

Diagnostik bei Patienten mit Antikörpern gegen hochfrequente Antigene

Axel Seltsam

■ Reaktionsmuster



Antikörper (AK) gegen hochfrequente Antigene (AG)

- Schwierig zu identifizieren
- Hohes Risiko, zusätzliche Allo-AK zu übersehen
- Verzögerung in der Diagnostik führt zu Verzögerungen in der Blutversorgung immunisierter Patienten

Differentialdiagnose

- Unspezifische Reaktionen
 - Zellstabilisator
 - Gelmatrix
 - Medikamente

- Auto-AK

- Gemisch von mehreren Allo-AK-Spezifitäten

Differentialdiagnose

- Klinische Relevanz
 - Orientierung an AK-Spezifität
 - Konsequenz für Versorgung

- “Versteckte” weitere Allo-AK-Spezifitäten
 - in 20% der Fälle
 - Konsequenz für Versorgung

Diagnostik

➤ AK-Suche

Routinelabor

➤ AK-Differenzierung (ICT)

➤ AK-Differenzierung (2. ICT)

➤ AK-Differenzierung (Enzymtest)

Speziallabor

➤ Titerbestimmung

➤ Inhibitionstest mit Plasma

➤ Einsatz seltener Blutproben

Referenzlabor

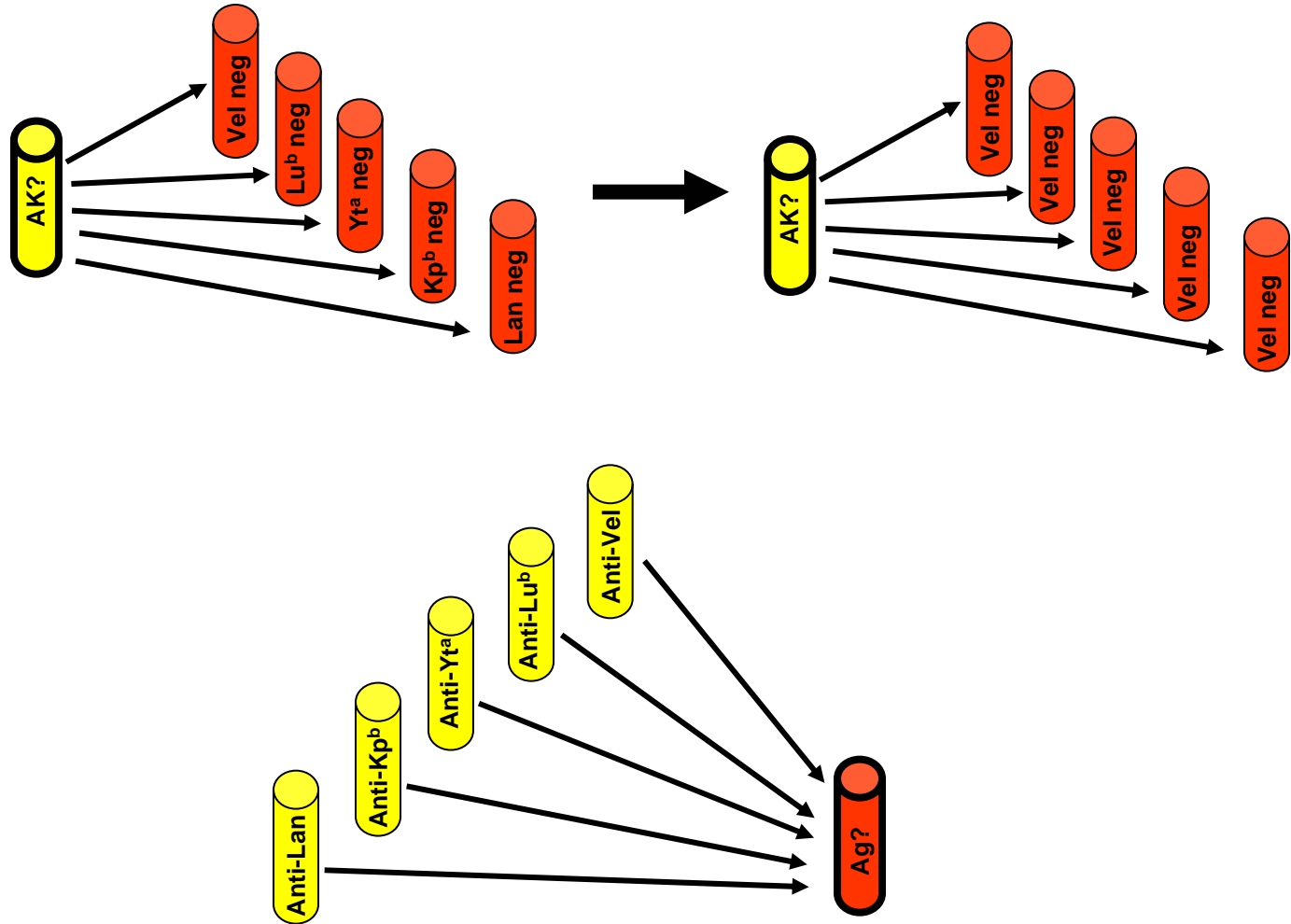
➤ Genotypisierung

Einsatz seltener Blutproben

- Antigen-negative Erythrozyten
 - Panel unterschiedlicher Phänotypen
 - Cave ABO-BG, am besten O
 - Menge/Qualität

- Antiseren mit AK gegen hochfr. AG
 - Panel unterschiedlicher Spezifitäten
 - Cave ABO-BG, am besten AB
 - Menge/Qualität

■ Einsatz seltener Blutproben



Beispiel

Set ID-DiaPanel: 45160.85.x
 (Japan: 4516.85.xx)

ID-DiaPanel P: 45170.85.x
 (Japan: 4517.85.xx)

Ch.-B: 06170.85.x -
 lot no.: 06270.85.x
 no. lot: 05360.85.x -
 05460.85.x

Verw. bis: 2001.01.08
 Exp. date: 2001.01.08
 Exp. le: (Japan:08.01.01)

Antigen-Table Antikörper-Identifizierung Antigen-Table Antibody identification Table d'antigènes Identification d'anticorps V.I.P. Software Ch.-B./lot no./no. lot: P73

Patientennummer	Rh-hr						Kell						Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luth.		Xg		Bemerkungen Remarks Remarques	Resultat/Result/ LISS/Coombs Enzym Enzyme	
	D	C	E	c	e	C ^w	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	Pi	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	Xg ^b			
M600110	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	1	##	##
M601373	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	2	##	##
601070	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	3	##	##
M200707	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	4	##	##
M201357	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	5	##	##
M100012	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	+	+	6	##	##
M100698	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	7	##	##
M300605	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	8	##	##
M100776	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0	9	##	##
M101348	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	10	##	##
M900825	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	11	##	##
Eigenkontrolle negative control																														

Die Rückseite.
 reverse.
 les autres voir au verso.

Die farbig gekennzeichneten Antigene können im Enzymtest unterdrückt oder zerstört werden.
 Shaded columns indicate antigens destroyed or diminished in reactivity by enzyme treatment.
 La réaction peut être inhibée avec les anticorps des systèmes MNSs, Duffy et Xg, si les hématies sont traitées aux enzymes protéolytiques.

Blutgruppe + Antigene Bloodgroup + antigens Groupe de sang + antigènes	Interpretation Interpretation Interprétation	Untersuchungsdatum Examined on Date de l'analyse
--	--	--

Antigenaustestung																	
Patientenname: v																	
Geburtsdatum: 30.1.34 Blutgruppe: <u>0 CCD. re k-</u> Datum: 29.12.00 el. Angaben																	
	Einf.-Nr.		Serum 1			Serum 2				Einf.-Nr.		Serum 1			Serum 2		
	Ser1	Ser2	Pat.	p K	n K	Pat.	p K	n K		Ser1	Ser2	Pat.	p K	n K	Pat.	p K	n K
Cw									Di(a)			Ø					
K			Ø						Di(b)								
k			Ø						Co(a)			+					
Kp(a)			Ø						Co(b)								
Kp(b)			Ø						Wr(a)			Ø					
Js(a)			Ø						Do(b)			±					
Js(b)			Ø						Vel			+/					
Lu(a)			Ø						Lan			+/					
Lu(b)			+/						IGc			±					
M			+						I								
N			Ø						H			+					
S			+						LW(a)								
s			+														
Vw									Jr(a)			Ø					
P1									Cr			+					
Tja									Yt(a)			+					
P			+						Lu6								
Le(a)			Ø						Lu8			+					
Le(b)			+						JMH								
Fy(a)			+						Ch(a)								
Fy(b)			+						Rg(a)								
Jk(a)			+						Kn(a)								
Jk(b)			+/						McC(a)								
Xg ^a			Ø						Yk(a)								
v									Cs(a)								



E3/00 E12/97
 0 Wdk. pos. # #
 # # 100. # #

Beispiel

DiaMed-ID Micro Typing System		Set ID-DiaPanel: 45161.05.x <small>(Japan: 4516.05.x)</small>	ID-DiaPanel P: 45171.05.x <small>(Japan: 4517.05.x)</small>	Ch.-B: 06171.05.x - lot no.: 06271.05.x no. lot: 05361.05.x - 05461.05.x	Verw. bis: 2002.03.04 Exp. date: (Japan:04.29.02) Exp. lot:	ID-DiaPanel ID-DiaPanel-P																							
Antigen-Tabelle Antikörper-Identifizierung		Antigen-Table Antibody identification		Table d'antigènes Identification d'anticorps		V.I.P. Software Ch.-B./lot no./no. lot: P07																							
Titel	Spamer/ Date/ Donor	A-B				EeI				JuI-		KdI		Lwis		P		MNS		Dith		Xg	Spez. Antigen Special spe: Antigènes sp. I	Fas./In./Result/Result	Bemerkungen/ Remarks Remarques				
		D	D	E	C	C _H	E	E ₁	E ₂	E ₃	Js	Fe	Je	Je	JE	L ₁	L ₂	F ₁	F ₂	N	D					I	h	Xg	USZ/ Quante
1	C ⁺ CD.00	R:R:	M601064	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+			1	H	0	
2	CCD.00	R:R:	M602003	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+			2	+	0	
3	ccD.EE	R:R:	M700598	+	0	+	+	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+			3	+	0	
4	Ccddee	r:r	M202220	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	Co ⁺	4	+	0		
5	ccddEe	r:r	M200373	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0		5	+	0		
6	ccddeee	rr	M100215	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+		6	+	0		
7	ccdddee	rr	M100579	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0		7	+	0		
8	ccD.00	R:0	M302240	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0		8	+	0		
9	ccdddee	rr	M102237	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+		9	+	0		
10	ccdddee	rr	M100377	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+	nt	Mit ⁺	10	+	0		
11	CCD.00	R:r	M400512	+	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	0	0	+		11	+	0		

Zusätzliche Antigene siehe Rückseite.

Additional antigens see reverse.

Pour antigènes supplémentaires voir au verso.

Die folgenden angegebenen Antigene, die in der E-Zeile nicht angegeben sind, sind nicht vorhanden.
 The following indicated antigens, which are not listed in the table, are not present.
 Les antigènes indiqués ci-dessous, qui ne sont pas indiqués dans le tableau, ne sont pas présents.
 L'ensemble peut être consulté sur le site du Groupe des centres SIDA, 11, rue Xg, à Lausanne, tél. 021 222 200, fax 021 222 200-4004, e-mail:...

0 = schwach reaktiv
 + = stark reaktiv
 nt = nicht messbar
 - = nicht reaktiv

Name/nama/nom _____ _____ _____	Blutgruppe - Antigene Bloodgroup + antigens Groupe de sang - antigènes	Interpretation Interpretation Interprétation	Untersuchungsdatum Examined on Date de l'analyse
---------------------------------------	--	--	--

HTLA-Antikörper

Spezifitäten:

anti-Rg^a (Rogers)

anti-Ch^a (Chido)

anti-Kn^a (Knops)

anti-McC^a (McCoy)

anti- Kn^a/ McC^a

anti-Yk^a (York)

anti-Cs^a (Cost)

anti-JMH (John Milton Hagen)



Chido/Rogers-Blutgruppensystem



Knops-Blutgruppensystem

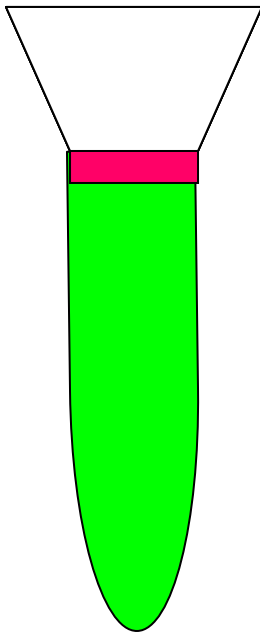
HTLA-Antikörper

- HTLA = High titre, low avidity
- Fraglich positive bis schwach positive Reaktionen im ICT
- Verlängerter Antikörpertiter, z.B.:

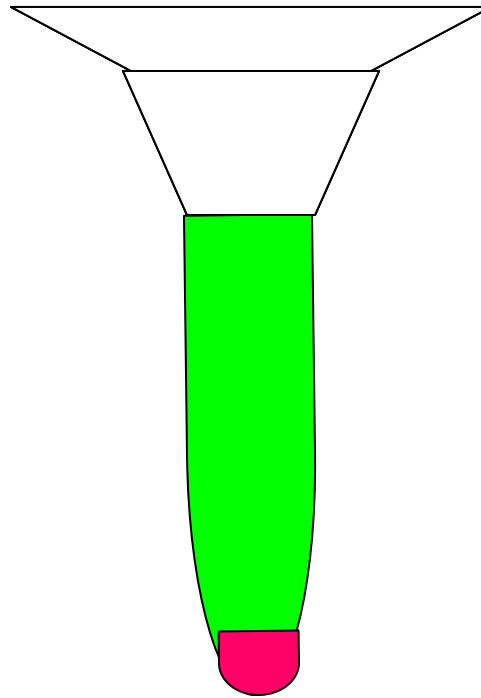
1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
2+	2+	2+	1,5+	1,5+	1,0+	0,5+	neg
- Absorptions-Elutionsversuch negativ
- I.d.R. Enzymsensitivität
- keine klinische Relevanz

anti-Ch^a und anti-Rg^a

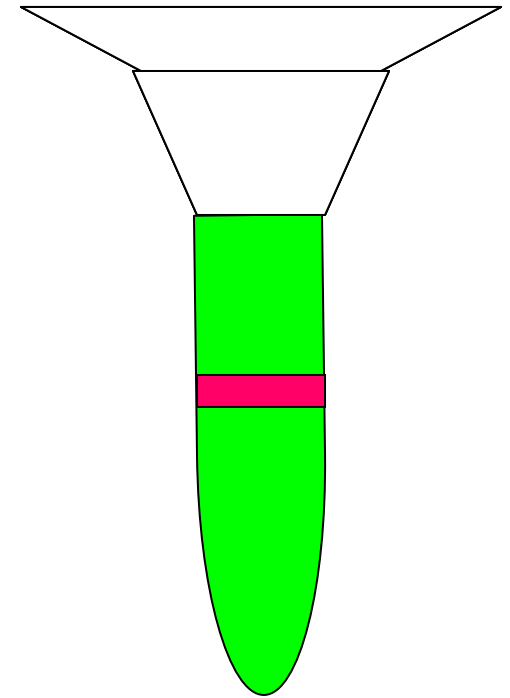
ICT



Hemmtest



NaCl-Ko



Differentialdiagnose panreaktiver AK

Alle Ansätze mit Testzellen pos.

Eigenansatz pos.

Reaktionen homogen
pos.

Reaktionen unterschiedlich
stark pos.

1. V.a. Wärmeautoantikörper
2. V.a. unspezifische Reaktionen
(z.B. Zusatzstoffe in Kartensystem
oder in Resuspensionslösungen)
3. V.a. Alloantikörper gegen
hochfrequentes Antigen mit
zusätzlich pos. DCT (z.B.
Trafu)

1. V.a. Wärmeautoantikörper
(evtl. mit Spezifität, z.B.
Anti-e)
2. V.a. Alloantikörper gegen
hochfrequentes Antigen mit
zusätzlich pos. DCT (z.B.
Trafu)
3. V.a. Mehrfachalloantikörper
mit zusätzlich pos. DCT
(z.B. Trafu)

Eigenansatz neg.

Reaktionen homogen
pos.

Reaktionen unterschiedlich
stark pos.

1. V.a. Alloantikörper gegen
hochfrequentes Antigen
2. V.a. unspezifische Reaktionen
(z.B. Konservierungsstoffe in
Testerys)

1. V.a. Alloantikörper gegen
hochfrequentes Antigen
2. V.a. Mehrfachalloantikörper

Weiterführende Techniken: monospezifischer DCT, Eluat, Enzymansatz, Anamnese, Absorption-Elution, Seltene Testzellen und Seren

Häufigkeit (Zeitraum von 3 a)

Spezifität	N	%
Ch(a)/Rg(a)	51	39
Kn(a)/McC(a)/Yk(a)	13	10
Vel	14	11
Yt(a)	13	10
Lu(b)	13	10
Kp(b), k	5	4
JMH	3	2
Ge2	2	2
Sc1	1	1
LW(a)	1	1
Cr	1	1
Andere	16	11
gesamt	133	100

Rot = klin. irrel.

■ Häufigkeit transfusionsmed. rel AK gegen hochfr. AG (Zeitraum von 30 Mo)

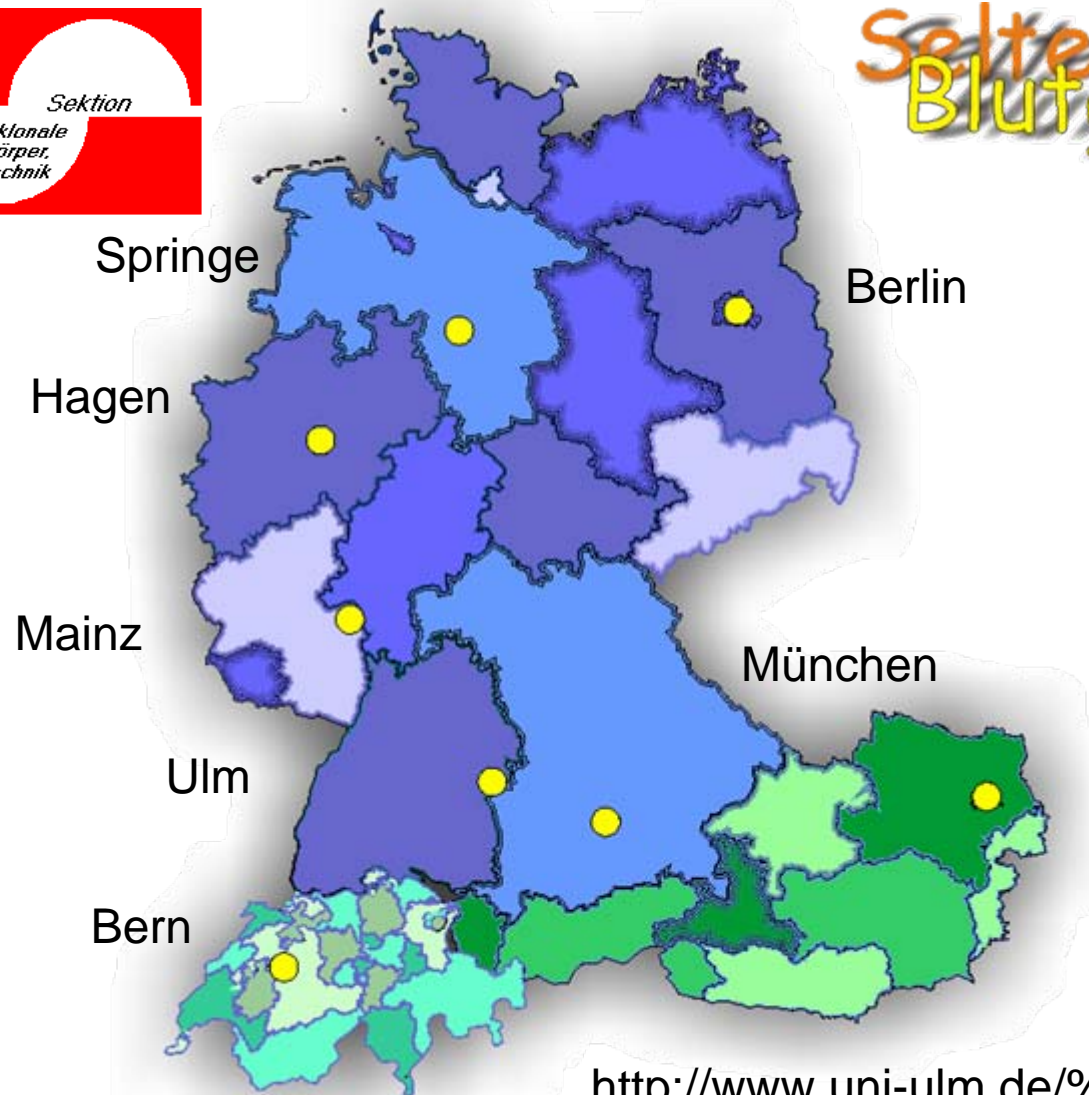
Antibody specificity	Number of cases observed
anti-Kp ^b	11
anti-Vel	10
anti-Lu ^b	8
anti-Yt ^a	8
anti-Co ^a	3
anti-H	3
anti-AnWj	2
anti-Kx	2
anti-MAM	2
anti-Fy ^{ab}	1
anti-Ku	1
anti-Lan	1
anti-Lu8	1
anti-LW ^a	1
anti-Rh17	1
anti-Tj ^a (PP1Pk)	1
Total	56

} 66 %

Nationales Austauschnetz



Seltene
Blutgruppen



Internationales Austauschnetz

SCARF

Serum, Cells And Rare Fluid
Exchange



Home
SCARF Exchange
General Public
Members
Contacts
About

The SCARF Exchange is an international group of individuals interested in human blood groups. This group includes scientists with an emphasis in transfusion medicine. They have agreed to exchange, among the membership, samples that have rare blood group substances useful for the investigation of complex serological problems. In addition, these samples have been used to elucidate the function of proteins carrying blood group factors.

New shorter link for your convenience! <http://also.as/scarfex>

<http://jove.prohosting.com/~scarfex/>

AK-Nachweissystem auf der Basis rekombinanter BG-Proteine

- schnelle und einfache und direkte Identifikation von AK
gegen hochfr. AG
- in Routinelaboratorien durchführbar

Ziel/Herausforderungen

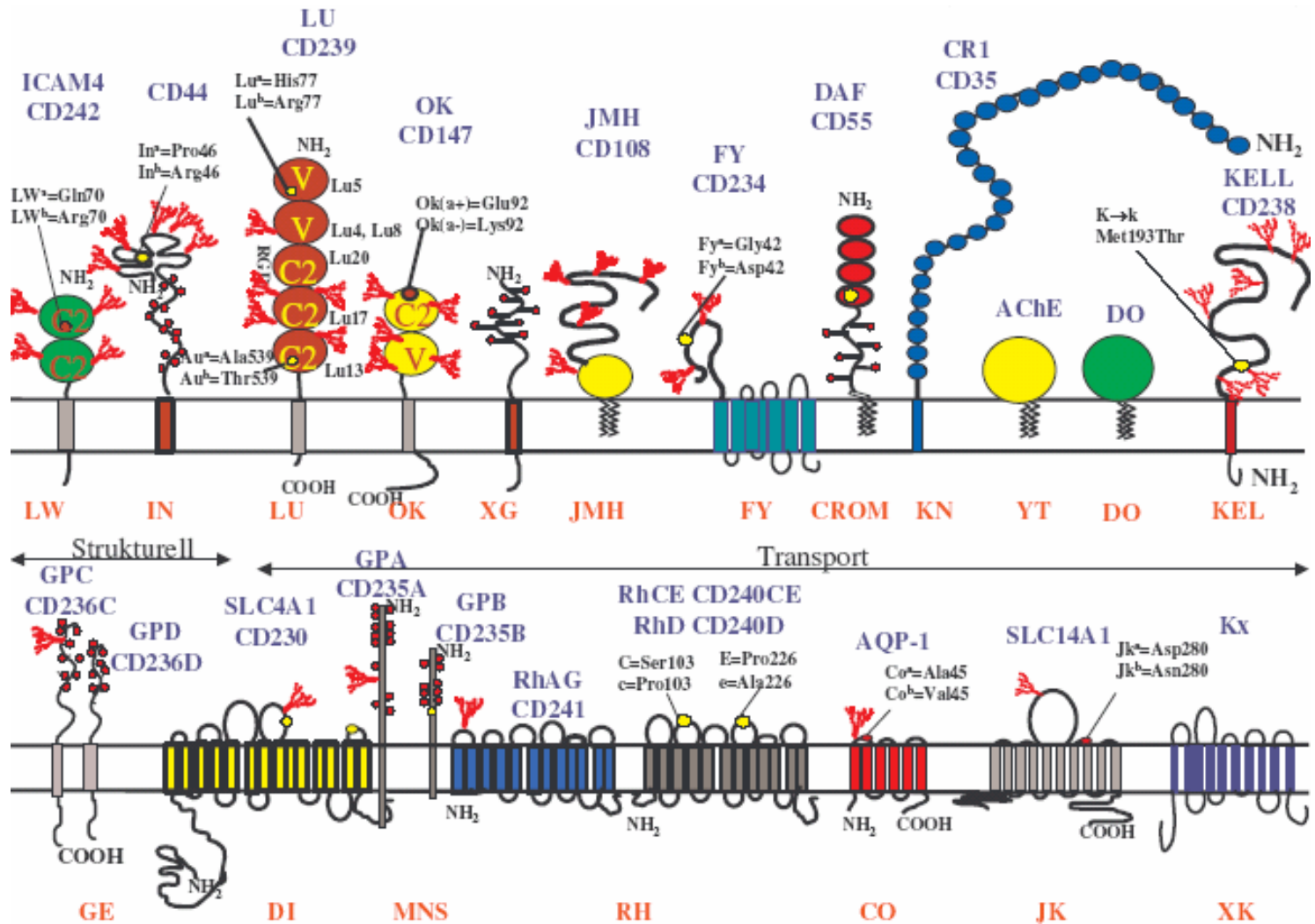
➤ **Vorteil:**

- Direkter einschrittiger Nachweis in einem „one well-one reaction“-System
- Verzicht auf potentiell infektiöse Testerythrozyten mit kurzer Haltbarkeit

➤ **Herausforderungen:**

- Expression unterschiedlicher Typen von Membranproteinen
- Eukaryote vs. prokaryote Expression

Blutgruppenproteine



Prinzip eines „one well-one antigen“ Reaktionssystems

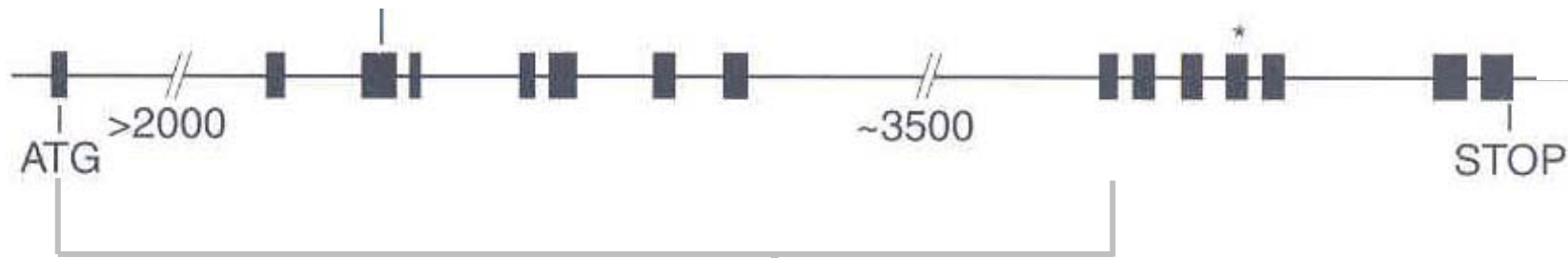
anti-c + anti-Lu^b

D	C	c	E	e	K	k	Fy ^a
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	M	N	S	s	Le ^a
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Le ^b	Kp ^a	Js ^a	Lu ^a	Kp ^b	Js ^b	Lu ^b	Xg ^a
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>
Vel	Lan	Yt ^a	Ch ^a	Rg ^a	JMH	Cr ^a	Kn ^a
<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

= negative reaction

= positive reaction

■ Expressionstrategie



Expressionsvektoren für C-terminal
trunkiertes Protein mit V5/His-tag

Stabile Transfektion in Zelllinie

Transformation von E. coli

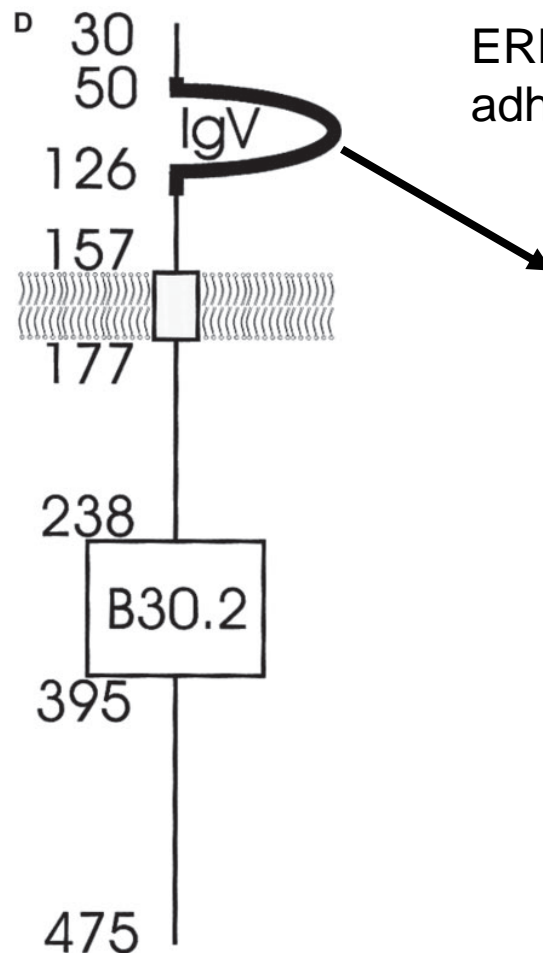
Proteinisolation und -aufreinigung

Antikörpernachweis

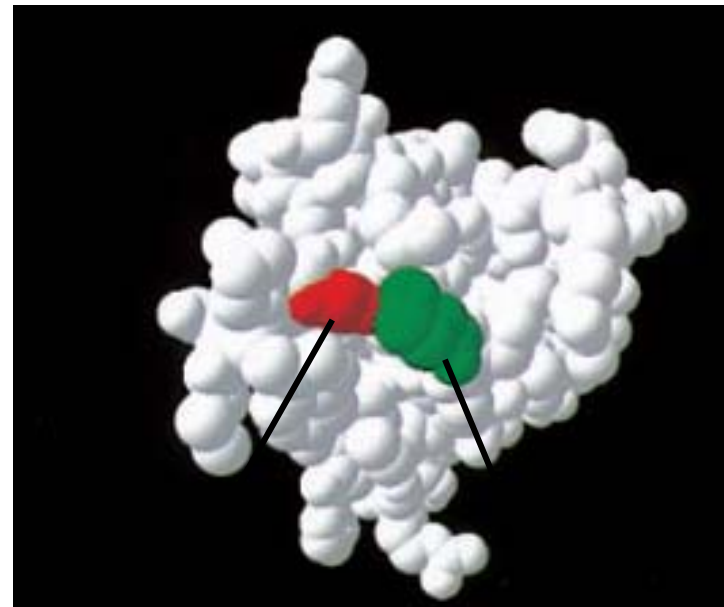
Rückfaltung

■ Scianna (ERMAP)-Protein

60-68 kD Glykoprotein



ERMAP = erythroid transmembrane
adhesion/receptor protein

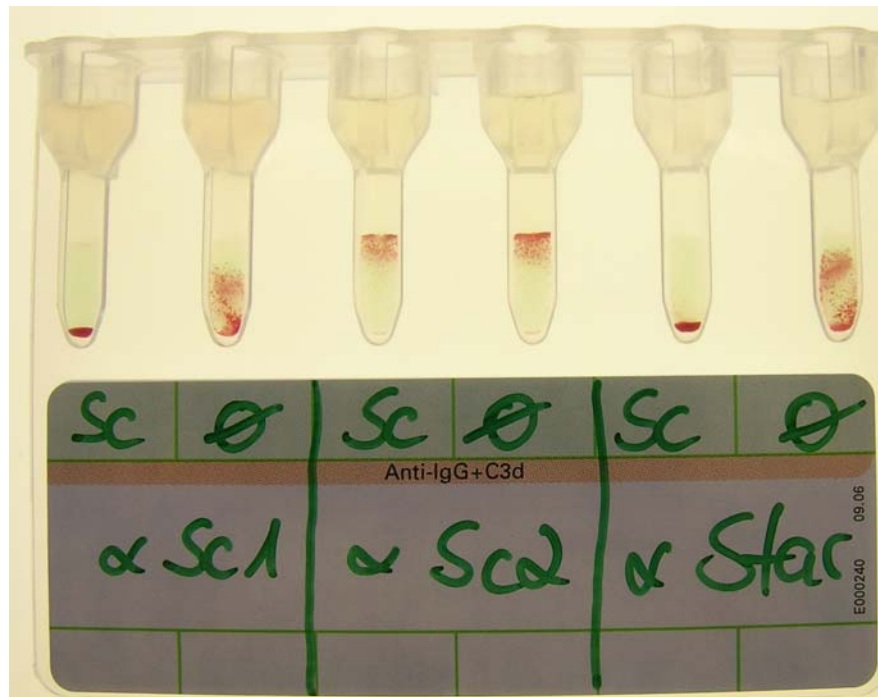


Sc1/2: Gly57Arg

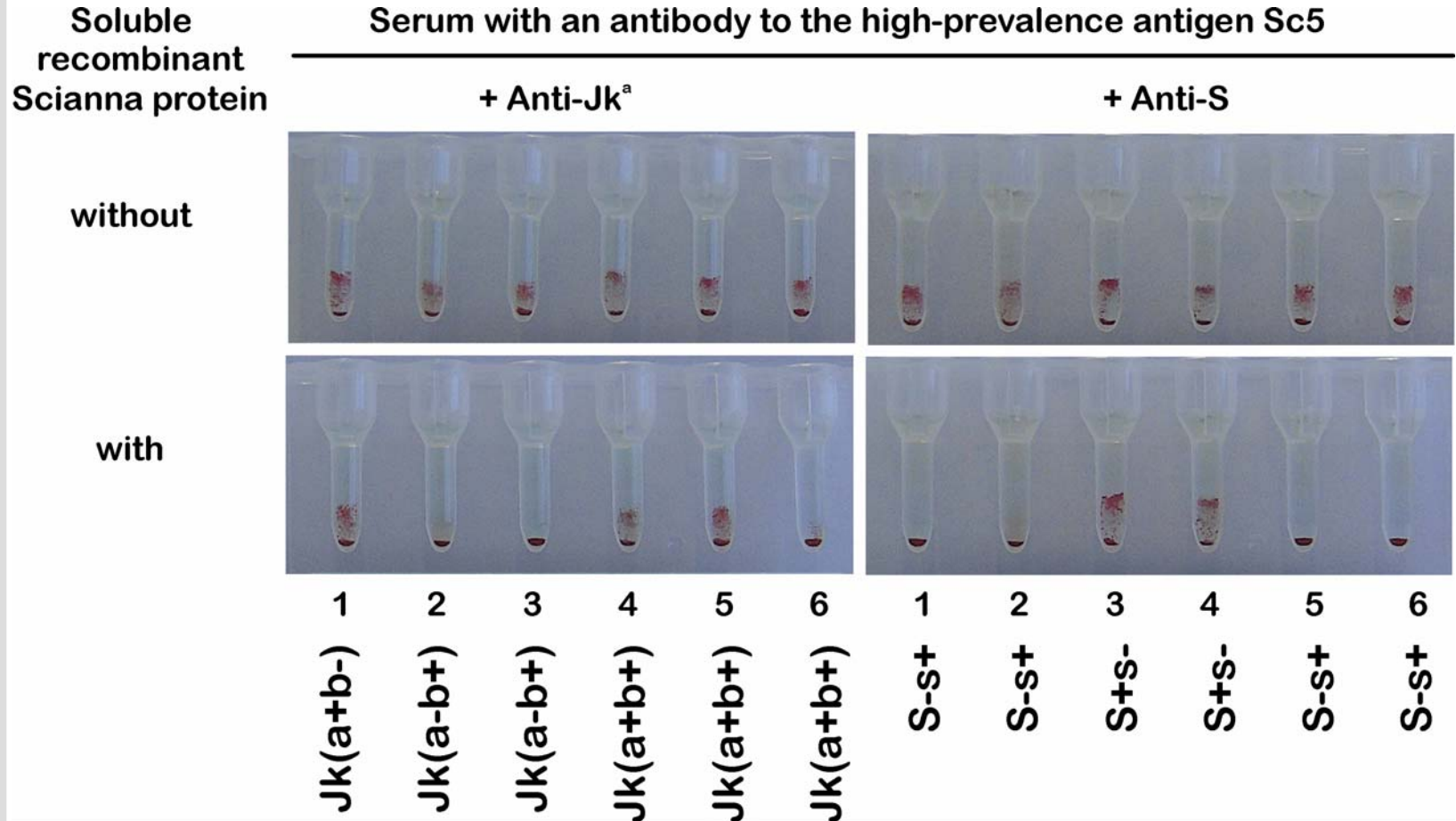
Rd: Pro60Ala

Inhibitionstest

Rekombinantes Protein: Sc 1,-2,3,-4,5,6,7



Nachweis zusätzlicher Allo-AK



Nachweis zusätzlicher Allo-AK mit einem Proteincocktail

High yield cocktail
 Scianna + JMH
 recombinant proteins

Anti-Sc1

Anti-JMH

control

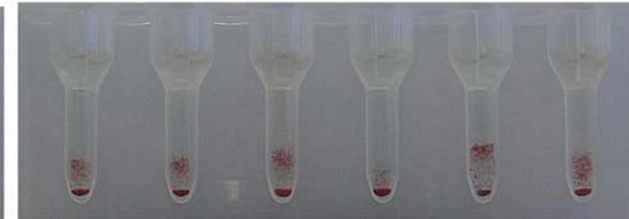
+ Anti-Fy^a

control

+ Anti-Fy^a

without

with



1
Fy(a-b+)

2
Fy(a+b-)

3
Fy(a-b+)

1
Fy(a-b+)

2
Fy(a+b-)

3
Fy(a-b+)

1
Fy(a-b+)

2
Fy(a+b-)

3
Fy(a-b+)

1
Fy(a-b+)

2
Fy(a+b-)

3
Fy(a-b+)

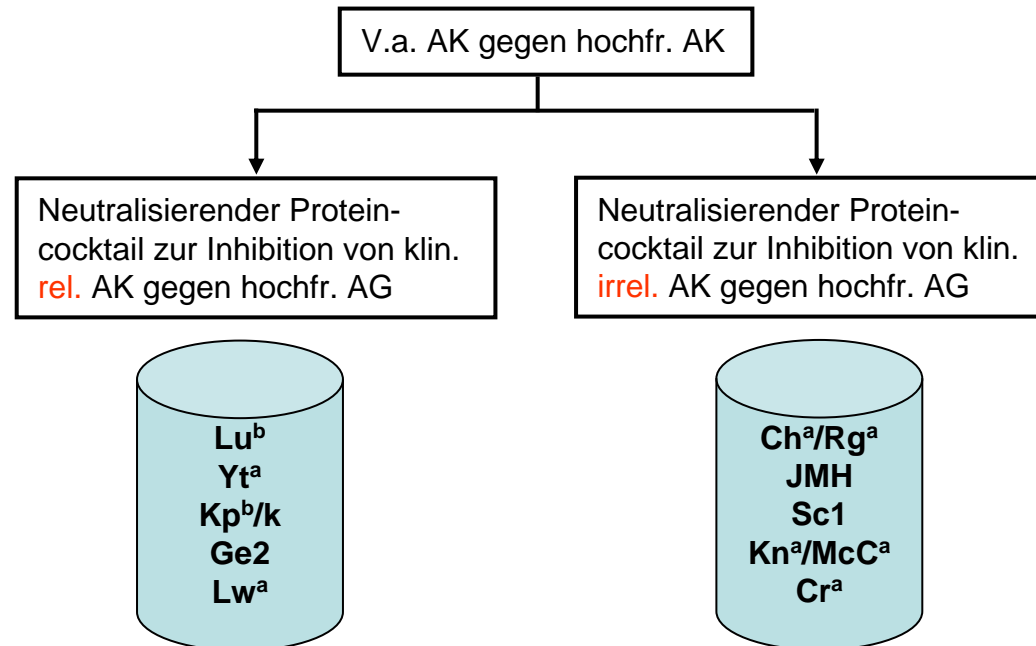
Potenzial der rekombinanten BG-Proteine

- Ersatz/Ergänzung der auf seltene Blutproben beruhenden Diagnostik von AK gegen hochfr. AG

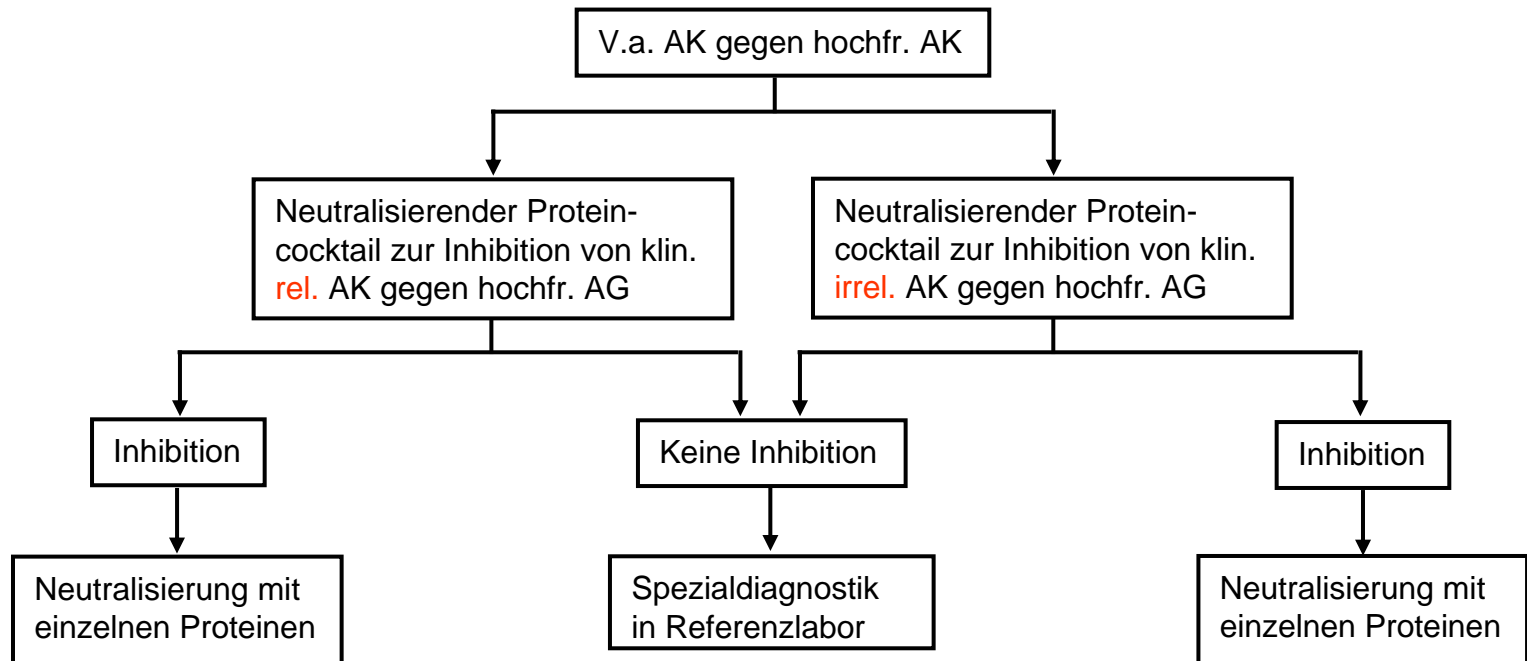
- Spezialdiagnostik in Routinelaboratorien
 - leicht in Diagnostik integrierbar
 - Langzeitstabilität der rekombinanten Proteine

- Verbesserung der Versorgung von Patienten mit schwierig abzuklärenden AK

Zukünftige Diagnostik



Zukünftige Diagnostik



■ Proteincocktail für klin. irrel. AK

