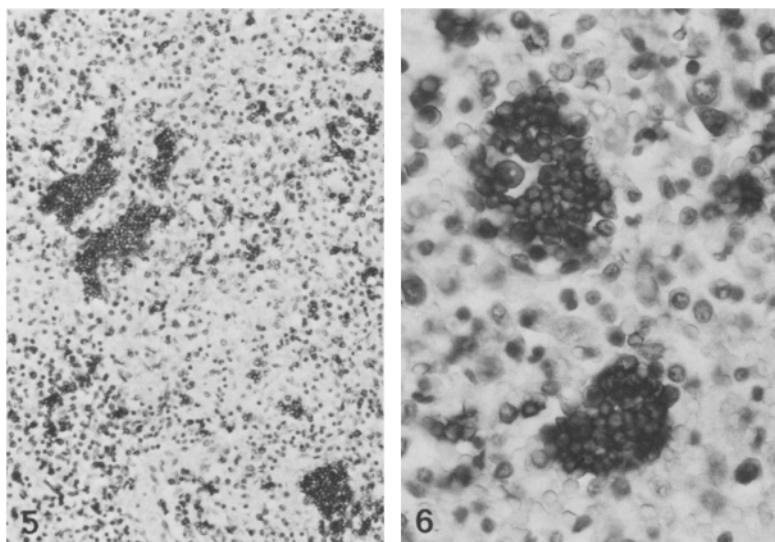
Mit Anti-A gelang in allen Organen die selektive Darstellung der Fremderythrocyten. Für die einzelnen Organe und Gefäßprovinzen waren folgende Verteilungsmuster charakteristisch:

In größeren Blutgefäßen aller Organe ließen sich zwischen regulären, unmarkierten Erythrocyten spärliche Agglutinate stark markierter A-Erythrocyten nachweisen (Abb. 1, 2).

Die Endstrombahn aller Organe enthielt neben unmarkierten Erythrocyten einen stark wechselnden Anteil markierter Fremderythrocyten (Abb. 3, 4). Besonders zahlreich waren die in kleinen Agglutinaten auftretenden Zellen in den sinusoidalen Kapillaren der Nebennierenrinde, in den Lungenkapillaren und in den Kapillarschlingen der Nierenglomerula, während sie in den Kapillaren des Herzmuskels und des Gehirns nur vereinzelt vorkamen.

Die rote Pulpa der Milz wies in den erweiterten Sinus dichte Ansammlungen A-positiver Erythrocyten auf. Eine Phagocytose solcher Zellen war jedoch nicht eindeutig nachzuweisen. In manchen Bezirken der roten Pulpa waren markierte, A-positive Erythrocyten fast gleich häufig wie unmarkierte (Abb. 5, 6). Dagegen war die weiße Pulpa frei von A-positiven Erythrocyten.

In den Sinus der Leber kamen markierte Erythrocyten in ähnlicher Häufigkeit und Verteilung vor wie in der Nebennierenrinde. Zum Teil waren deformierte A-Erythrocyten dem Sinusendothel und der Oberfläche der v. Kupffer'schen Sternzellen angelagert; eine Phagocytose konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.



**Abb. 5, 6.** Dichte Ansammlungen transfundierter A-Erythrozyten in den Sinus der roten Milz-pula; daneben locker gelagerte, unmarkierte O-Erythrozyten. Darstellung wie in Abb. 1, 2. Abb. 5:  $\times 135$ ; Abb. 6:  $\times 425$

## Diskussion

Transfusionszwischenfälle, die sich erst nach Ende der Transfusion und in den Stunden danach entwickeln und unter relativ milder klinischer Symptomatik verlaufen, werden als Frühreaktionen von den selteneren, foudroyant verlaufenden Sofortreaktionen abgegrenzt (Hoppe 1983). Der vorliegende, acht Stunden überlebte, in der ersten Phase symptomlose Zwischenfall ist also der Kategorie der Frühreaktionen zuzurechnen.

Bei diesem Reaktionstyp kommt zur sofort einsetzenden intravasalen Hämolysen der inkompatiblen Erythrozyten ein protrahierter extravasaler Abbau in Leber und Milz hinzu; an beiden Mechanismen ist das Komplementsystem wesentlich beteiligt (Wintrobe 1981; Hoppe 1983).

Welche immunhistochemischen Befunde diesen klinisch und pathophysiologisch unterscheidbaren Reaktionsformen entsprechen, kann nur vermutet werden, da entsprechende Untersuchungen bisher fehlen. Zu erwarten ist, daß mit zunehmender Überlebenszeit eine Sequestration der Fremderythrozyten aus dem zirkulierenden Blut in die Organe Leber und Milz stattfindet und sich in den immunhistochemischen Befunden dokumentiert.

Dieser Erwartung entsprechen die Beobachtungen im vorliegenden Falle recht gut:

Im zirkulierenden Blut der größeren Gefäße kommen nach achtstündiger Überlebenszeit nur noch spärliche Agglutinate A-positiver Erythrozyten vor, was den negativen Ausfall der serologischen Untersuchungen erklärt.

Ein erheblicher Teil der Fremderythrozyten befindet sich, auf verschiedene Organe verteilt, in der Endstrombahn. Offensichtlich wird ein Liegenbleiben der Zellen in der Gefäßperipherie einerseits durch die schockbedingte Strö-

mungsverlangsamung, andererseits durch Agglutination gefördert. Die Verlegung eines Teiles der Endstrombahn durch Erythrocyten-Agglutinate wird sich, entsprechend dem sludge-Phänomen bei anderen Schockformen, über eine Verstärkung der Gewebshypoxie schockintensivierend auswirken.

Als Korrelat des protrahierten, mehrstündigen Verlaufes ist wohl die sehr starke Anreicherung inkompatibler Erythrocyten in den Sinus der roten Milzpulpa aufzufassen. Der serologische Nachweis von A-Erythrocyten wäre sicher gelungen, wenn als Untersuchungssubstrat statt des peripheren Blutes Milzblut zur Verfügung gestanden hätte.

Nun gilt nach experimentellen Untersuchungen mit minimalen Dosen IgM-beladener Erythrocyten in erster Linie die Leber als dasjenige Organ, in dem Phagocytose und Abbau der opsonierten gruppenfremden Erythrocyten stattfinden (Jandl et al. 1957; Atkinson und Frank 1974; Wintrobe 1981). Der immunhistochemische Befund einer extremen Erythrocytenanreicherung in der Milz könnte einerseits darauf hindeuten, daß nach der Transfusion großer Erythrocytenmengen neben dem in der Leber ablaufenden, primär immunologischen Abbaumechanismus ein mechanisches „Abfiltern“ der Fremderythrocyten in der Milz von Bedeutung ist. Andererseits kann die Erythrocytenanreicherung in der Milz als Hinweis auf die Mitwirkung eines inkompletten Anti-A aus der IgG-Klasse gedeutet werden, wie es vor allem bei Menschen der Blutgruppe 0 vorkommt: IgG-beladene Erythrocyten werden überwiegend in der Milz abgebaut; im Milzblut finden sich in diesen Fällen reichlich Agglutinate IgG-beschichteter Erythrocyten (Jandl et al. 1957; Wintrobe 1981).

Die immunhistochemischen Leberbefunde ließen eine Anheftung von Fremderythrocyten an die Oberfläche v. Kupffer'scher Sternzellen vermuten, ohne daß jedoch eindeutige Zeichen einer Phagocytose zu erkennen waren.

Insgesamt belegen die Befunde, daß mit immunhistochemischen Methoden eine tödliche Transfusion AB0-inkompatiblen Blutes auch dann schlüssig bewiesen werden kann, wenn serologische Methoden wegen des geringen Anteils an Fremderythrocyten im zirkulierenden Blut versagen. Außerdem ist vorauszusagen, daß die immunhistochemischen Befunde, sobald ausreichende Vergleichsbeobachtungen vorliegen, Aussagen über den zeitlichen Ablauf eines Transfusionszwischenfallen erlauben werden. Der Mischzellagglutination, die für diese Fragestellung ebenfalls geeignet ist (Ishiyama et al. 1977; Chang et al. 1977; Keil et al. 1983), sind die moderneren Immunperoxidaseverfahren weit überlegen. Ihre Vorteile liegen in der technisch einfachen Herstellung von Dauerpräparaten, in der problemlosen Befundinterpretation und in dem ungleich höheren optischen Auflösungsvermögen, das selbst eine Lokalisierung der Antigene auf ultrastrukturellem Niveau erlaubt. Mit den eng verwandten Verfahren der Immun-Elektronenmikroskopie könnten die Phagocytose und der intrazelluläre Abbau inkompatibler Erythrocyten in Leber und Milz untersucht werden.

## Literatur

- Atkinson JP, Frank MM (1974) Interaction of IgM antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes in man. J Clin Invest 54:339–348

- Chang S, Nagai T, Ogawa K, Komuro E, Ishiyama I (1977) The significance of serologic investigation on the analysis of pathomorphogenesis in forensic medicine. Application of mixed cell agglutination reaction in analyzing the incompatible transfusion. *Nippon Hoigaku Zasshi* 31:17-26
- Floyd DM, Huang ST, Poon MC (1982) Quantitation of AB0 mixed-cell populations by a peroxidase-anti-peroxidase immunoenzyme method. *Transfusion* 22:352-354
- Hoppe I (1983) Hämolytischer Transfusionszwischenfall. In: Vorlaender KO (Hrsg) Immunologie, 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, S 292-294
- Ishiyama I, Nagai T, Chang S, Tokoro Y (1977) Topographic determination of transfused cells in incompatible transfusion from paraffin-sectioned tissue slices. *Am J Clin Pathol* 67:111-113
- Jandl JH, Jones AR, Castle WB (1957) The destruction of red cells by antibodies in man. I. Observations on the sequestration and lysis of red cells altered by immune mechanisms. *J Clin Invest* 36:1428-1459
- Keil W, Ishiyama I, Prokop O, Geserick G (1983) Die MCAR zur Beurteilung von letalen Transfusionszwischenfällen im AB0-Blutgruppensystem. In: Barz J, Bösche J, Frohberg H, Joachim H, Käppner R, Mattern R (Hrsg) Fortschritte der Rechtsmedizin, Festschrift für Georg Schmidt. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 399-404
- Myhre BA (1980) Fatalities from blood transfusion. *JAMA* 244:1333-1335
- Pedal I, Baedeker Ch (1986) ABH- und Lewis-Antigene der Trachealdrüsen. I. Lewis-positive Individuen. *Z Rechtsmed* 97:89-98
- Pedal I, Hülle J (1984) Immunenzymatische Bestimmung des AB0- und Sekretorstatus an paraffineingebettetem Autopsiematerial. *Z Rechtsmed* 93:289-300
- Pedal I, Kuhn K, Hülle J (1985) Immunhistochemische Bestimmung von mütterlicher und kindlicher Blutgruppe (AB0) an reifem Placentagewebe. *Z Rechtsmed* 94:145-153
- Pineda AA, Brzica SM Jr, Taswell HF (1978) Hemolytic transfusion reaction. Recent experience in a large blood bank. *Mayo Clin Proc* 53:378-390
- Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG (1970) The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18:315-333
- Wintrobe MM (ed) (1981) Clinical hematology, 8th ed. Lea and Febiger, Philadelphia, pp 904-908

Eingegangen am 5. August 1986