



## Leistungsverzeichnis

### Labordiagnostik / Transfusionsmedizin 1. Auflage, 29.09.2021

Inhaltsverzeichnis	Seite
1) Ansprechpartner und Telefonnummern	2
2) Präanalytik	4
• Untersuchungsmaterial	
• Anforderung, Versand, Ergebnismitteilung	
3) Laborleistungen	6
• Blutgruppenserologie und Immunhämatologie	6
• Hämatologie	13
• Infektionsserologie	16
• Klinische Chemie	19
• Molekulare Diagnostik (nicht-HLA)	20
• Thrombozyten- und Granulozytenserologie	23
• Transplantationsimmunologie (HLA)	26
4) Anhang	33
• Abkürzungen	

## **Ansprechpartner und Telefonnummern**

### **LEITUNG**

**Ärztlicher Zentrumsdirektor und Leiter der Medizinischen Labore des ZTB**  
Prof. Dr. med. Axel Pruß

**Stellv. Leiter der Medizinischen Labore des ZTB**  
Dr.-Ing. Nils Lachmann

### **MEDIZINISCHE LABORE – CAMPUS BENJAMIN FRANKLIN (CBF)**

#### **Anschrift**

Hindenburgdamm 30  
12203 Berlin

#### **Immunhämatologie (24 Stunden/7 Tage)**

Tel: (030) 8445 4182  
Fax: (030) 8445 2632

#### **Thrombozytenlabor (werktags 07:00 bis 15:30 Uhr)**

Tel: (030) 450 553238  
Fax: (030) 450 553948

#### **Granulozytenlabor (werktags 07:00 bis 15:30 Uhr)**

Tel: (030) 8445 2643  
Fax: (030) 450 553948

### **MEDIZINISCHE LABORE – CAMPUS CHARITÉ MITTE (CCM)**

#### **Anschrift**

Charitéplatz 1  
10117 Berlin

#### **Immunhämatologie (24 Stunden/7 Tage)**

Tel: (030) 450 625123  
Fax: (030) 450 525909

#### **Infektionsserologie/Klinische Chemie (werktags 07:00 bis 15:30 Uhr)**

Tel: (030) 450 669038  
Fax: (030) 450 525909

#### **Hämatologie (werktags 07:00 bis 15:30 Uhr)**

Tel: (030) 450 625123  
Fax: (030) 450 525909

## MEDIZINISCHE LABORE – CAMPUS VIRCHOW-KLINIKUM (CVK)

### **Anschrift**

Augustenburger Platz 1  
13353 Berlin

### **Allgemeine Immunhämatologie (24 Stunden/7 Tage)**

Tel: (030) 450 553188  
Fax: (030) 450 553988

### **Spezielle Immunhämatologie (Antikörper-Referenzlabor) (werktags 07:00 bis 15:30 Uhr)**

Tel: (030) 450 553098  
Fax: (030) 450 565998

### **HLA-Diagnostik (werktags 07:00 bis 15:30 Uhr)**

Tel: (030) 450 653108  
Fax: (030) 450 553918

# PRÄANALYTIK

## Probengewinnung

Allgemeine Anforderungen an die Präanalytik medizinischer Proben sind in der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen definiert. In den aktuellen Hämotherapie-Richtlinien sind die Anforderungen zur Präanalytik für blutgruppenserologische Untersuchungen unter Punkt 4.2.3 und 4.2.4 gesondert geregelt. Für transplantationsimmunologische Probenanforderungen gelten die Standards der European Federation for Immunogenetics (EFI) in der aktuell gültigen Version. Nachfolgend aufgeführte Anforderungen sind für alle Analysen wichtig, um Verwechslungen zu vermeiden, die Proben zeitgerecht bearbeiten und die Befunde richtig interpretieren zu können:

- NUR für diesen Zweck entnommene und geeignete Blut-/Gewebeprobe
- die eindeutige Patientenidentifizierung und Übereinstimmung der Angaben auf den Probegefäßen und der Anforderung unter Verantwortung des anfordernden Arztes
- Nabelschnurblut sollte als solches gekennzeichnet sein
- Übernahme der Patientendaten, besonders bei Umlauten, vom gültigen Personaldokument und möglichst nicht von der Chipkarte
- Entnahmedatum, ggf. Uhrzeit soweit für die Interpretation notwendig
- Unterschrift der abnehmenden Person und des anfordernden Arztes
- die Mitteilung von Diagnosen, Therapien, verabreichten Medikamenten, Schwangerschaften, Vortransfusionen und ggf. solide Organ- bzw. Stammzelltransplantationen

Hinweise zur Präanalytik stehen den Kunden bei Bedarf zur Verfügung.

Zu jeder Anforderung wird ein schriftlicher Befundbericht mit den Ergebnissen der Untersuchungen erstellt. Falls dies erforderlich ist, wird die transfusionsmedizinische Relevanz des Befundes beurteilt und dem Patienten ein Nothilfepass (*laut Richtlinie 4.2.5.7.2*) ausgestellt.

Für virusserologische und molekulargenetische Untersuchungen sollten originalverschlossene Blutentnahmegefäße eingesendet werden (Vermeidung von Verwechslungen/Kontaminationen). Für molekularbiologische Methoden kein Heparinblut einsenden (mögliche Hemmung der PCR), geeignet sind EDTA-oder Citrat-Blut.

Die Untersuchung für alle Proben zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik sollte in einem Zeitraum von 15 bis 120 Minuten nach Entnahme erfolgen. Die Lagerung der Proben darf nur bei  $> 2^{\circ}\text{C}$  bis  $< 40^{\circ}$  erfolgen. Nach einer Lagerung im Kühlschrank kann keine Diagnostik mehr durchgeführt werden (Kälteaktivierung der Thrombozyten). Nach Rücksprache mit dem Bereichsleiter kann ggf. eine Untersuchung der Proben bis zu 240 Minuten nach Entnahme erfolgen, wobei die verlängerte Lagerzeit bei der Interpretation des Untersuchungsergebnisses zu berücksichtigen ist.

Folgende generelle Hinweise gelten für die **Entnahme** von Proben:

- Die Entnahme der Blutprobe erfolgt in der Regel durch Venenpunktion. Die Vene ist dabei kurz zu stauen, bis punktiert wurde (max. 1 Minute). Nach erfolgreicher Punktion ist die Staubinde möglichst wieder etwas zu lösen, um eine iatrogene Gerinnungsaktivierung zu vermeiden.
- Die Befüllung des Röhrchens ist langsam vorzunehmen, um Schaumbildung zu vermeiden. Schaumbildung kann durch zu hohen Blutfluss entstehen und kann zur teilweisen Zerstörung der Blutzellen führen (Hämolyse). Durch Freisetzung von Phospholipiden aus zerstörten Zellmembranen und durch freies Hämoglobin kann die Messung beeinträchtigt werden.
- Röhrchen mit Antikoagulans müssen bis zur Markierung befüllt werden. Nur dadurch ist sichergestellt, dass das Mischungsverhältnis von Blut und Antikoagulans richtig ist. Bei Unterfüllung kann es zu Verdünnungsfehlern bei der Messung kommen. Bei Überfüllung und bei zu langsamer Blutentnahme (z. B. durch schlechten Blutfluss) kann es zur Aktivierung von Gerinnungsprozessen im Röhrchen kommen (Röhrcheninhalt geronnen).
- Nach Abschluss der Blutentnahme ist das Röhrchen 3–4 x langsam über Kopf zu kippen und zu mischen (nicht schütteln!).
- Blutentnahme aus zentralen Venenkathetern: Falls der Katheter mit heparinhaltiger Lösung gefüllt ist, sind 10 ml Blut (bei Säuglingen max. 3 ml Blut) aus dem Katheterlumen abzuziehen und zu verwerfen. Erst danach ist die Entnahme von Untersuchungsproben vorzunehmen.

### **Verpackung und Versand von Proben**

- Bekannt oder potenziell infektiöse Proben (z. B. Hepatitis, HIV) müssen als solche gekennzeichnet werden.
- Der Versand von Proben hat lt. aktueller Gefahrgutverordnung, Abschnitt „Versand von Proben zur Diagnostik“ zu erfolgen.
- Die empfohlenen Transporttemperaturen sind den Angaben zu den einzelnen Analysen zu entnehmen. Das Einfrieren zellhaltiger Proben ist strikt zu vermeiden (Temperatur im Transportbehälter muss > 2°C sein).

### **Anforderungsscheine**

- Anforderungsscheine sind telefonisch in den Blutdepots, direkt bei den entsprechenden Laboratorien oder neben dem Leistungsverzeichnis im Internet auf der Homepage des ZTB (<https://www.ztb-charite.de/Service/Formulare.php>) anzufordern.
- Laut Gendiagnostikgesetz muss bei gendiagnostischen Untersuchungen (ausgenommen molekulargenetische HLA-Typisierung in Vorbereitung einer soliden Organ- bzw. Stammzelltransplantation bzw. erythrozytäre Blutgruppen) zur Diagnoseunterstützung von bestimmten Krankheiten (wie HLA-assoziierte Krankheiten und Medikamentenunverträglichkeiten und Rh-Zygotie) im Anforderungsschein vermerkt werden, dass eine Aufklärung des Patienten erfolgt ist und eine Einverständniserklärung des Patienten zur genetischen Untersuchung vorliegt.
- Die Sicherung der Probenidentität erfordert es, dass nur die Proben einer Anforderung und der dazugehörige Anforderungsschein in eine Versandeinheit zusammengeführt werden.

- *Unvollständig ausgefüllte Anforderungsscheine und/oder die fehlende Unterschrift des anfordernden Arztes können dazu führen, dass die Probe abgelehnt werden muss.*

### **Ergebnisse/Befundmitteilung**

- Die Befunde werden schriftlich mitgeteilt, in dringenden Fällen auch an Sonn- und Feiertagen.
- Änderungen des Probenmaterials und Einführung neuer Analysen werden via Labormitteilungen oder Internet rechtzeitig bekannt gegeben bzw. bei Neuauflage des Leistungsverzeichnisses aufgenommen.

## **Laborleistungen**

### **Blutgruppenserologie und Immunhämatologie**

Immunhämatologische Laboratorien gibt es an allen Standorten des ZTB (CBF, CCM, CVK). Sie bieten:

- Routineuntersuchungen zur Vorbereitung von Transfusionen (z. B. Blutgruppenbestimmung, Antikörpersuchtest, Kreuzprobe)
- spezielle immunhämatologische Untersuchungen und die Klärung von Problemfällen
- einen Service rund um die Uhr (außer Ak-Referenzlabor)
- die Betreuung durch einen Facharzt für Transfusionsmedizin
- die Bereitstellung kompatibler Präparate, auch bei schwierig zu versorgenden Antikörperspezifitäten

Am Standort CVK wird ein immunhämatologisches Referenzlabor vorgehalten (Montag bis Freitag), welches bei immunhämatologischen Problemfällen umfassende und hochkomplexe Diagnostik anbietet (z.B. bei Autoimmunhämolyse (Kälte- und Wärmetyp, medikamentös-induzierte Immunhämolyse, Donath-Landsteiner Hämolyse), schwangerschafts- und transfusionsrelevante Antikörper-Konstellationen inkl. Antikörper gegen seltene und hochfrequente Antigene, PNH, spezielle molekulargenetische Blutgruppentypisierungen bei unklaren Blutgruppen mit Schwerpunkt RhD-Diagnostik)

### **Indikationen**

Gemäß den aktuellen Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) ist es erforderlich, dass vor allen invasiven und operativen Eingriffen, bei denen eine Transfusion ernsthaft in Betracht kommt, ein gültiger Befund der Blutgruppenbestimmung und ein Ergebnis des Antikörpersuchtests vorliegen.

Des Weiteren sollten bei jeder Schwangeren entsprechend den Mutterschaftsrichtlinien zu einem möglichst frühen Zeitpunkt die ABO-Blutgruppe und der Rh-Faktor D bestimmt und der Antikörpernachweis durchgeführt werden.

## Blutgruppenserologische Untersuchungen

Blutgruppenserologische Untersuchungen umfassen:

- die Bestimmung der AB0-Blutgruppe, des Rh-Faktors D, der Rh-Formel und des Merkmals Kell
- den Antikörpersuchtest
- die Identifizierung von Antikörpern, ggf. mit Titerbestimmung bei positivem Antikörpersuchtest und Beurteilung der transfusionsmedizinischen Relevanz sowie die Erstellung eines Nothilfepasses
- ggf. weiterführende immunhämatologische Untersuchungen

Bei Neugeborenen und Kindern im ersten Lebensjahr ist die Blutgruppenbestimmung vorläufig, weil die Blutgruppenmerkmale z. T. noch nicht vollständig ausgeprägt sind. Ein Nothilfepass wird zu diesem Zeitpunkt aus diesen Gründen noch nicht ausgestellt.

## Antikörpernachweis

Mit dem Antikörpersuchtest werden klinisch relevante und potenziell relevante Allo- und Autoantikörper nachgewiesen. Positive Reaktionen sollten mit weiterführenden Verfahren rechtzeitig vor Transfusionsbedarf spezifiziert werden, um antigenkompatible Blutprodukte in der erforderlichen Anzahl bereitstellen zu können.

Während der Schwangerschaft ist die Antikörperspezifizierung und Titerbestimmung relevanter Antikörper mit der Beurteilung der klinischen Relevanz hinsichtlich einer hämolytischen Erkrankung des Feten und / oder Neugeborenen möglich. Post partum ist beim Neugeborenen mit Verdacht auf Morbus haemolyticus neonatorum oder AB0-Erythroblastose neben der Antikörperbestimmung ein direkter Antiglobulin-Test auch aus kleinsten Mengen Blut möglich, um die klinische Situation durch serologische Untersuchungen zu bestätigen.

## Wichtigste Laborleistungen im Überblick

Untersuchung	Verwendete Methoden	Bemerkungen
AB0-Blutgruppe	Gelkartentechnik, Festphasensystem (Capture), Röhrchentechnik	ggf. Molekularbiologie bei Vortransfusionen oder Blutgruppen-Varianten
Rh-Faktor, Rh-Formel, Kell	Gelkartentechnik, Festphasensystem (Capture), Röhrchentechnik	ggf. Molekularbiologie bei Vortransfusionen oder schwachen RhD-Varianten
Weitere Blutgruppenmerkmale wie z.B. MNSs, Kidd, Duffy, P1	Gelkartentechnik, Festphasensystem (Capture), Röhrchentechnik; Multicard	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nachweis des korrespondierenden Antigens bei bekanntem Antikörper</li> <li>- ggf. Molekularbiologie bei Vortransfusionen</li> </ul>

Antikörpersuchtest, Antikörperdifferenzierung, Antikörpertiter	Gelkartentechnik, Festphasensystem (Capture), oder Röhrchentechnik in Reaktionspanel von 3 – 16 korrespondierenden Zellen bzw. Ansatz gegen seltene Zellen (seltene Antigene, Fehlen hochfrequenter Antigene); Ansatz gegen rekombinante Antigene, Plasmahemmversuch, HPC-Ansatz, Ansatz gegen DTT-behandelte Erythrozyten	<ul style="list-style-type: none"> <li>- indirekter Antihumanglobulintest (Coombs-Test)</li> <li>- indirekter Antihumanglobulintest (Coombs-Test) auch bitherm, enzymbehandelt oder bei +20 °C</li> <li>- Enzymtest</li> <li>- NaCl-Ansatz bei + 20 °C und +4 °C</li> <li>- zur Beurteilung der klinischen Relevanz von Antikörpern</li> </ul>
Verträglichkeitsprobe	Gelkartentechnik, Festphasensystem (Capture), Röhrchentechnik	Beurteilung der Verträglichkeit des zu transfundierenden Erythrozyten- bzw. Granulozytenkonzentrates
DAT = direkter Antiglobulin-Test (direkter Coombs-Test) mit <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anit-IgG, Anti-C3d, Anti-IgM</li> <li>- Anti-IgA, Anti-C3c</li> <li>- Subklassen IgG1 und IgG3, IgG-Gesamtiter</li> </ul>	Gelkartentechnik	Beurteilung des Hämolyserisikos der Patientenerythrozyten, bei Neugeborenen Abklärung einer Erythroblastose
Elution- und Adsorptionsverfahren (Autoadsorption, Alloadsorption)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- z.B. Säure-, Hitzeelution</li> <li>- REST, Kälteelution</li> </ul>	Abklärung von Autoimmunhämolysen, Nachweis gebundener Alloantikörper nach verzögerter HTR, Morbus haemolyticus neonatorum oder AB0-Erythroblastose
Kälteagglutinintest	Röhrchentechnik	Abklärung von kältebedingten Autoimmunhämolysen Temperaturamplitude, -/titer,
D weak/D partial	Gelkartentechnik, molekularbiologische Methoden	Aussage zur künftigen Rh-Prophylaxe bzw. Transfusionsempfehlung je nach Typ
HTLA-Antikörper	Neutralisationstest	Abklärung von unklaren Ak-Differenzierungen (Panagglutination)
Hämolysin-Nachweis	Röhrchentechnik	Abklärung von Autoimmunhämolysen (Kälte-/Wärme-hämolysine), ggf. hämolytisches Potenzial von Alloantikörpern;

## **Analysen**

### **Analysen**

#### Vollständige Blutgruppenbestimmung (AB0, Rhesusfaktor, Rhesusformel, Kell, Antikörper-suchtest)

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 6 ml + 2 ml EDTA-Blut  
Indikation: serologische Bestimmung der Blutgruppenmerkmale  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Bestimmung spezieller Blutgruppenantigene

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: Verdacht auf Alloimmunisierung, Bereitstellung kompatibler Blutpräparate  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Serologische Verträglichkeitsprobe (Kreuzprobe) inkl. Ak-Suchtest

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 6 ml EDTA-Blut; 20 ml bei bekannten serologischen Problemen  
Indikation: Verträglichkeitsprüfung Patient/EK vor Transfusion  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Lagerung: Anlieferung innerhalb von 1 Tag nach Entnahme  
Regelbearbeitungszeit: 1 Werktag

#### Antikörper-Suchtest

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: Identifizierung des Antikörpers bei positivem Antikörpersuchtest bzw. bei Immunhämolyse  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Antikörper-Identifizierung (Ak-Differenzierung), Abklärung einer Immunhämolyse

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 10 ml EDTA-Blut und 10 ml Nativblut  
Indikation: Identifizierung des Antikörpers bei positivem Antikörpersuchtest bzw. bei Immunhämolyse  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Antikörpertiter

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 10 ml EDTA-Blut oder Nativblut  
Indikation: Beurteilung der Antikörperstärke im Verlauf z. B. bei einer Schwangerschaft

Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Isoagglutinin-Titer

Labore: CBF  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 10 ml Nativblut  
Indikation: Bestimmung des Titers der Isoagglutinine (Anti-A, Anti-B)  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Direkter Antihumanglobulintest (DAT, direkter Coombs-Test)

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: Nachweis von Komplement- oder Immunglobulin-Beladung auf der Erythrozytenoberfläche, z. B. bei Verdacht auf Autoimmunhämolyse oder inkompatible Transfusionen  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Direkter Antihumanglobulintest (DAT, direkter Coombs-Test) bei Neugeborenen

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 6 ml Nabelschnurblut oder 1 ml EDTA-Blut  
Indikation: Nachweis von Komplement- oder Immunglobulin-Beladung auf der Erythrozytenoberfläche, z. B. bei Verdacht auf Erythroblastose  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Monospezifischer direkter Antihumanglobulintest (inkl. IgG, C3d und ggf. IgA, IgM, C3c )

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: spezifischer Nachweis von C3c, IgM oder IgA auf der Erythrozytenoberfläche, z. B. bei Verdacht auf Autoimmunhämolyse  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Bestimmung der IgG-Subklassen

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: spezifischer Nachweis der klinisch relevanten IgG-Subklassen IgG1 und IgG3  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Bestimmung des IgG-Titers

Labore: CBF, CCM  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 6 ml EDTA-Blut

Indikation: Teilbeurteilung des Hämolyserisikos  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Untersuchungen auf Alloantikörper bei Nachweis eines Autoantikörpers

Labore: CVK  
Methode: Hämagglutinationstest, Elutionsverfahren, Adsorptionsverfahren  
Material: 10 ml EDTA-Blut und 10 ml Venenblut (nativ)  
Indikation: Nachweis und Charakterisierung von Alloantikörpern bei Nachweis von Autoantikörpern  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Donath-Landsteiner-Antikörper (nicht akkreditiert)

Labore: CVK  
Methode: Hämagglutinationstest, Hämolysetest  
Material: 10 ml Nativblut sofort bei +37 °C gerinnen lassen und warm trennen und 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: Nachweis von biphasischen Hämolysinen  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Abklärung von Transfusionsreaktionen

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Hämagglutinationstest, ggf. Elutionsverfahren, bakteriologische Kultur  
Material: vor Transfusion: 6 ml Nativblut oder EDTA-Blut (z. B. Rückstellprobe der Kreuzprobe)  
nach Transfusion: 10 ml EDTA-Blut; Restmaterial (Beutel) aller transfundierten Präparate (steril)  
Indikation: Verdacht auf Transfusionsreaktion  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Kälteagglutinine

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Kälteexposition; Hämagglutination  
Material: 10 ml Nativblut (nativ) und 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: Verdacht auf Kälteagglutinine  
Transport: Material warm trennen oder bei +37 °C transportieren  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Untersuchungen auf variantes D (partial D, weak D)

Labore: CVK (AK-Labor)  
Methode: Hämagglutination ggf. zusätzlich PCR-SSP oder Real-time PCR  
Material: 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: Verdacht auf weak D oder partial D, Probleme bei D-Typisierung  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Identifizierung von Antikörpern gegen hochfrequente Antigene

Labore: CVK (AK-Labor)  
Methode: Hämagglutination  
Material: 10 ml EDTA-Blut, 20 ml Nativblut  
Indikation: durchgehend positive Reaktionen bei der Antikörperidentifizierung mit kommerziellen Identifizierungspanels  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Nachweis gebundener spezifischer Antikörper (positiver direkter Coombs-Test)

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: Elutionsverfahren, Hämagglutination  
Material: 6 ml EDTA-Blut,  
Indikation: Autoimmunhämolyse, Hämolyse unklarer Genese, inkompatible Vortransfusion, unklarer positiver direkter und/oder indirekter AHG-Test  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Abklärung eines MHN

Labore: CCM, CVK  
Methode: Hämagglutination, Elution  
Material: 3 ml EDTA-Blut  
Indikation: feto-maternale Inkompatibilität (pos. DAT beim Kind)  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Antigentypisierung mittels Adsorption/Elution (nicht akkreditiert)

Labore: CVK (Ak-Labor)  
Methode: Adsorptionsverfahren, Elutionsverfahren, Hämagglutination  
Material: 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: Nachweis eines stark abgeschwächten Antigens  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Medikamentenabhängige Antikörper (Erythrozyten) (nicht akkreditiert)

Labore: CVK (Ak-Labor)  
Methode: Hämagglutination, Elution  
Material: 10 ml EDTA-Blut und 10 ml Nativblut, Urin des Patienten unter der Medikamenteneinnahme (falls möglich)  
Indikation: Verdacht auf medikamentenabhängige Immunhämolyse  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

#### Test auf Anti-IgA (nicht akkreditiert)

Labore: CVK (AK-Labor)  
Methode: Hämagglutinationstest (Analyse erfolgt durch Auftragslabor)  
Material: 10 ml Nativblut  
Indikation: spezifischer Nachweis eines Anti-IgA bei IgA-Mangel und Transfusionsbedürftigkeit  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

### PNH-Diagnostik (nicht akkreditiert)

Labore: CCM  
Methode: Hämagglutinationstest  
Material: 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: spezifischer Nachweis von CD55 und CD59 auf Erythrozyten (DAF, MIRL)  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

### **Einflussgrößen und Störfaktoren (limitations)**

- Die Verwendung von Heparin-Blut kann zu falsch negativen Ergebnissen bei der molekulargenetischen Blutgruppenbestimmung führen
- Stark hämolytische Proben können zu Problemen in der Serumgegenprobe, Antikörpersuche / -differenzierung führen, v.a. bei automatisierten Verfahren
- Die therapeutische Gabe von Immunglobulinen in hohen Dosen kann zu falsch positiven Ergebnissen beim direkten Coombstest, der Bestimmung der Isoagglutinintiter und ggf. bei der Antikörpersuche / -differenzierung führen
- $\beta$ -Laktam Antibiotika können zu falsch positiven Ergebnissen beim direkten Coombstest führen
- therapeutische monoklonale Antikörper (z.B. Anti-CD38: Daratumumab, Anti-CD279: Checkpoint Inhibitoren, z.B. Nivolumab, Pembrolizumab) führen zu falsch positiven Ergebnissen bei der Antikörpersuche / -differenzierung und beim direkten Coombstest
- der therapeutische monoklonale Antikörper Anti-CD47 führt zu falsch positiven Ergebnissen bei fast allen immunhämatologischen Untersuchungen (Blutgruppe, AKS, AK-Diff, DAT)
- Kälteagglutinine in hoher Konzentration bzw. Temperaturamplitude können zu falsch positiven Reaktionen bei der Blutgruppenbestimmung (v.a. in der Serumgegenprobe) führen
- Im Falle kürzlich erfolgter Transfusionen (< 3 Monate) kann es zu falsch positiven und falsch negativen Bestimmungen von Blutgruppenmerkmalen kommen; daher müssen diese (mit Zeitangabe) immer auf dem Anforderungsschein vermerkt werden

## **Hämatologie**

### **Blutbild**

Das Blutbild ist eine Untersuchungsmethode, bei der mikroskopisch oder photometrisch die quantitative Verteilung der Blutzellen und die Hämoglobinkonzentration bestimmt wird. Darüber hinaus gibt das Blutbild Auskunft über die Zellmorphologie und das Vorhandensein irregulärer Zellen (z.B. Vorläuferzellen). Die Bestimmung des Blutbildes erfolgt heute überwiegend durch automatische Hämatologiegeräte. Die Bewertung des Blutbildes ermöglicht die Diagnose verschiedenster Erkrankungen. Der diagnostische Umfang eines Blutbildes ist abhängig von der klinischen Fragestellung.

**Tabelle 2. Blutbild-Normalwerte bei Erwachsenen**

Parameter	Normalwerte bei Erwachsenen
Leukozyten	3,9 – 10,2 x 10 <sup>9</sup> /l
Granulozyten	1,5 – 7,7 x 10 <sup>9</sup> /l
Lymphozyten	1,1 – 4,5 x 10 <sup>9</sup> /l
Monozyten	0,1 – 0,9 x 10 <sup>9</sup> /l
Eosinophile	0,2 – 0,5 x 10 <sup>9</sup> /l
Basophile	0,0 – 0,2 X 10 <sup>9</sup> /l
Erythrozyten	4,4 – 6,0 x 10 <sup>12</sup> /l
Hämoglobin	♂ 14,0 – 18,0 g/dl ♀ 12,0 – 16,0 g/dl
Hämatokrit	♂ 0,38 – 0,52 g/dl ♀ 0,37 – 0,46 g/dl
MCV (mittleres korpuskuläres Volumen)	82 – 101 fl
MCH (mittleres korpuskuläres Hämoglobin)	27 – 34 pg
MCHC (mittlere zelluläre Hb-Konzentration)	32 – 36 g/dl
Thrombozyten	140 – 440 x 10 <sup>9</sup> /l
MPV (mittleres Plättchenvolumen)	7,4 – 11 fl
<i>Quelle: Referenzbereiche SYSMEX</i>	

## Oberflächenmarker humaner Leukozyten

### Populationen

Humane Leukozyten setzen sich aus verschiedenen Populationen zusammen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Expression typischer Oberflächenmarker mittels fluo-rochrommarkierter spezifischer Antikörper durchflusszytometrisch identifiziert werden können:

- CD3+ T-Zellen
- CD3+CD4+ T-Helfer-Zellen
- CD3+CD8+ zytotoxische T-Zellen
- CD16+CD56+ NK-Zellen
- CD19+ B-Zellen
- CD14+ Monozyten/Makrophagen

### Bedeutung

Die absolute Anzahl und das relative Verhältnis dieser Populationen im peripheren Blut können entscheidende

Hinweise auf bestimmte Erkrankungen liefern. Beispielsweise ist

- die Zunahme von CD19+ B-Zellen und die Verschiebung des Verhältnisses der Expression der leichten Immunglobulinketten k und l charakteristisch für eine maligne hämatologische Erkrankung
- die Abnahme der absoluten Zahl von CD3+CD4+ T-Helfer-Zellen und eine relative Zunahme von CD3+CD8+ zytotoxischen T-Zellen typisch für eine fortschreitende HIV-Erkrankung

Die Bestimmung der Anzahl von CD3+ T-Zellen in klinischen Präparaten ist bei allo- genen Stammzelltransplantationen essenziell. Die im Präparat enthaltenen potenziell alloreaktiven T-Zellen erkennen Zellen des Empfängers als fremd und können darauf- hin Entzündungsreaktionen auslösen, die in eine schwere lebensbedrohende Trans- plantat-Wirt-Erkrankung (Graft versus Host Disease) übergehen. Um das Risiko einer solchen GvHD minimieren zu können, muss daher die Zahl der im Transplantat ent- haltenen T-Zellen bestimmt werden. Dies geschieht durch den Nachweis der Oberflä- chenexpression von CD3 mithilfe der Durchflusszytometrie.

Mit der Durchflusszytometrie lassen sich einzelne Partikel oder Zellen schnell und ver- lässlich entsprechend ihrer charakteristischen Eigenschaften nach mehreren Parame- tern gleichzeitig vermessen und so voneinander unterscheiden. Hierzu macht man sich die unterschiedlichen Streulichteigenschaften und Expressionsdichte von charakte- ristischen Markern der Zellen zunutze, die mittels fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern spezifisch angefärbt werden. So angefärbte Zellen werden mit einem Flüs- sigkeitsstrom im Durchflusszytometer vereinzelt an Laserstrahlen vorbeitransportiert, die die Fluoreszenzfarbstoffe auf der Zelloberfläche zur Emission von Licht charakte- ristischer Wellenlänge anregen. Von den Fluoreszenzfarbstoffen emittiertes und an den Zellen gestreutes Licht bestimmter Wellenlänge wird (mithilfe des optischen Sys- tems) über Spiegel und Filter zu Detektoren gelenkt, in denen das einfallende Licht in Abhängigkeit seiner Intensität in elektrische Impulse umgewandelt wird. Durch Zuord- nung der elektrischen Impulse zu den entsprechenden Messereignissen lassen sich auf diese Weise multiparametrische Analysen einzelner Zellen generieren.

## **Analysen**

### Blutbild

Labore: CBF, CCM, CVK  
Methode: elektronische Zellzählung (Hämatologieautomat)  
Material: 2 ml EDTA-Blut; Cave: Zitratblut bei EDTA-Pseudothrombozytopenie  
Indikation: Blutspenderscreening, Kontrolle hämatologischer Patienten  
Lagerung und  
Transport: bei > 2°C bis < 40° innerhalb von 6 h

### Zählung von Lymphozyten im Differentialblutbild

Labore: CCM  
Methode: elektronische Zellzählung (Hämatologieautomat)  
Material: 2 ml EDTA-Blut  
Indikation: Bestimmung des Anteils der Lymphozyten als Basisparameter des Immunstatus  
Lagerung und  
Transport: bei > 2°C bis < 40° innerhalb von 6 h

### Bestimmung CD3+ T-Zellen

Labore: CCM  
Methode: Durchflusszytometrie  
Material: 2 ml venöses Blut (in K2EDTA oder K3EDTA)  
Indikation: Bestimmung CD3-positiver Zellen als Basisparameter des Immunstatus  
Lagerung und  
Transport: bei > 2°C bis < 40°

### Bestimmung des Immunstatus

Labore: CCM  
Methode: Durchflusszytometrie  
Material: 2 ml venöses Blut (in K2EDTA oder K3EDTA)  
Indikation: Ermittlung des Immunstatus (CD3, CD4, CD8, CD16-56, HLA-DR)  
Lagerung und  
Transport: bei > 2°C bis < 40°

## **Infektionsserologie**

Das Laboratorium für Infektionsserologie gibt es im ZTB am Standort CCM. Es bietet:

- einen hohen Automationsgrad (Liaison XL [Fa. Diasorin]) und dadurch eine schnelle kostengünstige Diagnostik
- einen hohen Probendurchsatz
- Untersuchungen an Blutserum oder Blutplasma entsprechend den gültigen Richtlinien der Bundesärztekammer
- serologische Tests zur HIV-, HBV-, HCV-, CMV- und Syphilis-Diagnostik

### **Erreger und Krankheitsbilder**

#### Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)

Das HI-Virus ist weltweit verbreitet und Auslöser von AIDS. Es gehört zur Gruppe der stark wirtsspezifischen Retroviren und kann mit Körperflüssigkeiten übertragen werden. Als Risikofaktoren gelten i.v. Drogenkonsum, Sexualkontakt zwischen Männern und Sexualkontakt mit Partnern aus Gebieten mit hohem Anteil HIV-infizierter Personen in der Bevölkerung, z. B. Afrika oder Asien. Die Symptome im Anfangsstadium sind grippeähnlich unspezifisch. Die hohe Mutationsrate des HI-Virus stellt hohe Anforderungen an die Therapie und macht auch eine ständige Weiterentwicklung der Testsysteme in der Infektionsdiagnostik notwendig.

#### Hepatitis-B-Virus (HBV)

Die Hepatitis B-Infektion gehört zu den weltweit häufigsten Virusinfektionen. Gebiete mit hoher Prävalenz sind neben Afrika und Asien vor allem Sud- und Osteuropa. In Deutschland ist das Risiko, an einer Hepatitis B zu erkranken, durch vorbeugende Impfung relativ niedrig. Die wichtigsten Übertragungswege sind parenteral und sexuell. Die Erkrankung verläuft fast immer akut, nur bei 5–10 % chronisch. Zwei Drittel der Erkrankten zeigen keine Symptome, ein Drittel hat nach 1–6 Monaten Inkubationszeit die typischen Symptome (Gelbfärbung der Haut, Ikterus, Schmerzen im Oberbauch). Etwa ein Viertel der chronischen Infektionen entwickeln in der Folge eine Leberzirrhose oder ein Leberzellkarzinom.

#### Hepatitis-C-Virus (HCV)

Das HCV ist ein sehr kleines Einzel-Strang-RNA-Virus, dessen einziger natürlicher Wirt der Mensch ist. Der Infektionsweg beim HCV ist oft nicht mehr nachvollziehbar. Als Hauptrisiken einer Übertragung gelten heute verschiedene Praktiken des Drogenkonsums und Verletzungen der Haut mit scharfen Gegenständen und Instrumenten, bei denen Blut übertragen wird (z. B. Tätowierungen, Piercings). Die sexuelle Übertragung ist bei HCV von geringerer Bedeutung. Nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen bis 6 Monaten kann es zu den typischen Gelbsuchtsymptomen kommen, sehr viele

Infektionen verlaufen jedoch symptomlos. 50–75 % der Infektionen gehen in chronische Formen über, die mit unspezifischen Beschwerden (Müdigkeit, Oberbauchbeschwerden) einhergehen. Unbehandelt kommt es bei fischen Beschwerden (Müdigkeit, Oberbauchbeschwerden) einhergehen. Unbehandelt kommt es bei einem Viertel der chronisch Infizierten zur Leberzirrhose oder zur Entstehung eines Leberzellkarzinoms. Seit 2015 stehen für die Behandlung der chronischen Hepatitis C neue Medikamente zur Verfügung. Diese Medikamente greifen direkt in die Vermehrung des Hepatitis C-Virus ein und ersetzen die bislang gängige Therapie mit dem nebenwirkungsreichen Interferon.

### Treponema pallidum

Der Erreger der Syphilis ist das Bakterium *Treponema pallidum*. Es wird überwiegend durch direkte sexuelle Kontakte, seltener durch hochinfektiöse Geschwüre der Haut übertragen. Eine große Gefahr besteht durch eine Übertragung der Syphilis in der Schwangerschaft auf das Kind im Mutterleib. In westlichen Industrieländern hat die Syphilis heute ihren Schrecken weitgehend verloren, weil sie mit Antibiotika vollständig geheilt werden kann. Bleibende Schädigungen in späten Stadien sind heute selten zu beobachten. Der Antikörper bleibt aber als „Serumnarbe“ im Blut erhalten.

### Cytomegalievirus (CMV)

Das Cytomegalievirus (CMV) gehört zu den humanen Herpesviren (Humanes Herpesvirus 5). CMV ist ein behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus. Das CMV ist weltweit verbreitet und gilt als häufigster viraler Erreger einer kongenitalen Infektion. Die Übertragung erfolgt über den Speichel, Urin, Spermasekrete sowie bei der Bluttransfusion. Die Seroprävalenz ist vom Alter und sozioökonomischen Faktoren der untersuchten Population abhängig. CMV-Infektionen sind in der Allgemeinbevölkerung weit verbreitet und mit dem Risiko einer intermittierenden Virusausscheidung verbunden. Im Vordergrund stehen (allgemein) präventive Maßnahmen zum Schutz besonders gefährdeter Personengruppen. Zu diesen zählen seronegative Schwangere und Immunsupprimierte. Es gibt gegenwärtig keine verpflichtende Testung von Blut- und Plasmaspenden auf CMV, doch werden Produkte für gefährdete Personen auf CMV-Antikörper getestet. Die Bestimmung des Virusgenoms via NAT wird diese Testung jedoch mittelfristig ablösen.

### **Nachweismethoden**

Die Proben werden mit Screeningassays auf Antikörper bzw. Antigene getestet. Bei HIV, HBV, HCV, CMV und Lues-Ak werden dafür mikropartikelbasierende Chemilumineszenz-Immunoassays verwendet. Bei den Chemilumineszenz-Immunoassays ist die Chemilumineszenzreaktion (Photonenemission) proportional zu den im Blut befindlichen Antikörpern bzw. Antigenen.

## **Analysen**

### Hepatitis-B-Virus-Core-Antikörper (Anti-HBc)

Labore: CCM  
Methode: Chemilumineszenz-Immunoassay (ChLIA)  
Material: 2 ml Serum oder Plasma  
Indikation: Nachweis einer (durchgemachten) Hepatitis-B-Virus-Infektion  
Transport: zwischen +2 °C bis > 2°C bis < 40°  
Lagerung: bis 24 h bei > 2°C bis < 40°, max. 7 Tage bei +2 °C bis +8 °C

### Hepatitis-B-Surface-Antigen (HBsAg)

Labore: CCM  
Methode: Chemilumineszenz-Immunoassay (ChLIA)  
Material: 2 ml Serum oder Plasma  
Indikation: Nachweis einer akuten oder chronischen Hepatitis-B-Virus-Infektion  
Transport: zwischen +2 °C bis > 2°C bis < 40°  
Lagerung: bis 24 h bei > 2°C bis < 40°, max. 7 Tage bei +2 °C bis +8 °C

### Hepatitis-C-Virus-Antikörper (Anti-HCV)

Labore: CCM  
Methode: Chemilumineszenz-Immunoassay (ChLIA)  
Material: 2 ml Serum oder Plasma  
Indikation: Nachweis einer Hepatitis-C-Virus-Infektion  
Transport: zwischen +2 °C bis > 2°C bis < 40°  
Lagerung: bis 24 h bei > 2°C bis < 40°, max. 7 Tage bei +2 °C bis +8 °C

### Human-Immunodeficiency-Virus-Typ-1/2-Antikörper (Anti-HIV-1/2)

Labore: CCM  
Methode: Chemilumineszenz-Immunoassay (ChLIA) als Kombitest mit HIV-Ag  
Material: 2 ml Serum oder Plasma  
Indikation: Nachweis von Antikörpern gegen HIV der Typen 1 und 2 sowie des HIV-1-Antigens  
Transport: zwischen +2 °C bis > 2°C bis < 40°  
Lagerung: bis 24 h bei > 2°C bis < 40°, max. 7 Tage bei +2 °C bis +8°

### Antikörper gegen Treponema pallidum

Labore: CCM  
Methode: Chemilumineszenz-Immunoassay (ChLIA)  
Material: 2 ml Serum oder Plasma  
Indikation: Nachweis von Antikörpern gegen Treponema pallidum  
Transport: zwischen +2 °C bis > 2°C bis < 40°  
Lagerung: bis 24 h bei > 2°C bis < 40°, max. 7 Tage bei +2 °C bis +8°

## Klinische Chemie

Ein Labor für die klinische Chemie gibt es im ZTB am Standort CCM. Es bietet:

- einen hohen Automationsgrad (AU-Serie Fa. Beckman Coulter) und dadurch eine schnelle kostengünstige Diagnostik
- ein breites Spektrum an Untersuchungen von Enzymen und spezifischen Proteinen
- einen hohen Probendurchsatz
- Untersuchungen an Blutserum oder Blutplasma entsprechend den gültigen Richtlinien der Bundesärztekammer

## Analysen

### Alanin-Aminotransferase (ALT)/Syn. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)

Labor: CCM  
Methode: optimierte Standardmethode IFCC  
Material: 1 ml Serum/Plasma  
Indikation: Screening auf Leberzellschädigung  
Lagerung  
und Transport: max. 7 Tage zwischen +2 °C bis +8 °C  
Normalwerte: Frauen: < 34 U/l, Männer: < 45 U/l

### Eiweiß (Gesamtprotein)

Labor: CCM  
Methode: Biuret  
Material: 1 ml Serum/Plasma  
Indikation: Vd. a. Synthesestörungen, Mangelernährung, Malabsorptionsstörungen  
Lagerung und  
Transport: max. 7 Tage zwischen +2 °C bis +8 °C  
Normalwerte: 66–87 g/dl

### Immunglobulin G (IgG)

Labor: CCM  
Methode: Turbidimetrie  
Material: 1 ml Serum/Plasma  
Indikationen: Differenzialdiagnose des Immunglobulinmangels  
Lagerung und  
Transport: max. 7 Tage zwischen +2 °C bis +8 °C  
Normalwerte: IgG: 7,0–16,0 g/l

## Molekulare Diagnostik (Nicht-HLA-Merkmale)

Laboratorien für die molekulare Diagnostik gibt es im ZTB an den Standorten CBF und CVK. Sie bieten die molekulare Bestimmung:

- von erythrozytären Blutgruppenmerkmalen (CVK)
- der HPA-Merkmale (CBF)
- der HNA-Merkmale (CVK)

### **Molekulare Bestimmung erythrozytärer Blutgruppenmerkmale**

Dieser Bereich umfasst die molekulardiagnostischen Analysen erythrozytärer Blutgruppensysteme mittels SSP-PCR bzw. Real-time PCR in Ergänzung zur klassischen Serologie.

#### AB0-Genotypisierung

Patienten, die eine schwache AB0-Ausprägung besitzen bzw. deren Muster der Isoagglutinine nicht eindeutig passt, können mittels molekulargenetischer Verfahren nachtypisiert werden. Neben der molekulardiagnostischen Bestimmung der 5 Hauptallele A1, A2, B, 01 und 02 können mittels SSP-PCR die bedeutendsten AB0-Varianten bestimmt werden. Die Indikationen sind:

- unklare serologische Blutgruppenbestimmungen
- Überlagerung des ursprünglichen Serotyps nach wiederholten oder massiven Transfusionen von Fremderythrozyten
- Monitoring nach AB0-differenter Stammzelltransplantation
- Neugeborene, weil bei ihnen die AB0-Antigenexpression schwach entwickelt ist und die Antikörper passiv von der Mutter erworben sein können

#### Rhesus-Genotypisierung (RHD und RHCE)

In Fällen der Abklärung serologisch schwacher bzw. unklarer D-Bestimmungen bei Patienten und bei Spendern können verschiedene Testkits für die Rhesus-Genotypisierung einzeln oder kombiniert eingesetzt werden. Fragliche Proben werden gezielt auf die häufigsten bzw. bedeutendsten partial D (inkl. D-Kategorien) und weak D Subtypen hin untersucht und somit eindeutig charakterisiert. Molekularbiologische Nachtypisierungen serologisch D-negativer Proben mit einem C- oder E-Antigen zeigen in seltenen Fällen einen D-positiven Genotyp (DEL, D weak, D variant). Die PCR-SSP-Testsysteme für das CDE-System liefern eindeutige Ergebnisse für die RHCE-Allele C, c, E, e und Cw. Im Fall eines fraglichen serologischen Befundes der C-, c-, E- oder e-Reaktion ist zur weiteren Abklärung die Untersuchung auf RHCE-variant-Gene empfehlenswert. Diese eignet sich zur Analyse anomaler serologischer Befunde wie z. B. unerwartete RH-Antikörper. Indikationen sind:

- Absicherung unklarer oder schwacher serologischer Reaktionen
- Vermeidung von D-Immunisierungen durch eine sichere molekularbiologische Bestimmung des D-Merkmals

### Weitere bzw. seltene Blutgruppensysteme/-allele:

Verschiedene hämolytische Erkrankungen wie die Sichelzellanämie oder Thalassämie, aber auch komplexe Krankheitsverläufe mit multiplen Operationen nach Unfällen oder chronischen Erkrankungen erfordern regelmäßige Transfusionen. Durch Transfusionen entstehen bei den Empfängern Blutgemische, die eine posttransfusionelle Feststellung insbesondere der Blutgruppen der Systeme Kell, Kidd, Duffy und MNS des Empfängers erschweren. Häufig sind auch Antiseren seltener Blutgruppen (wie Lu a/b, Di a/b, Yt a/b, Wr a/b, Co a/b, Kp a/b, Do a/b, Kn a/b) nicht oder nur schwer verfügbar. Patienten bilden gelegentlich schwer identifizierbare Antikörper, die auch gegen Antigene aus dem Bereich der seltenen Blutgruppenallele gerichtet sind. Im Zuge der Globalisierung steigt die Nachfrage nach Blutkonserven mit seltenen Blutgruppen stetig an. Eine eindeutige Bestimmung der seltenen Blutgruppen-Allele unterstützt die Suche nach der geeigneten Konserve. Indikationen sind:

- Absicherung unklarer oder schwacher serologischer Reaktionen
- Abklärung seltener Blutgruppenallele bei Patienten, die Allo- oder Autoantikörper gebildet haben und/oder in der serologischen Typisierung einen positiven DAT zeigen

### **HPA-Merkmale**

Die Human Platelet Antigens (HPA) sind Glykoproteine der Thrombozytenmembran. Werden Antikörper gegen HPA-Merkmale des Spenders gebildet, können Immunreaktionen im Blut des Empfängers eine Lyse der transfundierten Thrombozyten verursachen. In diesen Fällen benötigt der Patient Thrombozytenkonzentrate, die keine vom Antikörper erkannte Antigenstruktur besitzen. Die HPA-Merkmale HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, HPA-6, HPA-9 und HPA-15 treten jeweils in 2 unterschiedlichen Antigenstrukturen auf, die mit „a“ und „b“ bezeichnet werden. Die bi-allelischen Varianten beruhen auf einzelnen Polymorphismen (SNPs), die zu einem Aminosäureaustausch führen. Indikationen für die molekulare Bestimmung der HPA-Merkmale sind:

- Unterstützung bei der Diagnosestellung von Thrombozytopenien (z. B. Alloimmunthrombozytopenie, posttransfusionelle Purpura oder neonatale Alloimmunthrombozytopenie [NAIT])
- Patienten mit thrombozytären Antikörpern, die einen Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusion bedingen
- Bereitstellung geeigneter Thrombozytenkonzentrate mit ausgewählten HPA-Merkmalen für diese Patienten mit o. g. Krankheitsbildern

### **HNA-Merkmale**

Die Granulozytenantigene HNA (Human Neutrophil Antigens) repräsentieren eine Gruppe polymorpher allelischer Marker, lokalisiert auf den humanen neutrophilen Granulozyten. Klinisch bedeutsam sind die Merkmale HNA-1a, -1b, -1c (NA1, NA2 und SH) des FcγRIIIB-Glykoproteins, HNA-3a, -3b (5b, 5a) des Cholintransporter-Proteins-2 (CTL2) sowie HNA-4a (Mart) und HNA-5a (Ond) der Familie der b2-Integrine. Die PCR-SSP ermöglicht die molekulargenetische Bestimmung von HNA-Merkmalen wie HNA-1a/b/c, HNA-3a/av/b, HNA-4a/bw und HNA-5a/bw.

Indikationen für die molekulare Bestimmung der HNA-Merkmale sind:

- Unterstützung bei der Diagnosestellung von neonatalen Alloimmunneutropenien, Granulozytopenien und der transfusionsabhängigen akuten Lungeninsuffizienz (TRALI)
- HNA-Typisierung der Testzellen bei der HNA-Antikörperbestimmung mittels GIFT, GAT

## **Analysen**

Molekulargenetische Blutgruppenbestimmung (ABO, RHD, RHD-Zygotie, RHCE, Kell, Kidd, Duffy, MNS, seltene Blutgruppen)

Labore: CVK (AK-Labor)  
Methode: PCR-SSP, Real-time PCR  
Material: 6 ml EDTA-Blut  
Indikation: unklare serologische Blutgruppen-Bestimmung  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Lagerung: Anlieferung innerhalb von 3 Tagen nach Entnahme

DNA-Typisierung der HPA-Merkmale

Labore: CBF  
Methode: PCR, Amplifikation mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (SSO)  
Material: 10 ml EDTA-Blut  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Lagerung: Anlieferung innerhalb von 3 Tagen nach Entnahme

DNA-Typisierung der HNA-Merkmale

Labore: CVK  
Methode: PCR, Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern (SSP)  
Material: 10 ml EDTA-Blut  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Lagerung: Anlieferung innerhalb von 3 Tagen nach Entnahme

## Thrombozyten- und Granulozytenserologie

Ein Labor für die Thrombozyten- und Granulozytenserologie gibt es im ZTB am Standort CBF. Es bietet:

- die Analyse von Thrombozyten- und Granulozytenantigenen (siehe auch Kapitel Molekulare Diagnostik)
- den Nachweis der Antikörper gegen die HPA und HNA
- die HIT-II-Diagnostik
- die Thrombozytenfunktionstestungen

### Thrombozytenantigene

Auf der Oberfläche von Thrombozyten befinden sich Antigene, die die Bildung von Antikörpern (AK) bewirken können. Daraus können spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen resultieren. Bei den Antigenen auf der Thrombozytenoberfläche kann grundsätzlich unterschieden werden zwischen:

- Antigenen, die sich auch auf anderen Körperzellen befinden (z. B. AB0-System, HLA-Klasse I)
- Antigenen, die sich nur auf Blutplättchen nachweisen lassen (Humanes-Plättchen-Antigen-System [HPA])

### Thrombozytenspezifische Antigene

Derzeit sind 12 thrombozytenspezifische Antigene bekannt, die biallelen Systemen zugeordnet werden (HPA-1 bis 6, HPA-9 und HPA-15, das häufigere Allel wird mit a, das seltenere mit b bezeichnet), und weitere bisher 21 Antigene ohne zugehöriges Partnerantigen. Nach neueren Erkenntnissen sind einige HPA allerdings auch auf Endothel- oder Muskelzellen nachweisbar. Die wichtigste Rolle in der medizinischen Praxis spielen HPA-1a und HPA-5b. Die HPA-Merkmale werden vorwiegend molekular-genetisch nachgewiesen.

### Antikörper

Es gibt verschiedene Typen von Antikörpern, die sich gegen Thrombozyten richten:

- Thrombozytenisoantikörper, die sich spezifisch gegen Epitope der Glykoproteinrezeptoren (GPRzeptoren) auf der Plättchenoberfläche richten mit dem Ergebnis einer immunologisch ausgelösten Thrombozytopenie
- Autoantikörper, die mit monomorphen Determinanten auf den autologen Thrombozyten (und auf Thrombozyten gesunder Probanden) reagieren. Sie verursachen eine Autoimmunthrombozytopenie (ITP)
- Alloantikörper, die mit den genetisch determinierten Varianten thrombozytärer Oberflächenglykoproteine reagieren. Sie können eine fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT), eine posttransfusionelle Purpura (PTP) oder einen Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusionen auslösen
- medikamentenabhängige Antikörper, die medikamenteninduzierte Thrombozytopenien verursachen. Die klinisch bedeutsame heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT) nimmt eine Sonderstellung ein.

## **Indikationen**

### Indikationen für Thrombozyten-Antikörpertestung

- Nachweis von gebundenen und freien Autoantikörpern gegen die spezifischen Glykoproteinkomplexe der Thrombozyten bei Immunthrombozytopenien bzw. Autoimmunthrombozytopenien
- Nachweis von Thrombozytenantikörpern bzw. spezifischen HPA-Alloantikörpern bei fetaler/neonataler Alloimmunthrombozytopenie, einer posttransfusionellen Purpura, oder Refraktärzuständen nach Thrombozytentransfusionen
- Verdacht auf eine medikamentenabhängige Thrombozytopenie, z. B. heparininduzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT II)

### Indikationen für Granulozyten-Antikörpertestung

- Untersuchung auf HNA-Antikörper bei Plasma- und Thrombozytenspendern, um die TRALI verhindern zu können
- Autoimmunneutropenie
- neonatale Immunneutropenie
- transfusionsassoziierte Lungeninsuffizienz (TRALI)
- schwere febrile, nicht hämolytische Transfusionsreaktion
- Immunneutropenie nach Knochenmarktransplantation
- ineffektive Granulozytentransfusion
- Untersuchung der Verträglichkeit des Patienten mit einem ausgewählten Spender (x-match)

### Indikationen für einen Thrombozyten-Cross-Match

- Suche nach geeigneten Spendern für Patienten mit multispezifischen Antikörpern oder Refraktärität trotz Beachtung der Antikörper

## **Nachweismethoden**

### Thrombozytenantikörper, HPA-Alloantikörper, HNA-Alloantikörper

Zum Nachweis der Thrombozytenantikörper bzw. HPA-Alloantikörper kommen der ELISA, der traditionelle MAIPA-Test bzw. der sensitivere Test PAK-Lx, ein Festphasenassay mittels Luminexmessung (SPA), zum Einsatz. Das Prinzip des SPAs beruht auf der Verwendung verschiedener Beads, die eine Differenzierung der HPA-Antikörperspezifitäten gegen HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, GPIV und HLA-Klasse I ermöglichen.

Die HNA-1a-, HNA-1b-, HNA-1c- und HNA-2a-Antikörper werden in einem Präscreeningstest mittels Bead-Array-Technik (SPA) erfasst und mittels Granulozytenimmunofluoreszenztest und Granulozytenaggregationstest sowie im MAIGA sicher bestätigt und differenziert. Für den Nachweis der HNA-3a und HNA-3b-Antikörper kommt derzeit ausschließlich der Granulozytenaggregationstest in Kombination mit dem Granulozytenimmunofluoreszenztest zur Anwendung.

### Autoantikörper

Bei einer Immunthrombozytopenie sind die Thrombozyten mit Antikörpern beladen, die sich gegen die Merkmale des HPA-Systems richten. Die meisten Thrombozytenautoantikörper reagieren mit Determinanten auf den Glykoproteinkomplexen und induzieren eine Thrombozytopenie bei weitgehend erhaltener Thrombozytenfunktion.

Sie werden nachgewiesen durch Untersuchung auf

- an Thrombozyten gebundene Autoantikörper (zellständige Antikörper) aus EDTA-Blut des Patienten und
- freie Thrombozyten-Auto-/Alloantikörper aus dem Serum des Patienten.

### HIT-II-Diagnostik

Der Verdacht auf eine heparininduzierte Thrombozytopenie basiert mehr auf klinischen Daten und besonders auf der Kinetik der Thrombozytenwerte des Patienten. Neben dem Nachweis von Antikörpern gegen Heparin/Plättchenfaktor-4-Komplex (HPF4-Komplex) sollte auch stets der funktionelle Test, der HIPA-Test, durchgeführt werden. Die Bewertung der Ergebnisse im Labor erfordert Informationen über die Thrombozytenzahlen des Patienten, das verwendete Heparin und den Zeitpunkt der Medikamentengabe bei der Diagnose. Diese Angaben können auf dem speziellen Anforderungsschein der HLA-Labore für Thrombozytendiagnostik eingetragen werden.

## **Analysen**

### Nachweis heparininduzierter Thrombozytenantikörper (HIT II)

Labor: CBF  
Methode: Lateral Flow Immunoassay (PF-4-AK-Test), ELISA, Aggregationstest (HIPA)  
Material: 10 ml Nativblut  
Indikation: Verdacht auf HIT II  
Transport: bei > 2°C bis < 40° (nicht länger als 2 Tage)  
Lagerung: bei +2 °C bis +8 °C  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

### Thrombozyten-Alloantikörper-Bestimmung\*

Labor: CBF  
Methode: Immunfluoreszenz (FACS), MAIPA und PAK-Lx (Bead-Array-Technik)  
Material: 10 ml Nativblut und 3 x 10 ml EDTA-Blut  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Lagerung: bei +2 °C bis +8 °C für 48 h, danach bei –20 °C für max. 3 Jahre  
*\* Medikamentenabhängige Antikörper nur nach tel. Voranmeldung!*  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

### Thrombozyten-Autoantikörper-Bestimmung

Labor: CBF  
Methode: Immunfluoreszenz (FACS), MAIPA und PAK-Lx (Bead-Array-Technik)  
Material: 10 ml Nativblut und 2 x 10 ml EDTA-Blut  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Lagerung: bei +2 °C bis +8 °C für 48 h, danach bei –20 °C für max. 3 Jahre  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

### Thrombozyten-Cross-Match mittels MAIPA-Test

Labor: CBF  
Methode: MAIPA  
Material: 10 ml Nativblut des Patienten, 10 ml EDTA-Blut des Spenders  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Lagerung: Nativblut bei +2 °C bis +8 °C, EDTA-Blut bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

### Granulozyten-Alloantikörper-Bestimmung

Labor: CBF  
Methode: Granulozytenimmunfluoreszenztest (GIFT, FACS)  
Granulozytenaggregationstest (GAT)  
Material: 10 ml Nativblut  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Lagerung: 5 Tage, zwischen 4°C bis > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

### Thrombozytenfunktionsdiagnostik (nur nach tel. Voranmeldung!)

Labor: CBF  
Methode: Aggregation nach Born, Flow Cytometrie (CD62p, CD63, Mepacrin-Freisetzung, Expression CD41/CD61 u- CD42a/CD42b, Bindung PAC-1)  
Material: 30 ml Citratblut  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Lagerung: keine Lagerung  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

## **Transplantationsimmunologie (Gewebetypisierung, HLA-Diagnostik)**

Das Labor für Gewebetypisierung (HLA-Diagnostik, Transplantationsimmunologie) ist im ZTB am Standort CVK verortet. Das Labor ist aktuell nach den Standards der EFI akkreditiert. Es bietet folgende Leistungen an:

- HLA-Typisierungen der Genorte HLA-A, -B, -C (Klasse I), HLA-DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1 (Klasse II) von niedrig- bis hochauflösend für Patienten sowie für potenzielle Spender unter Verwendung molekularbiologischer Methoden: Hybridisierung mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (PCR-SSO), Amplifikation mittels sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP), Next Generation Sequencing (NGS) und quantitative PCR (qPCR)
- Bestimmungen von HLA-Merkmalen, die mit bestimmten Krankheiten assoziiert sind bzw. Medikamentenunverträglichkeiten bedingen
- HLA-Antikörperdiagnostik mittels zell- und festphasenbasierten Techniken: Mikrolymphozytotoxizitätstest (LCT), Micro-Bead-Arrays
- Bestimmung komplementbindender HLA-Antikörper mittels Festphasen-Technik basierend auf Micro-Bead-Array (C1q-Test)
- HLA-Verträglichkeitsprobe (Kreuztest, Crossmatch) mittels LCT
- Typisierung des Killer Cell Immunoglobuline-like Receptor (KIR)

Schwerpunkte des transplantationsimmunologischen Labors am ZTB sind:

- HLA-Typisierung von Patient und Spender vor Stammzell- und Organtransplantationen
- HLA-Antikörper-Bestimmungen bei Patienten in Vorbereitung zur Organ- und Stammzelltransplantation
- HLA-Antikörper-Bestimmungen bei Patienten in Nachsorge einer Organ- und Stammzelltransplantation
- HLA-Verträglichkeitsprobe vor Stammzell- und Organtransplantation
- HLA-Typisierung und -Antikörperbestimmung im Rahmen transfusionsmedizinischer Fragestellungen

- HLA-Typisierung eines Merkmals bei Krankheitsassoziationen und Medikamentenunverträglichkeiten
- Organspenderdiagnostik für die Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) im 24/7-Rufdienst
- Transplantationsimmunologische Konsultierungen für die Transplantationsprogramme der Charité im 24/7-Rufdienst
- HLA-Referenzlabor und Leitung immungenetischer externer Qualitätssicherungsprogramme (Ringversuche) bei INSTAND e.V.

## **HLA-System – Transplantationsgrundlagen**

Die Transplantation ist derzeit das optimale Therapieverfahren für diverse Erkrankungen. Es gibt 2 große Bereiche der Transplantation:

- die Transplantation von soliden Organen/Gewebe
- die Stammzelltransplantation durch die Nutzung von Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut als Stammzellquelle

### HLA-System

Die Kompatibilität der Gewebemerkmale von Spender und Empfänger ist entscheidend für den Erfolg einer Transplantation. Die Gewebemerkmale des humanen Leukozytenantigens (HLA) werden basierend auf Struktur, Funktion, Expression und genetischer Organisation eingeteilt in:

- HLA-Klasse I (HLA-A, -B, -C) und
- HLA Klasse II (HLA-DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1).

Die Bezeichnung des Merkmals entspricht der Lokalisierung der Gensequenz auf dem entsprechend bezeichneten Genort. Derzeit unterscheidet man 2 Ebenen der Auflösung der Merkmale:

- Eine niedrigauflösende HLA-Typisierung oder Einfeldauflösung liegt vor, wenn das erste Feld, in der Regel die ersten 2 Ziffern des Allels ermittelt bzw. berichtet werden. Diese Einfeldauflösung entspricht auch im weitesten Sinn der bisher bekannten serologischen Nomenklatur der HLA-Merkmale.
- Eine hochauflösende Typisierung oder Zweifeldauflösung liegt vor, wenn mind. die ersten beiden Felder des Allels berichtet werden.

Details zur HLA-Nomenklatur und eine Übersicht über serologisch und molekular-genetisch aktuell definierte Merkmale sind über folgenden Link einzusehen:

<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>

Der angestrebte Auflösungsgrad und Umfang der HLA-Typisierung richtet sich primär nach Indikation zur soliden Organ- bzw. Stammzelltransplantation.

## **HLA-Diagnostik im Rahmen von Stammzelltransplantationen und Organtransplantation**

### a) Stammzelltransplantation

Da bei einer Stammzelltransplantation immunkompetente Zellen transplantiert werden, ist eine hochauflösende

Zweifeldtypisierung der 6 HLA-Genorte (A, B, C, DRB1, DQB1 und DPB1) sowohl beim Patienten als auch bei potenziellen Spendern notwendig. Eine möglichst hohe HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger ist anzustreben, da bereits geringe Unterschiede bewirken können, dass die Immunzellen des Spenders, die sich aus dem

Transplantat entwickeln, eine starke Graft-versus-Host-Disease (GvHD) beim Patienten hervorrufen. Zur Diagnostik im Rahmen einer Stammzelltransplantation gehören:

- eine hochauflösende Zweifeld-HLA-Typisierung beim Patienten zur Transplantationsvorbereitung für die 6 Genorte (A, B, C, DRB1, DQB1 und DPB1)
- für potenzielle Stammzellspender sind folgende Untersuchungen vorgesehen:
  - i) Familienspendersuche: niedrigauflösende Einfeld-HLA-Typisierung der Genorte HLA-A, -B, -DRB1 zur Identifizierung kompatibler Spender und hochauflösende Zweifeld-HLA-Typisierung der Genorte HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 und -DPB1 zur Bestätigung und Erweiterung
  - ii) Fremdspendersuche: hochauflösende Zweifeld-HLA-Typisierung der Genorte HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 und -DPB1 zur Bestätigung und ggf. Erweiterung - Optional: KIR-Typisierung, Erweiterung der Typisierung auf HLA-DRB3/4/5, -DQA1, -DPA1
- eine HLA-Typisierung auf niedrig- oder hochauflösendem Niveau bei Nabelschnurblut

Im Rahmen einer Stammzelltransplantation mit HLA-Mismatches (z.B. haploidente Stammzelltransplantation mit einem Familienspender) wird zur Gewährleistung der Kompatibilität die Durchführung des Nachweises von HLA-Antikörpern und/oder LCT-Crossmatch empfohlen.

#### b) Nieren- und Pankreas-Transplantation

Die Allokation solider Organtransplantate von Verstorbenen spendern erfolgt durch die Vermittlungsstelle Eurotransplant (ET). Die Evaluation von potenziellen Lebendspendern für eine Nieren- oder Lebertransplantation erfolgt durch das zuständige Transplantationsprogramm.

Eine besondere Bedeutung für die Entscheidung zur Spender-Empfänger-Auswahl i.R.d. Nieren- und Pankreastransplantation hat die regelmäßige Überwachung der HLA-Antikörper des Patienten auf der Warteliste. Das Antikörperscreening mittels LCT und Micro-Bead-Array wird in 3-monatigen Abständen durchgeführt. Antikörper werden nach Isotyp (IgM vs. IgG) und Komplementbindungsfähigkeit mithilfe des Einsatz von Dithiotreitol (DTT) im LCT bzw. C1q-Test differenziert. Die HLA-Antikörperspezifitäten werden durch die Erhebung potenzieller Immunisierungsereignisse plausibilisiert, in der ET-Allokationsdatenbank dokumentiert, um ggf. bei der Vermittlung von Spenderorganen berücksichtigt werden zu können. Es gilt zu verhindern, dass vorhandene Antikörper des Patienten korrespondierende Antigene das Spenderorgan erkennen und kurz- oder mittelfristig das Transplantat abgestoßen wird.

Vor Transplantation bzw. zur Auswahl von Spenderorgan und Empfänger ist ein lymphozytotoxischer Cross-Match obligatorisch. Nach Nieren- und Pankreastransplantation findet in der Frühphase nach Transplantation ein wöchentliches HLA-Antikörper-Monitoring mittels Micro-Bead-Array zur Überwachung potenzieller Abstoßungsreaktionen statt. In der Spätphase ist ein jährliches HLA-Antikörper-Monitoring implementiert.

Im Rahmen der Nieren- und Pankreastransplantation ist die niedrigauflösende Einfeldtypisierung der Genorte HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 obligatorisch. Optional können weitere Genorte bzw. eine Zweifeldtypisierung zur Plausibilisierung nachweisbarer HLA-Antikörper und Ableitung serologischer Äquivalente erforderlich sein.

### c) Nicht-renale Organtransplantation

Die Allokation von Lebertransplantaten erfolgt derzeit i.d.R. ohne Berücksichtigung der HLA-Gewebemerkmale und -Immunsierung. Die aktuelle Richtlinie der Bundesärztekammer zur Lebertransplantation empfiehlt jedoch die HLA-Typisierung und –Antikörperdiagnostik zur Festlegung der immunsuppressiven Therapie nach Transplantation, um das Langzeittransplantatüberleben zu verbessern.

Vor der Transplantation thorakaler Organe (d.h. Herz und/oder Lunge) erfolgt die niedrigauflösende Einfeldtypisierung der Genorte HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 sowie die Detektion und Spezifikation von präformierten HLA-Antikörpern mittels LCT und Micro-Bead-Array. Im Rahmen der Transplantation werden derzeit zytotoxische Antikörper (LCT, C1q-Test) als nicht-akzeptable Antigenmismatches verboten.

Nach nicht-renalener Organtransplantation findet ein durch den klinischen Verlauf getriggertes Posttransplant-Monitoring mittels Micro-Bead-Array statt.

### d) HLA-Verträglichkeitsprobe (Crossmatch) im Rahmen von Transfusion und Organtransplantation

Vor Nieren- und Pankreas-Transplantation bzw. zur Auswahl von Spenderorgan und Empfänger i.R.d. Lebendspende ist ein lymphozytotoxischer Crossmatch (LCT-Crossmatch) obligatorisch, um eine hyperakute Abstoßung zu vermeiden. Ein positiver LCT-Crossmatch ist eine klare Kontraindikation zur Transplantation. Sind nur bestimmte Antikörper des Isotyps IgM ohne Spezifität gegen HLA oder Autoantikörper nachweisbar, ist eine Transplantation nicht zwingend kontraindiziert. Um IgM- oder Autoantikörper gegenüber transplantationsrelevanten IgG-Antikörper zu differenzieren, behandelt man Seren mit Dithiothreitol (DTT) vor, das IgM-Antikörper inaktiviert.

Heutzutage findet vielfach der sog. virtuelle Crossmatch Anwendung. Dabei werden HLA-Antikörper des Patienten mittels Micro-Bead-Array bestimmt und die Spezifitäten *in silico* mit der HLA-Spendertypisierung abgeglichen. Sind Antikörperspezifitäten gegen korrespondierende HLA-Antigene vorhanden, ist der virtuelle Crossmatch *per definitionem* positiv. Der virtuelle Crossmatch zeichnet sich durch eine erhöhte Sensitivität, Spezifität und verringerter Störanfälligkeit gegenüber dem LCT-Crossmatch aus. Die klinische Relevanz wird teilweise jedoch weiterhin kontrovers diskutiert.

### e) Typisierung von HLA-Merkmalen zur Abklärung von Krankheitsassoziationen bzw. Medikamentenunverträglichkeiten

Die zentrale Funktion der HLA-Klasse-I- und -II-Moleküle im Rahmen der Präsentation von endogenen bzw. exogenen Peptiden und der Allo-Erkennung erklärt, warum sie eine besondere Rolle bei Autoimmunerkrankungen, Allergien oder chronisch persistierenden Infektionen spielen und sogar als Indikatoren für definierte Erkrankungen dienen. Bei mehr als 30 Erkrankungen besteht eine Assoziation mit bestimmten HLA-Merkmalen, die auf eine Krankheitsprädisposition hinweisen können. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematoses (SLE), ankylosierende Spondylitis (Morbus Bechterew), multiple Sklerose (MS) der insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM) sowie um weitere Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises.

Der positive Nachweis eines HLA-Merkmals, das mit einer Krankheit assoziiert ist, weist auf eine genetische Prädisposition hin. Es ergibt sich ein – im Vergleich zum „Normalkollektiv“ – relatives Risiko des HLA-Antigentragers zu erkranken. Ein Merkmalsträger muss also nicht zwingend erkranken. Anhand von Studien konnte gezeigt werden, dass bei der Ausprägung dieser Erkrankungen Umweltfaktoren eine wichtige Rolle zukommt, sodass bei genetisch prädisponierten Betroffenen in belasteten Familien die Erkrankungen sporadisch auftreten.

## **HLA- und HPA-Diagnostik im Rahmen von Thrombozytenrefraktäritätszuständen**

Liegt der Thrombozytenanstieg nach Thrombozytentransfusion deutlich unter 10.000/ $\mu$ l, handelt es sich um eine Thrombozytenrefraktärität des Patienten. Die häufigste Ursache für einen immunologisch induzierten Refraktärzustand sind HLA-Antikörper, die gegen die HLA-Klasse-I-Merkmale gerichtet sind (die sich auf der Thrombozytenmembran befinden). In seltenen Fällen können auch HPA-Antikörper (thrombozytäre Antikörper) der Auslöser sein. HLA- und/oder thrombozytäre Alloantikörper des Patienten, die durch ein vorangegangenes Immunisierungereignis (Schwangerschaft oder Transfusion) gebildet wurden, binden an die entsprechenden Antigene auf der Oberfläche der Thrombozyten des Blutprodukts. Die antikörperbeladenen Thrombozyten werden beschleunigt aus dem Blut eliminiert.

Um einen Anstieg der Thrombozytenzahl beim Patienten zu erreichen, ist ggf. eine Transfusion von HLA-gematchten Thrombozyten erforderlich. Dazu wird:

- der aktuelle HLA- und/oder HPA-Antikörperstatus und die Spezifität der Antikörper geklärt
- eine HLA-Typisierung der HLA-Klasse-I-Merkmale (HLA-A, B) des Patienten auf niedrigauflösendem Niveau vorgenommen und
- der Blutspender gezielt nach HLA- bzw. HPA-Merkmalen ausgewählt, wobei das Antigen, gegen das sich der Patientenantikörper richtet, nicht vorhanden sein darf, was eine molekularbiologische HLA- bzw. HPA-Antigenbestimmung (niedrigauflösend) der Spender erfordert

## **Indikationen**

### HLA-Antikörperbestimmung

- Nachweis von HLA-Antikörpern vor und nach Organ- oder Stammzelltransplantation bei Patienten
- Nachweis von HLA-Antikörpern bei Patienten zur Abklärung von Transfusionszwischenfällen
- Antikörperüberwachung bei therapierten Patienten mit habituellen Aborten
- bei Patienten, die infolge einer bestimmten Therapie vermehrt Thrombozytenkonzentrate transfundiert bekommen, ist eine Kontrolluntersuchung auf HLA-Antikörper in bestimmten Abständen nach Transfusion zu empfehlen
- Untersuchung des Antikörperstatus zu Therapiebeginn besonders bei Empfängern, die durch Transfusionen, Transplantationen oder Schwangerschaften vorsensibilisiert sein können
- 3-monatiges Screening bei Patienten auf der Nieren- und Pankreaswarteliste und zusätzliche Antikörperkontrolle nach Sensibilisierungseignissen (z. B. Bluttransfusionen)
- Untersuchung auf HLA-Antikörper, um Refraktärzustände nach Thrombozytengabe abklären zu können
- Untersuchung auf HLA-Antikörper bei Plasma- und Thrombozytenspendern bei Vd. auf TRALI

## HLA-Typisierung

in Vorbereitung zur Nieren-, Pankreas- oder Herz- und Lungentransplantation

- zur Abklärung HLA-assoziiierter Krankheiten bzw. Medikamentenunverträglichkeiten
- Verstorbenen- und Lebendorganspender
- Blutspender
- Identitätsprüfung im Rahmen GMP-gerechter Herstellung autologer und allogener Zelltherapeutika

## Crossmatch

- LCT-Crossmatch vor Nieren- und Pankreastransplantation obligatorisch
- LCT-Crossmatch vor Herz-, Lunge- und Lebertransplantation optional
- LCT-Crossmatch vor Stammzelltransplantation optional
- virtuelles Crossmatch vor Organ- und Stammzelltransplantation optional

## **Analysen**

### Molekularbiologische Bestimmung der HLA-Klasse-I-Merkmale (A, B, C) (niedrigaufgelöst oder hochaufgelöst)

Labor:	CVK
Methode:	PCR-SSP, PCR-SSO, NGS, qPCR
Material:	10 ml EDTA- oder Citratblut
Lagerung u. Transport:	bei > 2°C bis < 40°
Regelbearbeitungszeit:	5 Werktage (SSO, SSP) bzw. 8 Werktage (NGS)

### Molekularbiologische Bestimmung der HLA-Klasse-II-Merkmale (-DRB1\*, -DQB1\*, -DQA1\*, -DPA1, -DPB1\*, DRB3/4/5) (niedrigaufgelöst oder hochaufgelöst)

Labor:	CVK
Methode:	PCR-SSP, PCR-SSO, NGS, qPCR
Material:	10 ml EDTA- oder Citratblut
Lagerung u. Transport:	bei > 2°C bis < 40°
Regelbearbeitungszeit:	5 Werktage (SSO, SSP) bzw. 8 Werktage (NGS)

### Molekulargenetische Einzelantigenbestimmung i.R.v. Krankheitsassoziationen und Medikamentenunverträglichkeiten (z.B. HLA-B\*27)

Labor:	CVK
Methode:	PCR-SSP, PCR-SSO
Material:	10 ml EDTA- oder Citratblut
Lagerung u. Transport:	bei > 2°C bis < 40°
Regelbearbeitungszeit:	5 Werktage

### Molekulargenetische Bestimmung der KIR-Antigene

Labor:	CVK
Methode:	PCR-SSP, PCR-SSO, qPCR
Material:	10 ml EDTA- oder Citratblut
Lagerung u. Transport:	bei > 2°C bis < 40°
Regelbearbeitungszeit:	10 Werktage

#### HNA-1a-, 1b-, 1c-, 3a-, 3a-variant und 3b-, 4a-, 4b-, 5a-, 5b-Merkmalbestimmung

Labor: CVK  
Methode: PCR-SSP  
Material: 10 ml EDTA-Blut  
Lagerung u.  
Transport: bei > 2°C bis < 40°  
Regelbearbeitungszeit: 5 Werktage

#### Antikörperscreening und -Differenzierung zytotoxischer HLA Klasse I Antikörper mittels LCT (mit und ohne DDT-Vorbehandlung)

Labor: CVK  
Methode: LCT  
Material: 10 ml Nativblut oder Serum  
Transport: ohne Kühlung  
Lagerung: ≤1 Tag: senkrecht bei > 2°C bis < 40°, >1 Tag: senkrecht bei +4°C bis +8°C, Serum bei 4-8°C  
Regelbearbeitungszeit: 5 Werktage

#### Antikörperscreening und -Differenzierung komplementbindender HLA Klasse I und Klasse II Antikörper mittels C1q-Assay

Labor: CVK  
Methode: C1q-Test  
Material: 10 ml Nativblut oder Serum  
Transport: ohne Kühlung  
Lagerung: ≤1 Tag: senkrecht bei > 2°C bis < 40°, >1 Tag: senkrecht bei +4°C bis +8°C, Serum bei 4-8°C  
Regelbearbeitungszeit: 8 Werktage

#### HLA-Klasse-I- und II-Antikörperscreening und -differenzierung mittels Luminex-Bead-Array-Technik

Labor: CVK  
Methode: Bead-Array-Technik (SPA), Single-Antigen-Bead-Technik (SPA)  
Material: 10 ml Nativblut oder Serum  
Transport: ohne Kühlung  
Lagerung: ≤1 Tag: senkrecht bei > 2°C bis < 40°, >1 Tag: senkrecht bei +4°C bis +8°C, Serum bei 4-8°C  
Regelbearbeitungszeit: 5 Werktage

#### Autologer Kreuztest mittels LCT

Labor: CVK  
Methode: LCT-Kreuztest  
Material: 10 ml Citrat-Blut und 10 ml Nativblut oder Serum vom Empfänger  
Transport: ohne Kühlung  
Lagerung: ≤1 Tag: senkrecht bei > 2°C bis < 40°, >1 Tag: senkrecht bei +4°C bis +8°C, Serum bei 4-8°C  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werktage

### HLA-Verträglichkeitsprobe mittels LCT (ohne und mit DTT-Vorbehandlung)

Labor: CVK  
Methode: LCT-Kreuztest mit peripheren Lymphozyten und ggf. isolierten T- und B-Lymphozyten  
Material: 20 ml Citrat-Spenderblut; Spenderprobe aus Milz oder Lymphknoten  
10 ml Nativblut oder Serum vom Patienten  
Transport: ohne Kühlung  
Lagerung: ≤1 Tag: senkrecht bei > 2°C bis < 40°, >1 Tag: senkrecht bei +4°C bis +8°C, Serum bei 4-8°C  
Regelbearbeitungszeit: 3 Werkzeuge

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABO	ABO-Blutgruppensystem
ADCC	Antibody dependent cellular Cytotoxicity, antikörpervermittelte zelluläre Toxizität
AHG	Antihumanglobulin
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
AK	Antikörper
ALT	Alaninaminotransferase
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CFU	Colony Forming Unit
CMIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
CMV	Zytomegalievirus
CPDA	Zitrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (Konservierungsmittel)
DAkkS	Deutsche Akkreditierungsstelle
DAT	Direct Antiglobuline Test
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
DTT	Dithiotreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
FNAIT	Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie
GAT	Granulozytenaggregationstest
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GIFT	Granulozytenimmunfluoreszenztest
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GvHD	Graft versus Host Disease
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIPA	Heparin-induced Platelet Antibody
HIT	Heparininduzierte Thrombozytopenie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRT	Hämolytische Transfusionsreaktion
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

Ig	Immunglobuline
ITP	Idiopathische thrombozytopenische Purpura (Morbus Werlhof)
IU	International Unit
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCT	Lymphocyte Cytotoxicity Test, Lymphozytenzytotoxizitätstest
LDL	Low Density Lipoproteins
LIA	Lumineszenzimmunoassay
MAIPA	Monoclonal Antibody-specific Immobilisation of Platelet Antigens
MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MPV	Mittleres Plättchenvolumen
MTHFR	Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase
NAIT	Neonatale Alloimmunthrombozytopenie
NK	Natürliche Killerzelle
NSB	Nabenschnurblut
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PF4	Plättchenfaktor 4
PIFT	Plättchenimmunfluoreszenztest
PTP	Posttransfusionelle Purpura
RNA	Ribonukleinsäure
SASPA	Simultaneous Analysis of specific Platelet Antibodies
SPA	Solid-Phase-Assay
SSO	Sequence-Specific Oligonucleotide Probe Hybridization
SSP	Sequence Specific Primers
TPHA	Treponema-pallidum-Hämagglutinationstest
TRALI	Transfusion related acute Lung Insufficiency
VDRL	Veneral Disease Research Laboratory (Lues-Test)
VZV	Varizella-Zoster-Virus
ZZAP	Cysteine-activated Papain and Dithiothreitol