

*Versorgung von Patienten  
mit Antikörpern gegen  
hoch frequente Antigene:*

# **Systematische Spendersuche**

Franz F Wagner

Blutspendedienst der Landesverbände des DRK  
Niedersachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen,  
Oldenburg und Bremen gGmbH

## Systematische Spendersuche

- Welche Methoden gibt es?
- Macht eine molekulare Suche Sinn?
- Welche Spender sollten gesucht werden?
- Wie viele typisierte Spender werden benötigt?

## Welche Methoden gibt es?

- Jeder Blutspendedienst führt eine systematische Spendersuche durch!

## Welche Methoden gibt es?

- Jeder Blutspendedienst führt eine systematische Spendersuche durch!

ccD.EE:

nur 2 von 100 Blutpräparaten passen!

## Welche Methoden gibt es?

- Jeder Blutspendedienst führt eine systematische Spendersuche durch!

ccD.EE:

nur 2 von 100 Blutpräparaten passen!

Rh<sub>null</sub>, -D-:

extrem selten, fallen aber bei der Rh-Typisierung  
regelmäßig auf  
(Fehlen der Antigene C, c, E und e)

## Sofort auffallende Phänotypen

- Phänotypen, die bei regulärer Spendertypisierung praktisch immer gefunden werden (sollten)
  - Rh<sub>null</sub>, -D- : Rhesus-Antigene fehlen
  - Bombay (0h): Obligatorisches Anti-H
  - p : Obligatorisches anti-PP1Pk
  - P<sup>k</sup>: Obligatorisches Anti-P

## Sofort auffallende Phänotypen

- Die mangelnde Verfügbarkeit von Rh<sub>null</sub>, -D-, 0h, p und P<sup>k</sup>-Präparaten spiegelt die Seltenheit der Phänotypen
- Eine Erhöhung der Zahl bekannter Spender ist nur durch Untersuchung neuer Spender möglich
  - Eventuell gezielte Werbung in interessanten Populationen
- Identifizierte Spender sollten zu weiteren Spenden ermutigt werden

## Erkennung über Antikörper

- Viele „seltene“ Phänotypen fallen auf, wenn die Träger Antikörper gebildet haben
  - Voraussetzung: Definitive Abklärung im Blutspendedienst
  - Unter „unspezifisch“, „nicht zuzuordnen“ oder ähnlichem kann sich ein Antikörper gegen ein hoch frequentes Antigen verbergen

## Erkennung über Antikörper

- Antikörper entstehen oft nach Transfusion
  - Manche Blutspendedienste lassen Spender nicht zu, die zuvor Bluttransfusionen bekommen hatten
  - Diese Maßnahme hat wesentlich stärkere Auswirkungen auf „seltene Spender“ als auf die Spenderpopulation insgesamt.
- Antikörperbildung kann ein seltenes Ereignis sein
  - Viele k-negative Patienten bilden niemals ein Anti-k
  - Nur ein Bruchteil der „seltenen Spender“ fällt durch Antikörperbildung auf

# Erkennung über Antikörper

- Im Regelfall fallen nur wenige Spender im Jahr mit irregulären Antikörpern auf
  - Beispiel Springe: ca 80 000 Neuspender / Jahr
  - Ausbeute von 5 Jahren:
    - 2x Anti-Ge2, 1x Anti-Lu(b) [Altspender], 2x 0h, 1x p, 1x adult i

## Besonderheit der Erythrozyten

- $Jk_{null}$ -Phänotyp:  
Resistenz der Erythrozyten gegen Harnstoff-Hämolyse
  - Die Resistenz lässt sich relativ leicht nachweisen
  - Suche nach  $Jk_{null}$  wurde in geeigneten Populationen mittels Resistenztestung durchgeführt

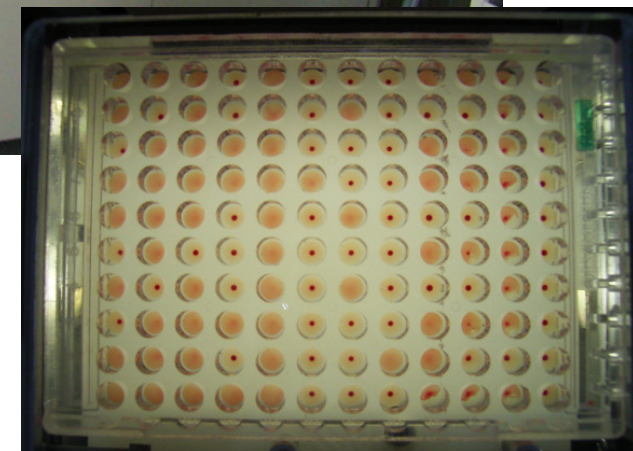
## Bestimmung der Antigene

- Direktestes Vorgehen beim Screenen nach Spendern mit seltenen Phänotypen
- Effizienz steht und fällt mit der Verfügbarkeit geeigneter Seren

## Bestimmung der Antigene



Die Blutgruppenbestimmung am (häufig eingesetzten) PK 7x00 erfolgt mittels direkter Agglutination: Effizient für A, B, CcDEe und K



## Bestimmung der Antigene

- Antiseren gegen hoch frequente Antigene, die direkt agglutinieren, sind selten
  - Falls verfügbar, effizientester Weg der Spendersuche

## Bestimmung der Antigene

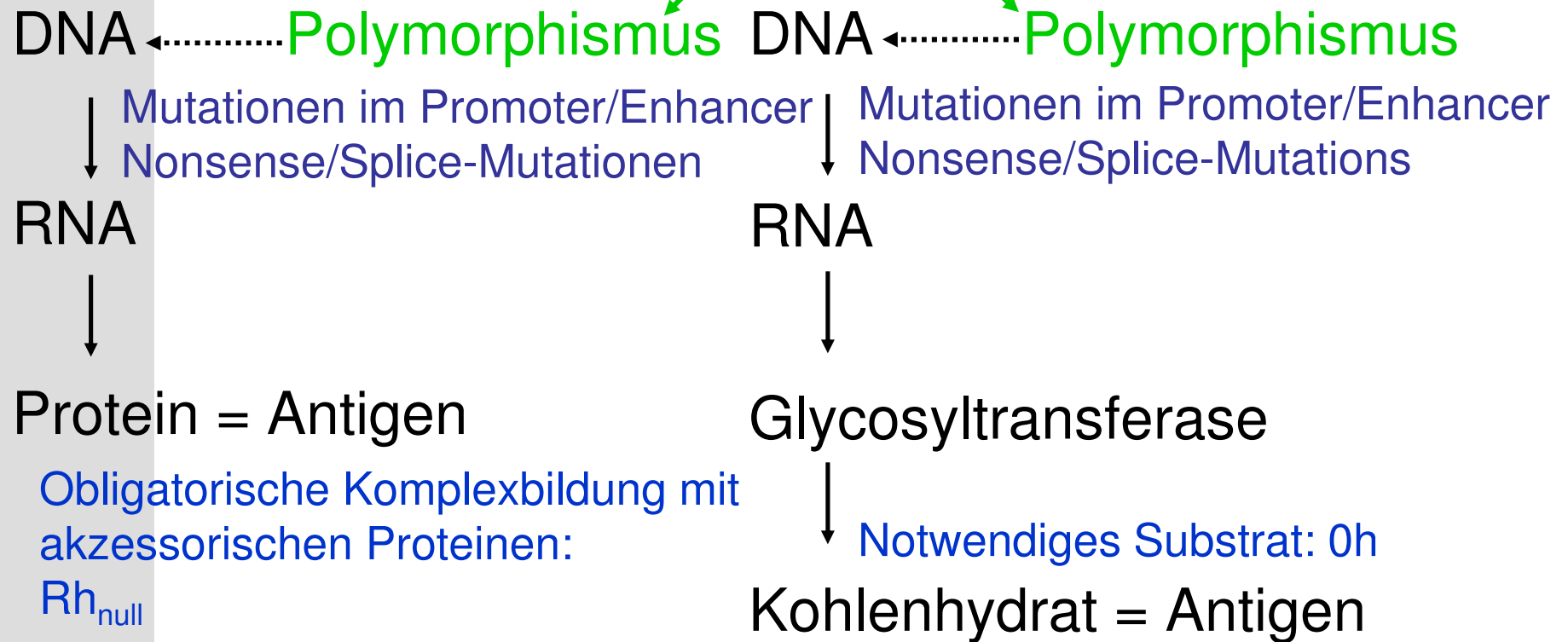
- Antiseren gegen hoch frequente Antigene, die direkt agglutinieren, sind selten
  - Falls verfügbar, effizientester Weg der Spendersuche
- Typischer Nachweismethode: Indirekter Coombstest
  - Automatisiert durchführbar auf zahlreichen immunhämatologischen Automaten
  - Deutlich höherer Aufwand
- Für viele Antigene liegen Antikörper in so geringer Menge oder so geringer Qualität vor, dass eine serologische Suche undurchführbar ist

## Molekulare Antigenvorhersage

- Bei einer Reihe „seltener“ Phänotypen ist die molekulare Ursache bekannt
- Direkter Nachweis des ursächlichen Polymorphismus
- Hochdurchsatzmethoden sind verfügbar

# ■ Gene und Antigen

## Molekulare Typisierung



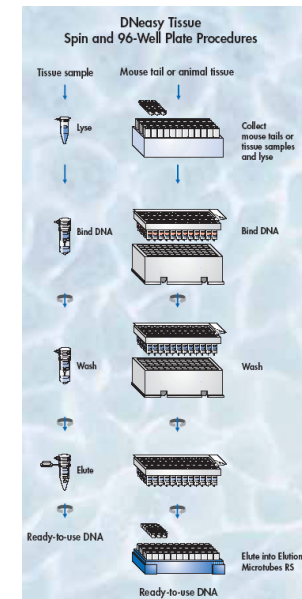
## Molekulare Antigenvorhersage

- (PCR mit Gelelektrophorese)
- Real-Time PCR
- Kapillarelektrophorese
- Mikroarray
  - Progenika BloodChip
  - Immucor BeadChip
  - Biotrove OpenArray
  - Luminex

# Vereinfachte DNA-Isolierung

- Extract-N-Amp-System
- Einfache 2-Stufen DNA Isolierung
  - (i) Blut und Lyselösung mischen
  - (ii) Stopplösung zugeben
  - (iii) Weiter zur PCR!
- Keine DNA Aufreinigung
  - Keine Zentrifugation
  - Keine Waschschrirte
- Manuelle Isolierung:  
Ca 96 Proben in 15 min

## Konventionell



## Extract-N-Amp

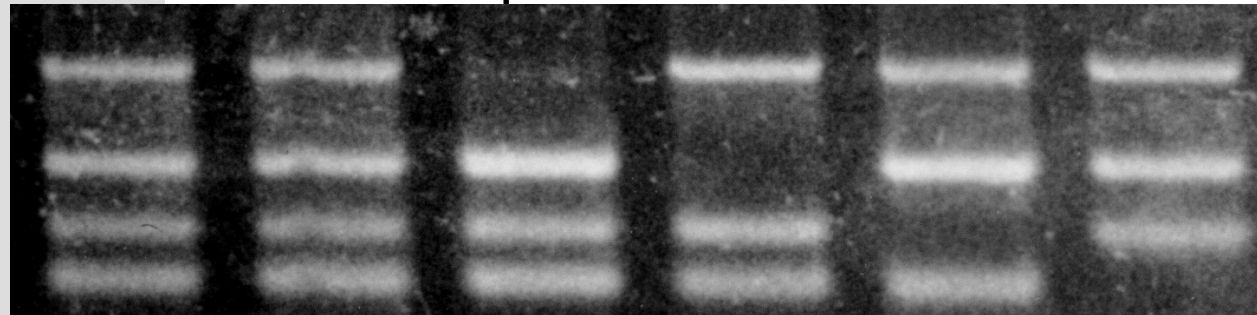
Incubate whole blood sample with Extraction Solution for 10 minutes at room temperature.

Heat at 95 °C for 3 min.  
Add Neutralization Solution.



## PCR-SSP mit Agarose-Elektrophorese

D1            D2    Kp<sup>b-</sup>    Yt<sup>a-</sup>    Lu<sup>b-</sup>    Co<sup>a-</sup>



Kp<sup>b</sup>        (493 bp)

Yt<sup>a</sup>        (303 bp)

Lu<sup>b</sup>        (217 bp)

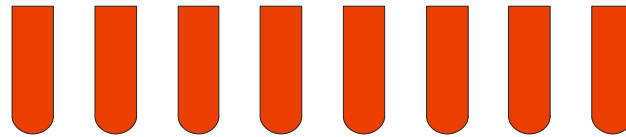
Co<sup>a</sup>        (164 bp)

0 ccddee K neg Spender

Methode	untersucht	wiederholt	Kp <sup>b-</sup>	Co <sup>a-</sup>	Yt <sup>a-</sup>	Lu <sup>b-</sup>
Methode 1	679	151	1	2	1	0*
Methode 2	2.743	416	0	4	9	5
Gesamt	3.422		1	6	10	5

\* Nicht sensitiv für Lu<sup>b</sup>

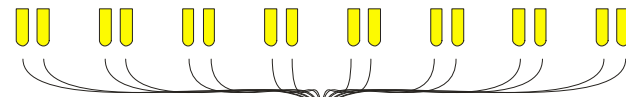
# Gepoolte Kapillarelektrophorese



8 Blutproben



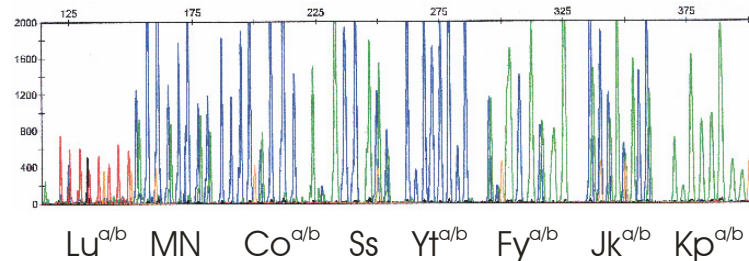
8 DNA-Schnellisolierungen  
(Extract-N-Amp)



2x8 Multiplex  
PCR-Reaktionen



1 Kapillarelektrophorese



1 6x8 Antigenvorhersagen

# ■ Gepoolte Kapillarelektrophorese

Jk(a)	Jk(b)	Fy(a)	Fy(b)	M	N	S	s	Co(a)	Co(b)	Lu(a)	Lu(b)	Yt(a)	Yt(b)	Kp(a)	Kp(b)
POS	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
NEG	POS	LOV	LOV	POS	NEG	LOV	LOV	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS
POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS
POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS
POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
POS	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
POS	POS	???	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS
POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS
POS	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	POS

Automatisierte Vorhersage  
von 16 Antigenen

Identifizierte „seltene“ Spender:

- Kp(b-): 4
- Lu(b-): > 25
- Yt(a-): > 70
- Co(a-): > 90

Spender-Typisierung Teil 1					
	molekularbiologisch		serologisch		
Jk(a)	: pos	6604801	02.10.07		
Jk(b)	: pos	6604801	02.10.07		
Fy(a)	: pos	6604801	02.10.07		
Fy(b)	: neg	6604801	02.10.07		
M	: neg	6604801	02.10.07		
N	: pos	6604801	02.10.07		
S	: neg	6604801	02.10.07		
s	: pos	6604801	02.10.07		
Co(a)	: pos	6604801	02.10.07		
Co(b)	: neg	6604801	02.10.07		
Kp(b)	: neg	6604801	02.10.07		
Kp(b)	: pos	6604801	02.10.07		

## Molekulare Antigenvorhersage

- Gut geeignet:
  - Biallele Systeme mit einem seltenen Allel:  
Co(a), Yt(a), Kp(b), Js(b) Di(b), LW(a), Sc1
  - „Häufige“ Null-Allele:  
Fy(a-b-), Jk(a-b-) in manchen Populationen
- Wenig geeignet:
  - Multiple, seltene Null-Allele  
„Jeder Spender hat sein eigenes Allel“  
0h, Jk(a-b-) in anderen Populationen
- Ungeeignet:
  - Seltene Phänotypen noch nicht aufgeklärter molekulare Struktur  
Vel, Lan, At(a)

## ■ Molekulare Antigenvorhersage

- Bei Bi-Allelen Systemen ist die molekulare Suche der serologischen meist überlegen
  - Multiplex-Systeme erlauben „seltene Phänotypen“ als „Add-on“
  - Somit fast keine inkrementiellen Kosten
  - Keine Abhängigkeit von „guten“ Seren!
- Für die typischen „seltenen Null-Phänotypen“ ist die molekulare Suche unbrauchbar

## Welche Spender sollten gesucht werden?

- Art des seltenen Phänotyps
- Blutgruppenkonstellation
- Spendeverhalten

## Welche Spender sollten gesucht werden?

- Art des seltenen Phänotyps
- Aktuell hoher Bedarf:
  - Bombay (sehr selten)
  - Vel (kaum sinnvolle Seren verfügbar)
  - Kp(b-)
- Noch sinnvoll:
  - Lu(b), Yt(a), Co(a), k  
(oft benötigt, leicht suchbar, schon deutlich verbesserte Versorgungssituation)
- Weniger sinnvoll
  - Adult i (Antikörper selten klinisch relevant)
  - Rhesus-Partial-Deletionen (nur für gleichen Typ relevant)

## Welche Spender sollten gesucht werden?

- Blutgruppenkonstellation:

- ABO:

Blutgruppe	Häufigkeit	geeignet für
AB	5%	5 %
B	10%	15%
A	45%	50 %
0	40%	100 %

## ■ Welche Spender sollten gesucht werden?

- Blutgruppenkonstellation:

- Rhesus:

Blutgruppe	Häufigkeit	geeignet für
CcD.Ee	12%	12 %
CcD.ee	36%	48%
<b>CCD.ee</b>	<b>20%</b>	<b>66 %</b>
ccD.Ee	11%	24 %
ccD.EE	2%	25 %
ccD.ee	2%	61 %
<b>ccddee</b>	<b>16%</b>	<b>78 %</b>

## Welche Spender sollten gesucht werden?

- Blutgruppenkonstellation:

- Rhesus:

Blutgruppe  
CcD.Ee

Versorgung auch mit  
ccddee, CcD.ee, CCD.ee,  
ccD.Ee, ccD.EE, ccD.ee  
ccD.ee, ccddee, CCD.ee

CcD.ee  
CCD.ee

ccD.Ee

ccD.EE, ccddee, ccD.ee

ccD.EE

ccD.ee

ccddee

ccddee

## Welche Spender sollten gesucht werden?

- Art des seltenen Phänotyps
- Spender mit seltenem Phänotyp sollten für die „üblichen“ transfusionsrelevanten Antigene typisiert werden
  - Nur so können Anfragen „Anti-Yt(a)+Anti-Jk(a)“ sinnvoll beantwortet werden

## Welche Spender sollten gesucht werden?

- Spendeverhalten
- Durchschnittliche Spendefrequenz (NSTOB):  
1,8 Spenden / Jahr
- Bis 6 Spenden / Jahr möglich
- Auswahl „frequenter Spender“ steigert Effizienz
  - Selbst bei zufälliger Auswahl sind „frequente Spender“ häufiger, da sie auch häufiger spenden
- Gezieltes Ansprechen von Nicht-Spendern (z.B. Patienten) ist eher wenig effizient

## Welche Spender sollten gesucht werden?

- Spendegruppen
- Erstspender
  - Jeder Spender wird 1x untersucht
  - Viele Erstspender kommen nicht wieder
- Mehrfachspender
  - Kurzzeit-Screening: Dauer < Spendeintervall
  - Langzeit-Screening: Kennzeichnung schon typisierter Spender notwendig

## ■ Wie viele Spender werden benötigt?

- **Kryokonservierung**
  - Wenige Spender ausreichend  
(1 Spender → viele verfügbare Präparate)
  - Beschränkung auf günstige AB0 / Rh-Formel
  - Cave: Stammen alle kryokonservierten Präparate von sehr wenigen Spendern, können zusätzliche Antikörper die Versorgung verunmöglichen
- **Eingeladene Spender**
  - Mobilisationseffizienz ~ 30 - 50% (grobe Schätzung)
    - Abwesenheit, Sperren...
    - „Altspender“ oft schwerer zu motivieren
  - Meist 2 - 4 Präparate erwünscht
  - Mindestens 8 - 12 Spender pro AB0/Rh-Formel

## Wie viele Spender werden benötigt?

- Frische Präparate
  - Idealbedingungen:
    - 6 Spenden / Jahr
    - 4 Wochen Zurückhalten vor Verbrauch
  - 1 Spender → 24 Wochen / Jahr → 0,45 Präparate
  - Um 2 Präparate auf Lager zu haben, benötigt man im Idealfall 5 frequente Spender
  - Unter „realen Bedingungen“ sind wesentlich mehr Spender erforderlich

## Wie viele Spender werden benötigt?

### ■ Aktueller Bestand (5.2.10; 9:00)

Besonderheit	0 Rh-	0 Rh+	A Rh-	A Rh+
k-	3	2	1	1
Lu(b-)		1		3
Kp(b-)		1		
Co(a-)			1	
Yt(a-)			2	1
Vel -	Kein Präparat verfügbar			

## Schlussfolgerung

- Durch gezielte Spendersuche kann die Versorgungssituation verbessert werden
- Für Antigene „mittlerer Frequenz“ wie Yt(a), Lu(b), Co(a) haben molekulare Ansätze zu einer deutlichen Verbesserung geführt
- „Gute“ Seren zur Typisierung werden aber weiterhin dringend benötigt