

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen
Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. E. Seifried

Prävalenz und Eigenschaften natürlich präformierter Antikörpern gegen
S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Lisa Stempniewski

aus Karlsruhe

Frankfurt am Main, 2018

Dekan: Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. Erhard Seifried
Korreferentin: Prof. Dr. Daniela Krause

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	8
1.1 Antigen-Antikörperreaktion und Hämagglutination	8
1.2 Einteilung erythrozytärer Antikörper	13
1.3 Hämolyse	15
1.4 Transfusionsbedingte Risiken	17
1.4.1. Infektionsbedingte Risiken	17
1.4.2. Nicht infektionsbedingte Risiken	20
1.5 Pathogenreduktionskonzept	21
1.6 Pathogenreduktion mit S-303	22
1.7 Klinische Studien mit S-303-behandelten Erythrozytenkonzentraten und das Auftreten von Immunreaktionen	24
1.8 Fragestellung	27
2. Material und Methodik	29
2.1 Material	29
2.1.1 Material zur Herstellung von Testzellen aus einem Erythrozytenkonzentrat mit 300 ml	29
2.1.2 Material zum Auftauen der gefrorenen Testzellen	30
2.1.3 Material für das Screening der Patientenproben auf Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten	30
2.1.4 Material zur Charakterisierung der Antikörper	31
2.1.5 Geräte	32
2.1.6 Software	32
2.2 Methoden	33

2.2.1	Antihumanglobulintest.....	33
2.2.2	Untersuchungstechniken	34
2.2.3	Die Testzellen	36
2.2.4	Das Screening der Patientenproben	40
2.2.5	Ausschlusskriterien	41
2.2.6	Spezifität der Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten	42
2.2.7	Charakterisierung der Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten	43
2.2.8	Enzymbehandlung der Testzellen.....	47
2.2.9	Aufbewahrung der Patientenproben	47
2.2.10	Datenerfassung	47
2.2.11	Statistik.....	48
2.2.12	Genehmigung der Ethik-Kommission	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Deskriptive Beschreibung der Patienten.....	49
3.2	Die Auswertung der Screening Untersuchung.....	50
3.3	Prävalenz der Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten.....	53
3.4	Nachweis eines Antikörpers gegen S-303-behandelte Erythrozyten mit Erst- und Zweitgenerationszelle	55
3.5	Charakterisierung der Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten .	56
3.6	Ergebnisse mit enzymbehandelten Testzellen	60
4	Diskussion	64
4.1	Prävalenz der Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten	64
4.2	Spezifität der Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten	64
4.3	Klinische Bedeutung der Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten.....	65
4.4	Die Testerythrozyten	66
4.5	Das Testverfahren.....	66

4.6	Statistische Auswertung zur Testung mit Erst- und Zweitgenerationszelle..	70
4.7	Ursache der Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten.....	70
4.8	Enzymbehandlung der Testzellen mit Bromelin	71
4.9	Sonstiges.....	73
4.10	Schlussfolgerung.....	74
3	Zusammenfassung	76
3.1	Summary	78
4	Literaturverzeichnis	80
5	Anhang.....	88
5.1	Weitere Methoden	88
5.1.1	Die Herstellung von Testzellen mit unterschiedlicher GSH-Konzentration	88
5.1.2	Säureelution.....	88
5.2	Weitere Abbildungen	89
6	Eigene Veröffentlichungen	91
7	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9	Schriftliche Erklärung.....	92

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: IgG und IgM Antikörper ¹⁸	8
Abbildung 2: Hämagglutination ¹	10
Abbildung 3: Das Zetapotential ¹	11
Abbildung 4: Einteilung erythrozytärer Antikörper.....	14
Abbildung 5: Mechanismen extravasaler Hämolyse ²	16
Abbildung 6: Der Wirkmechanismus von S-303 über Quervernetzung der DNA Stränge ³	23
Abbildung 7: direkter und indirekter Antihumanglobulintest ⁴	33
Abbildung 8: Agglutinationsreaktion in der Gelkarte. -/0 = negatives Ergebnis, + - ++++ = positives Ergebnis, eingeteilt anhand der Reaktionsstärke von 1 (+) bis 4 (++++)(Fa. Bio-Rad)	34
Abbildung 9: S-303 und das Nebenprodukt S-300 (Fa. Cerus)	38
Abbildung 10: Herstellungsprozess der Testzellen (Fa. Cerus).....	39
Abbildung 11: Momentaufnahme einer Geldrollenformation mit sieben Erythrozyten ⁵	42
Abbildung 12: Verteilung der Geschlechter	49
Abbildung 13: Altersverteilung	50
Abbildung 14: Anzahl der Testungen.....	51
Abbildung 15: Auswertung der Screeninguntersuchung	52
Abbildung 16: Probe 2 AKS mit Testzelle 7 High, Low und Control.....	54
Abbildung 17: Probe 4, Titer mit Testzelle 7 High.....	56
Abbildung 18: Nachweis eines IgG2- oder IgG4-Antikörpers bei Patientenprobe 3..	56
Abbildung 19: Probe 4, AKS mit Testzelle (Unit) 7 High (H), Low (L), Control (K).....	89
Abbildung 20: Probe 10, Testzelle (Unit) 7 High, Dissoziation mit S-300	90
Abbildung 21: Probe 4, Testzelle (Unit) 2, AKS mit aufgetauten und anschließend enzymbehandelten Testzellen	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Blutgruppensysteme und die zugehörigen Blutgruppenantigene ⁶	9
Tabelle 2: Transfusionsvermittelte Erkrankungen ⁷	17
Tabelle 3: Einige Infektionsrisiken durch Transfusion von Blutprodukten ⁷⁻¹⁰	18
Tabelle 4: Eigenschaften von S-303-behandelten EK im Vergleich zu konventionellen EK ¹¹⁻¹⁴	24
Tabelle 5: Phänotypen der 11 Testzellen	36
Tabelle 6: Endkonzentration von S-303 und GSH je nach Herstellungsverfahren ¹⁴	37
Tabelle 7: Ergebnisse der Patienten mit Antikörpern gegen Pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate in der Screeninguntersuchung	53
Tabelle 8: Beschreibung der Patientenproben, die einen Antikörper gegen Pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate haben.....	53
Tabelle 9: Eigenschaften der Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate.....	57
Tabelle 10: AKS Probe 4 ohne/mit RESt®, Temperaturreaktivität anhand der Reaktionsstärke	58
Tabelle 11: Dissoziation mit S-300	59
Tabelle 12: AKS mit aufgetauten und anschließend enzymbehandelten Testzellen	60
Tabelle 13: Ergebnisse des AKS mit Bromelinbehandelten und anschließend pathogenreduzierten Erythrozyten.....	62
Tabelle 14: AKS mit S-303 pathogenreduzierten und anschließend Bromelinbehandelten Testzellen	63

Abkürzungsverzeichnis

AB0	AB0-Blutgruppensystem
AIHA	Autoimmunhämolytische Anämie
AK	Antikörper
AKS	Antikörpersuchtest
Anti-Acridin	Antikörper gegen Acridin
Anti-IgG	Antihumanglobulinserum
Anti-A	Antikörper gegen das Blutgruppenantigen A
Anti-B	Antikörper gegen das Blutgruppenantigen B
Anti-HBc	Antikörper gegen das Hepatitis B-Core-Antigen
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ATP	Adenosin-Triphosphorsäure
BSD	Blutspendedienst
C, c	erythrozytäre Antigene des Rh-Blutgruppensystems
C3c	Komplementfaktor C3c
C3d	Komplementfaktor C3d
Control	Kontrolltestzellen
51Cr	Chromium 51
Cw	erythrozytäres Antigen des Rh-Blutgruppensystems
D	erythrozytäres Antigen des Rh-Blutgruppensystems
DAT	direkter Antihumanglobulintest
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
DTT	Dithiothreitol
E, e	erythrozytäre Antigene des Rh-Blutgruppensystems
EK	Erythrozytenkonzentrat
Fy(a), Fy(b)	erythrozytäre Antigene des Duffy-Blutgruppensystems
Ggf.	gegebenenfalls
GSH	Glutathion
Hb	Hämoglobin
HbsAg	HBV surface antigen = HBV-Oberflächenantigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HFA	Hochfrequente Antigene
High	Testzellen erster Generation

HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IAT	indirekter Antihumanglobulintest
Ig A/D/E/G/M	Immunglobulin der Klasse A/D/E/G/M
IgG1/2/3/4	Immunglobulin G Subklasse 1, 2, 3, 4
Jk(a), Jk(b)	erythrozytäre Antigene des Kidd-Blutgruppensystems
ISBT	International Society of Blood Transfusion
K, k	erythrozytäres Antigen des Kell-Blutgruppensystems
Kp(a)	erythrozytäres Antigen des Kell-Blutgruppensystems
LISS	low ionic strength solution
Le(a), Le(b)	erythrozytäres Antigen des Lewis-Blutgruppensystems
Low	Testzellen zweiter Generation
Lu(a)	Lutheran(a) erythrozytäres Antigen
M	erythrozytäres Antigen des MNS-Blutgruppensystems
Me	erythrozytäres Antigen des MNS-Blutgruppensystems
MNS	MNS-Blutgruppensystem
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline
PR	pathogenreduziert
RBC	Rote Blutkörperchen
RESt®	Kaninchenerythrozytenstroma
Rh	Rhesus-Blutgruppensystem
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
S, s	erythrozytäre Antigene des MNS-Blutgruppensystems
S-300	nicht reaktives Abbauprodukt von S-303
S-303	Amustaline Dihydrochloride
TA-GVHD	transfusion associated Graft versus Host disease
TR	Transfusionsreaktion
TRALI	transfusion related acute lung injury
UV	Ultraviolettstrahlung
vCJD	Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
Wr(a)	Wright(a) erythrozytäres Antigen des Diego-Blutgruppensystems

1 Einleitung

1.1 Antigen-Antikörperreaktion und Hämagglutination

Ein Antigen ist eine Substanz, die parenteral in den Körper injiziert wurde. Diese Substanz kann vom Empfänger als fremd erkannt werden und eine Immunreaktion mit Antikörperbildung auslösen. Erythrozytenantigene sind genetisch kodierte Strukturen auf der Oberfläche roter Blutkörperchen. Es sind über 300 Erythrozytenantigene bekannt, welche anhand ihrer Genlokalisierung in 36 verschiedenen Blutgruppensysteme eingeteilt werden (siehe Tabelle 1). Bei der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten (EK) gelangen fremde Erythrozyten in den Organismus des Empfängers. Weisen diese fremde Oberflächenmerkmale auf, können Antikörper (AK) dagegen gebildet werden. ^{6,15(p8)}

Antikörper sind Immunglobuline (Ig). Anhand ihres Aufbaus werden fünf Hauptklassen unterschieden: IgG, IgA, IgD, IgE und IgM. ¹⁶

In der Immunhämatologie spielen vor allem IgG und IgM eine Rolle. IgM-Antikörper haben ihr Reaktionsoptimum überwiegend bei 4°C, IgG-Antikörper bei 37°C. ^{16,17}

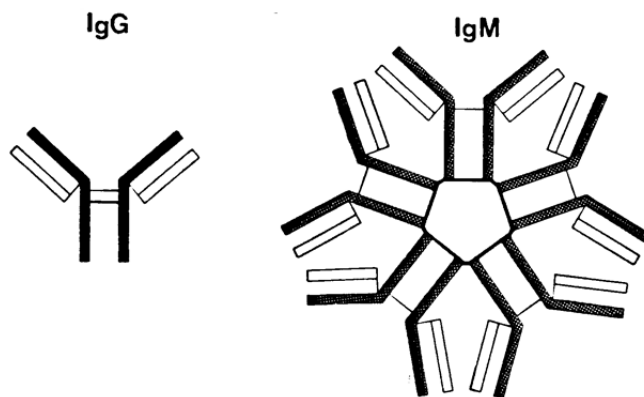


Abbildung 1: IgG und IgM Antikörper ¹⁸

Tabelle 1: Blutgruppensysteme und die zugehörigen Blutgruppenantigene ⁶

Blutgruppensysteme			Anzahl Antigene
Nr.	Abkürzung	Name	
1	AB0	AB0	4
2	MNS	MNS	48
3	P	P	4
4	Rh	Rhesus	61
5	Lu	Lutheran	23
6	Kel	Kell	38
7	Le	Lewis	6
8	Fy	Duffy	6
9	Jk	Kidd	3
10	Di	Diego	22
11	Yt	Cartwright	2
12	Xg	Xg	2
13	Sc	Scianna	7
14	Do	Dombrock	8
15	Co	Colton	4
16	Lw	Landst./ Wiener	3
17	Ch/Rg	Chido/ Rodgers	9
18	H	Hh	1
19	Xk	Kx	1
20	Ge	Gerbich	12
21	Crom	Cromer	18
22	Knops	Knops	9
23	In	Indian	4
24	Ok	Ok	3
25	Raph	Raph	1
26	Jmh	John Milton Hagen	6
27	I	I	1
28	Glob	Globoside	2
29	Gil	Gill	1
30	<i>RHAG</i>	Rh-associated glycoprotein	4
31	FORS	FORS	1
32	Jr	Jr	1
33	LAN	Langereis	1
34	Vel	VEL	1
35	CD59	CD59	1
36	AUG	AUG	2

Bindet ein Antikörper sein Antigen, kommt es zu einer nicht sichtbaren Antigen-Antikörperreaktion. Bindet ein Antikörper mehrere Zellen mit dem gleichen Antigen, kommt es zur sichtbaren Agglutination (siehe Abbildung 2).¹

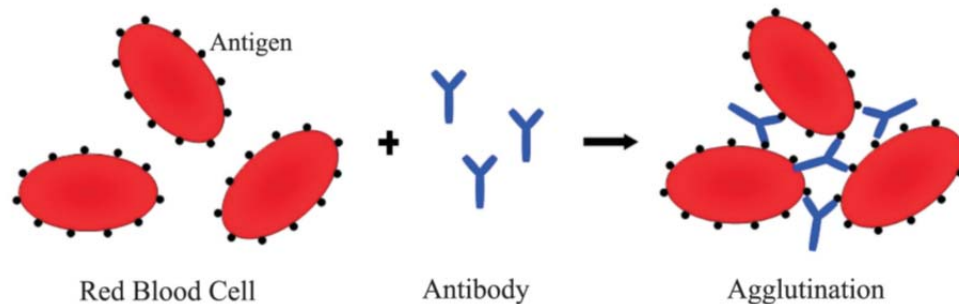


Abbildung 2: Hämagglutination¹

Die Agglutination wird von zwei Faktoren beeinflusst. Die Anziehungskräfte (Van der Waals Kräfte) zwischen Antigen und Antikörper und die Abstoßungskraft zwischen zwei Erythrozyten auf Grund des Zetapotentials.¹⁹

Auf der äußeren Oberfläche der roten Blutkörperchen befindet sich Sialsäure, dessen Carboxylgruppe vor allem für die negative Oberflächenladung der Erythrozyten verantwortlich ist.²⁰

Positiv geladene Moleküle werden angezogen und es bildet sich eine Ionenwolke um die Erythrozyten herum, auch Compact Layer genannt. Diese positive Ionenwolke zieht wiederum Ionen aus dem Medium, in welchem sich die Erythrozyten befinden, an. Es bildet sich das Diffuse Layer. Zwischen Compact Layer und Diffuse Layer besteht das Zetapotential (siehe Abbildung 3).¹

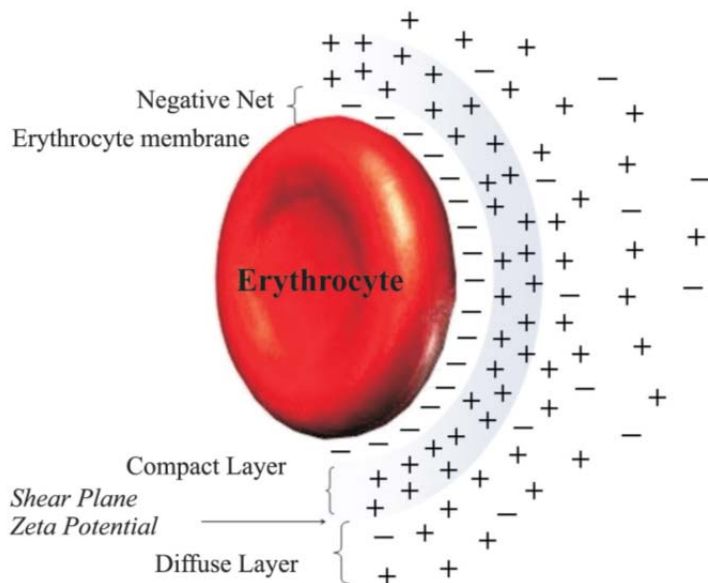


Abbildung 3: Das Zetapotential¹

Die Ladung der roten Blutkörperchen sorgt dafür, dass zwischen zwei Erythrozyten immer ein Mindestabstand eingehalten wird. IgM-Antikörper können diesen Mindestabstand überbrücken. Eine Antigen-Antikörperreaktion führt somit zu einer sichtbaren Agglutination. IgG-Antikörper können diesen Mindestabstand in der Regel nicht überbrücken, eine Antigen-Antikörper-Reaktion führt hier nicht zu einer sofortigen Agglutination. Durch Zugabe von Antihumanglobulinserum (Anti-IgG) können Erythrozyten, an die bereits ein IgG-Antikörper gebunden ist, miteinander vernetzt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Abstand zwischen den Erythrozyten zu verkleinern. Dies gelingt zum Beispiel durch Reduktion des Zetapotentials, durch Verstärkung der Van der Waals Kräfte mittels Dehydratation oder durch physikalische Maßnahmen wie Zentrifugation, um die Zellen räumlich näher zusammen zu bringen.^{21, 22}

Durch Enzymbehandlung der Erythrozyten wird deren Oberfläche verändert. In der Immunhämatologie werden vor allem Bromelin und Papain eingesetzt, aber auch Neuraminidase, Chymotrypsin, Dispase, Ficin, Pesin und Trypsin. Peptidasen spalten die Peptidbindungen zwischen Aminosäuren in Proteinen. Man unterscheidet zwischen Exo- und Endopeptidasen. Exopeptidasen greifen am Ende der Polypeptidketten an, der freien Amino- oder Carboxylgruppe. Endopeptidasen katalysieren die Hydrolyse zwischen der Amino- und Carboxylgruppe zweier Aminosäuren im inneren einer Polypeptidkette. Anhand von ihrem reakt-

tiven Zentrum werden Endopeptidasen in Serine-, Cysteine-, Aspartic- und Metalloendopeptidasen eingeteilt. ¹

Durch proteolytische Abspaltung der Sialsäure von der Oberfläche der roten Blutkörperchen kann die negative Oberflächenladung und somit auch das Zetapotential reduziert werden. Neuraminidase spaltet fast 95-100% der Sialsäuren ab und reduziert dadurch das Zetapotential um ca. 90%. ^{1,20}

Des Weiteren können Glykoproteine an der Oberfläche der Erythrozyten proteolytisch abgespalten werden. Die sterische Behinderung zwischen den roten Blutkörperchen wird geringer und sie liegen räumlich näher beieinander. Zudem sind Antigene besser für Antikörper zugänglich. ¹

In der vorliegenden Arbeit wird Bromelin zur Modifikation der Erythrozytenoberfläche eingesetzt.

Bromelin ist eine Cystein-Endopeptidase und wird aus der Ananaspflanze gewonnen. In der Blutgruppenserologie wird es unter anderem verwendet, um Antikörper gegen Antigene des ABO-, Rhesus (Rh)-, P-, MNS-, Kell-, Duffy-, Kidd-, Lewis- sowie Vel-Blutgruppensystems nachzuweisen. Darüber hinaus können an Erythrozyten gebundene inkomplette Antikörper bestimmt werden. ^{1,23}

Eine weitere Möglichkeit, das Zetapotential zu verringern, besteht darin, das Medium in dem sich die Erythrozyten befinden, zu verändern. Durch die Zugabe von negativ geladenen Makromolekülen wie Albumin werden positiv geladene Moleküle abgefangen und die positive Ionenwolke um den Erythrozyten wird gleichzeitig verkleinert. Durch den Einsatz von low ionic strength solution (LISS) wird die Agglutination beschleunigt und kann auch noch bei niedrigem Antikörpertiter nachgewiesen werden. LISS ist eine elektrolytarme Lösung, bestehend aus 0,17M Kochsalzlösung, 0,15M Phosphatpuffer und 0,3M Natrium Glycinate. Durch den niedrigen Anteil von Natrium und Chlorid wird die Ionenwolke um den Erythrozyten verringert. Antigen und Antikörper treffen somit häufiger aufeinander, wodurch die Antigen-Antikörperreaktion beschleunigt wird. Wegen der geringeren Ionenkonzentration wird auch das Zetapotential verkleinert, der Min-

destabstand zwischen zwei Erythrozyten verkleinert und die Agglutination schlussendlich verstärkt.^{1, 24,25}

1.2. Einteilung erythrozytärer Antikörper

In der Immunhämatologie werden Antikörper unterschieden, die sich gegen fremde Blutgruppenmerkmale (Alloantikörper) und gegen körpereigene Blutgruppenmerkmale (Autoantikörper) richten. Es wird zwischen Wärmeautoantikörpern, überwiegend von IgG-Typ und Kälteautoantikörpern, mehrheitlich von IgM-Typ unterschieden. Durch Autoantikörper können autoimmunhämolytische Anämien ausgelöst werden. Alloantikörper werden eingeteilt in regulären und irregulären Alloantikörper. Reguläre Alloantikörper sind Antikörper, welche regulär vorhanden sind, z.B. Antikörper gegen das Blutgruppenantigen A und B (Anti-A und Anti-B) im ABO Blutgruppensystem. Irreguläre Alloantikörper entstehen individuell unterschiedlich. Anhand vom Bildungsmechanismus wird zwischen immunen und natürlichen Alloantikörpern unterschieden (siehe Abbildung 4).

^{17,26}

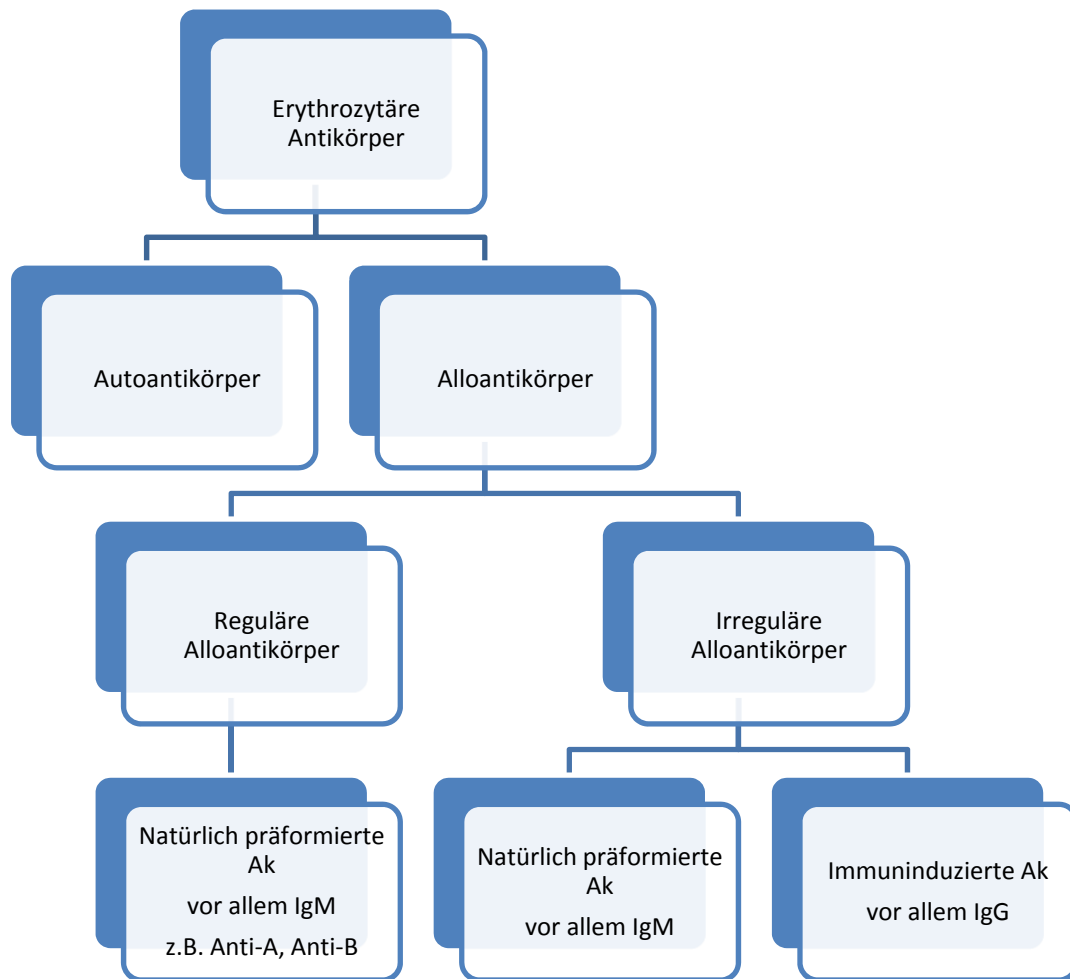


Abbildung 4: Einteilung erythrozytärer Antikörper

Immune Alloantikörpern werden nach Kontakt mit fremden Blutgruppenantigenen, z.B. im Rahmen einer Transfusion, induziert. Es handelt sich um IgG-Antikörper. Die Zellen des Immunsystems erkennen die fremden Erythrozyten und bauen diese ab. Die Antigene werden auf ihrer Oberfläche präsentiert. Über T-Helferzellen erfolgt die Aktivierung von B-Zellen, welche nun in großen Mengen Antikörper gegen dieses bestimmte Antigen produzieren. ^{16,17,27}

Medikamente können eine immunogene Wirkung haben. Penicillin, Piperacillin und Oxaliplatin können mit Oberflächenstrukturen roter Blutkörperchen reagieren und zugleich das Immunsystem aktivieren, sodass Medikamentenspezifische Antikörper gebildet werden. Eine Antigen-Antikörperreaktion kann stattfinden. Eine solche Reaktion zwischen medikamentenbedingten Antikörpern und sensibilisierten Erythrozyten kann zu einer immunhämolytischen Anämie führen. ^{28, 29}

Natürliche Alloantikörper werden von bestimmten B-Zellen, den B-1 Zellen, vermutlich ohne T-Zell-Aktivierung gebildet. Die Bildung wird nicht durch Kontakt mit fremden Antigenen initialisiert. Der genaue Mechanismus ist noch weitgehend unerforscht. Natürliche Alloantikörper sind meist vom IgM-Typ, können aber auch vom IgG- oder IgA-Typ sein. Es handelt sich um polyreaktive Antikörper, d.h. sie reagieren mit mehreren verschiedenen Antigenen. Die Antigene müssen nicht unbedingt eine strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. Die Affinität polyreaktive Antikörper variiert stark je nach Antigen. Insgesamt haben polyreaktive Antikörper aber eine geringere Affinität als monoreaktive Antikörper. Grundsätzlich spielen natürlich präformierte IgM-Antikörper eine wichtige Rolle im (a) angeborenen Immunsystem, in (b) der Clearance apoptotischer Zellen, (c) Homöostase der B-Zellen, (d) Entzündungsreaktionen, (e) Atherosklerose und (f) Autoimmunerkrankungen. Die Rolle von natürlich präformierten IgG- und IgA-Antikörpern ist noch weitestgehend unerforscht. Natürlich präformierte IgG-Antikörper erkennen Pathogene und leiten deren Phagozytose ein. Zudem können Sie die Produktion von Cytokinen beeinflussen und damit auch Entzündungsreaktionen. Bis jetzt ist noch nicht eindeutig nachgewiesen, ob natürlich präformierter IgG-Antikörper auch eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen, Entzündlichen Erkrankungen und der Zell-Homöostase spielen. Natürlich präformierte IgA Antikörper spielen z.B. eine Rolle in der Immunabwehr von pathogenen Mikroorganismen auf Schleimhäuten.^{17,30-32}

1.3. Hämolysen

Der Abbau von Erythrozyten wird als Hämolysen bezeichnet. Rote Blutkörperchen zirkulieren 100-120 Tage im Blut bis Sie physiologisch abgebaut werden. Dabei werden unter physiologischen Bedingungen jeden Tag 2×10^{11} Erythrozyten (ca. 40 ml) entfernt.³³

Der vorzeitige, gesteigerte Abbau von roten Blutkörperchen kann mehrere Ursachen haben. Bei der immunvermittelten Hämolysen wird zwischen einem intravasalen und extravasalem Mechanismus unterschieden. Die intravasale Hämolysen ist eine komplementvermittelte Lyse. Erythrozyten, auf deren Oberfläche IgM-Antikörper gebunden sind, aktivieren die Komplementkaskade. Die Zellmembran wird zerstört und es kommt zur intravasalen Hämolysen. Die extravasale Lyse wird durch Zellen des Immunsystems, überwiegend Makrophagen

und Monozyten, vermittelt, die auf der Oberfläche von Erythrozyten gebundene IgG-Antikörper und Komplementfaktoren erkennen. Sie findet im Reticuloendothelialen System vorwiegend in Leber und Milz statt. Makrophagen können mit einem speziellen Rezeptor die Fc-Region von IgG-Antikörpern, die auf der Oberfläche von Erythrozyten gebunden sind, erkennen und binden. Makrophagen können den Erythrozyt komplett oder teilweise phagozytieren. Zudem können sie den Erythrozyt auch ohne Phagozytose über eine Antikörper abhängige Zelluläre Toxizität zerstören (siehe Abbildung 5).^{2,34,35}

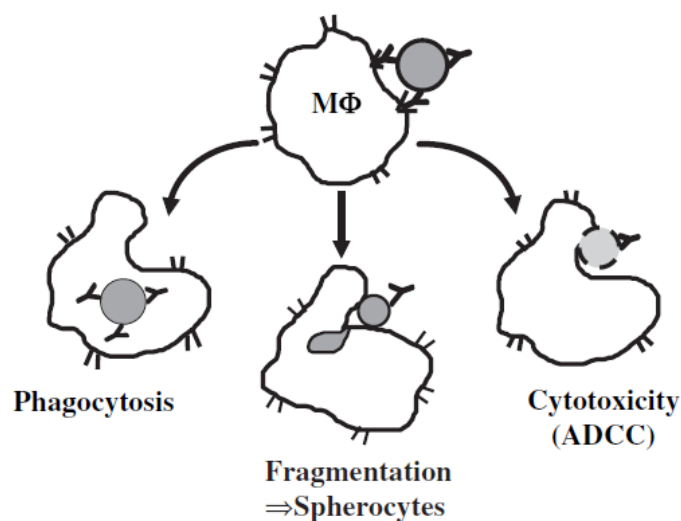


Abbildung 5: Mechanismen extravasaler Hämolyse²

An der extravasalen Lyse sind jedoch nicht nur Makrophagen beteiligt. In Vitro konnte auch die Interaktion von Lymphozyten, dendritischen Zellen und Granulozyten mit sensibilisierten roten Blutkörperchen nachgewiesen werden. Antikörpereigenschaften, Quantität der gebundenen Antikörper, Komplementfaktoren und Aktivität der Makrophagen sind weitere Faktoren, die die Interaktion zwischen Erythrozyt und Immunzelle beeinflussen. Antikörperklasse und -subklasse, Spezifität, Temperaturreaktivität, Titer, Komplementaktivierung sowie Affinität des Antikörpers helfen die Tendenz zur Hämolyse zu beurteilen. Anhand des Kohlenhydratanteils der Fc-Domäne werden IgG-Antikörper in verschiedene Subklassen von 1-4 (IgG1-4) eingeteilt. Sowohl Komplementsystem als auch Makrophagen werden durch IgG4-Antikörper nicht aktiviert, sodass sie klinisch nicht relevant sind. IgG2-Antikörper aktivieren das Komplementsystem schwach. Makrophagen binden nur an einen bestimmter Fc-Rezeptor-Allotyp,

welcher bei 30% Kaukasiern und 85% Asiaten exprimiert wird. Erythrozyten, an dessen Oberfläche IgG2-Antikörper gebunden sind, können somit sowohl eine normale als auch eine verkürzte Lebenszeit haben. IgG1 und IgG3 können sowohl Makrophagen als auch das Komplementsystem aktivieren und verursachen in der Folge eine Lyse der Erythrozyten. Antikörper verschiedener Subklassen können die gleiche Spezifität haben. ^{2,34,36,37}

1.4. Transfusionsbedingte Risiken

1.4.1. Infektionsbedingte Risiken

Mit der Transfusion von Blutprodukten können Viren, Bakterien, Parasiten und andere Pathogene vom Blutspender auf den Blutempfänger übertragen werden (siehe Tabelle 2). Einige dieser Erkrankungen können fatale Folgen für den Empfänger haben. Deshalb ist es sehr wichtig, infektiöse Blutprodukte zu erkennen. Hepatitis B kann bei bis zu 5% der akut Infizierten chronifizieren. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen kann die Rate aber auf bis zu 95% ansteigen. ⁷

Tabelle 2: Transfusionsvermittelte Erkrankungen⁷

Viral	Parasitär	Bakteriell	Prionen
Hepatitis B	Malaria	Treponema pallidum (Syphilis)	v Creutzfeldt-Jacob Erkrankung
Hepatitis C	Chagas Erkrankung	Yersinia enterocolitica	
Humane Immundefizienz-Virus (HIV)	Babesiosis	Borrelia burgdorferi	
Humanes T-lymphotropes Virus (HTLV) I/II	Toxoplasmose	Ehrlichiosis	
Westnilvirus und andere Arboviren	Leishmaniose		
Cytomegalievirus			
Epstein-Barr Virus			
Kaposi Sarkom (Humanes Herpesvirus Typ 8)			
Parvovirus B19			

Die Transfusionssicherheit konnte in den letzten Jahren deutlich verbessert werden, sodass heute für viele bekannte Erreger ein relativ geringeres Risiko für transfusionsassoziierte Infektionen besteht (siehe Tabelle 3). Anhand von Fragebögen, z.B. über Auslandsaufenthalte, Sexualkontakte und i.v. Drogenabusus können Spender mit Risikofaktoren für übertragbare Erkrankungen frühzeitig erkannt werden. Zudem wurden und werden immer sensiblere und sensitivere Testverfahren entwickelt. Antikörpertestungen sind meist erst bei fortgeschrittener Infektion erfolgreich. Mit Verfahren zur Antigenerkennung oder zum Nachweis von Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) kann der Erreger auch schon in frühen Infektionsstadien identifiziert werden. Um das diagnostische Fenster möglichst gering zu halten, kommen meist mehrere Testverfahren gleichzeitig zum Einsatz. Beim Hepatitis B Screening wird das Oberflächenantigen (HbsAg) des Hepatitis-B-Virus (HBV), die Antikörper gegen das Hepatitis B-Core-Antigen (Anti-HBc) und HBV-DNA bestimmt, um eine möglichst hohe Sensitivität zu gewährleisten.^{7-9,38}

Tabelle 3: Einige Infektionsrisiken durch Transfusion von Blutprodukten⁷⁻¹⁰

Erkrankung	Testungen	Verbleibendes Risiko einer transfusionsvermittelten Infektion
Hepatitis B	HBsAg, Anti-HBc, HBV-DNA	1:500 000
Hepatitis C	Risikofaktoren, Antikörper gegen das Hepatitis-C-Virus (HCV), HCV Ribonukleinsäure	1:1 000 000
HIV	Risikofaktoren, Anti-HIV, HIV p24 Antigen, HIV-DNA	1:1 000 000
Bakterielle Kontamination	Bakterientestung	< 1:100 000 bis < 1:1 000 000

Für viele bekannte Erreger besteht jedoch noch kein zufriedenstellendes Testverfahren. Teilweise kann das Risiko nur anhand eines Fragebogens abgeschätzt werden oder es steht nur ein einzelnes Testverfahren zur Verfügung, sodass nicht alle Infektionsstadien sicher abgedeckt werden können. Dies betrifft zum Beispiel Malaria, Babesiosis und die Chagas Krankheit. Diese Testverfahren können zudem sehr teuer sein.^{7, 39-46}

Im Gegensatz zur klassischen Variante der Creutzfeld-Jacob Erkrankung, kann die neue Variante (vCJD) über Transfusion von Blutprodukten übertragen wer-

den. Vor allem in Großbritannien traten einige transfusionsvermittelte vCJD auf. Die Ursache der Erkrankung sind infektiöse abnorme Proteine (Prione), ein Isomer einer physiologischen Form. Diese abnormen Prione befinden sich zu 50% im Plasma und zu 50% in weißen Blutkörperchen. Gegen Proteine kann der menschliche Körper keine Antikörper bilden, sodass die abnormen Prionen zwingend nachgewiesen werden müssen, um die Erkrankung zu diagnostizieren. Dies erweist sich als äußerst schwierig, da im präklinischen Stadium nur sehr geringe Mengen dieser Prionen vorhanden sind und es äußerst schwierig ist, sie von der großen Anzahl der physiologischen Form eindeutig zu unterscheiden. Daraufhin wurde die universelle Leukozytendepletion eingeführt und das Plasma dieser Spender nicht mehr verwertet.^{7, 47-49}

Des Weiteren können auch Erreger in der Haut des Spenders während der Venenpunktion in das Blut gelangen und dieses so kontaminieren, z.B. *Yersinia enterocolitica*. Dieses Risiko konnte reduziert werden, indem die ersten Milliliter Blut nach der Punktion verworfen werden. Zudem erhalten viele Transfusionsempfänger, unabhängig von der Transfusion, auch eine antibiotische Behandlung. Verfahren zur Detektion vor Punktion befinden sich noch in der Entwicklung.^{7,50,51}

Die Bedeutung vieler bekannter Erreger für die transfusionsassoziierte Übertragung ist noch unerforscht, wie z.B. bei Influenza. Neben den schon bekannten, durch Transfusion übertragbaren Erregern, treten auch immer wieder neue Infektionserkrankungen auf, bei denen die Gefahr einer transfusionsvermittelten Infektion nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem werden transiente Infektionen des Blutspenders und Zoonosen neue Herausforderungen darstellen. Im Rahmen der Globalisierung können Erreger, die bisher nur regional begrenzt vorkamen, in kürzester Zeit überall auf der Welt verbreitet werden.⁷

Um das Risiko einer transfusionsassoziierten Übertragung zu evaluieren, muss bei neu aufgetretenen Erkrankungen erstmal zwischen infektiös und nicht-infektiös unterschieden werden. Falls es sich um eine infektiöse Erkrankung handelt, muss im Rahmen der Erregerermittlung untersucht werden, ob diese durch Transfusion von Blutprodukten übertragen werden kann und welche Konsequenzen dies für den Empfänger haben könnte. Zudem müssen Risikofaktoren

ermittelt und ein Testverfahren entwickelt werden. Auch der Ausschluss von Blutspendern sollte gut durchdacht werden, da die Blutbanken und Patienten auf sie angewiesen sind.⁷

1.4.2. Nicht infektiionsbedingte Risiken

Neben infektiionsbedingten Risiken bestehen auch nicht infektiionsbedingte Risiken. Die häufigsten Reaktionen im Rahmen einer Transfusion sind die Allergische Reaktion, die febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktion (TR), sowie die akute hämolytische und verzögerte hämolytische bzw. serologische Transfusionsreaktion. Weitere transfusionsbedingte Reaktionen sind die **transfusion related acute lung injury (TRALI)**, **transfusion associated graft versus host disease (TA-GVHD)**, **transfusion associated circulatory overload**.^{14,52}

Verschiedene Mechanismen können allergische Reaktionen auslösen:

- Vorbestehende IgE oder IgG Antikörper des Empfängers reagieren mit Allergenen oder Proteinen im transfundiertem Blut,
- Anti-IgA-Antikörper des Empfängers reagieren mit IgA-Antikörpern des Spenders,
- IgE-Antikörper können mit der Transfusion vom Spender auf den Empfänger übertragen werden,
- während der Lagerung können sich Anaphylatoxine, Histamin, Bradykinin und Cytokine bilden, welche ebenfalls eine allergische Reaktion auslösen können.⁵³

Die fieberhafte nicht-hämolytische Transfusionsreaktion beruht auf der Freisetzung inflammatorischer Cytokine aus Leukozyten während der Lagerung der Erythrozytenkonzentrate. Eine Leukozytendepletion vor der Lagerung reduziert das Auftreten dieser Transfusionsreaktion.^{10,54–56}

Die hämolytische Transfusionsreaktion beruht auf einer Reaktion zwischen Antigenen der Spendererythrozyten und Antikörpern des Empfängers. Die häufigste Ursache ist die ABO-Inkompatibilität. Hierbei wird eine akute hämolytische Transfusionsreaktion durch natürlich präformierte Isoagglutinine des Empfängers verursacht. Die verzögerte hämolytische Reaktion tritt überwiegend bei Patienten nach wiederholten Transfusionen auf. Initial findet eine Sensibilisierung gegen Antigene der Spendererythrozyten statt. Bei erneuter Transfusion

können die gebildeten Antikörper geboostert werden und Tage bis Wochen nach der Transfusion eine Hämolyse auslösen. Als verzögerte serologische Transfusionsreaktion bezeichnet man die Boosterung anamnestischer Antikörpern gegen Spendererythrozyten im Rahmen der Transfusion, ohne dass eine Hämolyse manifest wird. ^{10,57–59}

Transfusion related acute lung injury (TRALI) ist definiert als ein **acute respiratory distress syndrome (ARDS)** innerhalb von sechs Stunden nach der Transfusion von Blutkomponenten. Verschiedene Mechanismen führen letztendlich zur Aktivierung von Neutrophilen, welche zur Sequestration und zur Endothelschädigung der Lungenkapillaren führen. Durch Leukozytendepletion sollen weniger Neutrophile aktiviert werden. ^{14,60–63}

Die TA-GVHD wird über T-Zellen vermittelt. Die T-Zellen, welche mit Erythrozytenkonzentraten transfundiert werden, werden normalerweise durch das Immunsystem des Empfängers zerstört. Bei immunsupprimierten Patienten oder Spendern aus dem Verwandtenkreis, sowie bei gleichen **Human Leukocyte Antigen (HLA)** Merkmalen können die T-Zellen überleben und eine zelluläre Immunantwort gegen Organe des Empfängers auslösen. Diese ist nicht therapierbar. Um diese Reaktion zu vermeiden, werden Risikopatienten mit Leukozytendepletierten und anschließend bestrahlten Erythrozytenkonzentraten transfundiert. Bestrahlte EKs weisen jedoch höhere extrazelluläre Konzentrationen von Kalium und Laktatdehydrogenase auf. ^{14,64,65}

1.5. Pathogenreduktionskonzept

Pathogenreduktion von Blutprodukten ist ein wichtiger Schritt zur Verbesserung der Transfusionssicherheit, vor allem für neu aufgetretene und noch nicht entdeckte infektiöse Erreger. ⁶⁶

Für unbekannte Erreger steht kein Testverfahren zur Verfügung. Um neue Erreger zu entdecken, muss zunächst ein neues Screeningverfahren entwickelt werden, um potentiell infektiöse Spender zu erkennen. Dieses ist zeit- und kostenintensiv. Zudem ist die Anzahl Testungen bei einem Spender begrenzt. Darüber hinaus wird die Zahl an Blutspendern abnehmen, da Blutprodukte von positiv getesteten Spendewilligen nicht verwendet werden dürfen. Mit einem effizienten Pathogenreduktionsverfahren werden sowohl bekannte als auch neue

und unentdeckte Pathogene reduziert, sodass auch Blutprodukte potentiell infektiöser Spender verwendet werden können. Durch Pathogenreduktion wird die Infektionskette unterbrochen.⁶⁷

Pathogenreduktionstechnologien für Plasma und Thrombozytenkonzentrate wurden bereits entwickelt. Das photochemische Verfahren mit Psoralen oder Riboflavin und Ultraviolettstrahlung (UV) des Unterbereichs UV-A hat sich durch Transfusionsicherheit und Therapieerfolg ausgezeichnet. Blutprodukte, welche nach diesem Verfahren pathogenreduziert (PR) wurden, befinden sich bereits in der klinischen Anwendung.^{68–75}

Die Entwicklung und klinische Anwendung von Pathogenreduktionstechnologien aller Blutkomponenten einschließlich Erythrozytenkonzentraten wäre ein Meilenstein für die Sicherheit der Transfusionstherapie. Pathogenreduzierte EK befinden sich noch nicht in klinischer Anwendung. Um maximale Transfusionsicherheit zu erreichen, sollte es ein Pathogenreduktionsverfahren für Erythrozyten, den am häufigsten transfundierten Blutbestandteilen, geben.^{14,66,76}

Eine photochemische Pathogenreduktion mit Psoralen oder Riboflavin ist bei Erythrozyten jedoch ineffizient, da Hämoglobin (Hb) UV-Strahlung mit einem Maximum bei 400 nm absorbiert.¹¹

1.6. Pathogenreduktion mit S-303

Amustaline Dihydrochloride (S-303) kann aufgrund seiner amphipatischen Eigenschaften sowohl Zellmembranen als auch Virushüllen durchdringen. Seine chemische Struktur enthält einen Acridin-Ring, womit die Substanz sich in die DNA Helix einbringt. Auf Grund seiner bifunktionell alkylierenden Wirkung werden Nukleinsäuren angegriffen und quervernetzt, so dass eine DNA-Replikation nicht mehr möglich ist. Bei dieser Reaktion entsteht das nicht reaktive Nebenprodukt S-300 (siehe Abbildung 6). Die Reaktionskinetik nimmt mit sinkender Konzentration von S-303 ab. S-303 reagiert zusätzlich auch mit anderen Nukleophilen, wie Phosphat, Wasser und Makromolekülen, wie z.B. Proteinen auf der Oberfläche der Erythrozyten. Um diese unspezifischen Reaktionen zu reduzieren, wird Glutathion (GSH) in den Pathogenreduktionsprozess mit eingebracht. GSH ist ein natürlich vorkommendes Antioxidans, welches intrazellulär mit einer Konzentration von 5 mmol/l vorkommt. Es kann die Zellmembran nicht durch-

dringen. Das extrazellulär vorkommende S-303 wird abgefangen, folglich werden die unspezifischen Nebenreaktionen verringert, ohne dass der Pathogenreduktionsprozess wesentlich beeinträchtigt wird.¹⁴

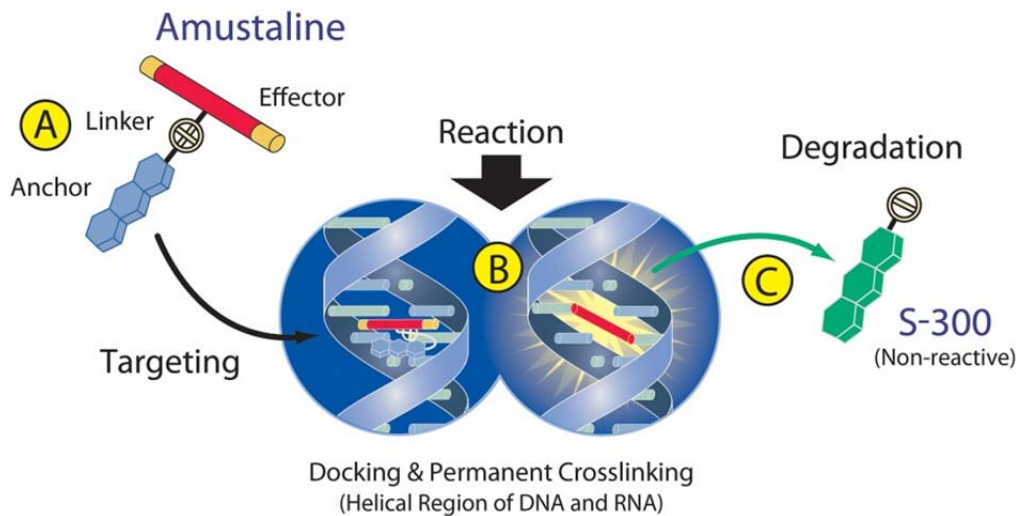


Abbildung 6: Der Wirkmechanismus von S-303 über Quervernetzung der DNA Stränge³

Bei dem Erstgenerationsverfahren wurde 0,2 mmol/l S-303 und 2 mmol/l GSH verwendet. Bei den anschließenden klinischen Studien konnten mit der serologischen Verträglichkeitsprobe, auch Kreuzprobe genannt, sowohl in der Kontroll- als auch in der Versuchsgruppe Antikörper gegen S-303 pathogenreduzierte EK nachgewiesen werden. Dieser Antikörper richtet sich gegen Acridin. Es handelt sich vermutlich um natürlich präformierte und immuninduzierte Antikörper. Um eine Immunantwort durch einen solchen Antikörper zu reduzieren, wurde das Verfahren modifiziert. Beim Zweitgenerationsverfahren werden 0,2 mmol/l S-303 und 20 mmol/l GSH verwendet. Durch die Erhöhung des GSH-Anteils wird extrazellulär mehr S-303 abgefangen und folglich weniger Acridin auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen gebunden. Das Immunisierungsrisiko sowie auch die Reaktion mit natürlich präformierten Antikörpern soll vermindert werden.¹⁴

Ein erfolgreicher Pathogenreduktionsprozess zeichnet sich aus durch (a) effektive Pathogenreduktion, (b) vergleichbare in vitro Eigenschaften mit konventionellen Blutprodukten sowie (c) Transfusionssicherheit und (d) Therapieerfolg.¹¹

Mit dem S-303-Pathogenreduktionsprozess erster und zweiter Generation können sowohl infektiöse als auch nichtinfektiöse Transfusionsrisiken verringert

werden. Grampositiven und Gramnegativen Bakterien, sowie Viren mit und ohne Hülle werden effektiv reduziert und sind nicht mehr nachweisbar. Die Anzahl Leukozyten wird reduziert und verbleibendes Plasma entfernt. ^{11,14}

Pathogenreduzierte Erythrozyten zeigten bezüglich ihrer metabolischen und physiologischen Eigenschaften in vitro keine relevanten Unterschiede zu konventionellen Erythrozyten. Leichten Abweichungen waren stets innerhalb des jeweiligen Referenzbereiches (siehe Tabelle 4). ^{11,13,14}

Tabelle 4: Eigenschaften von S-303-behandelten EK im Vergleich zu konventionellen EK¹¹⁻¹⁴

	2nd Gen. RBC
Glukose	↑
Laktat	↓
Kalium (extrazellulär)	↓
Adenosin-Triphosphorsäure (ATP) -Level	↔/↓
pH	↓
Volumenverlust	↔
Hämatokrit	↓
Hämoglobin-Verlust	↔
Gesamthämoglobin	↔
mean corpuscular hemoglobin	↔
mean corpuscular volume	↓
Hämolyse	↔

Mit Chromium 51 (⁵¹Cr) markierten Erythrozyten wurde die Überlebensfähigkeit S-303-behandelter Erythrozyten in vivo getestet. Nach Transfusion wurde die mittlere 24h Erholung (mean 24 h recovery) der 35 Tage alten S-303-behandelten Erythrozyten gemessen. Die Erholung Erst- und Zweitgenerationszellen war geringer als die der unbehandelten Erythrozyten, aber immer noch mehr als 75%. Die Lebensdauer Erstgenerationserythrozyten wich nicht von der Lebensdauer unbehandelter roten Blutkörperchen ab. Die Lebensdauer der Zweitgenerationszellen war auf Grund von Dehydration geringer. In Folgestudien konnte das Problem der Dehydration jedoch beseitigt werden. ^{12,77}

1.7. Klinische Studien mit S-303-behandelten Erythrozytenkonzentraten und das Auftreten von Immunreaktionen

Bis jetzt wurden acht klinische Studien mit S-303-behandelte Erythrozytenkonzentraten durchgeführt: Fünf Studien mit dem Erstgenerationsverfahren, eine

Studie mit einem modifiziertem Verfahren und zwei Studien mit Zweitgenerationsverfahren.^{14,77-80}

Mit der Erstgenerationszelle wurden drei klinische Studien der Phase I durchgeführt, um die Überlebensfähigkeit roter Blutkörperchen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Studien zeigten sich keine immunologischen Reaktionen mit pathogenreduzierten roten Blutkörperchen.^{14, 77}

Im Anschluss folgten zwei klinische Studien der Phase III, um den Therapieerfolg nach Transfusion von pathogenreduzierten Erythrozytenkonzentraten zu evaluieren. Sie schlossen kardiochirurgische und chronisch transfusionsbedürftige Patienten ein. Anhand der kardiochirurgischen Patienten mit akutem Blutverlust sollte die Gewebsoxygenierung untersucht werden. Die Ergebnisse der chronisch transfusionsbedürftige Patienten sollten verwendet werden, um einen Rückgang der Anämie und der endogenen Erythropoese nachzuweisen.^{14, 78,79}

Beide Studien mussten jedoch abgebrochen werden, da zwei chronisch transfusionsbedürftige Patienten nach Transfusion von S-303-behandelten Erythrozytenkonzentraten Antikörper gegen diese Erythrozyten entwickelten. Beide Patienten waren zum Zeitpunkt der Antikörperdetektion symptomfrei.^{14,78,79}

Anhand von in-vitro Studien konnte nachgewiesen werden, dass es sich um niedrigtitrige Antikörper gegen die Acridin-Komponente von S-303 handelt. S-303 reagiert im Rahmen des Pathogenreduktionsprozess auch mit Oberflächenmerkmalen der Erythrozyten. Dabei wird die Acridin-Komponente auf der Oberfläche roter Blutkörperchen gebunden.^{14,81}

Um die klinische Relevanz dieser Antikörper beurteilen zu können, wurde ein monocyte monolayer assay durchgeführt. S-303-behandelte Erythrozyten wurden mit dem Patientenplasma inkubiert und anschließend Monocyten ausgesetzt. Die mit Antikörpern beladenen Erythrozyten wurden nicht phagozytiert. Daraus lässt sich vermuten, dass eine Hämolyse nach Transfusion S-303-behandelter Erythrozytenkonzentrate bei diesen Patienten unwahrscheinlich ist.
^{14,81}

Im Rahmen einer Folgestudie fand für alle kardiovaskulären und chronisch transfusionsbedürftigen Patienten eine Nachuntersuchung statt, um eine mögli-

che Antikörperbildung gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate zu entdecken. Dabei konnten bei zwei kardiovaskulären Patienten aus der Kontrollgruppe Antikörper gegen S-303 pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate nachgewiesen werden, obwohl diese noch nie Kontakt mit S-303-behandelten Erythrozyten hatten. Es wurde angenommen, dass neben immuninduzierten auch natürlich präformierte Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten vorkommen können.^{14, 78}

Das Verfahren wurde weiter modifiziert, um die Wahrscheinlichkeit für eine mögliche Immunantwort zu reduzieren. Beim Zweitgenerationsverfahren wird bei gleichem Anteil S-303, 20 mmol/l GSH verwendet.

Zur Evaluierung von Antikörpern gegen S-303 pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate bei Personen, welche zuvor noch keine solche Bluttransfusion erhalten haben, wurde Serum von 200 gesunden Blutspendern und von 186 mehrfach transfundierten Patienten sowohl mit S-303-behandelten (Erstgenerationsverfahren), dem modifiziertem Verfahren also auch mit nicht behandelten roten Blutkörperchen auf Antikörpern untersucht. Bei den gesunden Blutspendern wurden zwei Proben, bei den mehrfach transfundierten Patienten drei Proben gefunden, die mit drei verschiedenen Zellen der ersten Generation positiv und mit allen drei Kontrollzellen negativ getestet worden sind. Da bei allen Patienten noch kein Kontakt zu S-303 bestanden hat, wird angenommen, dass es zu Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen S-303 ähnlichen Strukturen gekommen ist. Mit Zellen des Zweitgenerationsverfahrens kam es in beiden Kohorten zu keinen positiven Reaktionen. Die Reaktivität von S-303 mit Oberflächenmolekülen scheint durch die Erhöhung des GSH Anteils vermindert zu sein.^{14,82}

Mit Hilfe eines Tier-Modells wurde die Transfusion von S-303-behandelten EKs an einem immunisierten Empfänger untersucht. Neuseeländische weiße Hasen wurden mehrfach mit S-303-behandelten humanen Erythrozytenkonzentraten transfundiert und entwickelten einen Acridin spezifischen Antikörper. Die Immunreaktion wurde mittels Immunflusszytometrie gemessen. Trotz weiterhin wiederholten Transfusionen nahm die Immunantwort jedoch wieder ab. Vermutlich entwickelten die Hasen eine Toleranz gegenüber den behandelten roten Blutkörperchen.⁸³

Um Immunreaktionen mit der Zweitgenerationszelle zu untersuchen, wurden 200 Serumproben von gesunden Blutspendern und 800 Proben von Patienten mit angeborenen Hämoglobinopathien untersucht. Zum Screening wurden drei verschiedene S-303-behandelte Zellen sowie unbehandelte Kontrollzellen verwendet. Mit dem Serum der gesunden Spender sind keine positiven Reaktionen im Antikörpersuchtest aufgetreten. Im Patientenkollektiv mit angeborenen Hämoglobinopathien wurde bei drei Patienten ein Antikörper gegen Acridin (anti-Acridin) entdeckt. Es handelt sich beim ersten Patient um einen kältereaktiven IgM-Antikörper, beim zweiten Patienten vermutlich um einen IgG-Antikörper und beim dritten Patienten um einen IgG- und IgM-Antikörper.⁸⁴

Eine weitere klinische Studie mit 51 kardiochirurgischen Patienten zeigte, dass die Wirksamkeit und Sicherheit von pathogenreduzierten Erythrozytenkonzentraten der zweiten Generation vergleichbar mit konventionellen Erythrozytenkonzentraten ist. Bei keinem der Patienten konnte durch Transfusion von S-303-behandelten Erythrozytenkonzentraten eine Immunreaktion ausgelöst werden. Die Follow-Up Untersuchung mit dem indirekten Antihumanglobulintest (IAT) wurden bis 90 Tage nach Transfusion durchgeführt. Es konnten keine Anti-Acridin spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.⁸⁰

1.8. Fragestellung

Im Rahmen klinischer Studien mit der Erstgenerationszelle an chronisch transfusionsbedürftigen und kardiochirurgischen Patienten wurden erstmalig Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten entdeckt. Dieser Acridin spezifische Antikörper konnten sowohl bei Patienten in der Kontroll- als auch in der Versuchsgruppe nach Transfusion S-303-behandelter Erythrozytenkonzentrate nachgewiesen werden. Ein solcher Antikörper kann also sowohl durch Immunisierung gebildet werden, kommt aber auch als natürlich präformierter Antikörper vor.^{14,78,79,81,85,86}

Um den Acridinanteil auf der Oberfläche Roter Blutkörperchen zu vermindern, wurde das Verfahren durch Erhöhung des GSH Anteils bei der Herstellung modifiziert.¹⁴

Es wurden zwei In-Vitro Studien mit jeweils 386 und 1000 Patientenproben durchgeführt. Die Proben wurden auf einen Antikörper gegen pathogenreduzier-

te Erythrozyten untersucht. Die Zweitgenerationszelle zeigte eine geringe Reaktivität mit Antikörpern gegen pathogenreduzierte Erythrozyten im Vergleich mit der Erstgenerationszelle.^{82,84}

In dieser Arbeit soll Prävalenz und Eigenschaften natürlich präformierter Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten untersucht werden. Alle Testungen beruhen auf dem Prinzip eines indirekten Antihumanglobulintest in Gelkartentechnik. Es wird ein Kollektiv von mindestens 7000 potentiell transfusionsbedürftigen Patienten untersucht, die zuvor noch keine S-303 pathogenreduzierten Erythrozyten erhalten haben. Es wird mit der Erst- und Zweitgenerationszelle getestet, um zu untersuchen, in wie weit Patienten mit einem Antikörper gegen die Erstgenerationszelle mit der Zweitgenerationszelle reagieren und umgekehrt. Des Weiteren soll anhand der Charakterisierung dieser Antikörper auf die klinische Relevanz geschlossen werden. Zu Charakterisierung wird die Spezifität mittels Neutralisation bestimmt, die Antikörperklasse mit speziellen Gelkarten, welche ein spezifisches Reagenz gegen jede Antikörperklasse enthalten. Temperaturreaktivität und Titer sollen den Antikörper weiter charakterisieren.

2. Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Material zur Herstellung von Testzellen aus einem Erythrozytenkonzentrat mit 300 ml.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Kommentar
500 ml Zentrifuge-Flaschen (Trichterflaschen)	Corning	
Braun Extensions Set	Braun	
Spritzen (steril) 60 ml, 20 ml, 5ml	BD, Braun	
Chemo-Aide Flaschen Adapter	Baxter	
Pipettoraufsatz 50 ml	Eppendorf	
5 ml und 25 ml Pipetten (steril)	Greiner bio-one	
50 ml Falcon Tubes	Greiner bio-one	
2 ml Tubes	Starlab GmbH	

Reagenzien und Lösungen	Hersteller	Kommentar
GSH 3600 mg	Cerus	Glutathione Sodium Salt
S-303	Cerus	Amustaline Dihydrochloride
0,9%iges Natriumchlorid (NaCl) steril	Hospira	
0,9%iges NaCl	Braun	
Diluent (Mischbeutel mit Verdünnungslösung)	Cerus	
Glycerolyte	Fenwal	
ID Diluent 1	Bio-Rad	Enthält Bromelin für die Enzymbehandlung der Testzellen

2.1.2 Material zum Auftauen der gefrorenen Testzellen

Reagenzien und Lösungen	Hersteller	
NaCl	Fa. Roth	Zur Herstellung einer 9%igen und 2,5%igen NaCl Lösung
Aqua destillata	Fa. Braun	
ID Diluent 2	Bio-Rad	modifiziertes LISS

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	
Glasröhrchen	Sarstedt	
Transferpipetten	Sarstedt	

2.1.3 Material für das Screening der Patientenproben auf Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten

Als Untersuchungsmaterial wird Patientenplasma aus EDTA Blut verwendet.

Zur Testung werden aufgetaute, deglycerolisierte, in ID Diluent 2 aufgeschwemmte Testzellen erster und zweiter Generation sowie Kontrolltestzellen verwendet.

Reagenzien und Lösungen	Hersteller	Kommentar
Maus-Anti-Acridin-Antikörper (Ak)	Cerus	
S-300	Cerus	
ID Diluent 2	Bio-Rad	
GSH	Cerus	

Gelkarten	Hersteller	Kommentar
ID-Karte LISS/Coombs	Bio-Rad	

2.1.4 Material zur Charakterisierung der Antikörper

Als Untersuchungsmaterial wird Patientenplasma aus EDTA Blut verwendet.

Zur Testung werden aufgetaute, deglycerolisierte, in ID Diluent 2 aufgeschwemmte Testzellen erster und zweiter Generation sowie Kontrolltestzellen verwendet.

Gelkarten	Hersteller	Kommentar
ID-Card LISS/Coombs	Bio-Rad	
ID-Card NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins	Bio-Rad	ID-Karte neutral
ID-Card LISS/Coombs	Bio-Rad	Enthält Anti IgG+C3d
ID-Card DAT IgG1/IgG3	Bio-Rad	Enthält Anti-IgG1 und Anti-IgG3
ID-Card DC-Screening I	Bio-Rad	Enthält Anti IgG, IgA, IgM, Komplementfaktoren C3c (rabbit) und C3d (monoclonal)

Reagenzien und Lösungen	Hersteller	Kommentar
Kaltes 0,9%iges NaCl		
Waschlösung		
BAG Elutions-Kit	Firma BAG	Enthält Waschpuffer, Elutionslösung, Neutralisationspuffer
NaCl-Lösung 0,9 %	Firma B. Braun	
RESt®	Immucor	Kaninchenerythrozytenstomata Entfernt Kälteagglutinine
ID-Diluent 1	Bio-Rad	
1,4 Dithiothreitol	Roth	DTT
Duebecco's Phosphate Buffered Saline	gibco	DPBS

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	
Glasröhrchen	Sarstedt	

2.1.5 Geräte

Geräte	Hersteller	Kommentar
Kühlzelle		Überwachte Kühlzelle des Deutschen Roten Kreuz (DRK) Blutspendedienst (BSD) Frankfurt
Ultra-low Temperature Freezer	Sanyo	Modell: Mdf-u71v
ID-Incubator 37 SII	Bio-Rad	
Pipettor EP-3 und Spitzen	Bio-Rad	
Pipetten und Spitzen 10-1000µl	Eppendorf	
Zentrifuge	ID Sorvall	
Suwmam 3 Zentrifuge	Ortho	
ID Zentrifuge 24	Bio-Rad	
Freedom Evo 150	Tecan	Pipettierroboter
Saxo Reader	Bio-Rad	Automatischer Gelkartenleser

2.1.6 Software

Programm	Hersteller	
Access	Microsoft	
BiAS für Windows Version 10	Epsilon-Verlag	
Citavi 5	Swiss Academic Software	
Excel	Microsoft	
EdgeBlood™	Haemonetics	
EdgeLab™	Haemonetics	
IH-Com	Bio-Rad	

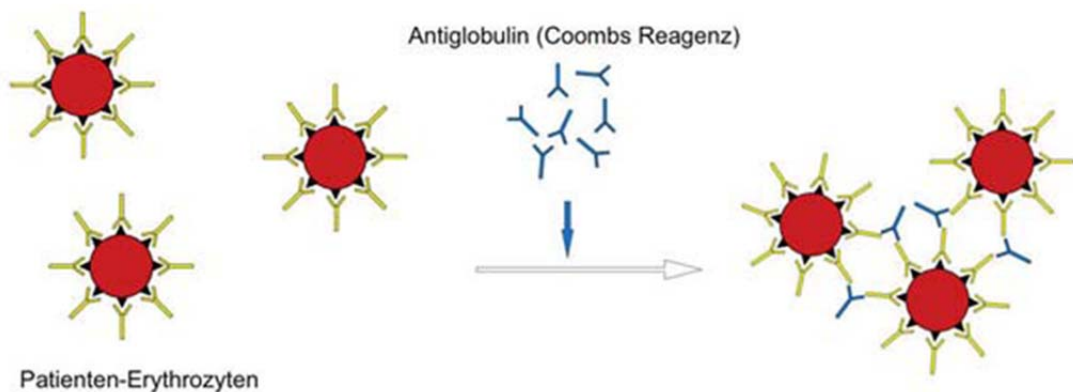
2.2 Methoden

2.2.1 Antihumanglobulintest

Zum Nachweis von Antikörpern wird der Antihumanglobulintest verwendet. Man unterscheidet den direkten Antihumanglobulintest (DAT) und den indirekten Antihumanglobulintest (IAT). Mit dem DAT werden bereits in vivo an Erythrozyten gebundene Antikörper und/oder Komplementfaktoren durch Zugabe von Antihumanglobulinserum nachgewiesen. Es kommt zur Agglutination der Erythrozyten (siehe Abbildung 7).^{15(pp20–24)}

Mit dem IAT werden Antikörper im Serum nachgewiesen. Hierzu werden Testzellen benötigt, welche die entsprechenden Antigene auf ihrer Oberfläche re-präsentieren. Um eine Antigen-Antikörperreaktion hervorzurufen, wird das Patientenserum zunächst zu den Testzellen gegeben und inkubiert. So kann der Antikörper an sein Antigen binden. Im Anschluss wird wie beim DAT verfahren (siehe Abbildung 7).^{15(pp28–29)}

Direkter Antiglobulin-Test (DAT):



Indirekter Antiglobulin-Test (IAT):

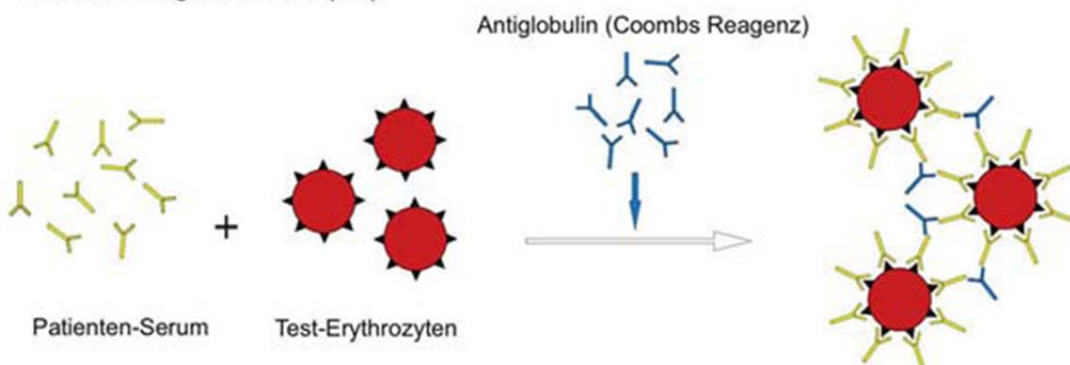


Abbildung 7: direkter und indirekter Antihumanglobulintest⁴

2.2.2 Untersuchungstechniken

Die Agglutinationsreaktion wird genutzt, um einen Antikörper nachzuweisen. Es stehen verschiedene Agglutinationstests, z.B. im Röhrchen oder in der Gelkarte, zur Verfügung, um einen Antikörpersuchtest (AKS) durchzuführen. Um eine ausreichend hohe Empfindlichkeit zu gewährleisten, soll der AKS mindestens in Röhrchentechnik mit Albumin als Supplement durchgeführt werden.^{87,88}

Bei der Röhrchentechnik wird das zu untersuchende Serum oder Plasma mit der Erythrozytensuspension im Röhrchen vermischt. Tritt eine Agglutination auf, ist der entsprechende Antikörper nachgewiesen. Die Agglutination kann durch Zentrifugation verstärkt werden.⁸⁷

Eine Gelkarte enthält mehrere Mikroröhrchen, welche mit einem Gel, einem Puffer und einem Reagenz befüllt sind. Je nach verwendetem Reagenz, z.B. Anti-humanglobulin, stehen verschiedene Gelkarten zur Verfügung. In die Öffnung der Mikroröhrchen wird eine Erythrozytensuspension - je nach Test zusätzlich auch Serum oder Plasma - hinein pipettiert und bei Zentrifugation durch das Gel bewegt. Ist der Test negativ, findet keine Agglutination statt. Die Erythrozyten gleiten durch das Gel, sammeln sich am Boden der Mikroröhrchen und bilden dort ein Pellet. Fällt der Test positiv aus, findet eine Agglutination statt und die vernetzten Erythrozyten werden im Gel zurückgehalten. Je nach Reaktionsstärke kann die Agglutinationsreaktion von Null (negativ) bis Vier (stärkste Agglutination) eingeteilt werden (siehe Abbildung 8).⁸⁹

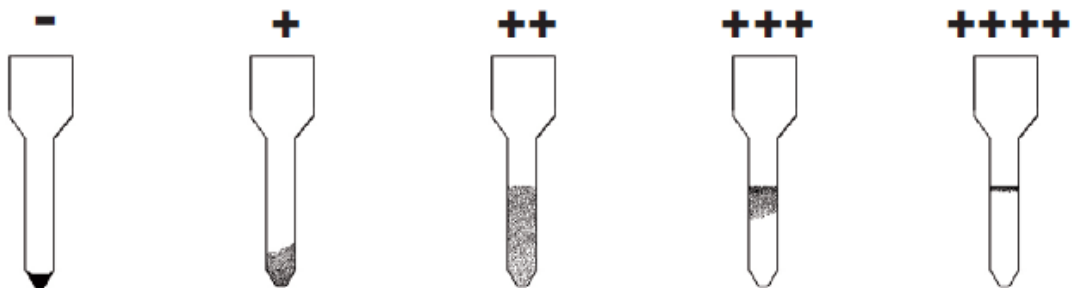


Abbildung 8: Agglutinationsreaktion in der Gelkarte. -/0 = negatives Ergebnis, + - ++++ = positives Ergebnis, eingeteilt anhand der Reaktionsstärke von 1 (+) bis 4 (++++)(Fa. Bio-Rad)

Der Gelkartentest bietet nicht nur in Bezug auf die Sensitivität Vorteile gegenüber der Röhrchentechnik. Die Durchführung und das Ablesen der Ergebnisse sind einfacher und können auch von weniger erfahrenerm Personal zuverlässig

durchgeführt werden. Die Gelkarten können zudem aufbewahrt und das Ergebnis auch noch Tage nach der Durchführung des Testes weitgehend unverändert abgelesen werden.⁹⁰

In dieser Arbeit wird der DAT und IAT in Gelkartentechnik mit Verwendung der „ID-Card LISS/Coombs“ gemäß der Arbeitsanweisung der Firma Bio-Rad durchgeführt.

Vor Durchführung des Antihumanglobulintestes wird eine 0,8%ige Erythrozytensuspension in ID Diluent 2 hergestellt. Beim DAT werden 50 µl dieser Erythrozytensuspension in die Gelkartensäule pipettiert und anschließend 10 min mit der ID-Zentrifuge zentrifugiert. Beim IAT werden 50 µl der 0,8%igen Erythrozytensuspension und 25 µl Plasma oder Serum in das Mikroröhrchen einer Gelkarte pipettiert. Diese wird 15 Minuten im ID-Inkubator bei 37°C inkubiert und anschließend mit der ID-Zentrifuge zentrifugiert. Nach Zentrifugation kann das Ergebnis abgelesen werden. Ist die Reaktion in der Gelkarte positive, fand eine Agglutination statt und der gebundene Antikörper wurde nachgewiesen.⁹¹

2.2.3 Die Testzellen

2.2.3.1 Die Auswahl der Blutspender

Zur Herstellung von elf verschiedenen Testzellen müssen ebenso viele verschiedene Erythrozytenkonzentrat-Spender der Blutgruppe O gefunden werden. Die Auswahl erfolgt mit Hilfe der Blutgruppenmerkmale (siehe Tabelle 5).

"Die Testzellen sollen folgende Merkmale aufweisen:

C, C_w, c, D, E, e, K, k, Fy (a), Fy (b), Jk (a), Jk (b), S, s, M, N, P (1), Le (a), Le (b).

Es wird empfohlen, dass folgende Merkmale in hoher Antigendichte (homozygote Erbanlage für das Allel) auf den Testzellen vorhanden sind:

D, c, Fy (a), Fy (b), Jk (a), Jk (b), S, s." ⁹²

Tabelle 5: Phänotypen der 11 Testzellen

cell nr.							MNSs				P	Lewis		Kell		Duffy		Kidd		Lutheran		
	D	C	E	c	e	C ^w	M	N	S	s	P ₁	Le ^a	Le ^b	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Lu ^a	Lu ^b	
1	+	o	+	+	+	o	+	+	o	+	+	o	+	o	+	+	o	o	+	o	+	1
2	+	o	+	+	o	o	+	+	o	+	+	o	+	o	+	+	o	+	+	o	+	2
3	o	o	o	+	+	o	+	+	+	+	+	o	+	o	+	+	+	+	o	o	+	3
4	+	+	o	o	+	o	o	+	o	+	+	o	+	+	+	o	+	o	+	o	+	4
5	+	+	o	o	+	+	+	+	+	o	+	o	+	o	+	+	+	o	+	o	+	5
6	+	o	+	+	o	o	o	+	o	+	+	o	+	o	+	+	+	+	o	o	+	6
7	o	o	o	+	+	o	+	+	+	o	+	o	+	o	+	o	+	o	+	o	+	7
8	o	o	o	+	+	o	+	o	+	+	o	o	+	o	+	o	+	+	o	o	+	8
9	+	+	o	o	+	o	+	+	o	+	+	o	+	o	+	o	+	+	o	o	+	9
10	+	+	o	o	+	o	o	+	o	+	+	o	o	o	+	o	o	o	+	o	+	10
11	+	o	+	+	o	o	+	o	o	+	+	o	+	o	+	o	o	o	o	+	nt	11

o	negative
+	heterozygous positive
+	homozygous positive
+	assumed, not tested
nt	not tested

2.2.3.2 Die Herstellung Testzellen erster und zweiter Generation

Um zu untersuchen, ob eine Probe einen Antikörper gegen Acridin oder GSH aufweist, werden aus dem Erythrozytenkonzentrat eines jeden Spenders jeweils drei verschiedene Testzellen hergestellt: Testzellen der ersten Generation (High), Testzellen der zweiten Generation (Low) und Kontrolltestzellen (Control).

Die Testzellen der ersten und zweiten Generation werden mit der gleichen Menge an S-303 hergestellt. Zur Herstellung der Testzellen der zweiten Generation wird mehr GSH verwendet als zur Herstellung der Testzellen der ersten Generation (siehe Tabelle 6).¹⁴

Die Kontrolltestzellen werden weder mit S-303 noch mit GSH behandelt.

Tabelle 6: Endkonzentration von S-303 und GSH je nach Herstellungsverfahren¹⁴

	S-303	GSH
Erste Generation	0,2 mM	2 mM
Zweite Generation	0,2 mM	20 mM
Kontrollzellen	0	0

Zur Vorbereitung wird das Braun-Extension-Set an das Erythrozytenkonzentrat angeschlossen. Die drei Trichterflaschen für die drei verschiedenen Testzellen werden mit 93,3 ml Erythrozyten aus dem gleichen Erythrozytenkonzentrat befüllt.⁹³

Um Glutathion (GSH) herzustellen wird Glutathion, Natriumsalz in sterilem, 0,9%igem NaCl aufgelöst. Um eine 600 mM Lösung zu erhalten, müssen 3600 mg Salz in 15,5 ml NaCl gelöst werden. Die Auflösung von GSH kann bis zu eine Stunde vor Benutzung erfolgen. Für Herstellung der Testzellen erster Generation wird eine 60 mM Lösung von GSH benötigt. Hierzu wird das 600 mM GSH mit 0,9%igem NaCl verdünnt werden. 3,3 ml der 60 mM GSH Lösung werden zu 93,3 ml Erythrozyten gegeben und gemischt. Für die Herstellung der Testzellen zweiter Generation werden 46,7 ml Diluent mit 5 ml der 600 mM GSH-Lösung vermischt. Diese Mischung wird dann zu 93,3 ml Erythrozyten gegeben und gemischt.^{14, 93}

Zwei Minuten vor Nutzung wird die benötigte 6 mM S-303 Lösung hergestellt. 57 mg S-303 werden vollständig in 18,5 ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung aufgelöst. Beim Arbeiten mit S-303 ist besondere Vorsicht geboten, da diese Lösung giftig ist. Die S-303 Lösung darf auf keinen Fall später verwendet werden, da S-303 innerhalb von wenigen Minuten zu S-300 verfällt. 3,3 ml der 6 mM S-303 Lösung werden zu den Erythrozyten mit GSH gegeben und sofort gut vermischt.^{14, 93}

Bei Raumtemperatur werden die Erythrozyten 18 Stunden inkubiert, damit S-303 in das nicht-reaktive Nebenprodukt S-300 umgewandelt werden kann (siehe Abbildung 9).^{14, 93}

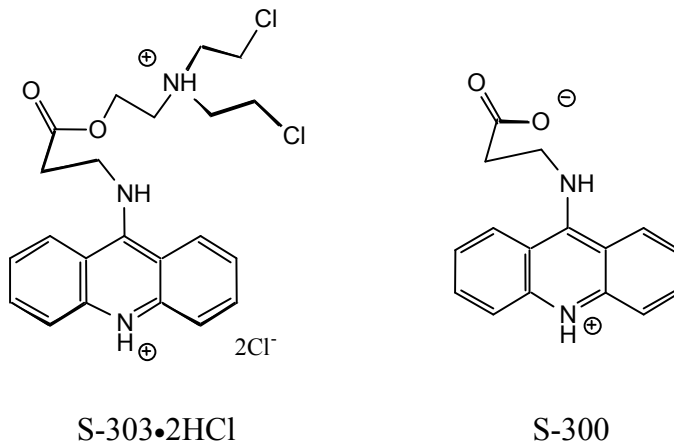


Abbildung 9: S-303 und das Nebenprodukt S-300 (Fa. Cerus)

Anschließend werden die Erythrozyten bei Raumtemperatur mit 2000 rpm (revolutions per minute) für drei Minuten mit Bremse 8 zentrifugiert, der Überstand entfernt und verworfen. Nun beginnt der Waschvorgang. Das verbleibende Erythrozytenpellet wird mit gleicher Menge 0,9%igem NaCl vermengt und gelöst, für erneut drei Minuten zentrifugiert (2000 rpm, Bremse 8), der Überstand entfernt und verworfen. Der Waschvorgang wird insgesamt zweimal durchgeführt.^{14, 93}

Nach der letzten Zentrifugation wird tröpfchenweise das doppelte Volumen an Glycerin zu den Erythrozyten gegeben und vermischt. Durch Zugabe von Glycerin wird eine Hämolyse während des Einfrierens verhindert. Je 1 ml dieser Erythrozytensuspension wird in ein 2 ml Tube abgefüllt und bei -80°C gefroren.^{93,94}

Der Herstellungsprozess wird in Abbildung 10 grafisch zusammengefasst.

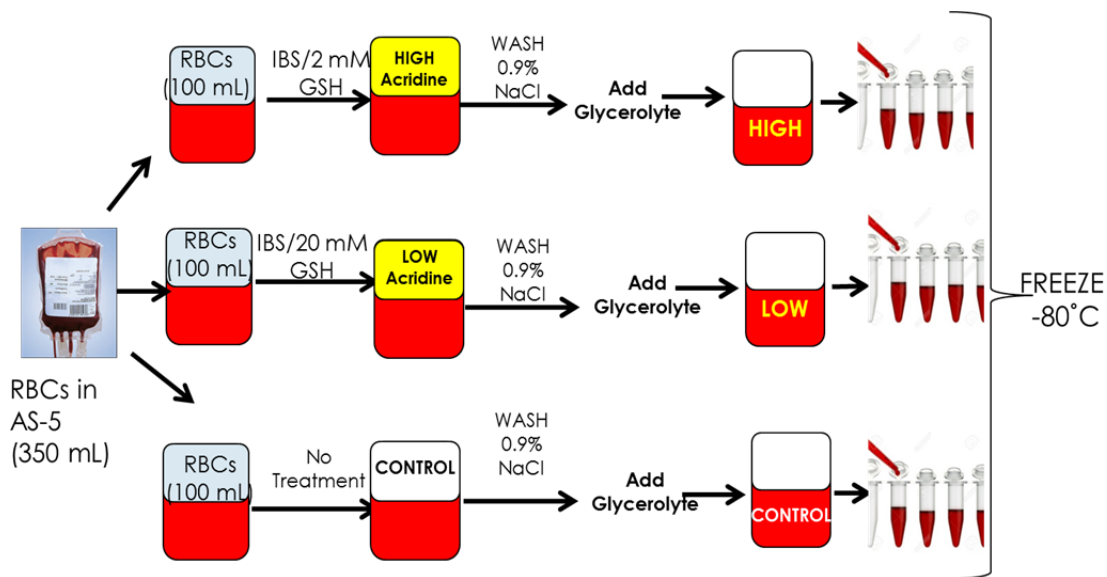


Abbildung 10: Herstellungsprozess der Testzellen (Fa. Cerus)

2.2.3.3 Die Herstellung Bromelin-behandelter Testzellen

Um darzustellen, ob sich die Oberfläche der roten Blutkörperchen (RBC) und damit auch deren Acridinbeladung durch eine Enzymbehandlung verändert werden kann, werden die Testzellen zusätzlich mit Bromelin behandelt.

Im ersten Versuchsansatz findet zunächst die Enzymbehandlung der Testzellen statt und anschließend die Pathogenreduktion mit S-303. Im zweiten Versuchsansatz wird zuerst die Pathogenreduktion durchgeführt und im Anschluss die Enzymbehandlung. Es soll untersucht werden, ob die Präsentation von Acridin auf der Oberfläche der Erythrozyten durch Enzymbehandlung vor Pathogenreduktion verstärkt wird, bzw. durch Enzymbehandlung nach Pathogenreduktion reduziert wird.

Die Enzymbehandlung wird gemäß der Arbeitsanweisung der Firma Bio-Rad zur Verwendung des Reagenz „ID Diluent 1“ durchgeführt. Die Erythrozyten werden mit der 20-fachen Menge an ID Diluent 1 vermischt, 10 Minuten bei 37°C inkubiert und dann dreimal mit 0,9%igem NaCl gewaschen.

2.2.3.4 Das Auftauen der Testzellen

Um die gefrorenen Zellen zur Testung verwenden zu können, muss das Glycerin entfernt werden. Hierzu werden die gefrorenen Testzellen zunächst aufgetaut. Anschließend wird tropfenweise die gleiche Menge 9%ige NaCl-Lösung dazugegeben und gemischt. Nach 2-3 Minuten wird die fünffache Menge der ursprünglichen Menge 2,5%ige NaCl-Lösung tropfenweise untergemischt und wieder einige Minuten später die 16-fache Menge der ursprünglichen Menge an 2,5%iger NaCl-Lösung tropfenweise dazugeben und vermischt. Anschließend wird das Gemisch bei 5000 rpm eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen.⁹⁵

Gemäß der Arbeitsanweisung der Firma Bio-Rad zur Verwendung des Reagenz „ID Diluent 2“ werden die Erythrozyten mit ID Diluent 2 zu einer 0,8%igen Aufschwemmung verdünnt. Die Testzellen können nun innerhalb von 24 Stunden zur Testungen verwendet werden.

2.2.4 Das Screening der Patientenproben

Zum Antikörper-Screening wird ein indirekter Antihumanglobulintest durchgeführt. Zur Positiv-Kontrolle wird bei jedem Durchlauf eine Probe mit 1:10 verdünnten murinen monoklonalen Antikörper „Maus-Anti-Acridin“ mitgetestet, um sicher zu gehen, dass die Acridin-Präsentation auf der Oberfläche der pathogenreduzierten Erythrozytenkonzentrate für die Testung stabil ist.

Die verwendeten EDTA-Patientenproben können bis zu 10 Tage bei 4°C aufbewahrt werden.⁹²

Die Auswahl der Testzelle sieben zum Screening erfolgte anhand der Prävalenz irregulärer Antikörper. Zu den sechs häufigsten Irregulären Antikörpern gehören anti-E, anti-M, anti-K, anti-D, anti-Fy(a) und anti-Le(a).⁹⁶⁻⁹⁸

Eine Testzelle, welche keine der entsprechenden Antigene exprimiert, steht nicht zur Verfügung. Die Testzelle 7 weist nur ein entsprechendes Blutgruppenmerkmal (M) auf ihrer Zelloberfläche auf. Daher wurde sie zum Screening ausgewählt (siehe Tabelle 5).

Die Testung erfolgt mit aufgetauten in ID Diluent 2 aufgeschwemmten Zellen der Testzelle 7 High und Low. Mit dem Tecan Pipettierroboter werden 25 µl Pa-

tientenplasma mit 50 µl der Testzellen in die Vertiefungen einer LISS/Coombs Gelkarte pipettiert. Die befüllten Gelkarten werden 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 10 Minuten zentrifugiert. Das Ergebnis wird mit einem automatischen Gelkartenleser abgelesen. Die Ergebnisse werden vom Untersucher überprüft. Als positives Ergebnis wird eine Agglutination mit Testzelle der ersten oder der zweiten Generation sowie mit beiden Testzellen gewertet. Die initial positiven Proben werden mit der Testzelle 7 High und Low im doppelten Ansatz zur Bestätigung nachuntersucht.

Wenn der Patient irreguläre Antikörper gegen Oberflächenantigene der Testzelle 7 aufweist, wird das Plasma mit einer Testzelle manuell nachuntersucht, welches dieses Antigen nicht auf ihrer Oberfläche aufweist.

Fällt die Reaktion mit einer der beiden Testzellen positiv aus, wird ein erneuter Versuchsansatz mit Testzellen High, Low und Control durchgeführt.

Besteht der Verdacht, dass ein Patient einen Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten hat, wird die Spezifität des Antikörpers abgeklärt.

2.2.5 Ausschlusskriterien

Wenn bei einem Patienten mit initial positiver Reaktion in der Screeninguntersuchung panagglutinierende Antikörper, Auto-Antikörper oder Geldrollenbildung bekannt sind, wurden keine weiteren Testungen auf Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate durchgeführt. Das Ergebnis des AKS mit S-303-behandelten Testzellen kann nicht eindeutig interpretiert werden, da auch durch panagglutinierende AK, Auto-AK oder Geldrollenformation eine sichtbare Agglutination ausgelöst wird. Der Aufwand um diese Störfaktoren zu eliminieren bzw. zu limitieren ist sehr groß.⁸⁸

Panagglutinierende Antikörper reagieren mit allen Testerythrozyten. Die Antikörperidentifizierung stellt daher eine große Herausforderung dar. Die Panagglutination kann durch einen Auto- oder Alloantikörper gegen hochfrequente Antigene (HFA) oder durch multiple Antikörper gegen nicht HFA ausgelöst werden. Wenn zusätzlich klinisch signifikante Alloantikörper vorliegen, können diese durch die Panagglutination maskiert werden. Mit einer Phänotypisierung/Genotypisierung von HFA sowie eine Adsorption von Auto- oder Alloan-

tikörpern kann die Ursache für die Panagglutination und das Vorliegen von klinisch signifikanten Alloantikörpern weiter untersucht werden.⁹⁹

Autoantikörper sind typischerweise panreaktiv und richten sich gegen körpereigene Erythrozyten. Die roten Blutkörperchen können zerstört werden und so eine Autoimmunhämolytische Anämie auslösen. Es wird zwischen wärmereaktiven Auto-Antikörpern von IgG-Typ und kältereaktiven Auto-Antikörpern von IgM-Typ unterschieden. Der Nachweis von Auto-Antikörpern erfolgt mit dem DAT, ggf. erfolgt die Testung temperaturabhängig, z.B. bei 4 oder 37°C.^{4,100}

Rote Blutkörperchen gesunder Spender können die Tendenz haben, Aggregate zu bilden, die wie Geldrollen aussehen (siehe Abbildung 11). Diese Aggregate sind reversibel, da die Anziehungskräfte zwischen den einzelnen Erythrozyten gering sind. Die Anzahl der Erythrozyten pro Geldrollenformation kann variieren. Je nach Stärke der Scherkräfte kann ein Geldrollenaggregat geteilt und auch komplett aufgelöst werden. Der genaue Mechanismus der Geldrollenbildung ist noch weitestgehend unerforscht.^{5, 101, 102}

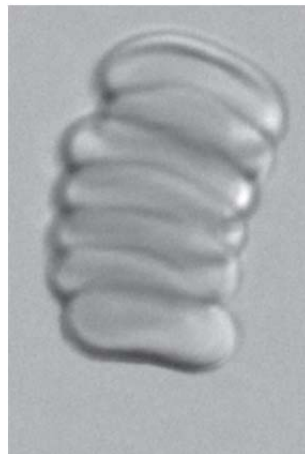


Abbildung 11: Momentaufnahme einer Geldrollenformation mit sieben Erythrozyten⁵

2.2.6 Spezifität der Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten

Um die Spezifität des Antikörpers gegen S-303 nachzuweisen wird eine Neutralisation des Antikörpers mit S-300, einem Abbauprodukt von S-303 durchgeführt.¹⁰³

Zunächst fertigt man eine geometrische Verdünnungsreihe von S-300 mit modifiziertem LISS (ID-Diluent 2) an, sodass S-300 in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegt: 6; 0,6; 0,06; 0,006 und 0,0006 mmol. Nun werden je 5 µl der

verschiedenen S-300-Lösungen in ein Reagenzglas gegeben und zur Kontrolle ein Reagenzglas mit 5 µl modifiziertem LISS (ID Diluent 2) anstelle von S-300 gefüllt. Zu den 5 µl S-300 bzw. modifiziertem LISS werden 25 µl Plasma gegeben, vermischt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Sofern Acridin-spezifische Antikörper vorliegen werden diese durch S-300 gebunden und damit neutralisiert. In eine LISS/Coombs Gelkarte werden in die sechs Mikroröhrchen jeweils 50 µl Testzellen der Ersten Generation pipettiert. Dazu gibt man entsprechend der verschiedenen Konzentrationen jeweils 25 µl des S-300-Plasma-Gemisches dazu. Die Gelkarten werden nun bei 37°C für 15 Minuten inkubiert und anschließend zentrifugiert. Nun kann das Ergebnis abgelesen werden. Wenn es sich um einen Antikörper gegen Acridin handelt, sollte das Ergebnis aus der Gelkarte bei höheren Konzentrationen von S-300 negativ ausfallen, da der Antikörper durch das S-300 vollständig gebunden und somit neutralisiert wurde und deshalb keine Agglutination mit den Testzellen hervorrufen kann. Die erste positive Reaktion der Gelkarte zeigt diejenige Konzentration von S-300 an, mit der der Antikörper nicht mehr vollständig neutralisierbar ist.¹⁰⁴

Liegt der Verdacht vor, dass eine Probe einen Antikörper gegen GSH enthält, wird die Neutralisation wie oben beschrieben, jedoch mit Hilfe einer geometrischen Verdünnungsreihe von GSH und mit Testzellen der zweiten Generation (Low) durchgeführt.

2.2.7 Charakterisierung der Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten

2.2.7.1 Titer

Um die Konzentration des Antikörpers im Plasma nachzuweisen, wird eine geometrische Verdünnungsreihe angefertigt. Dazu wird das Plasma mit der Verdünnungsstufe 1:1 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt. Um die nächst höhere Verdünnungsstufe zu erreichen werden 60 µl der vorherigen Verdünnungsstufe mit 60 µl 0,9%iger NaCl-Lösung gemischt. Für die 1:2 Verdünnung fügt man 60 µl Plasma zu 60 µl 0,9%iger NaCl-Lösung. Für die 1:4 Verdünnung mischt man 60 µl des 1:2 verdünnten Plasmas mit 60 µl 0,9%iger NaCl-Lösung. Diese Verdünnungsreihe wird bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:32 fortgesetzt.

Nun werden jeweils 50 µl der in modifiziertem LISS (ID Diluent 2) aufgeschwemmten Testzellen in sechs Mikroröhrchen der LISS/Coombs-Gelkarte pipettiert. Anschließend gibt man 50 µl Plasma der jeweiligen Verdünnungsstufe dazu.

Die befüllte Gelkarte wird nun 15 Minuten bei 37°C inkubiert und danach zentrifugiert. Nun kann der Titer bei der höchsten Verdünnungsstufe, die noch zu einer positiven Reaktion in der Gelkarte führt, abgelesen werden.

2.2.7.2 Dissoziation

Um die Affinität des Antikörpers zum Antigen auf der Testzelle zu bestimmen, wird eine Dissoziation durchgeführt.

Hierzu benötigt man 400 µl einer 0,8%igen Suspension von in modifiziertem LISS aufgeschwemmten Testzellen. Bei einem Antikörper gegen Acridin werden Testzellen der ersten Generation benötigt, bei einem Antikörper gegen GSH Testzellen der zweiten Generation.

Dazu werden 400 µl dieser Testzellensuspension der ersten Generation mit 300 µl Plasma vermischt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Der im Plasma enthaltene Antikörper soll hier an das Antigen auf der Testzelle binden. Die Lösung wird anschließend in drei Vorgängen mit je 2 ml modifiziertem LISS gewaschen, um freie Antikörper zu entfernen. Die letzte Waschlösung wird aufgehoben und ein AKS damit durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Waschvorgänge erfolgreich waren und keine freien Antikörper mehr nachzuweisen sind.

Die gewaschenen Zellen werden mit modifiziertem LISS zu einer 0,8%igen Suspension aufgeschwemmt.

Nun wird ein direkter Antihumanglobulintest mittels Gelkarten durchgeführt, um zu kontrollieren, ob die Antikörper wirklich an die Antigene auf den Testzellen gebunden sind. Dies ist der Fall, wenn der Test positiv ausfällt. Wenn der Test negativ ausfällt, müssen die Testzellen erneut mit Plasma inkubiert und anschließend gewaschen werden und wieder ein DAT durchgeführt werden, bis dieser positiv ausfällt.

In die sechs Vertiefungen einer Gelkarte werden je 50 µl Testzellen mit gebundenem Antikörper gegeben. Dazu werden 25 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe von S-300 gegeben (6; 0,6; 0,06; 0,006; 0,0006 mmol) und eine Kontrolle mit 25 µl LISS.

Die Gelkarten werden 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Nun kann das Ergebnis abgelesen werden. Je höher die Konzentrationen von S-300 bei der noch eine positive Reaktion in der Gelkarte auftritt, desto größer die Affinität des Antikörpers zum Antigen auf der Testzelle.

2.2.7.3 Antikörpertyp und -klasse

Um zwischen den verschiedenen Antikörperklassen zu unterscheiden wird mit dem zu untersuchenden Patientenplasma gemäß jeweiliger Arbeitsanweisung der Firma Bio-Rad ein IAT in der Gelkarte „DC Screening I“, „NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins“ und „LISS/Coombs“ durchgeführt. Die ID Karte „DC Screening I“ enthält Antihumanglobulinserum (Anti-IgG), Anti-IgA, -IgM, -C3c und -C3d und dient zum Nachweis dieser Antikörper bzw. Komplementfaktoren. Die ID-Karte „NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins“ enthält kein Reagenz. Kommt es hier zu einer positiven Reaktion liegt mutmaßlich ein komplett reagierender, direkt agglutinierender IgM-Antikörper vor. Fällt das Ergebnis in dieser Gelkarte negativ aus, aber in der ID-Karte „LISS/Coombs“ positiv, liegt ein IgG-Antikörper vor. ^{22,89,91,105,106}

Zur Verifizierung eines IgM-Antikörpers wird eine Behandlung mit Dithiothreitol (DTT) durchgeführt. DTT spaltet Disulfidbrücken und somit können IgM-Antikörper durch DTT zerstört werden und letztendlich keine komplette Agglutination mit Zielzellen hervorrufen. Dieser indirekte Nachweis von IgM-Antikörpern mit DDT im Plasma einer Probe ist dann indiziert, wenn der AKS in der Neutralkarte positiv ausfällt. Das Plasma wird in gleichen Teil mit 0,01 M DTT für 30 Minuten bei 37°C inkubiert um die Disulfidbrücken der IgM-Antikörper zu zerstören. Um bei einem negativen Ergebnis den Verdünnungseffekt auszuschließen, wird zusätzlich noch eine Kontrolle mit **Phosphate buffered saline (PBS)** anstelle von DTT angesetzt. 50 µl Testzellen der ersten Generation werden in zwei Säulen einer LISS/Coombs-Gelkarte und in zwei Säulen einer Neutralkarte gegeben. In die erste Säule wird jeweils 25 µl Plasma mit DTT

pipettiert. In die zweite Säule wird jeweils 25 µl Plasma mit PBS pipettiert. Die Gelkarten werden 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Liegt ein IgM-Antikörper vor, führt DTT zur Degradation des Antikörpers. Somit ist keine komplette Agglutination mehr möglich, und der AKS auf der Neutralkarte ist negativ. Um hier einen Verdünnungseffekt auszuschließen, muss der Ansatz mit PBS in der Neutralkarte zu einer Agglutination geführt haben. Wenn das Ergebnis in der LISS/Coombs-Gelkarte im Ansatz mit DTT sowie auch im Ansatz mit PBS positiv ist, liegt zusätzlich noch ein IgG-Antikörper vor.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

Um einen IgG-Antikörper genauer zu charakterisieren, werden die IgG-Subtypen bestimmt. Dazu wird ein IAT mit einer Gelkarte, die spezifische Antikörper gegen die IgG-Subklassen 1 und 3 enthält, durchgeführt. Wenn in einer oder beider Gelkartensäulen eine Agglutination stattgefunden hat, liegt je nach Säule ein IgG1- oder/ und IgG3-Antikörper vor.¹¹⁰

Ist das Ergebnis sowohl in der IgG1-Säule als auch in der IgG3-Säule negativ, liegt ein IgG2- oder IgG4-Antikörper vor.

2.2.7.4 Temperaturabhängigkeit

Es soll die Temperaturabhängigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktion bei 4°C, 20°C und 37°C untersucht werden. Um die optimal gleiche Temperaturbedingungen zu schaffen, werden Testzellen, High, Low und Control, Patientenplasma und Gelkarte zunächst 15 Minuten getrennt voneinander bei der gleichen Temperatur inkubiert. Anschließend werden die Testzellen und das Plasma in die Gelkarten pipettiert und erneut bei der entsprechenden Temperatur 15 Minuten inkubiert und anschließend zentrifugiert, um das Ergebnis ablesen zu können. Diese Testung wird zunächst erstmal mit der ID-Karte LISS/Coombs durchgeführt. Findet sich hier ein positives Ergebnis, wird hier der Titer des Plasmas mit der entsprechenden Testzelle bei der entsprechenden Temperatur getestet. Der Titer wird auf der ID-Karte LISS/Coombs und „NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins“ bestimmt.

2.2.7.5 Kälteagglutinine

Stellt sich im Rahmen der Testung der Temperaturreaktivität der Verdacht auf Kälteantikörper, können diese mit Hilfe von Kaninchenerythrozytenstroma (RESt®) absorbiert werden. Die Absorption wurde nach Anleitung der Firma

Immucor durchgeführt. Zunächst wird das RESt® Absorptionsfläschchen mindestens zwei Minuten zentrifugiert bis das Stromata gut gepackt ist. Der Überstand wird entfernt, es werden 1 ml Patientenplasma hinzugefügt. Das Gemisch wird für ca. 45 Minuten bei 1-10°C inkubiert und anschließend für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand kann nun verwendet werden. Falls nicht alle Kälteagglutinine gebunden sind, kann die Anwendung mit RESt® wiederholt werden.¹¹¹⁻¹¹³

2.2.8 Enzymbehandlung der Testzellen

Durch Behandlung mit Enzymen wird die Oberflächenstruktur von roten Blutkörperchen verändert. Enzyme spalten bestimmte Molekularbindungen und lösen somit Glykoproteine und andere Strukturen von der Oberfläche der Erythrozyten ab.¹

Die Testzellen sollen nun mit Bromelin behandelt werden, um zu untersuchen, in wie weit sich die Enzymbehandlung auf das an der Oberfläche der Testzellen gebundene Acridin bzw. GSH auswirkt.

Gemäß der Arbeitsanweisung der Firma Bio-Rad zur Verwendung des Reagenz „ID Diluent 1“ werden jeweils 50 µl Testzellen der ersten Generation, der zweiten Generation und Kontrolltestzellen in die ID-Karte LISS/Coombs pipettiert. Dazu wird jeweils 50 µl ID-Diluent 1 (enthält Bromelin) gegeben. Wegen des Verdünnungseffektes wird nochmal der gleiche Versuchsansatz gewählt, allerdings wird anstelle von ID-Diluent 1 PBS benutzt. Der Reaktionsansatz wird 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 25 µl Plasma dazugeben. Alles wird 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend 10 Minuten zentrifugiert. Das Ergebnis kann nun abgelesen werden.

2.2.9 Aufbewahrung der Patientenproben

Das Plasma der Patienten mit Anti-Acridin-AK wird bei -30°C gefroren, aufbewahrt und zu weiteren Untersuchungen aufgetaut.

2.2.10 Datenerfassung

Die Datenerfassung erfolgte in Zusammenarbeit mit der IT Abteilung des Instituts. Die Ergebnisse der Screening-Untersuchungen wurden mit dem Saxo-ID-Reader automatisch erfasst. Mittels Composer-Software erfolgte die Visualisie-

rung und Bewertung dieser Daten, sowie die Überführung in eine Microsoft Windows Standardanwendung. Über die Proben- und/oder Auftragsnummer konnten weitere Informationen zur Probe bzw. zum Patienten aus der Oracle Datenbank des Blutbank- bzw. Laborinformationssystem (EdgeLab™/EdgeBlood™) importiert werden. Zur weiteren Analyse wurden Access®-Datenbanken und Excel®-Tabellen erstellt. Neben Auftragsnummer und Patientenummer, sowie dem Ergebnis des IAT wurden Alter, Geschlecht und das Vorhandensein von Geldrollen-Bildung, Wärme-Auto-AK, Kälte-Auto-AK und panagglutinierenden AK erfasst. In die Screeninguntersuchung auf Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten wurden alle Proben von potentiell transfusionsbedürftigen Patienten eingeschlossen. Proben von Patienten mit Geldrollen-Bildung, Wärme-Auto-AK, Kälte-Auto-AK und panagglutinierenden AK wurden ausgeschlossen. Die Plausibilitätsprüfung der Daten erfolgte zusammen mit Mitarbeitern der IT-Abteilung. Die Daten werden personenbezogen erfasst, vor der Auswertung pseudonymisiert und zur Publikation anonymisiert.

2.2.11 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem BIAS®-Statistikprogramm in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biostatistik und Mathematische Modellierung der Universität Frankfurt.

Um das Testverfahren mit der Erst- und der Zweitgenerationszelle miteinander zu vergleichen, wird der Cohen's Kappa-Koeffizient als statistisches Testverfahren angewandt.¹²¹

Des Weiteren wurde die Sensitivität bestimmt, um die Testung mit Erst- oder Zweitgenerationszelle mit einer Testung mit beiden Zellen zu vergleichen.

2.2.12 Genehmigung der Ethik-Kommission

Die Ethik-Kommission ist zur Auffassung gekommen, dass keine berufsrechtlichen oder berufsethischen Bedenken gegen die Durchführung dieser Studie bestehen.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Beschreibung der Patienten

Über einen Zeitraum von 11 Monaten wurden 17300 Proben von 9789 potentiell transfusionsbedürftigen Patienten, welche im BSD Frankfurt eingegangen sind, getestet.

„Das Institut in Frankfurt nimmt die Versorgung des Universitätsklinikums Frankfurt am Main in allen transfusionsmedizinischen Belangen wahr und stellt in Mittel- und Südhessen die Versorgung von insgesamt 100 Krankenhäusern mit Blutprodukten sicher.“¹⁴

Von den insgesamt 9789 Patienten sind 4792 Patienten (48,95 %) weiblich und 4976 Patienten (50,83 %) männlichen. Bei 21 Patienten (0,22 %) ist das Geschlecht nicht bekannt (siehe Abbildung 12).

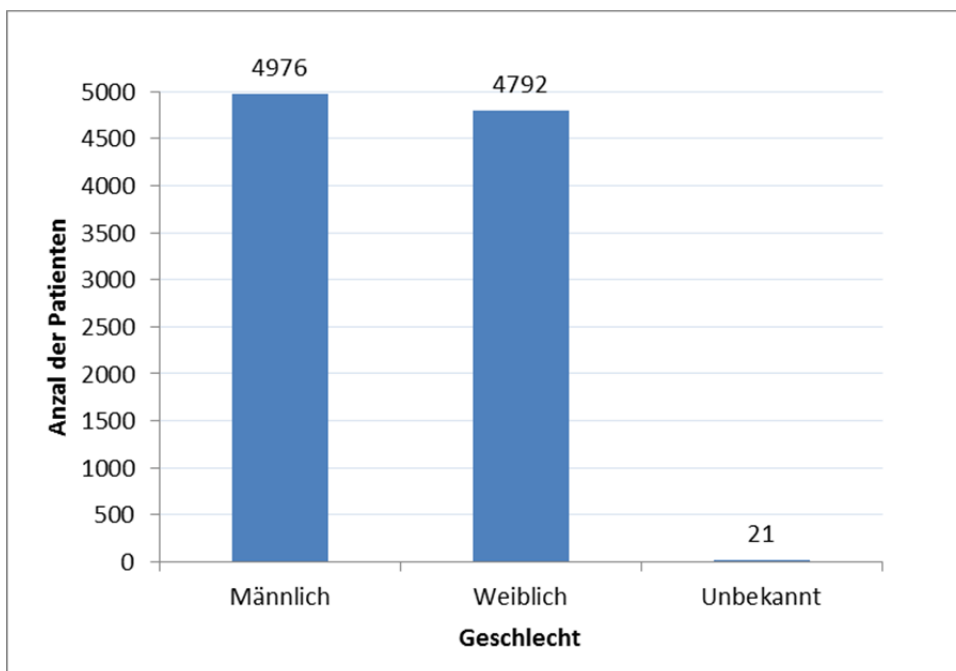


Abbildung 12: Verteilung der Geschlechter

Die Altersverteilung ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Altersgruppe 71-75 Jahre ist mit 1378 Patienten am häufigsten vertreten.

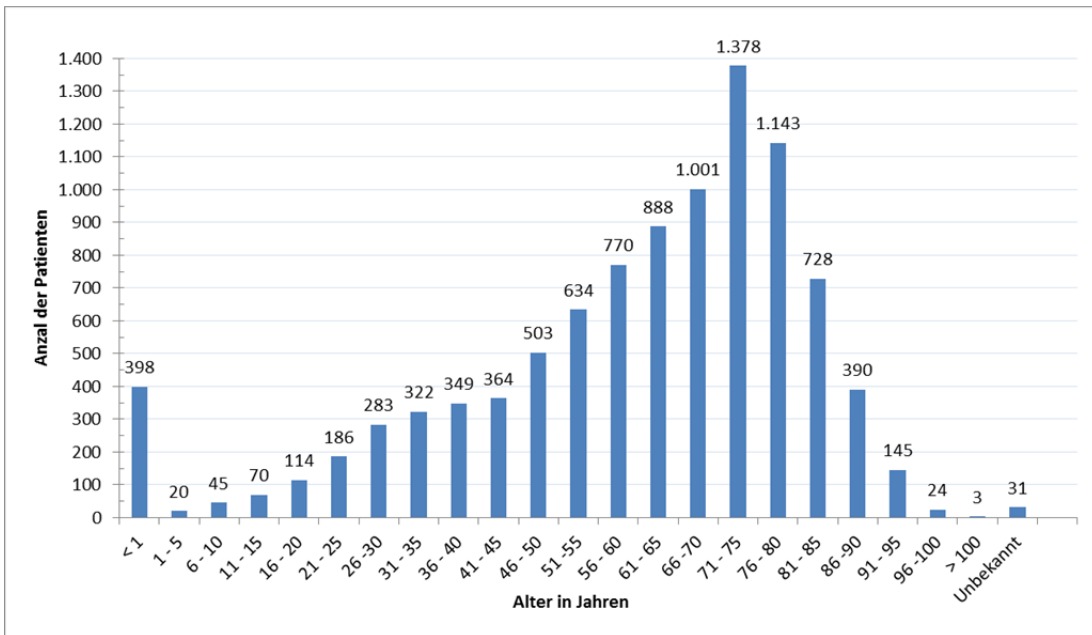


Abbildung 13: Altersverteilung

3.2 Die Auswertung der Screening Untersuchung

Insgesamt wurden 9789 Patienten getestet. 2467 Patienten wurden mehrfach untersucht (siehe Abbildung 14).

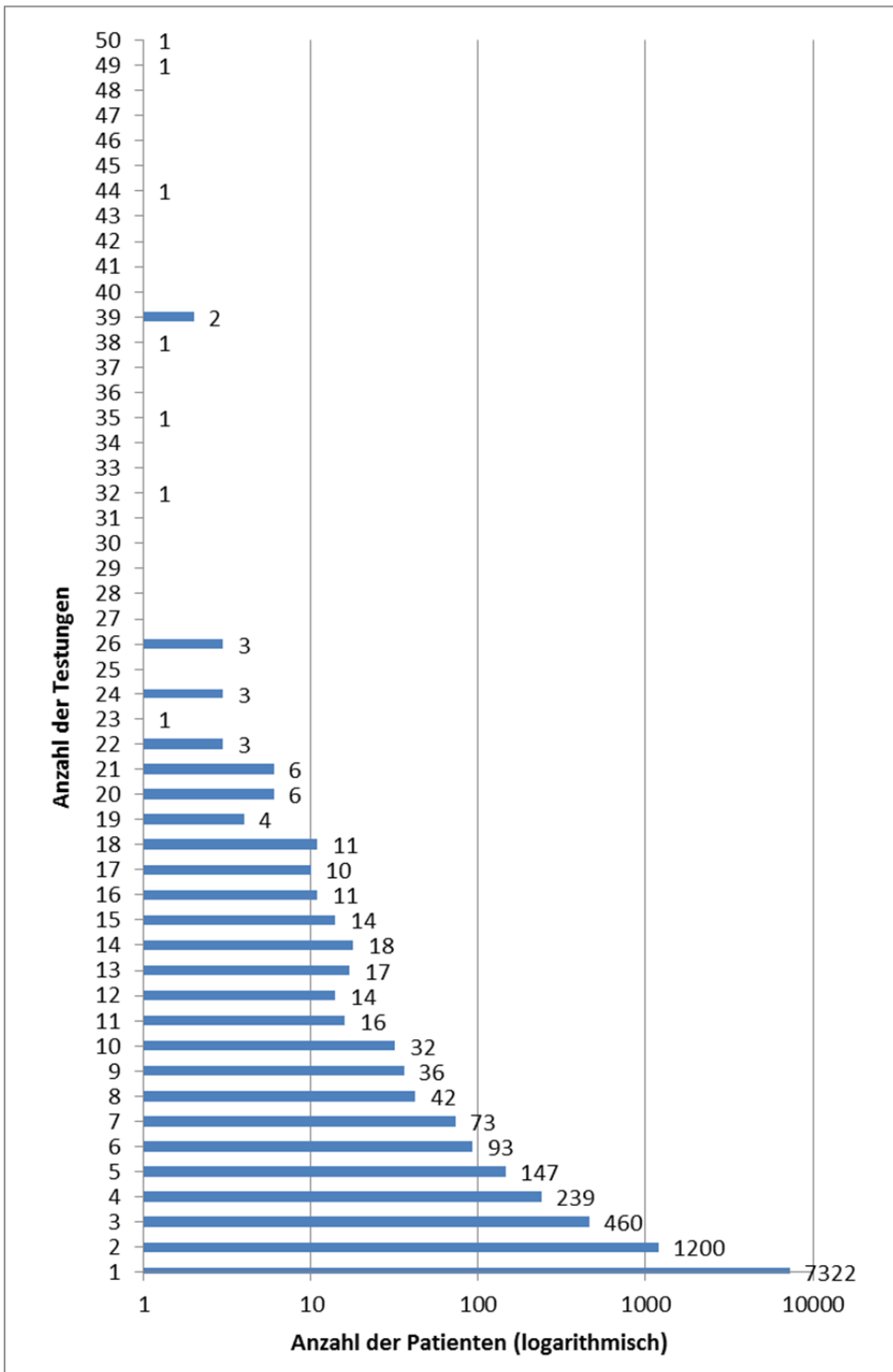


Abbildung 14: Anzahl der Testungen

110 Patienten mit panagglutinierenden Auto-AK, Wärme- oder Kälte-Auto-AK oder Geldrollenbildung wurden ausgeschlossen. Weitere acht Patienten mussten ausgeschlossen werden, da wegen mehrerer irregulärer Antikörper keine passende Testzelle zu Verfügung stand.

In die Auswertung werden 9671 Patienten eingeschlossen. 9449 Patienten hatten ausschließlich negative Ergebnisse im initialen AKS mit der Testzelle 7 erster oder zweiter Generation. 79 Patienten hatten im initialen Screening sowohl positive als auch negative Ergebnisse im AKS mit Testzelle 7. Dieses Ergebnis konnten jedoch bei allen 79 Patienten im Wiederholungsversuch mit Testzelle 7 oder einer anderen Testzelle, wenn irreguläre, spezifische Allo-Antikörper gegen Testzelle 7 vorhanden waren, bzw. auch im AKS mit Kontrolltestzellen nicht bestätigt werden. 143 Patienten hatten im initialen Screening ausschließlich positive Ergebnisse. Auch hier erfolgte eine Wiederholung des AKS, ggf. auch mit der Kontrollzelle oder einer anderen Testzelle. Letztendlich konnten bei 12 Patienten Antikörper gegen S-303 pathogenreduzierte Patienten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15).

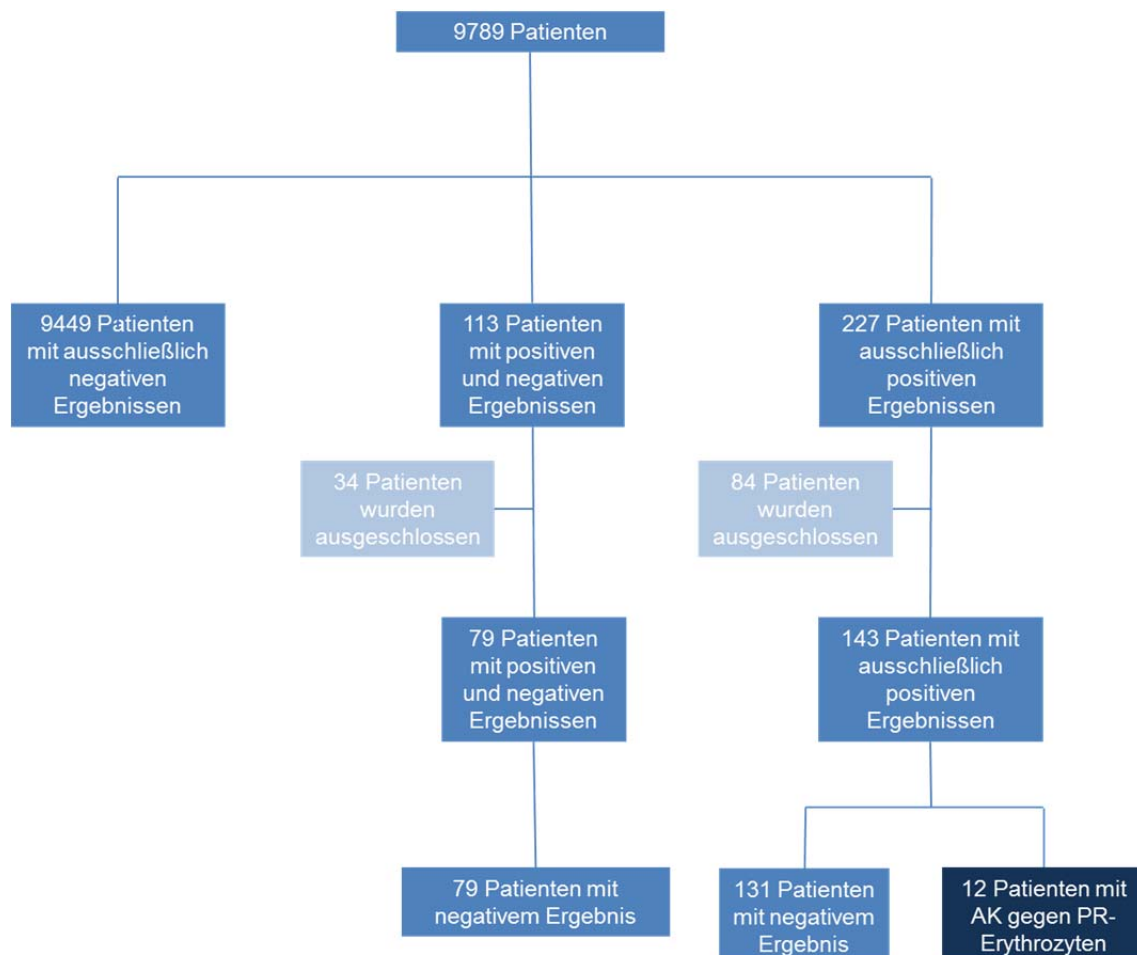


Abbildung 15: Auswertung der Screeninguntersuchung

Alle zwölf Patienten mit AK gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate hatten ausschließlich positive Ergebnisse in der Screeninguntersuchung mit Testzelle 7 (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnisse der Patienten mit Antikörpern gegen Pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate in der Screeninguntersuchung

Patienten mit AK gegen S-303 PR EK	Anzahl Testung	Anzahl positives Ergebnis	Anzahl negatives Ergebnis
1	1	1	0
2	2	2	0
3	2	2	0
4	3	3	0
5	1	1	0
6	1	1	0
7	1	1	0
8	1	1	0
9	1	1	0
10	1	1	0
11	1	1	0
12	1	1	0

3.3 Prävalenz der Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten

Bei zwölf verschiedenen Patienten-Proben von insgesamt 9671 konnte ein Antikörper gegen Zellen der ersten oder zweiten Generation nachgewiesen werden. Die geschätzte Wahrscheinlichkeit für eine positive Reaktion bei einem potentiell transfusionsbedürftigen Patienten liegt damit bei 0,12 % (95 % Konfidenzintervall [0,06 %; 0,22 %]).

Tabelle 8: Beschreibung der Patientenproben, die einen Antikörper gegen Pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate haben

Probe	Alter	Einweiser	Immunhämatologischer Status
1	75	Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie	unauffällig
2	85	Hämatologie, Onkologie	Anti-E, positive Reaktionen im Enzymtest ohne erkennbare Antigenspezifität
3	35	Notaufnahme	unauffällig
4	85	Eichhof-Medizinisches Zentrum	positive Reaktionen im Enzymtest ohne erkennbare Antigenspezifität; V.a. Kälte AK
5	21	Kreiskrankenhaus Gelnhausen	Anti-D nach Rh-Prophylaxe
6	76	Urologie	unauffällig
7	85	Notaufnahme	unauffällig
8	31	Gynäkologie/Geburtshilfe	Anti-Le(a)
9	75	Krankenhaus Bad Soden	Anti-Fy(a)
10	76	Orthopädie	unauffällig
11	51	Orthopädie	unauffällig
12	87	Allgemein- und Viszeralchirurgie	unauffällig

Bei 11 Patienten (Proben 1 sowie 3 bis 12) konnte ein spezifischer Antikörper gegen Acridin nachgewiesen werden. Die geschätzte Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Acridin-Antikörpers liegt bei 0,11% (95 % Konfidenzintervall [0,06 %; 0,20 %]). Alle 11 Proben haben mit der Erstgenerationszelle reagiert. Vier Proben haben zusätzlich mit der Zweitgenerationszelle reagiert. Die bedingte Wahrscheinlichkeit einen Anti-Acridin-Antikörper mit der 2. Generationszelle zu finden wird auf 36,36 % (95 % Konfidenzintervall [10,93 %; 69,21 %]) geschätzt, unter der Annahme, dass mit der Erstgenerationszelle alle Anti-Acridin-AK gefunden wurden.

Bei einem Patienten (Probe 2) kam es zu einer positiven Reaktion ohne Nachweis eines Antikörpers gegen Acridin oder GSH. Die geschätzte Wahrscheinlichkeit für einen solchen Ak liegt bei 0,0001 %, (95% Konfidenzintervall [0,0003 %; 0,0576 %]). Hier kam es nur mit der 2. Generationszelle zu einer positiven Reaktion (siehe Abbildung 16).

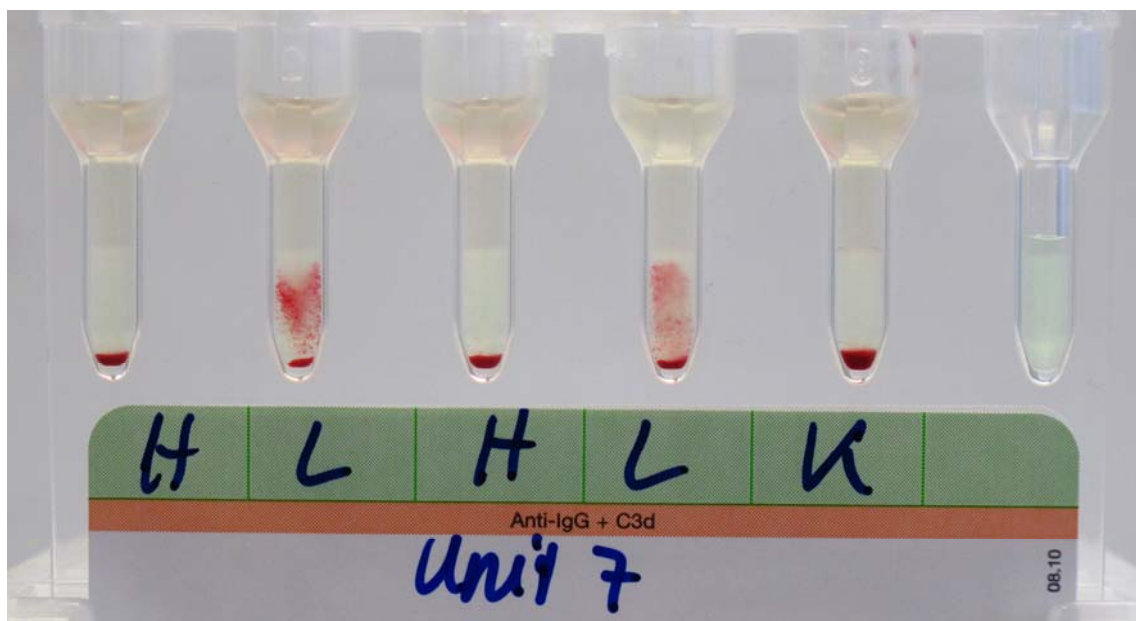


Abbildung 16: Probe 2 AKS mit Testzelle 7 High, Low und Control

3.4 Nachweis eines Antikörpers gegen S-303-behandelte Erythrozyten mit Erst- und Zweitgenerationszelle

Die folgende Testung der Sensitivität beruht auf der Annahme, dass mit Erst- und Zweitgenerationszelle alle Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten gefunden werden.

Mit der 1. Generationszelle konnten elf von insgesamt zwölf Antikörpern gegen PR-Erythrozyten entdeckt werden. Die Sensitivität, einen solchen AK mit der Erstgenerationszelle zu finden, wird auf 91,67 % (95 % Konfidenzintervall [61,52 %; 99,79 %]) geschätzt.

Mit der Zweitgenerationszelle konnten fünf von insgesamt zwölf Antikörpern gegen PR-Erythrozyten nachgewiesen werden. Die Sensitivität, einen solchen AK mit der Zweitgenerationszelle zu finden wird auf 41,67 % (95 % Konfidenzintervall [15,17 %; 72,33 %]) geschätzt.

Der Cohen's Kappa Koeffizient zeigt mit $\kappa = 0,59$ eine moderate Übereinstimmung zwischen Testung mit erster und zweiter Generation (95 % Konfidenzintervall [56,91 %; 60,67 %]). Die Übereinstimmung ist mit $p < 0,000001$ signifikant.

3.5 Charakterisierung der Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten

Der Titer der Anti-Acridin Antikörper mit Testzelle 7 High reicht von 2 bis 16. Bei Probe 4 zeigte sich z.B. ein Titer von 8 (siehe Abbildung 17). Bei Testung mit Testzelle 7 Low zeigt sich ein Titer von 4 bis 8. Der Antikörper unbekannter Spezifität weist einen Titer von 16 auf.

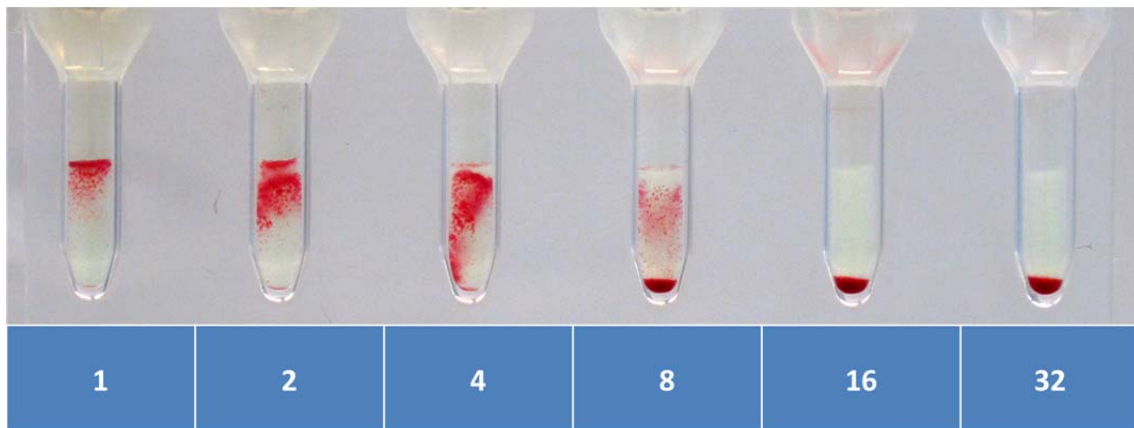


Abbildung 17: Probe 4, Titer mit Testzelle 7 High

Bei 10 Proben handelt es sich um IgG2- oder IgG4-Antikörper (siehe Abbildung 18). Bei einer Probe konnte ein IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Bei einer weiteren Probe konnte ein IgG1- oder IgG3-Antikörper nachgewiesen werden.

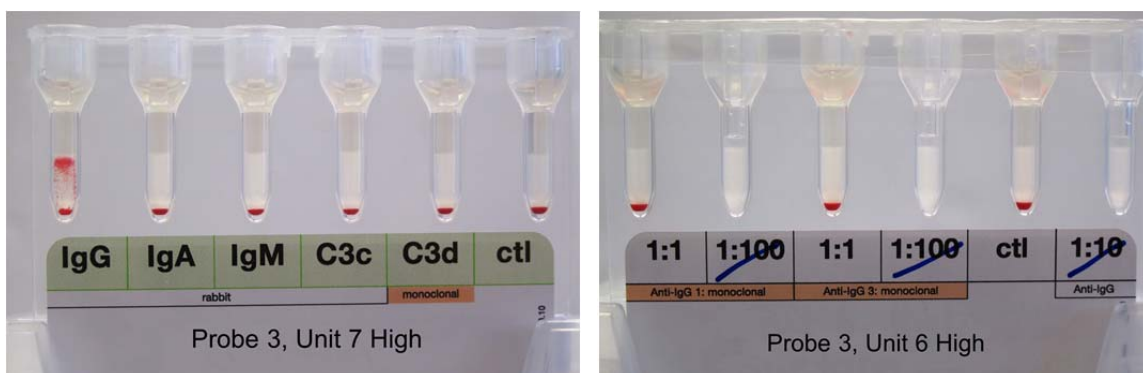


Abbildung 18: Nachweis eines IgG2- oder IgG4-Antikörpers bei Patientenprobe 3

Bei 37°C traten mit Zellen der ersten Generation die meisten positiven Reaktionen auf. Mit Zellen der zweiten Generation kommt es bei 20°C zu den meisten positiven Reaktionen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Eigenschaften der Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate

Probe	Spezifität	AK-Klasse	Titer		Temperaturreaktivität 1. Gen. (Titer)			Temperaturreaktivität 2. Gen. (Titer)		
			1. Gen.	2. Gen.	4°C	20°C	37°C	4°C	20°C	37°C
1	Acridin	IgG 2/4	4	0	4	4	2	0	0	0
2	unbekannt	IgG 2/4	0	16				*nt		
3	Acridin	IgG 2/4	4	0	0	2	2	0	0	0
4	Acridin	IgG 2/4	8	8	1	1	8	0	1	1
5	Acridin	IgG 2/4	1	0				*nt		
6	Acridin	IgG 2/4	4	4	0	0	2	0	0	0
7	Acridin	IgG 2/4	2	0	2	2	1	0	0	0
8	Acridin	IgG 1/3	2	0	0	1	1	0	1	0
9	Acridin	IgG 2/4	4	4	0	4	1	0	4	4
10	Acridin	IgM	16	0	2	4	4	1	1	0
11	Acridin	IgG 2/4	4	*nt (1++)	*nt (1+)	*nt (1+)	*nt (1+)	*nt (1+)	*nt (1+)	*nt (1+)
12	Acridin	IgG 2/4	4	0	1	1	1	0	0	0
Gesamtzahl positiver Ergebnisse	-	-	11	5	6	9	10	2	5	3

*nt= not tested = nicht getestet wegen zu wenig Material

Bei Untersuchung der Temperaturreaktivität ergab sich bei Probe 4 der Verdacht auf das Vorliegen von Kälte-AK, da der AKS bei 4°C ein positives Ergebnis mit der Kontrollzelle ergab. Durch Anwendung von RESt® der Firma Immucor konnte dieser Kälte-AK neutralisiert werden (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: AKS Probe 4 ohne/mit RESt®, Temperaturreaktivität anhand der Reaktionsstärke

	AKS mit	Temperatur		
		4°C	20°C	37°C
ohne RESt	1. Gen. Zelle	++++	++++	+++
	2. Gen. Zelle	++++	++++	+
	Kont. Zelle	++++	-	-
mit RESt	1. Gen. Zelle	+/-	++	
	2. Gen. Zelle	-	+	*nt
	Kont. Zelle	-	-	

*nt = not testes = nicht getestet

Die Dissoziation gibt Auskunft über die Affinität des Antikörpers zum Antigen. Je höher die Konzentration von S-300 bei der noch eine positive Reaktion im AKS auftritt, desto größer die Affinität des Antikörpers zum Antigen der Testzelle (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Dissoziation mit S-300

Probe	Testzelle	Konzentration von S-300 bei der noch eine positive Reaktion auftritt in mM	Konzentration von S-300 in mM								
			6	0,6	0,06	0,006	0,0006	0,00006	0,000006	0,0000006	
1	1. Gen.	6	+/-	+	+ -++	++	++				
2				*nt							*nt
3	1. Gen.	6×10^{-1}	-	+/-	++	+++	+++				*nt
4	1. Gen.	6×10^{-2}	-	-	+	++	++				*nt
5				*nt							
6	1. Gen.	6×10^{-4}	-	-	-	-	-		+		++
7	1. Gen.	6×10^{-4}	-	-	-	-	-		+		*nt
8				*nt							
9	2. Gen.	6×10^{-3}	-	-	-	+	+		++		*nt
10	1. Gen.	6×10^{-3}	-	-	-	+++	+++		+++		*nt
11				*nt							
12	1. Gen.	6×10^{-3}	-	-	-	+/-	+		+		*nt

*nt = nicht getestet

- = negativer AKS

+ - ++++ = positiver AKS (schwach-stark)

3.6 Ergebnisse mit enzymbehandelten Testzellen

Bei der Testung mit aufgetauten, deglycerolisierten in Diluent 2 aufgeschwemmten Testzellen, welche anschließend mit Diluent 1 (Bromelinhaltig) behandelt wurden, zeigten alle zehn getesteten Antikörperhaltigen Patientenproben ein negatives Ergebnis im AKS (siehe Tabelle 12). Zwei Patientenproben, welche mit S-303-behandelten Testzellen der ersten Generation ein positives Ergebnis aufwiesen, hatten mit den Testzellen nach PBS Zugabe ein negatives Ergebnis. Eine Patientenprobe, welche mit Testzellen der zweiten Generation ein positives Ergebnis im AKS hatte, wies nach Zugabe von PBS zu den Testzellen ein negatives Ergebnis auf.

Tabelle 12: AKS mit aufgetauten und anschließend enzymbehandelten Testzellen

Probe	1. Gen.			2. Gen.		
	Bromelin	PBS	S-303	Bromelin	PBS	S-303
1	0	+	+	0	0	0
2	*nt					
3	0	+	+	0	0	0
4	0	+	+	0	+	+
5	0	0	+	0	0	0
6	0	+	+	0	0	+
7	0	+	+	0	0	0
8	0	+	+	0	0	0
9	0	0	+	0	+	+
10	0	+	+	0	0	0
11	*nt					
12	0	+	+	0	0	0
Gesamtzahl	0	8	10	0	2	3

⊕ = AKS positiv

0 = AKS negativ

*nt= not tested = nicht getestet wegen zu wenig Material

Die Testzellen erster Generation, welche während der Produktion zuerst mit S-303 pathogenreduziert und anschließend mit ID Diluent 1 behandelt wurden, zeigten mit allen acht getesteten Anti-Acridin-haltigen Proben einen positiven AKS. Mit Testzellen, welche mit PBS anstatt von Bromelin behandelten wurden, hatten nur fünf Patientenproben ein positives Ergebnis im AKS. Mit Testzellen, welche mit S-303 pathogenreduziert, aber weder mit ID Diluent 1 noch mit PBS behandelten wurden, fiel der AKS mit alle acht Patientenproben positiv aus.

Mit Testzellen der zweiten Generation, welche während der Produktion zuerst mit S-303 und anschließend mit Bromelin behandelt wurden, kam es bei sechs der acht getesteten Patientenproben zu einem positiven Ergebnis. Mit der Kontrollgruppe kam es nur zu einem positiven Ergebnis. Die drei Patientenproben, welche mit Zweitgenerationszellen ohne PBS und Enzymbehandlung einen positiven AKS hatten, zeigten mit PBS behandelten Erythrozyten ein negatives Ergebnis.

Tabelle 13: Ergebnisse des AKS mit Bromelinbehandelten und anschließend pathogenreduzierten Erythrozyten

Probe	1. Gen. Zelle			2. Gen. Zelle		
	Bromelin + S-303	PBS + S-303	S-303**	Bromelin + S-303	PBS + S-303	S-303**
1	+	+	+	+	0	0
2		*nt			*nt	
3	+	+	+	+	0	0
4	+	+	+	+	0	+
5	+	+	+	0	0	0
6	+	+	+	+	0	+
7		0	+	+	0	0
8		*nt			*nt	
9	+	0	+	0	0	+
10		*nt			*nt	
11		*nt			*nt	
12	+	0	+	+	+	0

+ = positiver AKS 0 = negativer AKS

*nt= not tested = nicht getestet wegen zu wenig Material

** AKS mit Testzellen ohne Bromelin oder PBS Zugabe

Mit den Testzellen der ersten Generation, welche während der Produktion nach Zugabe von S-303 mit ID Diluent 1 behandelt wurden, zeigten fünf der acht getesteten Patientenproben ein positives Ergebnis.

Bei Testung mit der zweiten Generationszelle hatten zwei Proben, welche ohne Bromelinbehandlung ein negatives Ergebnis hatten, einen positiven AKS. Zwei weitere Proben, welche ohne Bromelinbehandlung ein positives Ergebnis hatten, wiesen ein negatives Ergebnis auf.

Tabelle 14: AKS mit S-303 pathogenreduzierten und anschließend Bromelinbehandelten Testzellen

Probe	1. Gen. Zelle		2. Gen. Zelle	
	S-303 + Bromelin	S-303	S-303 + Bromelin	S-303
1	0	+	0	0
2	*nt		*nt	
3	+	+	0	0
4	+	+	0	+
5	0	+	0	0
6	0	+	0	+
7	+	+	0	0
8	+	+	+	0
9	**nt		**nt	
10	*nt		*nt	
11	*nt		*nt	
12	+	+	+	0

+ = positiver AKS

0 = negativer AKS

*nt= not tested = nicht getestet wegen zu wenig Material

**nt= not tested = nicht getestet, da keine passende Testzelle vorhanden

4 Diskussion

4.1 Prävalenz der Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten

In dieser Studie wurden 9671 potentiell transfusionsbedürftigen Patienten, unabhängig von der Grunderkrankung, eingeschlossen. Bei 12 Patienten wurde ein Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate gefunden. Die geschätzte Wahrscheinlichkeit für einen solchen Antikörper ist mit 0,12 % (95 % Konfidenzintervall [0,06 %; 0,22 %]) gering.

Frühere Studien schlossen weniger Probanden ein. Bei 200 gesunden Blutspendern wurden zwei Proben gefunden, bei 186 potentiell transfusionsbedürftigen Patienten drei Proben, welche AK gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate haben könnten. Eine weitere Studie schloss 200 Blutspender und 800 chronisch transfusionsbedürftige Patienten ein. Es konnten drei Proben aus dem Patientenkollektiv mit Antikörpern gegen pathogenreduzierte Erythrozyten gefunden werden. ^{14,82,84}

4.2 Spezifität der Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten

Bei elf von zwölf Patienten konnten die Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten als Acridin-spezifische Antikörper identifiziert werden. Bei einem Patienten ist die Spezifität des Antikörpers unbekannt. Tests konnten zeigen, dass sich der Antikörper nur gegen die zweite Generation der S-303-behandelten Erythrozyten richtet, aber nicht spezifisch für Acridin oder GSH ist. Dieser Antikörper ohne Spezifität muss mit einem Antigen reagieren, welches im Rahmen der Pathogenreduktion mit dem Zweitgenerationsverfahren entstanden ist. Der AKS mit Testzellen der ersten Generation und mit Erythrozyten ohne S-303-Behandlung ist negativ.

Bekannt ist, dass S-303 nicht nur die Nucleinsäuren der DNA angreift, sondern auch mit anderen Nucleophilen z.B. mit Proteinen auf der Oberfläche der Erythrozyten reagiert. Eine Folge ist die Bindung von Acridin auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen. ¹⁴

Es könnte sich um unspezifische Reaktion von S-303 mit Oberflächenmerkmalen der Erythrozyten handeln. Da der AKS mit der Erstgenerationszelle negativ

ist, ist es unwahrscheinlich, dass das Antigen durch eine unspezifische Reaktion von S-303 mit Oberflächenmolekülen hervorgerufen wurde. Im Zweitgenerationsverfahren wurde die Konzentration von GSH erhöht, um die unspezifischen Reaktionen von S-303 zu reduzieren. Eine Neutralisation mit GSH zeigte sich jedoch ebenfalls negativ, sodass die Antikörper nicht spezifisch gegen GSH gerichtet sind.

Die geschätzte Wahrscheinlichkeit einen solchen Antikörper gegen die Zweitgenerationszelle zu haben ist mit 0,0001 %, (95% Konfidenzintervall [0,0003 %; 0,0576 %]) sehr gering.

Es handelt es sich um einen IgG-Antikörper der Subklasse 2 oder 4. Das Risiko für eine Hämolyse ist somit als gering einzuschätzen.^{2, 34,36,37}

4.3 Klinische Bedeutung der Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten

Bei den hier nachgewiesenen Antikörpern gegen Acridin handelt es sich überwiegend um niedrigtitrige IgG-Antikörper der Subklasse 2 oder 4. Es kann vermutet werden, dass eine geringe klinische Relevanz dieser natürlich präformierten AK gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate vorliegt. Das Temperaturoptimum liegt bei 37°C mit der Erstgenerationszelle. Der maximale Titer beträgt 16. Die klinische Relevanz der Antikörper ist typischerweise umso größer, je höher der Antikörpermenge und damit auch der Titer ist. Bei zehn von zwölf Patienten konnten IgG-Antikörper der Subklasse 2 oder 4 nachgewiesen werden. IgG4-Antikörper sind klinisch nicht relevant, da sie keine Hämolyse auslösen können. IgG2-Antikörper können das Komplementsystem schwach aktivieren und darüber eine intravasale Hämolyse auslösen. Bei einem Patienten konnte ein IgM-Antikörper, bei einem weiteren Patienten ein IgG1- oder IgG3-Antikörper nachgewiesen werden. Beide sind in der Lage, den Abbau von Erythrozyten zu aktivieren. Ein monocyte monolayer RBC phagocytic assay könnte noch weitere Hinweise für die klinische Relevanz dieser Antikörper ergeben. Wegen Materialmangel konnte die Untersuchung in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.^{2,34,36,37,115}

Die Dissoziation gibt Auskunft über die Affinität des Antikörpers zum Antigen. Der Antikörper wird an das Antigen auf der Testzelle gebunden. Im Anschluss

wird versucht, die Antikörper vom Antigen auf der Testzelle zu lösen, indem der Antikörper mit S-300 eine Bindung eingeht anstatt mit dem Antigen auf der Testzelle. Je höher die Konzentration von S-300, bei der noch gerade eine positive Reaktion im AKS auftritt, desto größer die Affinität des Antikörpers zum Antigen der Testzelle. Es stand eine maximale 6 mM osmolare Lösung von S-300 zur Verfügung. Eine Probe zeigte auch mit der 6 mM noch eine positive Reaktion. Alle weiteren Proben variierten zwischen einer 0,6-0,0006 osmolaren Lösung. Daraus lässt sich schließen, dass die Affinität des Antikörpers unterschiedlich sein kann.

4.4 Die Testerythrozyten

Die Testerythrozyten der ersten und zweiten Generation sowie die Kontrolltestzellen wurden in dieser Studie mit Glycerin vermischt und anschließend bei -80°C gefroren aufbewahrt. Zur Testung wurden die Zellen aufgetaut und deglycerolisiert. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Blutgruppenantigene durch den Pathogenreduktionsprozess sowie auch die Lagerung bei -80°C nicht beeinflusst werden. ¹¹⁶

Um sicher zu stellen, dass die Bindung von Acridin auf der Zelloberfläche der Testzellen durch Aufbewahrung bei -80°C stabil bleibt, erfolgte bei jedem Screeningdurchgang eine positive Kontrolle mit einem Monoklonalen Anti-Acridin-Antikörper. Eine positive Reaktion im AKS mit Testzellen und dem monoklonalen Anti-Acridin-AK bestätigt die Bindung von Acridin auf den Testerythrozyten.

In früheren Studien wurden die Testzellen der ersten und zweiten Generation sowie die Kontrolltestzellen im letzten Herstellungsschritt mit SAG-M vermischt und dann für 5 Tage 4°C aufbewahrt. ¹¹⁷

Nach unveröffentlichten Daten von Cerus, ist die Bindung von S-303 auf der Zelloberfläche nicht stabil, wenn die Erythrozyten bei 4°C aufbewahrt werden.

4.5 Das Testverfahren

Alle Proben wurden mit der Testzelle 7 der ersten und der zweiten Generation getestet. Initial positive Proben werden mit dieser Testzelle erster und zweiter Generation sowie mit Kontrollzellen im doppelten Ansatz manuell nachunter-

sucht. Bei Patienten mit irregulären Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Testzellen wird eine Testzelle ausgesucht, welche dieses Antigen nicht aufweist und der AKS wiederholt. Patienten mit panagglutinierenden Antikörpern, Kälte-AK oder Geldrollenbildung werden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Wenn der Verdacht auf einen Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate besteht, wird die Spezifität geklärt. Hier wird eine Neutralisation mit S-300 und/oder GSH durchgeführt.

Das Testverfahren früherer Studien wich von dem Verfahren in dieser Forschungsarbeit ab. In vorausgegangen Studien wurde mit drei Zellen getestet. Mit allen dieser drei Zellen wurden Testzellen der ersten Generation und der zweiten Generation sowie Kontrollzellen hergestellt. Ein Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate wurde nachgewiesen, wenn mit alle drei verschiedenen Testzellen erster oder zweiter Generation ein positiven AKS und mit den Kontrollzellen einen negativen AKS vorlag. Die Spezifität wurde nicht immer untersucht.^{14,82,84}

Im Vergleich zu vorherigen Arbeiten wurde in dem vorliegenden Forschungsvorhaben ein deutlich größeres Patientenkollektiv untersucht. Das Screening erfolgte nur mit einer Testzelle der ersten und zweiten Generation. Ein Screening mit insgesamt neun Testzellen, wie in früheren Studien, ist hier wegen des großen Patientenkollektives unverhältnismäßig aufwendig. In diese Studie wurden Proben, welche im initialen Screening ein positives Ergebnis haben, nachuntersucht. Stellte sich im Screening mit Erst- und Zweitgenerationszelle der Verdacht auf einen Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten, wurde der Versuch mit Erst- und Zweitgenerationszellen und Kontrollzellen im doppelten Ansatz wiederholt und die Spezifität des Antikörpers untersucht. Bei Patienten, welche irreguläre Antikörper gegen Blutgruppenmerkmale haben, wurde im Wiederholungsansatz eine Antigennegative Testzelle ausgesucht.

Mit der Gelkartentechnik wurde eine Methode verwendet, welche auch in täglichen Routineuntersuchungen eingesetzt wird und bezüglich der Empfindlichkeit den Mindeststandard erfüllt. Die Rate falsch negativer Patientenproben beim Screening mit nur einer Testzelle sollte somit gering sein. Zudem ist eine Testung auf einen spezifischen Antikörper mit mehreren Testzellen für den Alltag,

die die Untersuchung vieler Patientenproben erfordern würde, weniger geeignet.⁸⁸

In der Immunhämatologie gilt grundsätzlich, dass Erythrozyten mit einer höheren Antigendichte eine höhere Sensitivität in der Detektion des entsprechenden Antikörpers haben. Patienten können niedrigtitrige Antikörper gegen ein Blutgruppenantigen besitzen. Bei Antigen-Kontakt im Rahmen einer Transfusion können niedrigtitrige Antikörper geboostert werden und dadurch eine Hämolyse einleiten. Niedrigtitrige Antikörper können besser mit einer Testzelle mit hoher Dichte des entsprechenden Antigens entdeckt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Antikörper auf sein Antigen trifft wird dadurch erhöht.^{10,88,97}

In dieser Studie wurden zwölf Patientenproben mit Antikörpern gegen pathogenreduzierte Erythrozyten gefunden. Alle Proben der zwölf Patienten hatten immer ein positives Ergebnis im AKS der Screeninguntersuchung (siehe Seite 53). Dies spricht für eine hohe Sensitivität dieses Testverfahrens. Mit der Erstgenerationszelle konnten elf der zwölf Antikörper und alle Antikörper gegen Acridin gefunden werden. Mit der Zweitgenerationszelle konnten fünf Anti-Acridin-AK und ein Antikörper unklarer Spezifität gegen pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate der zweiten Generation gefunden werden. Das Screening mit der Erstgenerationszelle ist sensitiver für einen Anti-Acridin-AK. Als Ursache dafür kommt am ehesten die höhere Antigendichte im Vergleich zur Zweitgenerationszelle in Betracht. Bei einem Patienten konnte ein Antikörper unbekannter Spezifität nachgewiesen werden, welcher jedoch nur eine positive Reaktion mit der Zweitgenerationszelle auslöste. Der AKS vor einer möglichen Transfusion sollte mit der Erstgenerationszelle und der Zweitgenerationszelle erfolgen, auch wenn nur Erythrozytenkonzentrate transfundiert werden, welche nach dem Zweitgenerationsverfahren pathogenreduziert wurden. Die Erstgenerationszelle weist, wegen der höheren Antigendichte, eine höhere Sensitivität in der Detektion von Anti-Acridin-Antikörpern auf. Mit der Erstgenerationszelle können deshalb auch niedrigtitrige Antikörper entdeckt werden, welche mit der Zweitgenerationszelle eventuell nicht nachweisbar sind. Wenn mit der Erstgenerationszelle Anti-Acridin-AK nachgewiesen werden, mit der Zweitgenerationszelle jedoch nicht, sollten trotzdem keine S-303-behandelten Erythrozytenkonzentrate transfundiert werden. Bei Antigen-Kontakt können niedrigtitrige An-

tikörper geboostert werden und dadurch eine Hämolyse einleiten. Durch Testung mit der Erstgenerationszelle kann die Nachweisgrenze der Anti-Acridin-Antikörper gesenkt werden. Trotzdem sollte bedacht werden, dass auch mit der Erstgenerationszelle sehr niedrigtitrige Antikörper unterhalb der Nachweisgrenze liegen können. Eine geringe Anzahl falsch negativer Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden.

Proben von Patienten mit panagglutinierenden Antikörpern, Kälteagglutininen oder Geldrollenbildung wurden in dieser Studie nicht weiter untersucht. Eine Agglutination kann nicht eindeutig auf eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit Antikörpern gegen PR-EKs interpretiert werden. Die Agglutination kann auch durch panagglutinierende AK, Auto-AK oder Geldrollenbildung ausgelöst werden. Um zusätzliche Antikörper auszuschließen, stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Das Standardvorgehen ist, Methoden zu benutzen, die durch Auto-AK weniger gestört werden. Darüber hinaus existieren Adsorptionsverfahren für panagglutinierende AK. Kälteagglutinine z.B. können mit Kaninchenerythrozytenstroma (RESt®) absorbiert werden (siehe Kapitel 462.2.7.5 Kälteagglutinine, Seite 46). Diese Methoden sind sehr zeitintensiv, da die Absorption häufig mehrmals wiederholt werden muss. Das Verfahren wird daher auch nicht in allen immunhämatologischen Laboren angewendet.^{88,99,102,111,112}

In der vorliegenden Forschungsarbeit, welche das Screening einer großen Kohorte beinhaltet, wurde daher auf Adsorptionsverfahren verzichtet und Patienten mit Auto-AK von der Studie ausgeschlossen. Vor Transfusion von S-303-behandelten Erythrozytenkonzentraten stehen aber entsprechende Methoden zur Verfügung, um das Vorliegen eines durch Auto-AK maskierten Antikörpers gegen pathogenreduzierte Erythrozyten zu untersuchen.

4.6 Statistische Auswertung zur Testung mit Erst- und Zweitgenerationszelle

Die Sensitivität, Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten mit der Erstgenerationszelle zu finden, ist höher als mit der Zweitgenerationszelle. Die Sensitivität wird mit der ersten Generationszelle auf 91,67 % (95 % Konfidenzintervall [61,52 %; 99,79 %]) und mit der 2. Generationszelle auf 41,67 % (95 % Konfidenzintervall [15,17 %; 72,33 %]) geschätzt. Wegen der geringen Fallzahlen ist die Länge des Konfidenzintervalls sehr groß. Der Cohen's Kappa Koeffizient zeigt mit $\kappa = 0,59$ eine moderate Übereinstimmung zwischen Testung mit erster und zweiter Generation (95 % Konfidenzintervall [56,91 %; 60,67 %]) ($p < 0,000001$).

Um sicher zu gehen, dass möglichst viele Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten gefunden werden, sollte immer eine Testung mit Erst- und Zweitgenerationszelle erfolgen. Aus dem experimentellen Teil der Arbeit ist erkennbar, dass ein Anti-Acridin-AK am besten mit der Erstgenerationszelle gefunden wird. Alle elf Proben mit Anti-Acridin-AK haben mit der Erstgenerationszelle reagiert, aber nur vier Proben zeigten zusätzlich mit der Zweitgenerationszelle ein positives Ergebnis. Ein Patient (Probe zwei) zeigte eine positive Reaktion ohne Nachweis eines Antikörpers gegen Acridin oder GSH. Hier kam es nur mit der Zweitgenerationszelle zu einer positiven Reaktion.

4.7 Ursache der Antikörper gegen pathogenreduzierte Erythrozyten

In klinischen Phase-III-Studien mit akut und chronisch transfusionsbedürftigen Patienten konnten Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate bei Patienten, welche kein S-303-behandelten Erythrozytenkonzentrate erhielten, und bei Patienten, nach der Transfusion S-303-behandelter Erythrozytenkonzentrate nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass es natürlich präformierte und immun-induzierte Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate gibt.^{14, 78,79}

Diese Arbeit bezieht sich auf natürlich präformierte Antikörper. Die Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, haben zuvor keine S-303 pathogenreduzierten Erythrozytenkonzentrate erhalten.

Natürlich präformierte Antikörper sind in der Regel polyspezifische kältereaktive IgM-Antikörper, seltener auch IgG- oder IgA-Antikörper.¹⁷

In der vorliegenden Forschungsstudie wurden überwiegend IgG-Antikörper, spezifisch gegen Acridin, nachgewiesen. Es könnte es sich auch um Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen strukturell ähnliche Antigene handeln oder die Patienten hatten zuvor Kontakt mit anderen Acridin haltigen Produkten.

Immun-induzierte Antikörper werden erst im Rahmen einer Transfusion von S-303-behandelten Erythrozytenkonzentraten gebildet. Diese Antikörper lösten bei den Patienten der klinischen Phase III Studie mit Testzellen der ersten Generation keine Hämolyse aus. Das Auftreten und die Bedeutung solcher immun-induzierter Antikörper muss noch genauer untersucht werden. Eine Phase III Studie mit pathogenreduzierten Erythrozyten der zweiten Generation, welche 51 kardiochirurgischen Patienten einschloss, zeigte, dass bis 90 Tage nach Transfusion keine Acridin spezifischen Antikörper gebildet wurden. Diese Arbeit bestätigt, dass bei reduzierter Antigendichte das Immunisierungsrisiko sinkt. Größere klinische Phase III Studien mit S-303 pathogenreduzierten Erythrozytenkonzentraten der zweiten Generation können nun geplant werden.^{14,78–80}

4.8 Enzymbehandlung der Testzellen mit Bromelin

Bromelin ist eine Cystein-Endopeptidase. Mit einer Enzymbehandlung werden Polypeptidketten auf der Oberfläche der Erythrozyten verändert.^{1,23}

Mit der Enzymbehandlung der S-303-behandelten Testzellen wurde untersucht, wie sich die Oberfläche dieser Erythrozyten durch eine Behandlung mit Bromelin verändert und welche Auswirkungen es auf die Exprimierung von Acridin auf der Zelloberfläche hat.

Der Antikörpersuchtest wurde mit Anti-Acridin-AK-haltigen Patientenproben und enzymbehandelten Testzellen durchgeführt. Ein erster Versuch ist die Enzymbehandlung aufgetauter deglycerolisierter Testzellen. Der AKS mit diesen Testzellen ist mit allen zehn getesteten Anti-Acridin-haltigen Proben negativ. Man kann vermuten, dass die Oberfläche der Erythrozyten durch Enzymbehandlung so verändert wurde, dass der Anti-Acridin Antikörper nicht mehr an sein Antigen binden konnte.

Nach Zugabe von PBS zeigten drei Patientenproben, welche zuvor ein positives Ergebnis hatten, ein negatives AKS. Dies kann durch den Verdünnungseffekt erklärt werden.

Weitere Versuche wurden mit Testzellen durchgeführt, welche während der Herstellung mit Bromelin behandelt wurden.

Testzellen der ersten Generation welche vor Zugabe von S-303 mit Bromelin behandelten wurden, zeigten mit allen acht Anti-Acridin Proben einen positiven AKS. Allerdings kam es in der Kontrollgruppe (PBS statt Bromelin) nur mit fünf Anti-Acridin Proben zu einem positiven AKS. Mit Testzellen erster Generation ohne Bromelin oder PBS Behandlung kam es mit allen acht Proben zu einem positiven AKS.

Mit diesen enzymbehandelten Testzellen der zweiten Generation zeigten sechs Proben einen positiven AKS, während in der Kontrollgruppe (PBS statt Bromelin) nur mit einer Probe eine positiver AKS ausgelöst wurde. Mit Testzellen der zweiten Generation ohne Bromelin oder PBS Behandlung kam es mit drei der acht Proben, zu einem positiven AKS. Alle drei Proben zeigten mit PBS ein negatives Ergebnis. Drei Proben, welche mit Testzellen ohne Bromelin/PBS Behandlung ein negatives Ergebnis aufwiesen, verzeichneten ein positives Ergebnis bei Verwendung von Bromelin behandelten Testzellen.

Insgesamt bleiben noch zahlreiche Fragen offen. Warum gibt es unterschiedliche Ergebnisse beim AKS mit PBS behandelten Testzellen und Testzellen ohne Bromelin/PBS? Sind PBS behandelte Testzellen als Kontrollgruppe zum Vergleich mit Bromelin behandelten Testzellen geeignet? Besteht eine Möglichkeit, dass auch PBS die Oberfläche der Erythrozyten verändert oder liegt eventuell ein Fehler im Herstellungsprozess vor?

Bei Testzellen der ersten Generation, welche nach Zugabe von S-303 mit Bromelin behandelt wurden, kam es mit fünf Anti-Acridin haltigen Patientenproben zu einem positiven AKS. Mit Testzellen der ersten Generation ohne Bromelin und ohne PBS Behandlung reagierten alle acht Proben mit einem positiven AKS. Mit enzymbehandelten Testzellen der zweiten Generation zeigten zwei Proben einen negativen AKS, welche mit Testzellen ohne Bromelin/PBS einen

positiven AKS hatten. Allerdings hatten auch zwei weitere Proben einen positiven AKS, welche mit Testzellen ohne Bromelin/PBS einen negativen AKS aufwiesen.

Auch hier bleiben noch viele Fragen unbeantwortet: Kann man an der Vermutung festhalten, dass durch eine anschließende Enzymbehandlung mit Bromelin die Exprimierung von Acridin auf den S-303-behandelten Erythrozyten reduziert wird? Warum reagieren mit S-303 pathogenreduzierten und anschließend Bromelinbehandelten Testzellen 2. Generation zwei Patientenproben, welche zuvor nicht reagiert haben?

Insgesamt lässt sich anhand dieser Testergebnisse kein genauer Zusammenhang zwischen Bromelin-behandelten Testzellen und der Bindung von Acridin auf den Testzellen erschließen. Die Kontrollgruppe mit PBS behandelten Testzellen ist zur Auswertung nicht geeignet, da die Ergebnisse des AKS im Vergleich mit Testzellen ohne Bromelin/PBS Behandlung stark variieren. Mit pathogenreduzierten und zuvor wie auch mit anschließend Bromelin behandelten Zweitgenerationstestzellen zeigte sich mit einigen Patientenproben eine Zunahme der Reaktivität mit anderen Patientenproben eine Abnahme der Reaktivität im AKS. Mit pathogenreduzierten und anschließend Bromelin behandelten Testzellen erster Generation zeigte sich jedoch bei drei Patientenproben ein negativer AKS, mit Testzellen ohne Bromelin-Behandlung jedoch ein positives Ergebnis. Allerdings lässt sich auch hier weiterhin nur vermuten, ob man diese verminderte Reaktivität auf eine verminderte Acridin-Bindung wegen der Enzymbehandlung zurückführen kann.

Zudem können S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate, welche anschließend mit Bromelin behandelt werden, aktuell noch nicht transfundiert werden.

4.9 Sonstiges

In dieser Forschungsarbeit wurden ausschließlich Restproben verwertet. Da bei einigen Patientenproben nur wenig Restmaterial zur Verfügung stand, konnten nicht alle Versuche durchgeführt werden.

Es wurden elf verschiedene Testzellen hergestellt, um Testzellen mit unterschiedlichen Blutgruppenmerkmalen zur Verfügung zu haben. Die Screening-

Untersuchung wurde mit Testzelle sieben durchgeführt. Alle weiteren Analysen wurden mit unterschiedlichen Testzellen durchgeführt.

4.10 Schlussfolgerung

Natürlich präformierte Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate sind selten. Die Testung auf Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate sollte mit der Erst- und Zweitgenerationszelle erfolgen, auch wenn ausschließlich Erythrozytenkonzentrate transfundiert werden, welche mit nach dem Zweitgenerationsverfahren hergestellt wurden. Auf der Oberfläche der Erstgenerationszelle ist mehr Acridin gebunden. Die Sensitivität für den Nachweis eines Anti-Acridin-AK ist mit der Erstgenerationszelle höher als mit der Zweitgenerationszelle. Mit Zweitgenerationszelle sollte ergänzend getestet werden, da Antikörper unbekannter Spezifität nachgewiesen wurden, welche ausschließlich mit der Zweitgenerationszelle reagieren. Eine Transfusion von pathogenreduzierten Erythrozytenkonzentraten sollte grundsätzlich nur erfolgen, wenn mit beiden Testzellen kein Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate nachgewiesen werden konnte.

In dieser Arbeit konnten bei zwölf Patienten ein Anti-Acridin-Antikörper nachgewiesen werden. Es handelt sich überwiegend um niedrigtitrige IgG-Antikörper vom Subtyp 2 oder 4. Ich vermute daher eine geringe klinische Relevanz von natürlich präformierten Antikörpern gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate.

In klinische Studien mit S-303-behandelten Erythrozytenkonzentraten sollten Patienten mit natürlich präformierten Antikörpern gegen S-303-behandelte Erythrozyten ausgeschlossen werden. Zudem wäre es sehr hilfreich, die Antikörper hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung weiter zu charakterisieren.

Für den Fall, dass es zur Anwendung von S-303-behandelten Erythrozytenkonzentraten als Standardpräparat im Alltag kommt, ist es ratsam, Patienten mit einem Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate möglichst mit konventionellen Erythrozytenkonzentraten zu versorgen. Stehen keine konventionellen Erythrozytenkonzentrate zur Verfügung, sollte das am wenigsten inkompatible Erythrozytenkonzentrat transfundiert werden, sofern die Antikörper keine klinische Bedeutung haben. Ein Verfahren um die Acridin Komponente

auf den roten Blutkörperchen zu entfernen, z.B. durch Enzymbehandlung, könnte in Zukunft noch entwickelt werden.

3 Zusammenfassung

Mit S-303 pathogenreduzierten Erythrozytenkonzentraten können sowohl infektiöse also auch nicht-infektiöse Risiken einer Transfusionen möglicherweise weiter reduziert werden. Frühere Studien mussten abgebrochen werden, da Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozyten festgestellt wurden. S-303 reagiert als unerwünschten Nebeneffekt auch mit Oberflächenmolekülen der roten Blutkörperchen. Dabei wird die Acridin-Komponente von S-303 auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen gebunden. Gegen diese Acridin-Komponente können nach Transfusion von pathogenreduzierten EK immuninduzierte AK gebildet werden. Es existieren aber auch natürlich präformierte AK gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate. Das Verfahren wurde modifiziert, indem der Anteil von GSH erhöht wurde. Dadurch wird vermehrt S-303 im Extrazellulärraum abgefangen und weniger Acridin auf der Oberfläche der Erythrozyten gebunden.

In dieser Studie wurden 9671 potentiell transfusionsbedürftigen Patienten auf einen natürlich präformierten Antikörper gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate untersucht. Diese Patienten hatten zuvor noch keine S-303-behandelten Erythrozytenkonzentrate erhalten. Es wurden Testzellen von Blutspendern der Blutgruppe 0 hergestellt. Aus jedem EK wurden drei unterschiedliche Testzellen hergestellt (Erstgenerationszellen, Zweitgenerationszellen, Kontrollzellen). Das Screening erfolgte mittels IAT in Gelkartentechnik mit einer Testzelle der ersten und zweiten Generation. Die Antikörper wurden weiter charakterisiert bezüglich Spezifität, Titer, Antikörperklasse und –subklasse, Affinität und Temperaturreaktivität.

Bei zwölf Patienten konnte ein AK gegen S-303 pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate nachgewiesen werden und somit konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz eines solchen Antikörpers gering ist. Bei elf Patienten handelt es sich um einen Anti-Acridin-AK. Alle elf Patienten hatten immer einen positiven AKS mit der Erstgenerationszelle, jedoch nicht mit der Zweitgenerationszelle. Die Sensitivität, einen AK gegen Acridin mit der Erstgenerationszelle zu finden, ist höher als mit der Zweitgenerationszelle. Die Erstgenerationszelle hat auf ihrer Oberfläche mehr Acridin gebunden als die Zweitgenerationszelle. Bei einem Patienten konnte ein AK unbekannter Spezifität nachgewiesen werden,

welcher jedoch ausschließlich mit der Zweitgenerationszelle reagierte. Vor einer möglichen Transfusion von S-303 pathogenreduzierten Erythrozytenkonzentraten wird empfohlen immer eine Testung auf Antikörper gegen Testzellen der ersten und der zweiten Generation durchzuführen. Eine Transfusion sollte grundsätzlich nur erfolgen, wenn weder ein AK gegen die Erstgenerationszelle noch gegen die Zweitgenerationszelle nachgewiesen wurde. Insgesamt handelt es sich überwiegend um niedrigtitrige IgG-AK der Subklasse 2 oder 4. Es lässt sich daher vermuten, dass natürlich präformierten AK gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate nur eine geringe klinische Relevanz haben.

Eine klinischen Studie mit 51 kardiochirurgischen Patienten zeigte, dass nach Transfusion von pathogenreduzierten Erythrozytenkonzentrat der zweiten Generation keine immuninduzierten Antikörper gebildet wurden. Somit ist davon auszugehen, dass die Zweitgenerationszelle wegen der geringen Expression von Acridin auf der Zelloberfläche weniger immunogen ist als die Erstgenerationszelle. Klinische Studien mit einer größeren Anzahl an Patienten können nun grundsätzlich geplant werden.

Generell sollten Patienten mit natürlich präformierten Antikörpern gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate keine pathogenreduzierten Erythrozytenkonzentrate erhalten. Patienten, welche nach Transfusion von S-303-behandelten Erythrozytenkonzentrat AK gegen die pathogenreduzierten Erythrozyten gebildet haben, sollten regelmäßig nachuntersucht werden, um eine Hämolyse frühzeitig zu entdecken.

3.1 Summary

Pathogen reduction of blood products offers the possibility to reduce transfusion transmitted infectious risks. The pathogen reduction system for red blood cells uses S-303 and GSH. In previous clinical studies a small proportion of patients developed antibodies against cell-bound acridine adducts. S-303 may react with surface membrane proteins of red blood cells' resulting in cell-bound acridine adducts. Due to an immune response after transfusion of S-303-treated RBC antibodies might be formed against acridine. Immunoreactivity may also be induced by naturally occurring antibodies to S-303-treated RBC. In order to reduce immune reactivity a second generation pathogen reduction process was developed. The amount of GSH was increased. GSH quenches extracellular reactions of S-303 and the amount of cell-bound acridine is reduced.

In this study 9671 Patients potentially in need of a blood transfusion were tested against naturally occurring antibodies to S-303 treated RBC. These Patients did not receive any S-303-treated red blood cells before testing. Cell panels were prepared from group 0 units. Three different test cells were prepared from each unit (first generation process, second generation process, untreated control cells). Patient samples were screened against first and second generation S-303-treated RBC's. This serological screening was performed by IAT in a gel card. Clinical significance was estimated by testing the antibody specificity, antibody titer, antibody type and subtype, antibody affinity and thermal amplitude.

Twelve patient samples out of 9671 demonstrated pre-existing reactivity to S-303-treated RBCs implying that the incidence of naturally occurring antibodies to S-303-treated RBCs is low. Eleven out of twelve patients demonstrated antibodies formed against acridine. All samples containing an anti-acridine antibody demonstrated a positive response with the first generation of S-303-treated RBC, but not with the second generation. Compared with the second generation of S-303-treated RBC, the first generation test cell is more sensitive in identifying an anti-acridine antibody due to a higher amount of RBC bound acridine. One patient demonstrated only reactivity to second generation S-303-treated RBCs. Specificity of this antibody has not been able to be identified. This antibody is not formed against acridine or GSH. In case of a possible transfusion of S-303-treated RBC an IAT should be performed with first and second genera-

tion pathogen reduced RBC. In general blood transfusion should only be given if there are no antibodies against first and second generation S-303-treated RBC identified. In total there were mainly warm-reactive low-titer IgG2 or IgG4 antibodies detected. It can be presumed, that naturally occurring antibodies to S-303 treated RBC may have a low risk for antibody-mediated red cell destruction and therefore a low clinical significance.

A clinical trial including 51 patients undergoing cardiac surgeries demonstrated no reactivity with S-303 treated RBCs after transfusion of second generation pathogenreduced erythrocytes. It is to be expected that second generation S-303-treated RBCs are less immunogenic than first generations cells because of the minimized amount of RBC-bound acridine. Larger clinical trials may be planed now.

Patient with naturally occurring antibodies to S-303-treated RBCs should not receive pathogenreduced red blood components in general. Patients developing antibodies to S-303-treated RBCs after transfusion should be examined for signs a hemolysis.

4 Literaturverzeichnis

1. Fernandes HP, Cesar CL, Barjas-Castro, Maria de Lourdes. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2011;33(4):297-301. doi:10.5581/1516-8484.20110080.
2. Garratty G. The James Blundell Award Lecture 2007: Do we really understand immune red cell destruction? *Transfusion Medicine.* 2008;18(6):321-334. doi:10.1111/j.1365-3148.2008.00891.x.
3. Laughunn A, Santa Maria F, Broult J, Lanteri MC. Amustaline (S303) treatment inactivates high levels of Zika virus in red blood cell components. *Transfusion.* 2017;57:779-789.
4. Gerber B, Schanz U, Stüssi G. Autoimmunhämolytische Anämien. *Therapeutische Umschau. Revue thérapeutique.* 2010;67(5):229-236. doi:10.1024/0040-5930/a000042.
5. Steffen P, Verdier C, Wagner C. Quantification of Depletion-Induced Adhesion of Red Blood Cells. *Phys. Rev. Lett.* 2013;110(1):18102. doi:10.1103/PhysRevLett.110.018102.
6. International Society of Blood Transfusion. *Table of blood group antigens;* 2018.
http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/Table_of_blood_group_antigens_within_system_s_v7_180207.pdf.
7. Perkins HA, Busch MP. Transfusion-associated infections: 50 years of relentless challenges and remarkable progress. *Transfusion.* 2010;50(10):2080-2099. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02851.x.
8. Zou S, Dorsey KA, Notari EP, et al. Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing. *Transfusion.* 2010;50(7):1495-1504. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02622.x.
9. Zou S, Stramer SL, Notari EP, et al. Current incidence and residual risk of hepatitis B infection among blood donors in the United States. *Transfusion.* 2009;49(8):1609-1620. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02195.x.
10. Müller MM, Geisen C, Zacharowski K, Tonn T, Seifried E. Transfusion of Packed Red Cells: Indications, Triggers and Adverse Events. *Deutsches Arzteblatt international.* 2015;112(29-30):507-17; quiz 518. doi:10.3238/arztebl.2015.0507.
11. Mufti NA, Erickson AC, North AK, et al. Treatment of whole blood (WB) and red blood cells (RBC) with S-303 inactivates pathogens and retains in vitro quality of stored RBC. *Biologicals.* 2010;38(1):14-19. doi:10.1016/j.biologicals.2009.10.019.
12. Cancelas JA, Dumont L, Herschel L, et al. A randomized, controlled, 2-period crossover study of recovery and lifespan of radiolabeled autologous 35-day old red blood cells with a modified S 303 treatment for pathogen inactivation. *Vox sanguinis.* 2008:8-9.
13. Cancelas JA, Rugg N, Dumont LJ, et al. Comprehensive evaluation of a new process for S-303 pathogen-inactivation of red blood cells. *Transfusion.* 2010:9A-10A.

14. Henschler R, Seifried E, Mufti N. Development of the S-303 Pathogen Inactivation Technology for Red Blood Cell Concentrates. *Transfus Med Hemother*. 2011;38(1):33-42. doi:10.1159/000324458.
15. Arndt-Hanser A. *Coombs-Fibel: Der Antihumanglobulintest (Coombstest)*. 6th ed. Dreieich: BIOTEST; 1990.
16. Biochemie. *Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
17. Singbartl G, Walther-Wenke G. *Transfusionspraxis: Basiswissen Blutgruppenserologie*: Springer; 2014.
18. Madison Area Technical College. Blood bank antigens and antibodies. http://faculty.madisoncollege.edu/mljensen/BloodBank/lectures/blood_bank_antigens_and_antibodi.htm. Accessed July 18, 2018.
19. Pollack W, Reckel RP. A Reappraisal of the Forces Involved in Hemagglutination. *Int Archs Allergy Appl Immun*. 1977;54(1):29-42.
20. Eylar EH, Madoff MA, Brody OV, Oncley JL. The Contribution of Sialic Acid to the Surface Charge of the Erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*. 1962;237(6):1992-2000.
21. van Oss CJ, Absolom DR. Zeta Potentials, van der Waals Forces and Hemagglutination. *Vox Sang*. 1983;44:183-190.
22. Coombs, R. R. A., Mourant AE, Race RR. A new test for the detection of weak and 'incomplete' Rh agglutinins. *The British Journal of Experimental Pathology*. 1945;(26(4)):255-266.
23. Pirofsky B, Mangum, Melvin E. Jr. Use of Bromelin to Demonstrate Antibodies. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1959;101(1):49-52.
24. Löw B, Messeter L. Antiglobulin Test in Low-Ionic Strength Salt Solution for Rapid Antibody Screening and Cross-Matching. *Vox Sang*. 1974;26:53-61.
25. Moore HC, Mollison PL. Use of a Low Ionic Strength Medium in Manual Tests for Antibody Detection. *Transfusion*. 1976;16(4):291-296.
26. Kiefel V, ed. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. 4th ed.: Springer; 2010.
27. Eckstein R, Zimmermann R. *Immunhämatologie und Transfusionsmedizin*. 6th ed. München: Urban & Fischer; 2010.
28. Arndt P, Garratty G, Isaak E, Bolger M, Lu Q. Positive direct and indirect antiglobulin tests associated with oxaliplatin can be due to drug antibody and/or drug-induced nonimmunologic protein adsorption. *Transfusion*. 2009;49(4):711-718. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.02028.x.
29. Leger RM, Arndt PA, Garratty G. Serological studies of piperacillin antibodies. *Transfusion*. 2008;48(11):2429-2434. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01852.x.
30. Panda S, Ding JL. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2015;194(1):13-20. doi:10.4049/jimmunol.1400844.
31. Sedykh MA, Buneva VN, Nevinsky GA. Polyreactivity of natural antibodies: exchange by HL-fragments. *Biochemistry. Biokhimiia*. 2013;78(12):1305-1320. doi:10.1134/S0006297913120018.
32. Jarossay A, Hadzhieva M, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, Dimitrov JD. Natural and Induced Antibody Polyreactivity. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2015;15(10):1230-1241.
33. Bocci, V. Determinants of erythrocyte ageing: a reappraisal.: 1981 Aug;48(4):515-22. *British Journal of Haematology*. 1981;48(4):515-522.

34. Flegel WA. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis. *Transfusion*. 2015;55(S2):S47-S58. doi:10.1111/trf.13147.
35. LoBuglio AF, Cotran RS, Jandl J. Red Cells Coated with Immunoglobulin G Binding and Sphering by Mononuclear Cells in Man: Dec 22;158(3808):1582-5. *Science*. 1967;158(3808):1582-1585.
36. Hunt JS, Beck ML, Hardmann J, Tegtmeier GE, Bayer WL. Characterization of Human Erythrocyte Alloantibodies by IgG Subclass and Monocyte Interaction. *Am J Clin Pathol*. 1980;74(3):259-264.
37. Abramson N, Schur PH. The IgG Subclasses of Red Cell Antibodies and Relationship to Monocyte Binding. *Blood*. 1972;40(4):500-508.
38. Chambers RW, Foley HT, Schmidt PJ. Transmission of Syphilis by Fresh Blood Components. *Transfusion*. 1969;9(1):32-34.
39. Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox sanguinis*. 2006;90(2):77-84. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00733.x.
40. Spencer B, Steele W, Custer B, et al. Risk for malaria in United States donors deferred for travel to malaria-endemic areas. *Transfusion*. 2009;49(11):2335-2345. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02290.x.
41. Gubernot DM, Nakhasi HL, Mied PA, Asher DM, Epstein JS, Kumar S. Transfusion-transmitted babesiosis in the United States: summary of a workshop. *Transfusion*. 2009;49(12):2759-2771. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02429.x.
42. Leiby DA. Babesiosis and blood transfusion: flying under the radar. *Vox Sang*. 2006;90(3):157-165. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00740.x.
43. Mintz ED, Anderson JF, Cable RG, Hadler JL. Transfusion-transmitted babesiosis: a case report from a new endemic area. *Transfusion*. 1991;31(4):365-368.
44. Young C, Losikoff P, Chawla A, Glasser L, Forman E. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion*. 2007;47(3):540-544. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.01147.x.
45. Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*. 1991;31(6):547-557.
46. Agapova M, Busch MP, Custer B. Cost-effectiveness of screening the US blood supply for *Trypanosoma cruzi*. *Transfusion*. 2010;50(10):2220-2232. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02686.x.
47. Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox sanguinis*. 2006;91(3):221-230. doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00833.x.
48. Turner ML, Ludlam CA. An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood and plasma products. *British Journal of Haematology*. 2009;144(1):14-23. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07376.x.
49. Gregori L, McCombie N, Palmer D, et al. Effectiveness of leucoreduction for removal of infectivity of transmissible spongiform encephalopathies from blood. *Lancet (London, England)*. 2004;364(9433):529-531. doi:10.1016/S0140-6736(04)16812-8.
50. Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, et al. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion*. 2001;41(12):1493-1499.

51. Bruneau C, Perez P, Chassaigne M, et al. Efficacy of a new collection procedure for preventing bacterial contamination of whole-blood donations. *Transfusion*. 2001;41(1):74-81.
52. Politis C, Wiersum JC, Richardson C, et al. The International Haemovigilance Network Database for the Surveillance of Adverse Reactions and Events in Donors and Recipients of Blood Components: technical issues and results. *Vox Sang*. 2016. doi:10.1111/vox.12447.
53. Domen RE, Hoeltge, G. A. Allergic Transfusion Reactions: An Evaluation of 273 Consecutive Reactions. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2003;127(3):316-320.
54. Rajesh K, Harsh S, Amarjit K. Effects of prestorage leukoreduction on the rate of febrile nonhemolytic transfusion reactions to red blood cells in a tertiary care hospital. *Ann Med Health Sci Res*. 2015;5(3):185. doi:10.4103/2141-9248.157498.
55. Wang RR, Triulzi DJ, Qu L. Effects of Prestorage vs Poststorage Leukoreduction on the Rate of Febrile Nonhemolytic Transfusion Reactions to Platelets. *American Journal of Clinical Pathology*. 2012;138(2):255-259. doi:10.1309/AJCP5H7EKZTGGBKZ.
56. Heddle NM, Klama LN, Griffith L, Roberts R, Shukla G, Kelton JG. A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions. *Transfusion*. 1993;33(10):794-797.
57. Noizat-Pirenne F. Relevance of alloimmunization in haemolytic transfusion reaction in sickle cell disease. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2012;19(3):132-138. doi:10.1016/j.tracli.2012.03.004.
58. Ness PM, Shirey RS, Thoman SK, Buck SA. The differentiation of delayed serologic and delayed hemolytic transfusion reactions: incidence, long-term serologic findings, and clinical significance. *Transfusion*. 1990;30(8):688-693.
59. Sachan D, Kumar A, Jothimani D, Rela M. Delayed Serological Transfusion Reaction After Platelet Transfusion Due to Anti-e. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*. 2016;32(Suppl 1):287-289. doi:10.1007/s12288-016-0635-5.
60. Jaworski K, Maślanka K, Kosior DA. Transfusion-related acute lung injury: A dangerous and underdiagnosed noncardiogenic pulmonary edema. *Cardiol J*. 2013;20(4):337-344. doi:10.5603/CJ.2013.0091.
61. Triulzi DJ. Transfusion-Related Acute Lung Injury: Current Concepts for the Clinician. *Anesthesia & Analgesia*. 2009;108(3):770-776. doi:10.1213/ane.0b013e31819029b2.
62. Cardo LJ, Wilder D, Salata J. Neutrophil priming, caused by cell membranes and microvesicles in packed red blood cell units, is abrogated by leukocyte depletion at collection. *Transfusion and Apheresis Science*. 2008;38(2):117-125. doi:10.1016/j.transci.2008.01.004.
63. Blumberg N, Heal JM, Gettings KF, et al. An association between decreased cardiopulmonary complications (transfusion-related acute lung injury and transfusion-associated circulatory overload) and implementation of universal leukoreduction of blood transfusions. *Transfusion*. 2010;50(12):2738-2744. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02748.x.

64. Rühl H, Bein G, Sachs UJH. Transfusion-Associated Graft-Versus-Host Disease. *Transfusion Medicine Reviews*. 2009;23(1):62-71. doi:10.1016/j.tmr.2008.09.006.
65. Triulzi D, Duquesnoy R, Nichols L, et al. Fatal transfusion-associated graft-versus-host disease in an immunocompetent recipient of a volunteer unit of red cells. *Transfusion*. 2006;46(6):885-888. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00819.x.
66. Klein HG, Anderson D, Bernardi M-J, et al. Pathogen inactivation: making decisions about new technologies. *Transfusion*. 2007;47(12):2338-2347. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01512.x.
67. Allain JP, Bianco C, Blajchman MA, et al. Protecting the Blood Supply From Emerging Pathogens: The Role of Pathogen Inactivation. *Transfusion Medicine Reviews*. 2005;19(2):110-126. doi:10.1016/j.tmr.2004.11.005.
68. Singh Y, Sawyer LS, Pinkoski LS, et al. Photochemical treatment of plasma with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates pathogens while retaining coagulation function. *Transfusion*. 2006;46(7):1168-1177. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00867.x.
69. Mintz PD, Bass NM, Petz LD, et al. Photochemically treated fresh frozen plasma for transfusion of patients with acquired coagulopathy of liver disease. *blood components*. 2006;107(9):3753-3760.
70. Mintz PD, Neff A, MacKenzie M, et al. A randomized, controlled Phase III trial of therapeutic plasma exchange with fresh-frozen plasma (FFP) prepared with amotosalen and ultraviolet A light compared to untreated FFP in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion*. 2006;46(10):1693-1704. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00959.x.
71. Sandler SG. The status of pathogen-reduced plasma. *Transfusion and Apheresis Science*. 2010;43(3):393-399. doi:10.1016/j.transci.2010.09.006.
72. McCullough J, Vesole DH, Benjamin RJ, et al. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. *Blood*. 2004;104(5):1534-1541. doi:10.1182/blood-2003-12-4443.
73. Lin L, Dikeman R, Molini B, et al. Photochemical treatment of platelet concentrates with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates a broad spectrum of pathogenic bacteria. *Transfusion*. 2004:1496-1504.
74. Janetzko K, Cazenave J-P, Kluter H, et al. Therapeutic efficacy and safety of photochemically treated apheresis platelets processed with an optimized integrated set. *Transfusion*. 2005;45(9):1443-1452. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.00550.x.
75. Cazenave J-P, Folléa G, Bardiaux L, et al. A randomized controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with MIRASOL pathogen reduction technology. *Transfusion*. 2010;50(11):2362-2375. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02694.x.
76. Alter HJ. Pathogen Reduction: A Precautionary Principle Paradigm. *Transfusion Medicine Reviews*. 2008;22(2):97-102. doi:10.1016/j.tmr.2008.01.001.
77. Rios JA, Hambleton J, Viele M, et al. Viability of red cells prepared with S-303 pathogen inactivation treatment. *Transfusion blood components*. 2006:1778-1786.
78. Benjamin RJ, McCullough J, Mintz PD, et al. Therapeutic efficacy and safety of red blood cells treated with a chemical process (S-303) for pathogen inactivation.

- tivation: a Phase III clinical trial in cardiac surgery patients. *Transfusion blood components*. 2005:1739-1749.
79. Conlan MGC, Vichinsky E, Snyder E, et al. S-303 pathogen inactivated red blood cells in patients with hemoglobinopathies participating in chronic transfusion programs: preliminary safety and efficacy results. *Vox sanguinis*. 2005:121.
 80. Brixner V, Kiessling A-H, Madlener K, et al. Red blood cells treated with the amustaline (S-303) pathogen reduction system: A transfusion study in cardiac surgery. *Transfusion*. 2018. doi:10.1111/trf.14528.
 81. Conlan MG, Stassinopoulos A, Garratty G, et al. Antibody Formation to S-303-Treated RBCs in the Setting of Chronic RBC Transfusion. *blood components*. 2004:112A.
 82. North AK, Garratty G, Schott M, et al. A modified process for preparation of S-303 RBC for pathogen inactivation substantially reduces potential for reactivity. *Transfusion*. 2006:116A-117A.
 83. North AK, Lee V, Erickson A, Moore N. Demonstration of an S-303-induced immune response in a naïve rabbit model of chronic transfusion using a sensitive flow cytometry assay. *Vox sanguinis*. 2007:168.
 84. North A, Propst M, Henschler R, et al. Evaluation of Naturally Occurring Antibodies to Pathogen Inactivated Red Blood Cells. *Transfusion*. 2010:38A.
 85. North A, Castro G, Erickson A, Cook D, Corash L. Characterization of antibodies to red cells prepared with S-303 pathogen inactivation treatment. *Vox sanguinis*. 2007:167-168.
 86. Conlan MG, Lin J, Stassinopoulos A. Investigation of immunoreactivity observed after transfusion of S-303 RBCs in 2 phase III clinical trials in support of acute or chronic anemia. *Transfusion*. 2005:29A.
 87. Kiefel V, ed. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 4., überarb. und erw. Aufl. Berlin: SpringerMedizin; 2010.
 88. Wagner F. Erythrozytentransfusion: Prätransfusionelle Diagnostik - Teil 2. *Transfusionsmedizin*. 2015;5:e1-e17.
 89. Lapierre Y, Rigal D, Adam J, et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion*. 1990;30(2):109-113.
 90. Bromilow IM, Adams KE, Hope J, Eggington JA, Duguid, J. K. M. Evaluation of the ID-gel test for antibody screening and identification. *Transfusion*. 1990:159-161.
 91. Bio-Rad. *Packungsbeilage ID-Card LISS/Coombs: Indirekter und direkter Antihumanglobulintest*.
 92. Bundesärztekammer, ed. *Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie), Gesamtnovelle 2017*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag; 2017.
 93. Cerus Corporation. *Reagent RBC Preparation for INS 00600: S-303 treated RBCs for serology testing*.
 94. Smith AU. Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood cells. *Lancet*. 1950:910-911.
 95. Walker RH, ed. *Technical manual: American association of blood banks*. 11. ed. Bethesda: American association of blood banks; 1993.
 96. Tormey CA, Fisk J, Stack G. Red blood cell alloantibody frequency, specificity, and properties in a population of male military veterans. *Transfusion*. 2008;48(10):2069-2076. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01815.x.

97. Wagner F. Erythrozytentransfusion: Prätransfusionelle Diagnostik – Teil 1. *Transfusionsmedizin*. 2015;5(02):80-101. doi:10.1055/s-0033-1358130.
98. Erikstein BS, Hagen KG, Hervig T. RBC alloantibody prevalence and specificity in a Western Norwegian tertiary hospital. *Transfusion medicine (Oxford, England)*. 2018. doi:10.1111/tme.12511.
99. Chiaroni J, Gouvitsos J, Dettori I, Ferrera V. How we evaluate panagglutinating sera. *Transfusion*. 2009;49(8):1540-1545. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02183.x.
100. Valent P, Lechner K. Diagnosis and treatment of autoimmune haemolytic anaemias in adults: A clinical review. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2008;120(5-6):136-151. doi:10.1007/s00508-008-0945-1.
101. Svetina S, Zihel P. Morphology of small aggregates of red blood cells. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*. 2008;73(2):84-91. doi:10.1016/j.bioelechem.2007.12.002.
102. Wagner C, Steffen P, Svetina S. Aggregation of red blood cells: From rouleaux to clot formation. *Comptes Rendus Physique*. 2013;14(6):459-469. doi:10.1016/j.crhy.2013.04.004.
103. Benjamin RJ, McCullough J, Mintz PD, et al. Therapeutic efficacy and safety of red blood cells treated with a chemical process (S-303) for pathogen inactivation: a Phase III clinical trial in cardiac surgery patients. *Transfusion*. 2005;45(11):1739-1749. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.00583.x.
104. Cerus Corporation. *Agglutination Inhibition Assay by Gel Card to Determine Antibody Specificity in Serum or Plasma: S-300 COMPETITION ASSAY TO CONFIRM ACRIDINE SPECIFICITY*.
105. Bio-Rad. *Packungsbeilage ID-Card DC-Screening I: IgG, IgA, IgM, C3c, C3d, ctl; Direkter Antihumanglobulintest*.
106. Bio-Rad. *Packungsbeilage ID-Card NaCl, Enzyme and Cold Agglutinins: Nachweis von NaCl- und enzymreaktiven Anikörpern (für Serumgegenprobe, Antikörper-Nachweis und Identifizierung, Verträglichkeitstest)*.
107. Pirofsky B, Rosner ER. DTT Test: A New Method to Differentiate IgM and IgG Erythrocyte Antibodies. *Vox Sang*. 1974;27:480-488.
108. Olson PR, Weiblen BJ, O'Leary JJ, Moscowitz AJ, McCullough J. A Simple Technique for the Inactivation of IgM Antibodies Using Dithiothreitol. *Vox Sang*. 1976;30:149-159.
109. Okuno T, Kondelis N. Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies. *Journal of Clinical Pathology*. 1978;31:1152-1155.
110. Zupanska B, Thompson E, Brojer, E., Merry, A.H. Phagocytosis of Erythrocytes Sensitized with Known Amounts of IgG1 and IgG3 Anti-Rh Antibodies. *Vox Sang*. 1987;53:96-101.
111. Waligora SK, Edwards JM. Use of rabbit red cells for adsorption of cold autoagglutinins. *Transfusion*;23(4):328-330. doi:10.1046/j.1537-2995.1983.23483276869.x.
112. Yuan S, Fang A, Davis R, Siplon CJ, Goldfinger D. Immunoglobulin M red blood cell alloantibodies are frequently adsorbed by rabbit erythrocyte stroma. *Transfusion*. 2010;50(5):1139-1143. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02545.x.
113. Immucor. *Packungsbeilage RESt®: Rabbit Erythrocyte Stroma for Adsorption of Cold Agglutinins Anti-I, Anti-H or Anti-IH*.
114. DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen. Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt am Main.

- <https://www.blutspende.de/ueber-uns/institute-einrichtungen/frankfurt/institut-frankfurt.php>.
115. Arndt PA, Garratty G. A retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting the clinical significance of blood group alloantibodies. *Transfusion*. 2004;1273-1281.
 116. Geisen C, North A, Goetz M von, et al. Stability of red cell antigens on pathogen inactivated red blood cells (RBC). *Transfus Med Hemother*. 2014;41:65.
 117. Propst M, North A, Sherman C, Corash MM. *A Serology Study to Evaluate the Prevalence of Antibodies to S-303-Treated Red Blood Cells in Patients With Hemoglobinopathies and in Healthy Blood Donors Without Prior Exposure to S-303*; 2012.
 118. Rekvig OP, Hannestad K. Acid Elution of Blood Group Antibodies from Intact Erythrocytes. *Vox Sang*. 33;1977:280-285.
 119. BAG. *Gebrauchsanweisung BAG-Elutions-Kit CE: für die Säure-Elution von Antikörpern*.
 120. DRK Blutspendedienst Frankfurt. Standard Operating Procedure *Elution von erythrozytären Antikörpern*.
 121. Sachs L, Hedderich J. *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R : mit 180 Tabellen*. 12, vollst. neu bearb. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer; 2006. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-32161-3>.

5 Anhang

5.1 Weitere Methoden

5.1.1 Die Herstellung von Testzellen mit unterschiedlicher GSH-Konzentration

Die Herstellung von Testzellen unterschiedlicher GSH Konzentration soll weitere Informationen über die Spezifität des Antikörpers gegen S-303 pathogenreduzierte Erythrozytenkonzentrate geben, denn mit zunehmender GSH Konzentration nimmt die Acridin-Antigendichte ab und die GSH-Dichte auf der Zelloberfläche vermutlich zu. Je nach Antikörper wird sich eine unterschiedlich starke positive Reaktion zeigen.

Die Herstellung dieser Testzellen erfolgt mit der gleichen Konzentration an S-303 und unterschiedlichen Konzentrationen von GSH.

S-303 in mM	GSH in mM	
0,2	0	
	2	Zellen der Ersten Generation
	5	
	10	
	20	Zellen der Zweiten Generation
	30	
	40	

5.1.2 Säureelution

Eine Säureelution wird durchgeführt, um zu untersuchen, ob der an das Antigen gebundenen Antikörper von der Oberfläche der Testzellen durch Säure eluierbar ist. ¹¹⁸

Um den Antikörper an das Antigen auf der Oberfläche der Testzellen zu binden, werden 500 µl aufgetaute, deglycerolisierte, S-303-behandelte Erythrozyten mit 500 µl Plasma 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Testzellen viermal gewaschen. Als erstes mit kalten 0,9%igen NaCl-Lösung, im Anschluss dreimal mit einer Waschlösung. Auch hier wird die letzte Waschlösung aufgehoben und ein Antikörpersuchtest damit durchgeführt, um nachzuweisen, dass zwischen den Testzellen keine freien Antikörper mehr enthalten sind. Nach dem Waschen wird mit den Testzellen ein direkter Antihumanglobulintest

(DAT) durchgeführt. Hierzu werden 10ml Erythrozyten mit modifiziertem LISS zu einer 0,8%igen Aufschwemmung verdünnt. Ist der DAT positiv, haben die Antikörper an das Antigen auf den Testzellen gebunden. Fällt der DAT negativ aus, ist der Antikörper nicht an das Antigen auf den Testzellen gebunden und die Erythrozyten müssen erneut mit Plasma inkubiert werden bis der DAT positiv ausfällt. Die Erythrozyten, mit gebundenen Antikörpern, werden nun im Verhältnis 1:1 mit Säure vermischt und 1min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird aufgehoben. Zu diesem Überstand wird eine Pufferlösung getropft bis ein Blauer Farbumschlag erfolgt. Diese Lösung wird 3 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Falls sich ein brauner Film bildet, wird der Überstand abgehoben und aufbewahrt. Dieser kann nun zur Testung verwendet werden. Wenn sich kein Film bildet kann das Eluat sofort verwendet werden. Um den Antikörper im Eluat nachzuweisen wird ein IAT mit 50 µl Eluat und den Testzellen High, Low und Control durchgeführt. Fällt die Reaktion in High und/ oder Low positiv aus ist der Antikörper im Eluat nachweisbar.¹¹⁸⁻¹²⁰

5.2 Weitere Abbildungen

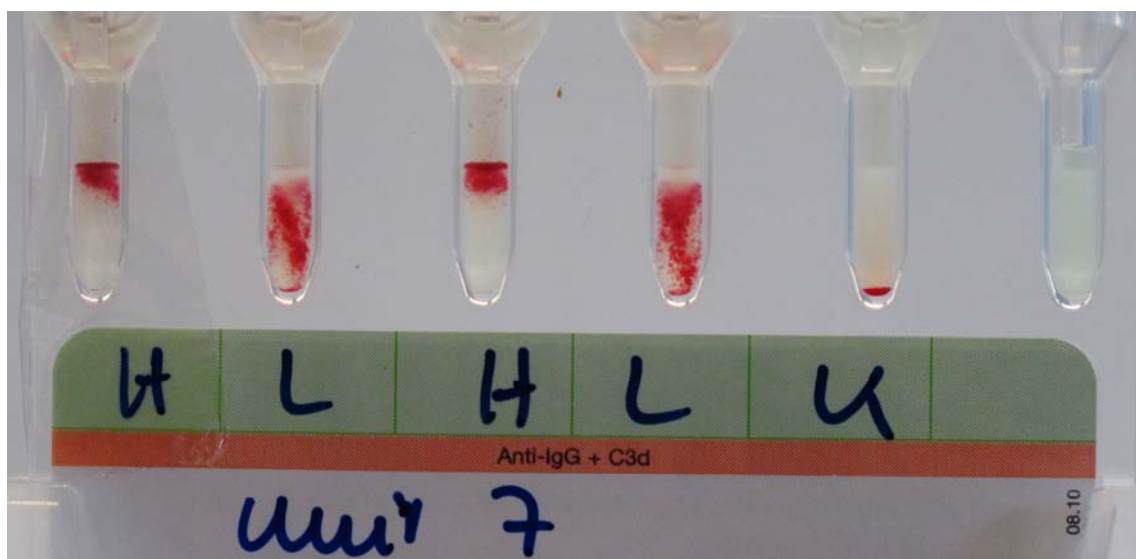


Abbildung 19: Probe 4, AKS mit Testzelle (Unit) 7 High (H), Low (L), Control (K)

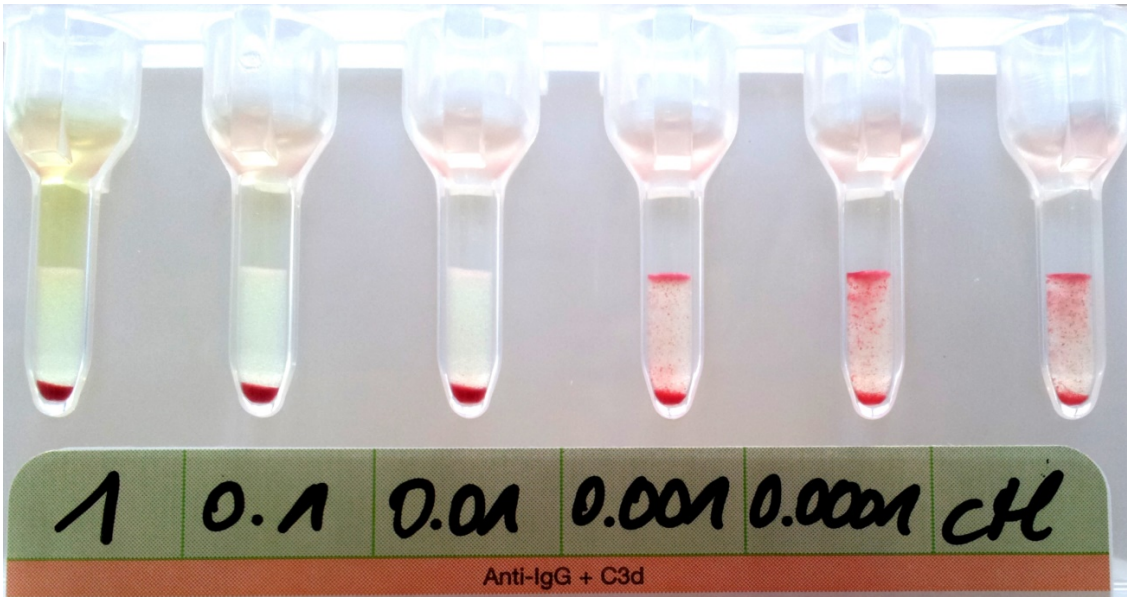


Abbildung 20: Probe 10, Testzelle (Unit) 7 High, Dissoziation mit S-300



Abbildung 21: Probe 4, Testzelle (Unit) 2, AKS mit aufgetauten und anschließend enzymbehandelten Testzellen

6 Eigene Veröffentlichungen

Geisen C., Brixner V.; Stempniewski L., North A., Kiessling AH, Müller MM, Mufti N., Seifried E.; Screening of patient sera for preexisting antibodies to S-303 pathogen inactivated red blood cells (S-303 RBC); Vox Sanguinis; 107, S. 173; 2014

Geisen C., Brixner V.; Stempniewski L., North A., Kiessling AH, Müller MM, Mufti N., Seifried E.; Characterization of preexisting antibodies to S-303 pathogen inactivated red blood cells (S-303 RBC) in 11,719 patient sera; Transfusion Med Hemotherapy, 41, S. 33; 2014

Geisen C., North A., Stempniewski L., Aydinok Y., Origa R.; Piga A.; Brixner V.; Seifried E.; Mufti N.; Benjamin R. J.; Natural and Acquired Antibodies to Amustaline (S-303)/Glutathione Pathogen Reduced Red Blood Cells (aktuell in Arbeit)

7 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Prävalenz und Eigenschaften natürlich präformierter Antikörpern gegen S-303-behandelte Erythrozytenkonzentrate

in dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Dr. h.c. Erhard Seifried mit Unterstützung durch Dr. Christof Geisen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht*. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

*) im Falle des Nichtzutreffens entfernen