

Deutsches Rotes Kreuz  
BLUTSPENDEDIENST  
NSTOB

## 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

Deutsches Rotes Kreuz  
BLUTSPENDEDIENST  
NSTOB

### ■ 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<sup>b</sup>, Yt<sup>a</sup>, Co<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup>
  - Lu<sup>b</sup>, Yt<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup> gehören zu den am häufigsten in Versorgungsproblemen involvierten Spezifitäten

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

Deutsches Rotes Kreuz  
BLUTSPENDEDIENST  
NSTOB

### ■ Systematische Spendersuche

- Serologische Suche
  - Etabliert bei „k“ (K2) (selektive Nachtestung von K pos Spendern)
  - Lu<sup>b</sup>, Co<sup>a</sup>, Kp<sup>b</sup>, Yt<sup>a</sup>:
    - 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

Deutsches Rotes Kreuz  
BLUTSPENDEDIENST  
NSTOB

### ■ 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


Deutsches Rotes Kreuz  
BLUTSPENDEDIENST  
NSTOB

### ■ Extrak-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.

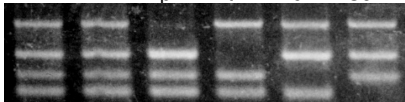


Blutspendedienst der Landesverbände des DRK  
Niedersachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen,  
Oldenburg und Bremen gGmbH

Deutsches Rotes Kreuz  
BLUTSPENDEDIENST  
NSTOB

### ■ Multiplex-PCR mit Agarose-Gel

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)

O ccddee K neg Spender

Method	getestet	wiederholt	Kp <sup>b-</sup>	Co <sup>a-</sup>	Yt <sup>a-</sup>	Lu <sup>b-</sup>
Method 1	679	151	1	2	1	0*
Method 2	2,743	416	0	4	9	5

\* Nicht für Lu<sup>b</sup> 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  
16x8 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 <sup>a</sup>	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
MN	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Co <sup>a</sup>	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Ss	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Yt <sup>a</sup>	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Fy <sup>a</sup>	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
JK <sup>a</sup>	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
Kp <sup>a</sup>	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	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<sup>a</sup>: 2 Spender
  - Lu<sup>b</sup>: 12 Spender
  - Yt<sup>a</sup>: 48 Spender (+ 3 Fehlvorhersagen)
  - Co<sup>a</sup>: 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<sup>b</sup> und Lu<sup>b</sup> 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

