

Effiziente molekulare Suche von Spendern ohne klinisch relevante Hochfrequenz-Antigene

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

Mittelhoch frequente Antigene

- Frequenz 99% - 99,99%
- Versorgung durch Testen vorhandener Präparate erst im Bedarfsfall nicht möglich
- Prinzipiell ausreichend Antigen-negative Präparate verfügbar
 - Bei Frequenz 1:500 (z.B. k) werden pro Tag in unserem Blutspendedienst ca. 6 Antigen-negative Präparate verarbeitet
- Versorgungsengpass durch unzureichende Spendentypisierung
- Beispiele: Lu^b, Yt^a, Co^a, Kp^b
 - Lu^b, Yt^a, Kp^b gehören zu den am häufigsten in Versorgungsproblemen involvierten Spezifitäten

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

Systematische Spendersuche

- Serologische Suche
 - Etabliert bei „k“ (K2) (selektive Nachtestung von K pos Spendern)
 - Lu^b, Co^a, Kp^b, Yt^a:
 - Antiseren nur begrenzt verfügbar
 - Testung nur im indirekten Coombstest
 - Testaufwand verhindert in der Realität die gezielte Suche
- Molekulare Suche
 - Prinzipiell unabhängig von Seren
 - In Multiplex-Typisierungsstrategien integrierbar
 - Voraussetzungen:
 - Molekulare Ursache geklärt
 - 1 (bis wenige) kausale Allele

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

Typisierungsansatz in Springe

- „Masse statt Klasse“
- Vereinfachtes molekulares Typisierungsverfahren
 - DNA-Isolierung ohne Reinigung mit Extrak-N-Amp
 - Nur 1 SNP pro Antigenvorhersage
 - Kosten vergleichbar – niedriger als bei Serologie
- Serologische Kontrolle Antigen-negativer Spenden

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

Extrakt-N-Amp PCR

- Nur 2 Schritte
 - 1. Blut + Lysis-Lösung
 - 2. Stopp-Lösung
- Keine Zentrifugtion
- Kein Waschschriff
- Keine magnetische Trennung
- 91 Proben von Hand in < 24 Min isoliert
- Nachteil: PCR erfordert speziell adaptiertes Enzym-Mix

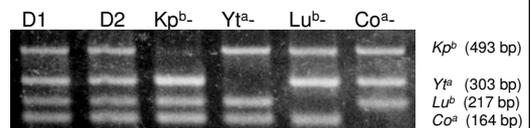
Incubate whole blood sample with
Extraction Solution for 10 minutes at
room temperature.

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



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

Multiplex-PCR mit Agarose-Gel



O ccddee K neg Spender

| Method | getestet | wiederholt | Kp ^{b-} | Co ^{a-} | Yt ^{a-} | Lu ^{b-} |
|----------|----------|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Method 1 | 679 | 151 | 1 | 2 | 1 | 0* |
| Method 2 | 2,743 | 416 | 0 | 4 | 9 | 5 |

* Nicht für Lu^b geeignet

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



Deutsches Rotes Kreuz
BLUTSPENDEDIENST
NSTOB

■ Multiplex-PCR mit Agarose-Gel

- Vorteile:
 - Materialkosten: 1,52 € pro Spender bei 4 Antigenen
 - „hands-on time“ für 91 Spender nur 102 Minuten
 - Keine spezielle technischen Apparate erforderlich
- Nachteile:
 - Hohe Versagerrate > 10%
 - Kaum erweiterbar auf mehr Antigene
 - Diskussionen über Aufwand/Nutzen, da „nur selten gebrauchte Raritäten“ gesucht werden

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

Deutsches Rotes Kreuz
BLUTSPENDEDIENST
NSTOB

■ Gepoolte Kapillarelektrophorese

8 Blutproben
8 DNA-Schnellsolierungen (Extract-N-Amp)
2x8 Multiplex PCR-Reaktionen
1 Kapillarelektrophorese
1x8 Antigenvorhersagen

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

Deutsches Rotes Kreuz
BLUTSPENDEDIENST
NSTOB

■ Gepoolte Kapillarelektrophorese

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

Deutsches Rotes Kreuz
BLUTSPENDEDIENST
NSTOB

■ Gepoolte Kapillarelektrophorese

| Antigen | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lu ^a | POS |
| MN | POS |
| Co ^a | POS |
| Ss | POS |
| Yt ^a | POS |
| Fy ^a | POS |
| JK ^a | POS |
| Kp ^a | POS |

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

Deutsches Rotes Kreuz
BLUTSPENDEDIENST
NSTOB

■ Gepoolte Kapillarelektrophorese

- Vorteile
 - Suche nach seltenen Spendern integriert in „generelle“ systematische Spendertypisierung
 - Kein Zusatzaufwand für Hochfrequenzantigene → keine Diskussionen über Sinn
 - Gefundene Spender weitgehend Antigen-typisiert
 - Geringe Materialkosten (< 2 € pro Spender)
- Nachteile
 - Serologische Kontrolle des Phänotyps notwendig
 - Spender mit „atypischen“ Allelen werden übersehen

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

Deutsches Rotes Kreuz
BLUTSPENDEDIENST
NSTOB

■ Gepoolte Kapillarelektrophorese Ergebnisse

- Untersuchte Antigene: Fy/JK/MNSs/Co/Lu/Yt/Kp
- 16 982 Spender untersucht
- FY/JK-Vorhersage erfolgreich: 14 394 Spendern
- Vollständiger Status: 12 453 Spendern
- Vorhergesagte seltene Phänotypen
 - Kp^a: 2 Spender
 - Lu^b: 12 Spender
 - Yt^a: 48 Spender (+ 3 Fehlvorhersagen)
 - Co^a: 44 Spender

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



■ Gepoolte Kapillarelektrophorese Übersehene Spender?

■ Vorhersage heterozygot:

| Phänotyp | Vorhersage: Heterozygot | Nachgetestet | Antigen-negativ |
|----------|-------------------------|--------------|-----------------|
| Kp(b-) | 269 | 116 | 1 |
| Lu(b-) | 1109 | 434 | 2 |
| Co(a-) | 1513 | 641 | 1 |
| Yt(a-) | 1378 | - | - |

■ Vorhersage fraglich

| Phänotyp | Vorhersage: fraglich | Nachgetestet | Antigen-negativ |
|----------|----------------------|--------------|-----------------|
| Kp(b-) | 0 | - | - |
| Lu(b-) | 16 | 7 | 1 |
| Co(a-) | 3 | 1 | 0 |
| Yt(a-) | 63 | 51 | 3 |

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

■ Gepoolte Kapillarelektrophorese Übersehene Spender?

■ > 90% aller Co(a-)-Spender werden gefunden

■ Für die Antigene Kp^b und Lu^b kann sich die serologische Kontrolle fraglicher/heterozygoter Spender lohnen

■ Cave: Nicht alle „zusätzlich gefundenen“ Spender sind wirklich Antigen-negativ:

- Molekulare Struktur z.T. Missense-Mutationen
- Antigenkontrolle Adsorption/Elution z.T. positiv

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

■ Zusammenfassung

- Molekulares Screenen ermöglicht Suche in großen Spenderpopulationen
- Gepoolte Kapillarelektrophorese:
Bei Multiplexansatz minimale inkrementielle Kosten
- Kostengünstige molekulare Typisierungsverfahren erlauben Einsatz außerhalb wissenschaftlicher Studien
- Die Mehrzahl der (wirklich) Antigen-negativen Spender wird gefunden

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

