

Universitätsklinikum Ulm
Institut für Transfusionsmedizin
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Hubert Schrezenmeier

**Human-Leucocyte-Antigen-Antikörperbildung unter
Hämotherapie**

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Thomas Rainer Holzer
Ravensburg

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hubert Schrezenmeier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jochen Greiner

Tag der Promotion: 20.04.2012

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DAS HLA-SYSTEM	1
1.2 THROMBOZYTEN	5
1.3 THROMBOZYTENTRANSFUSIONEN	6
1.4 HLA-ANTIKÖRPER	8
1.5 KOMPLIKATIONEN DURCH HLA-ANTIKÖRPER	10
1.6 FRAGESTELLUNGEN.....	12
2 MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1 PATIENTEN	13
2.2 KONTROLLGRUPPEN	13
2.3 PROBEN	14
2.4 LYMPHOZYTOTOXIZITÄTSTEST	14
2.5 ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY	17
2.6 VERWENDETE GERÄTE UND CHEMIKALIEN	20
2.7 STATISTIK.....	20
3 ERGEBNISSE.....	21
3.1 PATIENTENCHARAKTERISTIKA UND RISIKOFAKTOREN	21
3.2 HLA-AK DER KONTROLLGRUPPEN	27
3.3 TRANSFUSIONEN UND ERGEBNISSE ALLGEMEIN	29
3.4 RISIKOFAKTOREN UND HLA-AK ZU BEGINN	34
3.5 RISIKOFAKTOREN UND HLA-AK AN DEN VERSCHIEDENEN UNTERSUCHUNGSZEITPUNKTEN	41
3.6 RISIKOFAKTOREN UND HLA-AK IM GESAMTEN ZEITRAUM	49

4	DISKUSSION	63
4.1	PATIENTENCHARAKTERISTIKA, TRANSFUSIONEN, TESTMETHODEN.....	63
4.2	HLA-AK DER KONTROLLGRUPPEN	68
4.3	HLA-AK-BILDUNG DURCH HÄMOTHERAPIE	70
4.4	HLA-AK-BILDUNG DURCH ANDERE RISIKOFAKTOREN	82
4.5	SCHLUSSFOLGERUNG.....	86
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	88
6	LITERATURVERZEICHNIS	90
	DANKSAGUNG	104
	LEBENS LAUF	105

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper; Globuline die von Plasmazellen produziert werden. Sie entstehen bei der Immunantwort als Reaktion auf Antigene.
AML	Akute myeloische Leukämie; Eine maligne Erkrankung der Myelopoese, die zu einer Vermehrung unreifer Vorstufen der Myelopoese im Knochenmark und im Blut führt.
BMI	Body-Mass-Index; Maßzahl für die Bewertung des Gewichts eines Menschen. Der BMI wird berechnet indem man das Gewicht (in kg) durch die Körpergröße im Quadrat (in m) dividiert.
CCI	Corrected Count Increment; Formel mit welcher der Erfolg einer Thrombozytentransfusion berechnet werden kann.
CD	Cluster of Differentiation; Eine Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen. Diese lassen sich nach funktionellen oder biochemischen Eigenschaften ordnen. Bestimmte Moleküle sind dabei charakteristisch für bestimmte Zellen des Körpers.
DMSO	Dimethylsulfoxid; Eine farb- und geruchlose Flüssigkeit, die zu den Sulfoxiden gehört und als Lösungsmittel verwendet wird.
DNA	Deoxyribonucleic Acid; Ein Biomolekül, das in allen Lebewesen vorkommend. Die DNA ist die Trägerin der Erbinformation.
DRK	Deutsches Rotes Kreuz; Die Nationale Rotkreuz-Gesellschaft in Deutschland. Der Hauptsitz liegt in Berlin. Das Deutsche Rote Kreuz hat ca. 5 Millionen Mitglieder.
EBV	Epstein-Barr-Virus; Ein DNA-Virus aus der Familie der Herpesviren. Verursacher des Pfeifferschen Drüsenfiebers.
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Ein Verfahren, das für immunologische Nachweise verwendet wird. Der Nachweis beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion
EK	Erythrozytenkonzentrat
fg	Femtogramm; Das Billiardstel eines Gramms

HLA	Human Leucocyte Antigen; Der Name des humanen MHC, einer Gruppe von Genen bei Wirbeltieren. Diese codieren für Proteine, welche für die Immunerkennung, die Gewebeverträglichkeit und die immunologische Individualität wichtig sind.
HLA-AK	Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; Antikörper, die gegen HLA-Moleküle gerichtet sind.
HLA-TK	Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate; Ein TK, dessen HLA-Merkmale auf die des Empfängers abgestimmt wurden.
IgG	Immunglobulin G; Ein Glykoprotein, das von Plasmazellen zur Immunabwehr produziert wird. Als Antikörper ist es Teil der humoralen Abwehr und wirkt v.a. gegen Bakterien.
IgM	Immunglobulin M; Ein Glykoprotein, das von Plasmazellen zur Immunabwehr produziert wird. IgM-Antikörper sind die ersten Antikörper bei der humoralen Immunantwort.
IMGT	international ImMunoGeneTics information system; Eine globale Informationssammlung für Themen der Immungenetik und Immunoinformatik.
IKT	Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm; Das vom DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gemeinnützige GmbH und der Universität Ulm gemeinsam getragene Institut für Transfusionsmedizin der Universität Ulm nimmt die Aufgaben in Forschung und Lehre im Fachgebiet wahr.
LCT	Lymphocyte Cytotoxicity Test; Im deutschen Sprachraum auch Lymphozytotoxizitätstest, ein Test zum Nachweis von HLA-Antikörpern.
MgCl₂	Magnesiumchlorid; Das stark hygroskopische Magnesiumsalz der Salzsäure.
MHC	Major Histocompatibility Complex; Eine Gruppe von Genen bei Wirbeltieren. Diese codieren für Proteine, welche für die Immunerkennung, die Gewebeverträglichkeit und die immunologische Individualität wichtig sind.
n.a.	not available; Die Daten die mit n.a. abgekürzt werden, konnten nicht erhoben werden.

NaN₃	Natriumazid; Das Natriumsalz der Stickstoffwasserstoffsäure. Es verhindert das Wachstum von Mikroorganismen.
NaOH	Natriumhydroxid; Ein weißer Feststoff, der sich mit Wasser unter Wärmeentwicklung zu Natronlauge löst.
OD	Optische Dichte; Ein Maß für die Abschwächung einer Strahlung in einem Medium.
PBS	Phosphate Buffered Saline; Eine Pufferlösung mit dem pH-Wert 7,4. Durch die Salze besitzt die Lösung den osmotischen Druck des menschlichen Organismus.
PRA	Panel Reactive Antibodies; Dieser Wert gibt an, in wie viel Prozent der Panels einer LCT-Testplatte die Antikörper eines Serums eine positive Reaktion erzeugen.
SD	Standard Deviation; Im deutschen Standardabweichung. Ein Begriff der Statistik und der Wahrscheinlichkeitsrechnung und ein Maß für die Streuung der Werte einer Zufallsvariablen um ihren Mittelwert.
TK	Thrombozytenkonzentrat; Ein aus menschlichem Blut gewonnenes Medizinprodukt. Es dient zur Übertragung von Blutplättchen von einem Menschen auf einen anderen.
TRALI	Transfusion Related Acute Lung Injury; Komplikation bei der Transfusion von Blutprodukten, die zu einer akuten Schädigung der Lunge führt.
TRAP	The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group; Gruppe von Wissenschaftlern, die gemeinsam eine Studie durchführten.
UVB	Ultraviolettstrahlung B; Elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von 320–280 Nanometern.
WHO	World Health Organization; Eine Sonderorganisation der Vereinten Nationen. Sie stellt die Koordinationsbehörde für das internationale öffentliche Gesundheitswesen der Vereinten Nationen dar. Der Hauptsitz der WHO befindet sich in Genf (Schweiz).

1 Einleitung

1.1 Das HLA-System

Allgemeines:

Das Human Leucocyte Antigen System (HLA) ist die menschliche Variante des Major Histocompatibility Complex (MHC). Hauptaufgabe des HLA-Systems ist die Präsentation von Peptidfragmenten auf der Zelloberfläche, wo sie zusammen mit den HLA-Molekülen von T-Zellen erkannt werden und eine Immunantwort eingeleitet wird. Großen Einfluss hat das HLA-System beim Erkennen von körpereigenen und körperfremden Zellen. Es ist somit entscheidend am Erfolg von Organtransplantationen, Stammzelltransplantationen und der Transfusion von HLA-tragenden Zellen (z.B. Thrombozyten) beteiligt. Die HLA-Gene, die an der Immunantwort beteiligt sind, können in die Klassen I, II und III eingeteilt werden (Waßmuth 2005a). Sie finden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.1-6p21.3). Es handelt sich um 224 Genorte, von denen 128 exprimiert werden (The MHC sequencing consortium 1999). Sie erstrecken sich über einen DNA-Bereich von ca. 3600 Basenpaaren (Beck, Trowsdale 2000) und werden in die vier Hauptregionen A, B, C und D unterteilt. Zwischen den Genen der Klassen I und II liegen die der Klasse III. Man kann diese Region jedoch nicht dem HLA-System zuordnen und die Bezeichnung ergibt sich lediglich aus der Lage und der Historie (Waßmuth 2005a). Die HLA-Loci sind polygen, d.h. jedes Individuum verfügt über mehrere Klasse I- und Klasse II-Gene (Murphy et al 2009a). Weiterhin handelt es sich bei den HLA-Genen um die Gene mit dem höchsten Grad an Polymorphismus. Manche Gene haben dabei über 400 Allele, die alle in der Bevölkerung relativ häufig vorhanden sind (Murphy et al. 2009a). Auf Grund dieses Polymorphismus kommt die große Vielfalt verschiedener HLA-Phänotypen in der Gesamtbevölkerung zustande und es erklärt, warum die meisten Menschen an den HLA-Loci heterozygot sind (Murphy et al. 2009a). Die spezielle Kombination der HLA-Allele auf einem Chromosom bezeichnet man als Haplotyp. Jeder Mensch exprimiert zwei Allele pro Genort, wovon jeweils eines von der Mutter und eines vom Vater geerbt wurde. Die verschiedenen Merkmale werden dabei im Block vererbt. Für zwei Geschwister bedeutet dies, dass sie zu 25% beide Haplotypen gemeinsam haben (Vollidentität), zu 50% einen Haplotyp

(Haploidität) und in 25% keinerlei Übereinstimmung besitzen (Nichtidentität). Eltern und ihre Kinder sind jeweils haploidentisch zueinander (Murphy et al. 2009a; Waßmuth 2005a).

Nomenklatur:

Die jeweils gültige Nomenklatur für die Faktoren des HLA-Systems wird durch das WHO Nomenclature Committee festgelegt. Dies betrifft die Benennung neuer Gene, Allele und ihrer Genprodukte. Offizielle Quelle für die HLA-Sequenzen, die durch das WHO Nomenclature Committee festgelegt werden, ist die IMGT/HLA Sequence Database. Diese Datenbank enthält nach aktuellem Stand (07.02.2011) 6074 (siehe Abbildung 1) Allel-Sequenzen (WHO Nomenclature Committee 2011). Folgende Nomenklatur wird vom Komitee empfohlen:

- HLA: Bezeichnung des Systems
- A,B,C etc.: Bezeichnung der Loci bzw. der Regionen
- 1, 2, 3 etc.: Spezifität innerhalb eines Locus
- w: Kennzeichnung zellulär definierter Spezifitäten, von HLA-Bw4 und –Bw6 (Epitope an allen HLA-B- und einigen HLA-A-Genprodukten), sowie aller HLA-C-Faktoren (zur Vermeidung einer Verwechslung mit Komplementproteinen)
- Bei Unterteilungen der HLA-Merkmale kann die breitere Spezifität in Klammern hinter der engeren angegeben werden, z.B. A23(9)
- Schreibweise für Phänotypen: HLA-A1,3; B7,8; Cw7; DR2,3
- Schreibweise für Genotypen: HLA-A1, B8, Cw7, DR3/A3, B7, Cw7, DR2

(Fischer, Mayr 2004).

Noch immer sind nicht alle Alloantigene des HLA-Systems erfasst. Diese unbekanntes Allele werden als HLA-AX, -BX usw. bezeichnet.

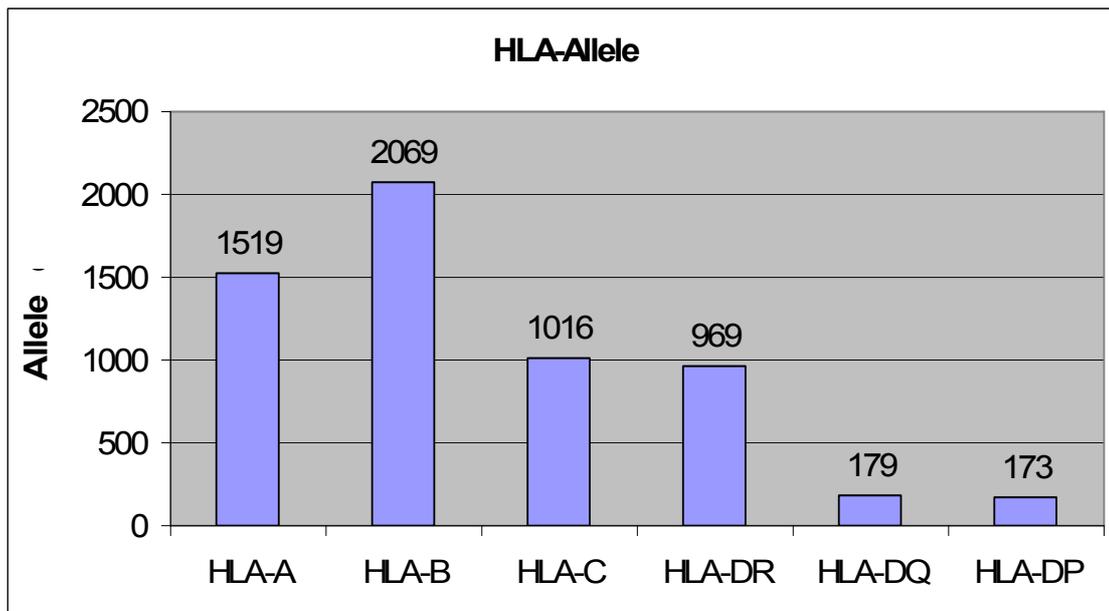


Abbildung 1: HLA-Allele: Anzahl der international durch die WHO anerkannten Allele für die entsprechenden HLA-Gene - Stand: 07.02.2011 (WHO Nomenclature Committee 2011). HLA-X = entsprechender Locus des Human Leucocyte Antigen Systems. HLA-A, -B, -C = Human-Leucocyte-Antigen-A, -B, -C (Klasse-I-Gene); HLA-DR, -DQ, -DP = Human-Leucocyte-Antigen-DR, -DQ, -DP (Klasse-II-Gene); WHO = World Health Organization.

Klasse-I:

Bei HLA-Klasse I Molekülen handelt es sich um nicht-kovalent verbundene Heterodimere. Sie bestehen aus einer polymorphen, glykosylierten α -Kette die in den Genregionen A, B und C auf Chromosom 6 codiert wird (Waßmuth 2005b; Fischer, Mayr 2004). An die α -Kette lagert sich das β_2 -Mikroglobulin an, ein Polypeptid, das außerhalb des HLA-Komplexes auf Chromosom 15 codiert ist (Waßmuth 2005b). Die so entstandenen Heterodimere werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert, sowie auf den kernlosen Thrombozyten (Santoso et al. 1993; Santoso et al. 1986). Lässt man Antikörper gegen bestimmte HLA-Merkmale mit den entsprechenden Molekülen reagieren, zeigen sich zahlreiche Kreuzreaktionen (Fischer, Mayr 2004). Im Genkomplex auf Chromosom 6 findet man insgesamt mehr als 20 Genorte von denen einige immunologische Relevanz haben während andere als Pseudogene für kein funktionsfähiges Produkt codieren. (Waßmuth 2005a). HLA-Moleküle der Klasse I präsentieren Proteine aus dem Zytosol der Zelle (z.B. virale Proteine) auf der Zelloberfläche an CD8-positive, zytotoxische T-Lymphozyten (Murphy et al. 2009b).

Klasse-II:

Auch die Moleküle der Klasse II bestehen aus nicht-kovalent-verbundenen Heterodimeren. Jedoch werden hier beide Teile in den Genen der HLA-D-Region auf Chromosom 6 codiert. Die D-Region wird dabei in die Subregionen HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ unterteilt. Die HLA-DR-Region kodiert für eine konstante α -Kette und mehrere β -Ketten. Es gibt Gene für 9 β -Ketten (DRB1-9), wovon jedoch nur DRB1, -3, -4 und -5 exprimiert werden. Bei den Restlichen handelt es sich um Pseudogene (Waßmuth 2005a). In den HLA-DP- und HLA-DQ-Regionen werden jeweils eine α -Kette und eine β -Kette exprimiert. Auch hier sind Pseudogene für andere Ketten enthalten (Waßmuth 2005a). HLA-Merkmale der Klasse II findet man nur auf antigenpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und aktivierten T-Zellen (Waßmuth 2005b).

HLA-Moleküle der Klasse II präsentieren extrazelluläre Proteine, die durch Endo- oder Phagozytose aufgenommen wurden. Nach Verarbeitung in der Zelle interagiert das beladene HLA-Molekül an der Zelloberfläche mit CD4-positiven T-Helferzellen (Peters et al. 1995, Batalia, Collins 1997, Murphy et al. 2009b). In Tierversuchen wurde gezeigt, dass fremde MHC-Moleküle ebenfalls diese normale Verarbeitung durchlaufen und anschließend auf den eigenen MHC-Merkmalen präsentiert werden (Benichou et al. 1992).

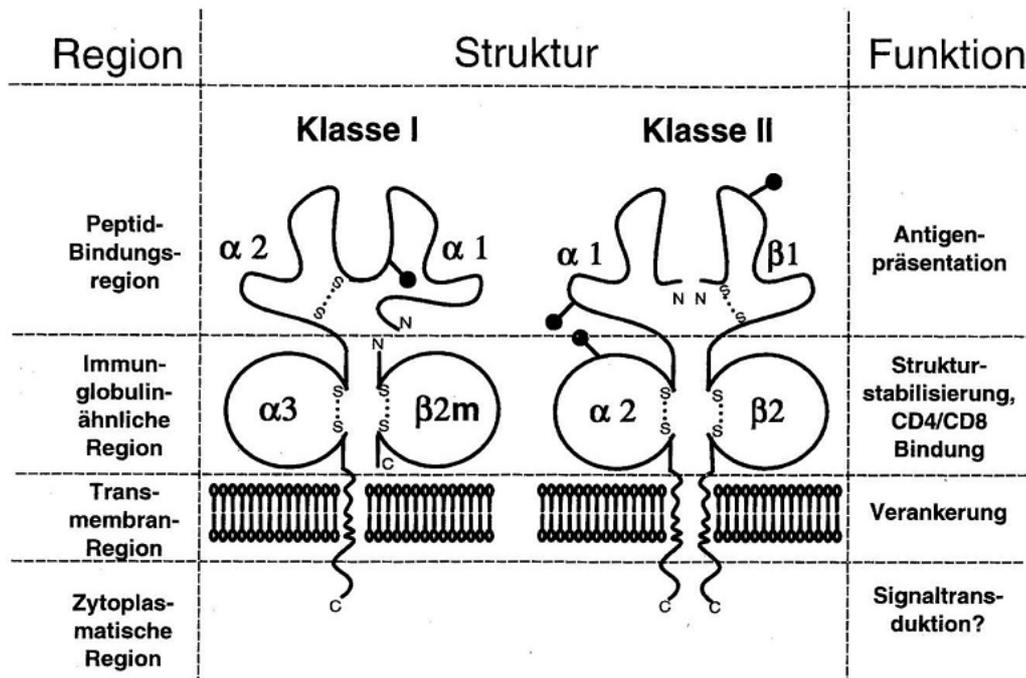


Abbildung 2: Struktur und Funktion von HLA-Klasse-I- und -Klasse-II-Molekülen: Grafische Darstellung der HLA-Moleküle und Beschreibung der Funktion einzelner Teile (Waßmuth 2005b). HLA = Human-Leucocyte-Antigen; $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ = Teile der Polypeptidketten; $\beta 1$, $\beta 2$ = Teile der Polypeptidketten; $\beta 2m$ = $\beta 2$ -Mikroglobulin; CD4/8 = Cluster of Differentiation 4/8.

1.2 Thrombozyten

Thrombozyten, oder auch Blutplättchen, sind mit 3-5 μm auf 0,5 μm die kleinsten Zellen des Blutes (Hod, Schwartz 2008). Sie entstehen aus ihrer Vorläuferzelle, dem Megakaryozyten, der sich unter Einwirkung des Thrombopoietins bildet. Aus jedem Megakaryozyten bilden sich ca. 1000-4000 Thrombozyten, wobei die Reifung insgesamt 5-10 Tage dauert. Täglich werden 35×10^9 Thrombozyten pro kg Körpergewicht produziert, die beim Gesunden durchschnittlich 7 bis 10 Tage überleben (Dreger, Schmitz 2004). Die normale Thrombozytenkonzentration im Blut beträgt 150.000-400.000 pro μl Blut (Hod, Schwartz 2008). Ihre Hauptaufgabe ist die Bildung von Thromben bei der physiologischen Blutstillung. Weiterhin tragen die Blutplättchen zur Aufrechterhaltung der Gefäßwandintegrität bei, hierfür werden täglich ca. 7100 Thrombozyten/ μl Blut verbraucht (Hanson, Slichter 1985; Hod, Schwartz 2008). Auch wenn Plättchen kernlose Zellen sind findet man HLA-Merkmale der Klasse I auf ihrer Oberfläche, die in den Thrombozyten synthetisiert werden (Brown et al. 1979; Santoso et al. 1993; Santoso et al. 1986)

1.3 Thrombozytentransfusionen

Allgemeines:

Auf Grund der mortalitätssenkenden Wirkung ist die Transfusion von Thrombozyten eine wichtige supportive Therapie bei hämatologischen Erkrankungen, ablativer Chemotherapie und Knochenmarktransplantationen. Jährlich werden deshalb in Europa über 2,9 Millionen und in den USA über 1,5 Millionen TKs transfundiert (Maniatis 2005; Sullivan, Wallace. 2005). Die Indikationsstellung für die TK-Gabe erfolgt in Abhängigkeit von der Grunderkrankung, der Anamnese, der aktuellen Thrombozytenzahl, den Blutungszeichen, dem Blutungsrisiko und der Kontrollmöglichkeit des Patienten. Hier ist insbesondere relevant, ob der Patient stationär oder ambulant geführt wird. Richtwerte für Transfusionstrigger geben z.B. die deutschen Querschnitts-Leitlinien, die von der Bundesärztekammer regelmäßig in aktualisierter Fassung herausgegeben werden (Ebell et al. 2009). Generell werden 2 Arten von Thrombozytenkonzentraten unterschieden, die Apherese-TKs und die Pool-TKs.

Apherese-Konzentrate:

Apherese-Konzentrate des Deutschen Roten Kreuzes haben im Schnitt ein Volumen von 200-300 ml. Sie enthalten $2,0-4,5 \times 10^{11}$ Thrombozyten, was einem Gehalt von $0,8-2,0 \times 10^9$ Thrombozyten/ml entspricht. Ein Konzentrat enthält weniger als 1×10^6 Restleukozyten und weniger als $3,0 \times 10^9$ Resterythrozyten (DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen 2010a). Es gibt Studien, die einen geringeren lagerungsbedingten Abbau funktionsfähiger Thrombozyten und eine höhere hämostatische Wirkung in vitro bei Apherese-TKs im Vergleich zu Pool-TKs nahe legen (Böck et al. 2002). Heddle und Kollegen zeigten, dass mit Apheresepräparaten teilweise ein besserer Thrombozytenanstieg erreicht werden kann, während die Rate an unerwünschten Reaktionen der von leukozytendepletierten Pool-TKs entspricht (Heddle et al. 2008). Die Thrombozytenapherese wird mittels Zellseparatoren durchgeführt, wobei die einzelnen Blutkomponenten durch Zentrifugation mit verschiedenen Geschwindigkeiten getrennt werden. Die Apherese ermöglicht es, von einem einzelnen Spender soviel Plättchen zu gewinnen, dass damit ein Thrombozytenkonzentrat hergestellt werden kann. Zudem besteht bei Apherese-

TKs die Möglichkeit HLA-ausgewählte TKs von HLA-kompatiblen Spendern zu transfundieren, was insbesondere bei Patienten mit HLA-AK von Relevanz ist.

Pool-Konzentrate:

Pool-Konzentrate des Deutschen Roten Kreuzes haben im Schnitt ein Volumen von 220-400 ml, sie enthalten $2,0-4,2 \times 10^{11}$ Thrombozyten, was einem Gehalt von $0,8-2,0 \times 10^9$ Thrombozyten/ml entspricht. Ein Konzentrat enthält weniger als 1×10^6 Restleukozyten und weniger als $3,0 \times 10^9$ Resterythrozyten (DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen 2010b). In Deutschland werden Pool-TKs durch die Buffy-coat-Methode hergestellt (Stroncek, Rebull 2007; Sachs, Bux 2004). Verschiedene Studien zeigten, dass bei der Behandlung der Thrombozytopenie mit Pool-TKs die gleichen Ergebnisse wie mit Apherese-TKs erzielt werden können. Diese bieten jedoch bei immunisierten Patienten einen Vorteil (Schrezenmeier, Seifried 2010).

Leukozytendepletion:

In Deutschland dürfen auf Beschluss des Paul-Ehrlich-Instituts seit dem 01.10.2001 nur noch leukozytendepletierte TKs transfundiert werden (Paul-Ehrlich-Institut 2000). Die Leukozytendepletion erfolgt dabei entweder durch geeignete Filter, oder durch eine entsprechende Einstellung und Zentrifugation bei der Apherese. Der Gehalt an Restleukozyten muss weniger als 1×10^6 pro Konzentrat betragen und die Depletion muss vor der Lagerung der TKs erfolgen (Paul-Ehrlich-Institut 2000). Begründet wurde dieser Beschluss unter anderem damit, dass durch Leukozytendepletion die HLA-Alloimmunisierungsrate sinkt (Andreu, Dewailly 1994; Novotny 1999, The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997). Je nach Verfahren (Filtration oder Zentrifugation) bleiben verschiedene Arten von Leukozyten im Präparat zurück. Den effektivsten Schutz würde eine kombinierte Behandlung der Präparate mit beiden Verfahren bieten (Slichter 2002). Durch eine Depletion vor der Lagerung kann ebenfalls eine deutliche Reduktion von febrilen, nicht-hämolytischen Transfusionsreaktionen erreicht werden (Paglino et al. 2004; Yazer et al. 2004). Heute werden Filter mit mehreren Schichten Polyesterfasern oder Polyurethanfasern verwendet (Sachs, Bux

2004). Durch diese Filter werden bis zu 99% der Leukozyten entfernt, wobei jedoch auch ein Verlust von bis zu 20% der Thrombozyten auftritt (Eckstein 2001). In jüngster Zeit konnte eine Reduktion um 99,97% bei einem Verlust von nur 8% erreicht werden (Yu et al. 2009).

Lagerung:

Nach den deutschen Querschnitts-Leitlinien werden TKs in speziellen gasdurchlässigen Kunststoffbeuteln bei einer Temperatur von 20-24 °C unter ständiger Agitation aufbewahrt (Ebell et al. 2009). Nachteil der Lagerung bei Raumtemperatur ist ein erhöhtes Risiko für Bakterienwachstum (Heal et al. 1986). TKs können unter diesen Bedingungen bis zu 5 Tage gelagert werden.

Bestrahlung:

Bei immunsupprimierten Patienten (oder speziellen Präparaten) kann durch teilungsfähige T-Lymphozyten eine transfusionsassoziierte Graft-versus-Host-Krankheit auftreten (Bein, Sachs 2009a). Die deutschen Querschnitts-Leitlinien empfehlen deshalb eine Bestrahlung der Präparate mit einer mittleren Dosis von 30 Gray, wodurch die Lymphozyten ihre Proliferationsfähigkeit verlieren (Bein, Sachs 2009b).

1.4 HLA-Antikörper

Allgemeines:

Man findet bei alloimmunisierten Menschen Antikörper gegen beide HLA-Klassen. Zumeist handelt es sich dabei um IgG-Antikörper. Im Anschluss an eine Antigenexposition finden sich jedoch auch für eine gewisse Zeit IgM-Antikörper. Weiterhin kann man die Antikörper in komplementfixierende HLA-AK und nicht-komplementfixierende HLA-AK unterteilen.

Antikörper entstehen vor allem durch immunisierende Ereignisse wie Schwangerschaften, Transfusionen oder Transplantationen. Es gibt jedoch auch sogenannte „natürliche“ AK (Morales-Buenrostro et al. 2008; Siehe auch Kapitel 4.2). Mit der Zeit kann die Prävalenz von HLA-Antikörpern auch zurückgehen, wenn z.B. nicht mehr transfundiert oder auf HLA-kompatible TKs umgestellt wird

(Murphy et al. 1987). Es gibt jedoch durchaus Fälle, in denen Antikörper über mehrere Dekaden persistieren (Triulzi et al. 2009, Norris et al. 2009).

Antikörper durch Schwangerschaften:

Während der Schwangerschaft kommt es zum Kontakt des mütterlichen Immunsystems mit fötalen Zellen. Durch diese Exposition mit HLA-Antigenen des väterlichen Haplotyps kann es zur Bildung von Antikörpern gegen die paternalen HLA-Merkmale kommen (Regan et al. 1991). Diese HLA-AK-Bildung konnte in zahlreichen Studien belegt werden, wobei die Rate an Patientinnen mit HLA-AK mit der Anzahl an Schwangerschaften steigt (Triulzi et al. 2009; Densmore et al. 1999; Kakaiya et al. 2010; Maślanka et al. 2007).

Antikörper durch Bluttransfusionen:

Bei Thrombozytentransfusionen kann es durch die HLA-Klasse-I-Merkmale auf der Thrombozytenoberfläche und vor allem durch HLA-Merkmale beider Klassen auf kontaminierenden Leukozyten zur Alloimmunisierung kommen (Claas et al 1981). In einem Tierversuch wurde demonstriert, dass übertragene Leukozyten mit MHC-Merkmalen der Klasse II stark an der Immunantwort des Empfängers und der Bildung von Antikörpern gegen Klasse I beteiligt sind (Kao, del Rosario 1998). Man kann dabei zwei Mechanismen unterscheiden, durch die HLA-AK entstehen. Der erste ist der direkte Weg. Hier werden die HLA-Heterodimere auf den übertragenen antigenpräsentierenden Zellen des Spenders von den T-Zellen des Empfängers als „fremd“ erkannt und eine Immunantwort eingeleitet. Beim indirekten Weg werden (wie bei einer normalen Immunantwort) Zellen des Spenders aufgenommen, verarbeitet und die Fragmente präsentiert. Dabei werden auch die HLA-Antigene des Spenders durch die HLA-Moleküle des Empfängers dargeboten (Sayeh et al. 2004). Meist bilden sich Antikörper gegen HLA-A oder HLA-B Antigene. In seltenen Fällen fanden sich jedoch auch Antikörper gegen HLA-C Antigene, welche zu Problemen bei der Transfusion von Plättchen führten (Saito et al. 2002).

In der Literatur findet man sehr verschiedene Zahlen, was die Alloimmunisierung von Patienten durch Thrombozytentransfusionen betrifft. Sehr hohe Immunisierungsraten findet man in allen Arbeiten, in denen nicht-leukozytendepletierte zelluläre Blutkomponenten transfundiert wurden (Kiefel et al.

2001; Doughty et al. 1994; Friedmann et al. 1996). Werden leukozytendepletierte Blutprodukte verwendet, bilden deutlich weniger Patienten HLA-AK (Triulzi et al. 2009; The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997; Seftel et al. 2004; Sniecinski et al. 1988; van Marwijk Kooy et al. 1991; Bordin et al. 1994). Im Jahr 2010 wurde eine Studie veröffentlicht, wonach das zusätzliche Risiko einer HLA-Alloimmunisierung durch frühere Transfusionen mit 0,8 % nicht signifikant ist (Kakaiya et al. 2010).

Antikörper, die durch Schwangerschaften entstanden sind, können durch Bluttransfusionen reaktiviert werden (Rebibou et al. 2002). Frauen mit positiver Schwangerschaftsanamnese scheinen auch häufiger mit Bildung von HLA-AK auf Transfusionen zu reagieren (The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997). Betrachtet man zahlreiche Veröffentlichungen zum Thema Antikörperbildung, scheint es zwischen Apherese- und Pool-Konzentraten (höhere Spenderexposition) keinen Unterschied in der Immunisierungsrate zu geben, solange alle TKs leukozytendepletiert sind (Schrezenmeier, Seifried 2010).

1.5 Komplikationen durch HLA-Antikörper

Neben allgemeinen Komplikationen wie allergischen, febrilen oder hämolytischen Reaktionen, gibt es besonders zwei Komplikationen, die mit der Anwesenheit von HLA-AK zusammenhängen.

Refraktärzustand:

Einen wiederholten ungenügenden Anstieg der Thrombozytenzahl nach Transfusion bezeichnet man als Refraktärzustand, was ein Problem bei der weiteren Versorgung dieser Patienten mit passenden TKs darstellt. Zur Berechnung des Anstieges wird heute im Allgemeinen das Corrected Count Increment (CCI) benutzt.

$$\text{CCI} = \text{Increment} \times \text{Körperoberfläche} \times 10^{11} / n$$

Increment = Anstieg der Thrombozytenzahl im Blutbild.

n = Anzahl an transfundierten Thrombozyten (3×10^{11} pro Beutel).

Die genaue Definition des Refraktärzustandes gestaltet sich schwierig. Grund für einen ungenügenden Anstieg ist neben Splenomegalie, Infekten, Fieber und Sepsis oftmals das Vorliegen von HLA-Antikörpern oder AK gegen thrombozytenspezifische Antigene (Murphy, Waters 1990; Slichter et al. 2005). Ob es zur Entwicklung eines Refraktärzustandes durch HLA-AK kommt, hängt entscheidend von der Art der verwendeten Präparate ab. So konnte gezeigt werden, dass durch den Gebrauch leukozytendepletierter zellulärer Blutkomponenten (Eernisse, Brand 1981; Sniecinski 1988; Saarinen et al. 1990; Seftel et al. 2004) bzw. leukozytendepletierter TKs (The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997) die Alloimmunisierung und damit die Rate an Patienten mit Refraktärzustand sinkt. Haben diese prophylaktischen Maßnahmen keinen Erfolg, müssen für immunisierte Patienten besondere TKs ausgewählt werden, damit ein angemessener Anstieg erreicht werden kann (Siehe Kapitel 4.3 – HLA-kompatible TKs).

TRALI:

Bei der Transfusion-Related Acute Lung Injury (TRALI) handelt es sich um eine seltene, aber schwere Komplikation im Zusammenhang mit HLA-Antikörpern im Thrombozytenkonzentrat (Bux, Sachs 2007). In einer Erhebung aus Großbritannien war die TRALI im Jahr 2009 für 1,6 % (21/1279) der schweren Transfusionszwischenfälle verantwortlich. Im Zeitraum von 1996 bis 2009 lag dieser Anteil bei 3,9 % (257/6653) (Serious hazards of transfusion annual report summary 2009). 2007 wurden in einer Studie in 68,2 % aller TRALI-Fälle AK bei Spendern oder Empfängern gefunden (Zupanska et al. 2007). TRALI ereignet sich größtenteils bei der Übertragung von Blutprodukten mit HLA-AK gegen Klasse II (Reil et al. 2008). Für die Pathogenese von TRALI gibt es zwei Theorien: Nach der ersten Theorie führen verschiedene Antikörper (z.B. HLA-AK) zur Aktivierung der Entzündungskaskade (Sachs et al. 2006; Zupanska et al. 2007). In der zweiten Hypothese wird von einer Prädisposition der Patienten durch Entzündungen und Operationen ausgegangen (Toy, Lowell 2007).

1.6 Fragestellungen

Für ein komplikationsfreies Überleben sind heutzutage viele Patienten auf eine Langzeitversorgung mit Blutkomponenten angewiesen. Problematisch wird es, wenn sich ein immunologischer Refraktärzustand gegen Thrombozytenkonzentrate einstellt. In diesem Fall muss auf die komplizierte Versorgung mit teuren und seltenen HLA-kompatiblen TKs umgestellt werden. Demnach ist es wichtig zu wissen, wodurch die verantwortlichen HLA-AK entstehen. Für diese Arbeit stellte sich deshalb die Frage: Wie wirkt sich die Transfusion der verschiedenen Blutkomponenten auf die Bildung von HLA-Antikörpern aus und welche anderen Faktoren haben einen Einfluss?

Das Augenmerk ist dabei auf die Fragen gerichtet: Welcher Zusammenhang besteht zwischen HLA-AK-Bildung und

- den Charakteristika (Geschlecht, Schwangerschaftsanamnese, Vortransfusionen, Grunderkrankung etc.) der Transfusionspatienten?
- der Art (TKs, EKs, bestrahlt, HLA-kompatibel) und Anzahl der transfundierten Präparate?

Dabei wird insbesondere beobachtet, wie sich die Testergebnisse im Verlauf des Beobachtungszeitraums entwickeln und welchen Einfluss die transfundierten Präparate und andere Risikofaktoren auf die HLA-AK-Bildung während der Untersuchung haben. Weiterhin soll untersucht werden, welche Vorteile die verschiedenen Testmethoden bieten.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Die untersuchten Patienten wurden routinemäßig in der Transfusionsambulanz des Instituts für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm / Instituts Ulm des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Hubert Schrezenmeier) betreut. Es handelt sich dabei um Patienten, die zumeist auf Grund einer hämatologischen Erkrankung oder der Therapie einer Erkrankung (z.B. Chemotherapie bei soliden Tumoren) transfusionsbedürftig wurden. Im Rahmen von transfusionsbegleitenden Untersuchungen wird therapiebegleitend regelmäßig die Alloimmunisierung bestimmt, um gegebenenfalls die Präparateauswahl anzupassen. Insgesamt wurden 74 Patienten mit mindestens einer HLA-AK-Untersuchung im Beobachtungszeitraum aufgenommen. Von diesen Patienten waren 33 weiblich und 41 männlich. Weitere Antikörperuntersuchungen zur Darstellung der Entwicklung über die Zeit liegen nur bei einem Teil der Patienten vor, da ein Teil der Patienten nach der ersten Probenentnahme verstarb (n=15) oder zum Zeitpunkt der geplanten Folgeuntersuchung aus anderen Gründen nicht mehr in die Transfusionsambulanz des IKT Ulm kam. Von 48 Patienten liegen zwei und von 21 drei HLA-Antikörperuntersuchungen im Verlauf einer chronischen Transfusionstherapie vor, um eine Aussage über die Dynamik der Antikörperentwicklung zu treffen. Zusätzlich zur Probenentnahme erfolgte die Auswertung der relevanten Daten wie Erkrankung, Anzahl und Zeitpunkt der Transfusionen, Schwangerschaften usw.

2.2 Kontrollgruppen

Aus dem Knochenmark- und Zellspenderverzeichnis Ulm wurden vier Kontrollgruppen (Kontrollgruppe A-D) erstellt. Dabei wurden nach dem Zufallsprinzip Ergebnisse des ELISA-Antikörper-Screening entsprechender Spender ausgewählt. Gruppe A besteht aus 40 männlichen, Gruppe B aus 40 weiblichen Spendern ohne Risikofaktoren für Antikörperbildung. Gruppe C (männlich) und D (weiblich) enthalten die gleiche Anzahl Spender mit Risikofaktoren (Schwangerschaften, Bluttransfusionen). Die

Antikörperuntersuchungen der Spender erfolgten im Rahmen der Maßnahmen zur Reduktion einer transfusionsassoziierten Lungeninsuffizienz (TRALI), welche bei allen Zytapherese-Spendern ein obligates Screening auf HLA-Antikörper vorsahen.

2.3 Proben

Den Patienten wurde im Rahmen der routinemäßigen prätransfusionellen Untersuchungen mit einem herkömmlichen Blutentnahmeset eine Probe Vollblut entnommen. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte im HLA-Labor des IKT Ulm. Nach Gerinnung des Blutes wurde es in einer Rotanda 460 R Zentrifuge der Firma Hettich für 20 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Serum wurde mit einer Kunststoffpipette in ein separates Röhrchen übertragen, die abzentrifugierten festen Bestandteile verworfen. Die Proben wurden anschließend entweder sofort bearbeitet, oder bei – 20°C zur späteren Bearbeitung eingefroren. Wenn möglich, wurde versucht von allen Patienten mindestens 2 Proben zu entnehmen. Der Zeitabstand zwischen zwei Proben war auf ca. 10-12 Wochen angesetzt. Da die Patienten für die Untersuchung nicht extra einbestellt wurden, sondern die Probenentnahme im Rahmen der Routinebehandlung in der Transfusionsambulanz erfolgte, musste dieser Zeitraum oft verkürzt oder verlängert werden.

2.4 Lymphozytotoxizitätstest

Der Lymphozytotoxizitätstest (LCT) wurde im Jahre 1964 von Terasaki und Kollegen entwickelt (Terasaki, McClelland 1964). Er wird zum Screening und zur Differenzierung von komplementabhängigen, zytotoxischen HLA-Klasse-I-AK eingesetzt. Die Möglichkeit der Spezifizierung ist ein Vorteil gegenüber anderen Untersuchungen wie z.B. dem ELISA. Im IKT Ulm werden Lymphoscreen ABC 60 - Testplatten der Firma Biotest mit Sitz in Dreieich (Deutschland) verwendet. Die Biotest Lymphoscreen-Platten zum Nachweis von HLA-Antikörpern bestehen aus 60 Panels. Diese enthalten periphere Lymphozyten von verschiedenen gesunden Blutspendern mit spezifischen HLA-Antigenen. Bei der Firma Biotest werden Lymphozyten von mindestens 300 HLA-typisierten Spendern verwendet (siehe Tabelle 1). Jeweils 100 Spender kaukasischer, afroamerikanischer und

hispanischer Abstammung. Die Lymphozyten der Spender werden so auf die 60 Panels der Testplatte verteilt, dass jedes HLA-Antigen in einer ausreichenden und garantierten Frequenz auf der Platte repräsentiert ist. Jedes Panel enthält also eine Auswahl an Lymphozyten mit ein paar definierten HLA-Antigenen, die auf dem beigelegten Worksheet vermerkt sind.

Tabelle 1: HLA-Merkmale im Spenderpool: Frequenz der einzelnen HLA-Merkmale im Pool der 300 typisierten Spender der Firma Biotest. Absolute Anzahl der Mitglieder des Spendenpools, die das entsprechende Merkmal tragen. Lymphozyten dieser Spender werden auf die Panels des LCT, hochgereinigte Glykoproteine auf die Klasse-I-Teststreifen des ELISA verteilt. AX = entsprechendes Allel des A-Locus; BX = entsprechendes Allel des B-Locus; LCT = Lymphozytotoxizitätstest; ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

Antigen	Frequency	Antigen	Frequency	Antigen	Frequency
A1	49	B7	45	B50	12
A2	122	B8	33	B51	21
A3	52	B13	11	B52	10
A11	21	B14	26	B53	28
A23	23	B18	24	B55	8
A24	52	B27	15	B56	2
A25	12	B35	58	B57	17
A26	17	B37	8	B58	19
A28	50	B38	11	B59	1
A29	20	B39	17	B60	17
A30	32	B41	13	B61	16
A31	18	B42	11	B62	16
A32	18	B44	48	B63	6
A33	29	B45	12	B67	2
A34	13	B47	2	B70	24
A36	7	B48	6	B73	2
A43	1	B49	13	B75	3

Die Testplatten werden von der Firma Biotest in tiefgefrorenem Zustand geliefert und im IKT Ulm in einer – 80°C Tiefkühltruhe aufbewahrt. Die Membran der gefrorenen Lymphozyten wurde durch Zugabe von DMSO (Dimethylsulfoxid) stabilisiert.

Durchführung:

Zur Testdurchführung werden die Platten für 10 Minuten mit 6 µl eines Auftaumediums aus Phosphate Buffered Saline (PBS) mit 10 % fetalem Kälberserum beschichtet. Das Medium verhindert eine Zerstörung der Lymphozyten durch die zytotoxische Wirkung von DSMO bei Raumtemperatur. Die überschüssige Flüssigkeit wird nach vollständigem Auftauen entfernt.

Anschließend werden jeweils 2 µl des Patientenserums in die 56 Testpanels übertragen. Bei jedem Test werden auf die übrigen 4 Panels zwei Negativkontrollen und zwei Positivkontrollen der Firma Biotest aufgetragen. Die Platten werden nun für 30 Minuten in einer dunklen Schublade bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wird das gefriergetrocknete Kaninchen-Komplement der Firma Biotest mit 2 ml destilliertem Wasser bei 4°C aufgelöst. Sollten im Serum des Patienten Antikörper gegen bestimmte HLA-Merkmale vorhanden sein, so heften sich diese nun in den entsprechenden Panels an die Antigene auf der Zellmembran der Lymphozyten. Dadurch bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe. Im nächsten Schritt werden alle 60 Panels mit 6 µl des aufgelösten Kaninchen-Komplements befüllt und für 60 Minuten in einer dunklen Schublade bei Raumtemperatur inkubiert. Die Komplementfaktoren werden durch Antigen-Antikörper-Komplexe aktiviert. Enthielt das zugegebene Serum Antikörper, erfolgt in den entsprechenden Panels durch die Antikörper und das zugegebene Komplement eine Lyse der Zellen. Waren in dem Serum keine Antikörper vorhanden, bleiben die Zellen intakt und werden nicht lysiert. Im letzten Schritt werden vorsichtig 5 µl Fluoroquench der Firma One Lambda zugegeben. Sind die Lymphozyten in einem Panel intakt, stellen sie sich grün dar, indem sie den Farbstoff Akridinorange aufnehmen. Wurden die Lymphozyten durch Antikörper und Komplement lysiert, so färben sie sich durch Ethidiumbromid rot. Die Testplatten werden nun mit einem Zeiss Axiovert 40 CFL (inverses Phasenkontrastmikroskop) abgelesen und die Ergebnisse im Worksheet eingetragen. Zunächst wird bewertet, ob in den Negativ-Kontrollen maximal 10 % der Lymphozyten zerstört sind und ob in den Positiv-Kontrollen mindestens 75 % der Lymphozyten lysiert wurden. Danach wird für jedes Panel ein Scorewert angegeben (siehe Tabelle 2):

Tabelle 2: Scorewerte im LCT: Relativer Anteil der zerstörten Lymphozyten in einem Panel und daraus resultierender Score-Wert und Bewertung im LCT. LCT = Lymphozytotoxizitätstest

% lysierte Zellen	Scorewert	Bewertung
0-10 %	1	Negativ
11-25 %	2	Fraglich negativ
26-50 %	4	Schwach positiv
51-75 %	6	Positiv
76-100 %	8	Stark positiv

Die abgelesenen Reaktionen werden im Arbeitsblatt bei dem entsprechenden Panel eingetragen. Anhand der positiven Panels und der bekannten HLA-Zusammensetzung jedes Panels kann man nun ablesen, gegen welche HLA-Antigene die Antikörper gerichtet sind. Findet man in 2/3 aller Panels mit einem bestimmten HLA-Antigen eine positive Reaktion (Score von 4 oder höher), so gilt dieser Antikörper als nachgewiesen. Ist es nicht möglich, eine Spezifität anzugeben (z.B. weil fast alle Panels eine positive Reaktion zeigen), so wird das Ergebnis in % PRA (Panel Reactive Antibodies), also als prozentualer Anteil aller Panels angegeben. Als Ergebnis wird in diesem Fall z.B. „87 % polyspezifische Antikörper“ notiert.

2.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Der Nachweis von HLA-Antikörpern durch ELISA geht zurück auf Kao und Kollegen (Kao et al. 1993). Im IKT Ulm wird der Biotest AbScreen HLA class I und II verwendet. Dabei handelt es sich um Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) für den in-vitro Nachweis von IgG-Antikörpern gegen HLA-Antigene der Klasse I und II. Die Teststreifen bestehen aus jeweils 8 Kavitäten, an deren Grund hochgereinigte HLA-Glykoproteine angelagert sind. Die Glykoproteine der Klasse I werden aus einem Thrombozytenpool von 300 typisierten Spendern gewonnen (Frequenz der einzelnen Antigene, siehe Tabelle 1). HLA-Klasse-II-Glykoproteine werden aus Zelllinien EBV-transformierter B-Lymphozyten gewonnen. Folgende Spezifitäten sind dabei enthalten: DR1, DR4, DR7, DR8, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR16, DR17, DR18, DR103, DR51, DR52 und DR53.

Durchführung:

Die Anzahl der Teststreifen (8 Kavitäten) orientiert sich an der Anzahl der zu testenden Patienten. 2 Kavitäten werden zur Bestimmung des Blancwertes genutzt, 4 mit einer Negativ-Kontrolle bestückt und 2 dienen als Positiv-Kontrolle (siehe Tabelle 3). Für jeden Patienten werden 2 Kavitäten mit Serum befüllt. Zunächst wird das gelieferte Waschpufferkonzentrat (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Tween 20, 1 % NaN₃) der Firma Biotest im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Streifen werden bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten mit 300 µl des Waschpuffers inkubiert. Sowohl die Patientenseren, als

auch die Negativ- und Positivkontrollen der Firma Biotest werden 1:1 mit Proben-Verdünnungspuffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Rinderserumalbumin, 0,1 % NaN_3 für Klasse I; phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Rinderserumalbumin, Maus-Serum, 0,1 % NaN_3 für Klasse II) gemischt. Der Waschpuffer wird durch einen Columbus Waschautomaten aus den Teststreifen entfernt. Von den verdünnten Proben und Kontrollen werden jeweils 50 μl in die entsprechenden Kavitäten übertragen (4 Negativkontrollen, 2 Positivkontrollen, 2 Proben für jeden Patienten), die Felder für den Blancwert bleiben leer.

Tabelle 3: Teststreifenbelegung: Belegung der Teststreifen am Beispiel von 6 Streifen zur Testung von 8 Patientenserum (Patienten A-H). Blanc = Kavität zur Blancwertermittlung, Negativ = Negativkontrolle, Positiv = Positivkontrolle, Patient A-H = Patientenserum. Linke Hälfte zur Testung von Antikörpern gegen Klasse I, rechte Hälfte (kursive Schrift) für Antikörper der Klasse II.

Blanc	Patient A	Patient E	<i>Blanc</i>	<i>Patient A</i>	<i>Patient E</i>
Blanc	Patient A	Patient E	<i>Blanc</i>	<i>Patient A</i>	<i>Patient E</i>
Negativ	Patient B	Patient F	<i>Negativ</i>	<i>Patient B</i>	<i>Patient F</i>
Negativ	Patient B	Patient F	<i>Negativ</i>	<i>Patient B</i>	<i>Patient F</i>
Negativ	Patient C	Patient G	<i>Negativ</i>	<i>Patient C</i>	<i>Patient G</i>
Negativ	Patient C	Patient G	<i>Negativ</i>	<i>Patient C</i>	<i>Patient G</i>
Positiv	Patient D	Patient H	<i>Positiv</i>	<i>Patient D</i>	<i>Patient H</i>
Positiv	Patient D	Patient H	<i>Positiv</i>	<i>Patient D</i>	<i>Patient H</i>

Die Mikrotiterplatte wird mit einer Folie abgedeckt und für 45 Minuten bei 37°C in einem Heraeus Brutschrank inkubiert. Sind in den Patientenproben Antikörper gegen die entsprechenden HLA-Merkmale enthalten, binden diese an die aufgetragenen Glykoproteine in den Kavitäten, und es bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe. Beim anschließenden viermaligen Waschen durch den Waschautomaten wird das gesamte Serum inklusive nichtgebundener Antikörper durch den Waschpuffer entfernt. Im folgenden Schritt wird das Konjugat im Verhältnis 1:100 mit dem Proben-Verdünnungspuffer gemischt und in jede Kavität (außer dem Blanc) 50 μl zugegeben. Anschließend werden die Teststreifen für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei dem Konjugat handelt es sich um einen Antikörper gegen humanes IgG, an den das Enzym alkalische Phosphatase angelagert

wurde. Sind im vorherigen Schritt Antigen-Antikörper-Komplexe entstanden, bindet der enzymmarkierte Antikörper an diese Komplexe. Somit entsteht eine Verbindung aus Antigen, zwei Antikörpern und der alkalischen Phosphatase. Während der Inkubationszeit wird 50 mg des kristallinen Substrats p-Nitrophenylphosphat in 500 µl destilliertem Wasser gelöst und anschließend im Verhältnis 1:100 mit Substrat-Verdünnungspuffer (Diethanolamin, MgCl₂, 0,02 % NaN₃) gemischt. Nach erneutem viermaligem Waschen werden jeder Kavität (außer dem Blanc) 100 µl der verdünnten Substratlösung zugegeben und die Teststreifen für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer dunklen Schublade inkubiert. Durch die alkalische Phosphatase wird p-Nitrophenylphosphat mit Wasser zu p-Nitrophenol und Phosphat umgesetzt, p-Nitrophenol zeigt dabei eine Gelbfärbung. Die Absorption kann im Photometer mit einem 410 nm Filter gemessen und anhand der Absorption auf die Menge an gebundenen HLA-Antikörpern geschlossen werden. Im letzten Schritt werden allen Kavitäten 100 µl der Stopplösung (3 M NaOH) zugegeben, die Blancfelder erhalten zusätzliche 100 µl. Die Teststreifen werden nun im ELx 800 Photometer der Firma BioTek ausgelesen und durch die Biotest AbScore Interpretation 1.1 Software beurteilt. Der OD-Mittelwert der Blancfelder wird hierbei von allen anderen Werten subtrahiert und die Werte der Proben als Vielfaches der Negativkontrolle angegeben. Der OD-Mittelwert der Negativkontrollen muss zwischen 0,04 und 0,15 liegen, der Mittelwert der Positivkontrollen höher als 1,50 sein. Ein Serum gilt als positiv, wenn der OD-Wert mindestens das Doppelte des Mittelwertes der Negativkontrollen beträgt (Score 2). Der Computer vergibt automatisch die Scorewerte 2, 4, 6, und 8, welche sich am Vielfachen des OD-Mittelwertes der Negativkontrollen orientieren. Es gibt eine Grauzone von 15 %, in der keine Aussage über die Probe getroffen werden kann.

2.6 Verwendete Geräte und Chemikalien

PBS - c.c. pro GmbH, Oberdorla GER

Aqua ad iniectabilia - Braun AG, Melsungen GER

Rotanda 460 R Zentrifuge - Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen GER

Fluoroquencher AO/EB - One Lambda, Inc., Canoga Park USA

Gefriergetrocknetes Kaninchenkomplement - Biotest AG, Dreieich GER

Axiovert 40 CFL - Carl Zeiss AG, Oberkochen GER

Columbus Waschautomat – Biotest AG, Dreieich GER

Heraeus Brutschrank – Heraeus, Hanau GER

ELx 800 Photometer – BioTek, Bad Friedrichshall GER

AbScore Interpretation 1.1 Software - Biotest AG, Dreieich GER

GraphPad Prism 5 - GraphPad Software, La Jolla USA

2.7 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit der Software GraphPad Prism 5 der Firma GraphPad Software durchgeführt. Für die Berechnung von Signifikanzen wurde dabei der Fisher-Yates-Test verwendet, der eine hohe Genauigkeit bei kleineren Stichproben bietet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika und Risikofaktoren

Insgesamt wurden von 74 Patienten zum ersten Untersuchungszeitpunkt Proben entnommen und Daten erhoben sowie 160 gesunde Spender ausgewertet.

3.1.1 Kontrollgruppen:

Die erstellten 4 Kontrollgruppen aus der Stammzellspenderdatei setzen sich aus jeweils 40 Personen mit den folgenden Charakteristika zusammen:

Gruppe A: 40 Männer ohne Risiko für Antikörperbildung

Gruppe B: 40 Frauen ohne Risiko für Antikörperbildung

Gruppe C: 40 Männer mit Risiko für Antikörperbildung

Gruppe D: 40 Frauen mit Risiko für Antikörperbildung

3.1.2 Ausgangssituation der Patienten:

Die Verteilung auf die Geschlechter und die Schwangerschaftsanamnese der 74 ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (41 Männer und 33 Frauen) stellt sich wie in Abbildung 3 dar.

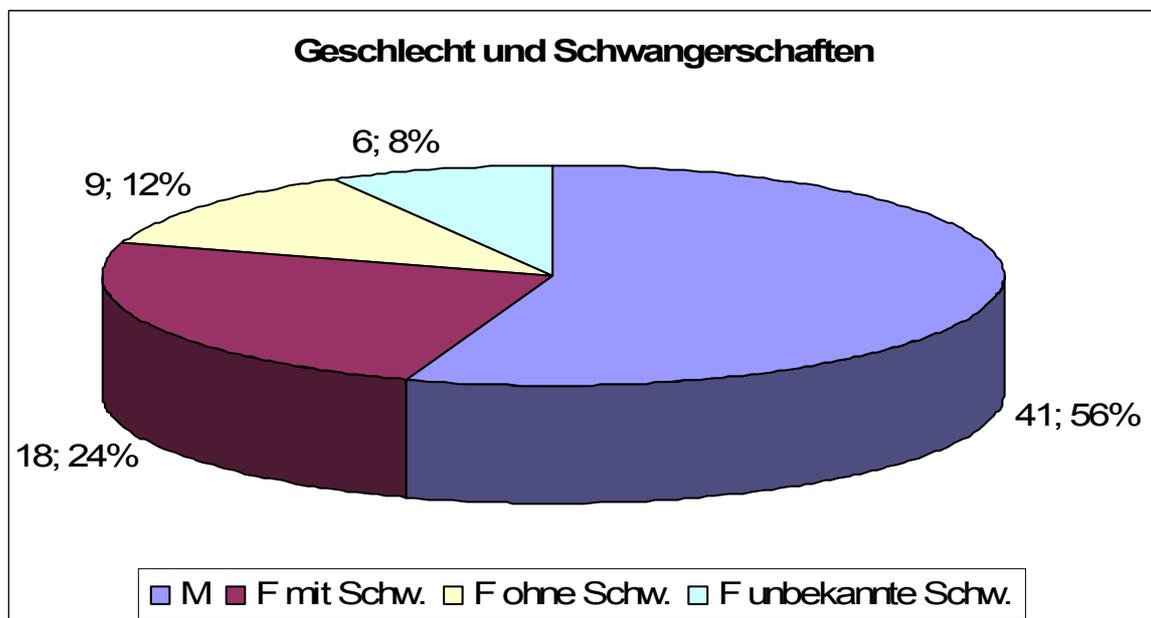


Abbildung 3: Geschlecht und Schwangerschaftsanamnese: Absoluter und relativer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit den entsprechenden Eigenschaften. M = Männer; F mit Schw. = Frauen mit positiver Schwangerschaftsanamnese; F ohne Schw. = Frauen mit negativer Schwangerschaftsanamnese; F unbekannte Schw. = Frauen mit unbekannter Schwangerschaftsanamnese

Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 56,6 Jahre (SD 16,8), der Median lag bei 59 Jahren (siehe Abbildung 4).

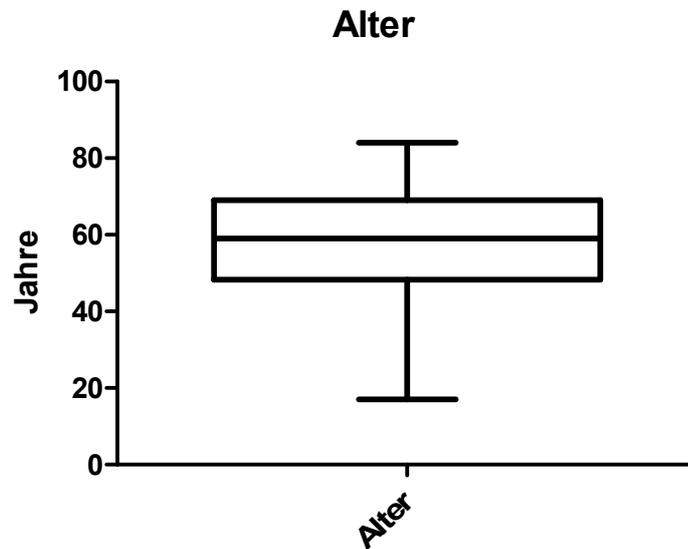


Abbildung 4: Alter der Patienten: Boxplot über das Alter der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) in Jahren.

Die Patienten verteilen sich wie folgt auf die verschiedenen Altersgruppen:

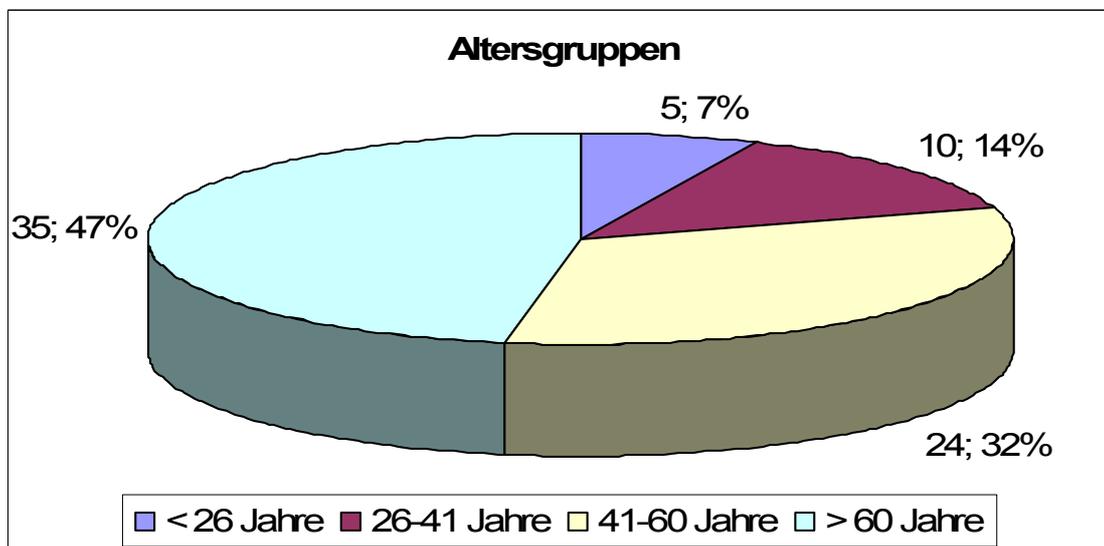


Abbildung 5: Größe der Altersgruppen: Absolute und relative Verteilung der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) in die verschiedenen Altersgruppen.

Die Patienten waren im Mittel 170 cm groß (SD 9,404 cm) und wogen 71,14 kg (SD 15,32). Median zeigten sich eine Größe von 170 cm und ein Gewicht von 70 kg (siehe Abbildung 6). Daraus ergibt sich eine mediane Körperoberfläche von

1,85 m² und ein BMI von 23,9 kg/m² (siehe Abbildungen 7 und 8). Größe, Gewicht, Körperoberfläche und BMI konnten nur von 69 Patienten erhoben werden.

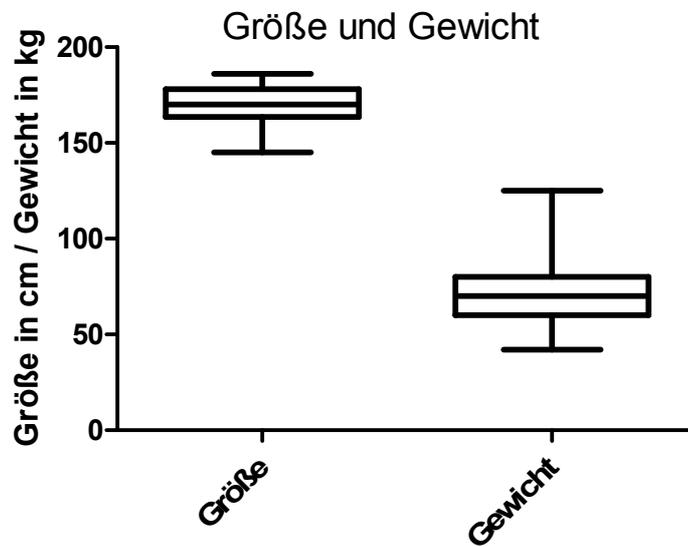


Abbildung 6: Größe und Gewicht: Boxplot über die Größe (in cm) und das Gewicht (in kg) der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 69). Von 5 Patienten konnten Größe und Gewicht nicht evaluiert werden.

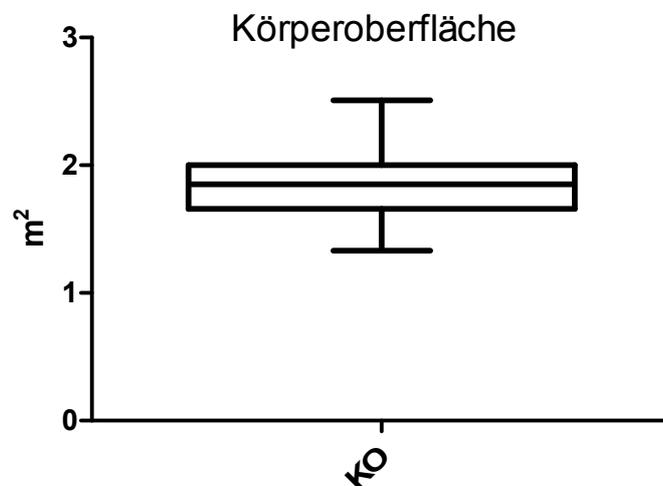


Abbildung 7: Körperoberfläche: Boxplot über die Körperfläche (in m²) der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 69). Von 5 Patienten konnte die Körperoberfläche nicht evaluiert werden. KO = Körperoberfläche.

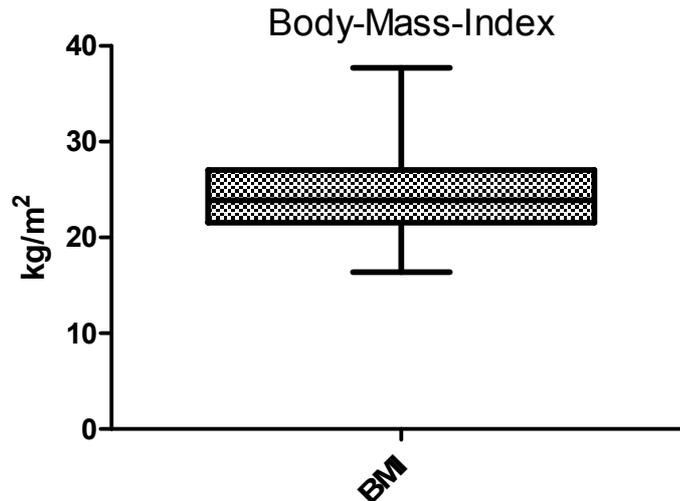


Abbildung 8: Body-Mass-Index: Boxplot über den Body-Mass-Index (in kg/m^2) der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz ($n = 69$). Von 5 Patienten konnte der BMI nicht evaluiert werden. BMI = Body-Mass-Index

Blutgruppen und Rhesusfaktor verteilen sich wie folgt auf die Patienten (siehe Abbildung 9):

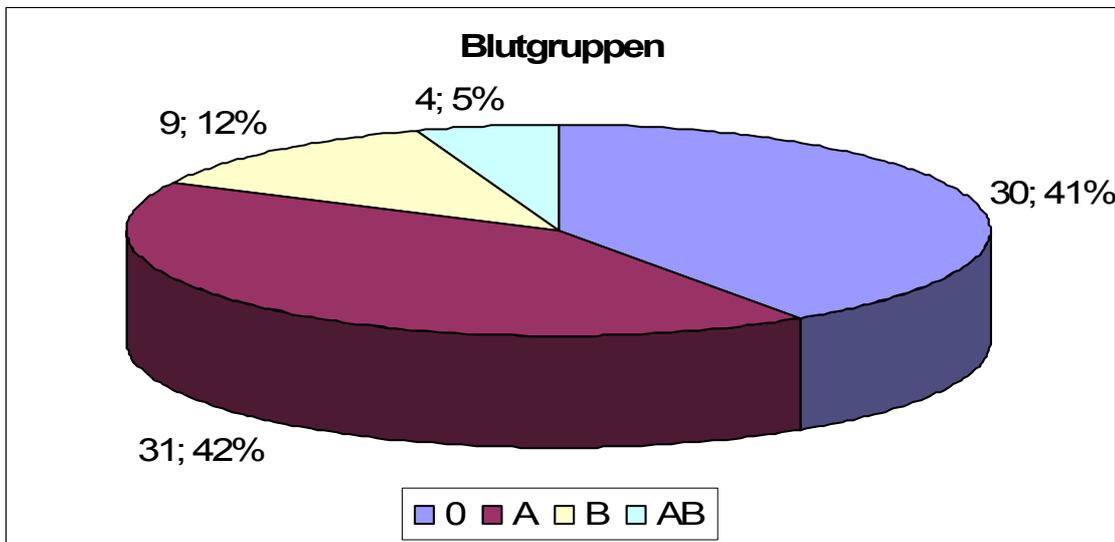


Abbildung 9: Blutgruppen: Absolute und prozentuale Verteilung der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz ($n = 74$) auf die entsprechenden Blutgruppen. 0 = Blutgruppe 0; A = Blutgruppe A; B = Blutgruppe B; AB = Blutgruppe AB.

Der Rhesusfaktor war bei 81 % (60/74) der Patienten positiv und bei 19 % (14/74) negativ.

Diagnosen:

Bei den Diagnosen der Patienten überwiegen deutlich die hämatologischen Erkrankungen (siehe Abbildung 10).

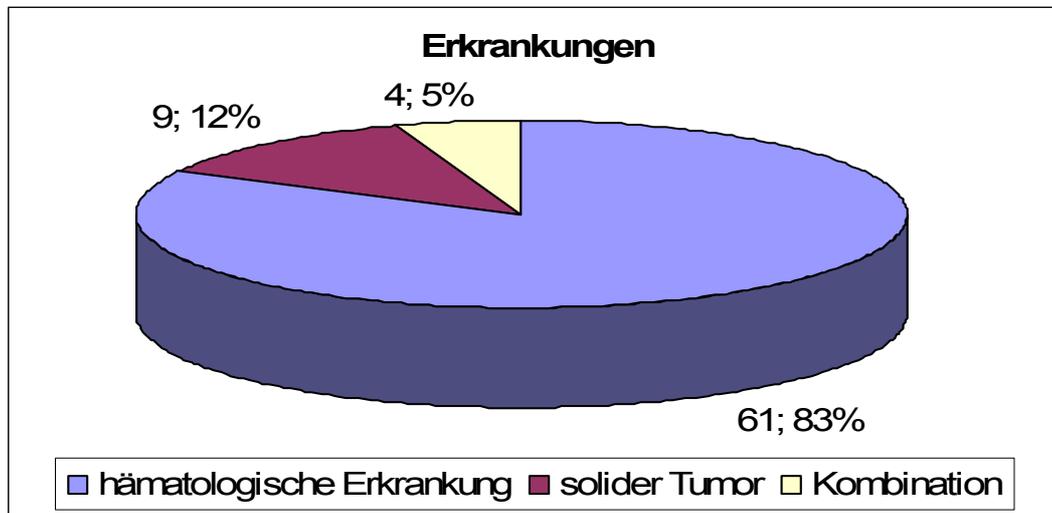


Abbildung 10: Erkrankungen: Absolute und prozentuale Verteilung der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) auf die verschiedenen Krankheitskategorien. Kombination = Kombination aus hämatologischer Erkrankung und solidem Tumor.

3.1.3 Testzeitpunkte

Die ausgewerteten Patienten wurden während des Beobachtungszeitraums an bis zu 3 Zeitpunkten auf HLA-AK getestet:

Zeitpunkt 1: 74 Patienten mit mindestens einer abgegebenen Probe.

Zeitpunkt 2: 48 Patienten mit mindestens zwei abgegebenen Proben.

Zeitpunkt 3: 21 Patienten mit drei abgegebenen Proben.

Tabelle 4 legt dar, wie sich der Anteil bestimmter Charakteristika zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten verändert hat.

Tabelle 4: Patientencharakteristika: Prozentualer Anteil (bzw. absolute Anzahl) der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz mit den entsprechenden Charakteristika zum angegebenen Untersuchungszeitpunkt. UZ 1 = Untersuchungszeitpunkt 1, erste Probenabnahme; UZ 2 = Untersuchungszeitpunkt 2, zweite Probenabnahme; UZ 3 = Untersuchungszeitpunkt 3, dritte Probenabnahme; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper, EKs = Erythrozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate.

	UZ 1	UZ 2	UZ 3
Anzahl Patienten	74	48	21
Auf HLA-AK positiv getestete Patienten	31 %	42 %	19 %
Patienten mit Vortransfusionen	74 %	100 %	100 %
Patienten die EKs erhielten	70 %	92 %	95 %
Patienten mit bestrahlten Präparaten	53 %	54 %	52 %
Patienten mit hämatologischen Erkrankungen	88 %	90 %	95 %
Versorgung mit HLA-TKs	3 %	23 %	33 %
Männer	55 %	56 %	57 %
Frauen mit Schwangerschaften	24 %	23 %	19 %
Frauen ohne Schwangerschaften	12 %	15 %	19 %
Frauen mit unbekannter Schwangerschaftsanamnese	8 %	6 %	5 %

3.2 HLA-AK der Kontrollgruppen

Die vier Kontrollgruppen A-D durchliefen ein ELISA-Screening auf HLA Antikörper, wobei sich folgende Ergebnisse boten (siehe Tabelle 5):

Tabelle 5: ELISA-Screening der Kontrollgruppen: Prozentualer Anteil der Mitglieder der Kontrollgruppen (aus der Stammzellspenderdatei) mit HLA-AK gegen Klasse I und II. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper. A = 40 Männer ohne Risiko für Antikörperbildung; B = 40 Frauen ohne Risiko für Antikörperbildung; C = 40 Männer mit Risiko für Antikörperbildung; D = 40 Frauen mit Risiko für Antikörperbildung.

Gruppe	Klasse I positiv	Klasse II positiv
A	0 %	2,5 %
B	2,5 %	12,5 %
C	0 %	2,5 %
D	30 %	27,5 %

Vergleicht man Frauen ohne bzw. mit Risiko (siehe Abbildung 11), zeigt sich im Fisher-Yates-Test eine signifikant höhere Rate an HLA-AK gegen Klasse I bei Frauen mit Risikoanamnese (P-Wert 0,002; Konfidenzintervall 95 %). Bei den männlichen Kontrollgruppen findet sich kein Unterschied.

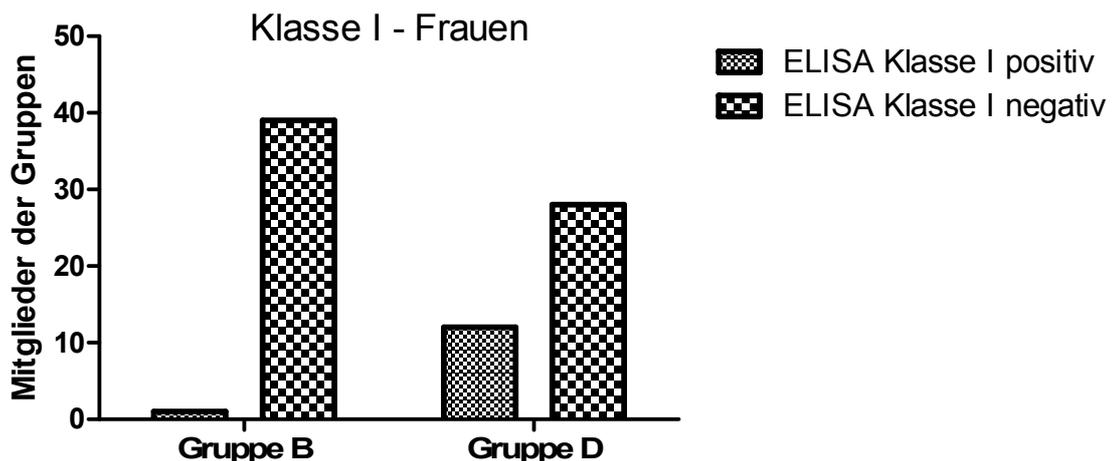


Abbildung 11: Klasse-I-Screening der weiblichen Kontrollgruppen: Absolute Anzahl der Mitglieder der beiden weiblichen Kontrollgruppen mit bzw. ohne HLA-AK gegen Klasse I im ELISA. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Gruppe B = 40 Frauen aus der Stammzellspenderdatei ohne Risiko für Antikörperbildung; Gruppe D = 40 Frauen aus der Stammzellspenderdatei mit Risiko für Antikörperbildung; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Frauen mit Risiko haben zwar eine erhöhte Rate an HLA-AK gegen Klasse II (siehe Abbildung 12), dieser Unterschied zu Frauen ohne Risikoanamnese ist jedoch nicht signifikant (P-Wert 0,16; Konfidenzintervall 95 %). Bei den männlichen Kontrollgruppen zeigt sich erneut kein Unterschied.

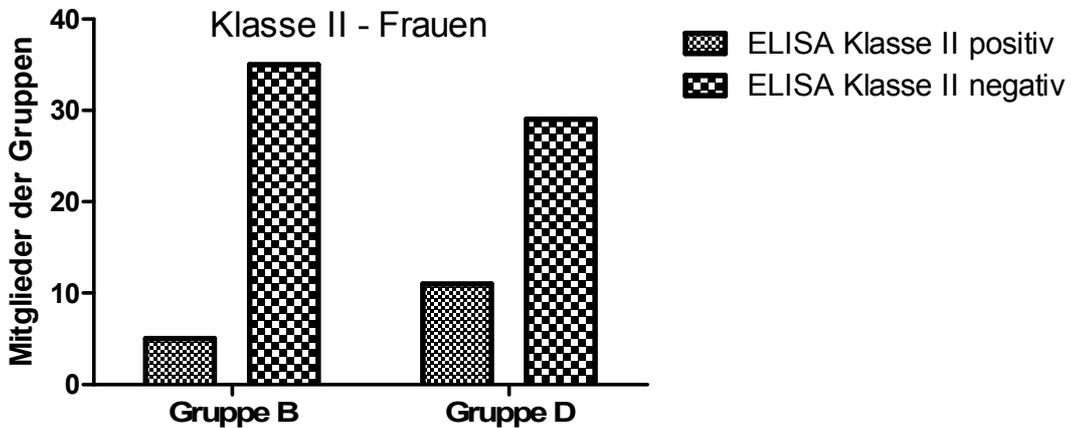


Abbildung 12: Klasse-II-Screening der weiblichen Kontrollgruppen: Anzahl der Mitglieder der beiden weiblichen Kontrollgruppen mit bzw. ohne HLA-AK gegen Klasse II im ELISA. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Gruppe B = 40 Frauen aus der Stammzellspenderdatei ohne Risiko für Antikörperbildung; Gruppe D = 40 Frauen aus der Stammzellspenderdatei mit Risiko für Antikörperbildung; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Betrachtet man die Screenings für Klasse I und II gemeinsam (siehe Abbildung 13), zeigt sich wieder ein signifikant höherer Anteil von HLA-AK bei Frauen mit Risikoanamnese (P-Wert 0,034; Konfidenzintervall 95 %).

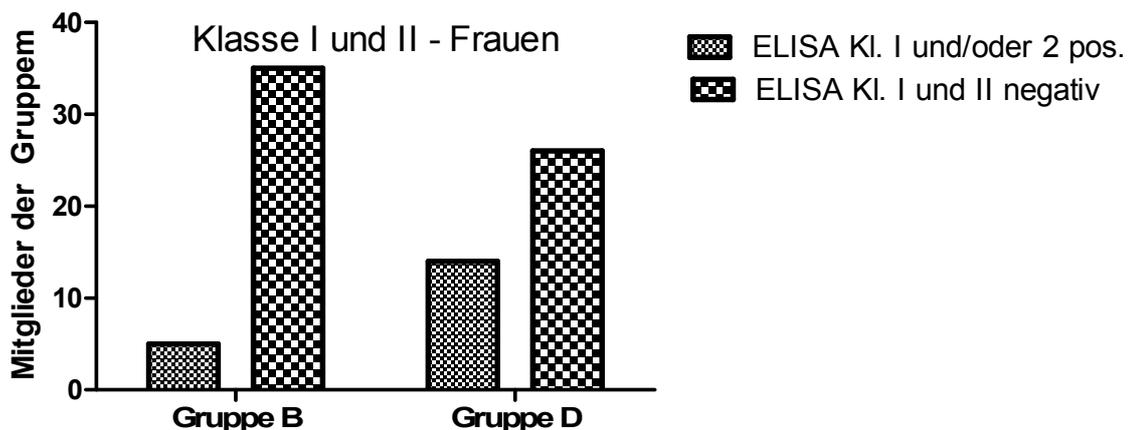


Abbildung 13: HLA-AK-Screening der weiblichen Kontrollgruppen: Anzahl der Mitglieder der beiden weiblichen Kontrollgruppen mit bzw. ohne HLA-AK gegen Klasse I und/oder II im ELISA. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Gruppe B = 40 Frauen aus der Stammzellspenderdatei ohne Risiko für Antikörperbildung; Gruppe D = 40 Frauen aus der Stammzellspenderdatei mit Risiko für Antikörperbildung; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

3.3 Transfusionen und Ergebnisse allgemein

Den Patienten wurden während des Beobachtungszeitraums insgesamt 607 Thrombozytentransfusionen verabreicht. Dabei erhielten sie je nach Höhe ihrer aktuellen Thrombozytenzahl entweder ein oder zwei TKs. Abbildung 14 gibt die Gründe für die Transfusionen an.

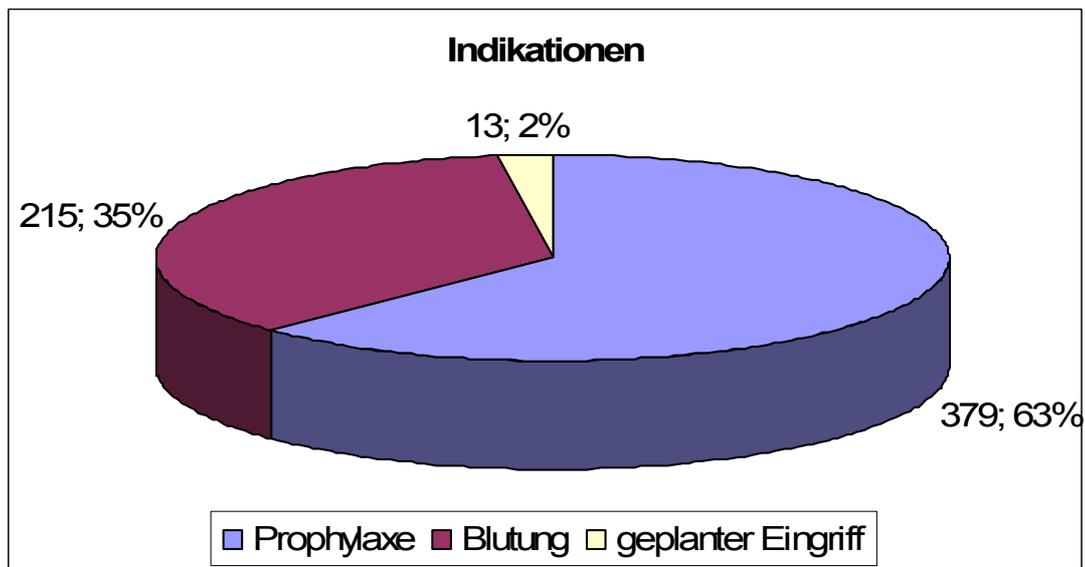


Abbildung 14: Transfusionsindikationen: Absoluter und prozentualer Anteil der verschiedenen Indikation an allen Thrombozytentransfusionen (n = 607), die bei den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) im gesamten Beobachtungszeitraum durchgeführt wurden.

Bei diesen Transfusionen wurden 968 leukozytendepletierte Thrombozytenpräparate verabreicht. Abbildung 15 gibt die Anteile der verschiedenen TKs an. Zusätzlich erhielten die Patienten im Beobachtungszeitraum 896 leukozytendepletierte EKs.

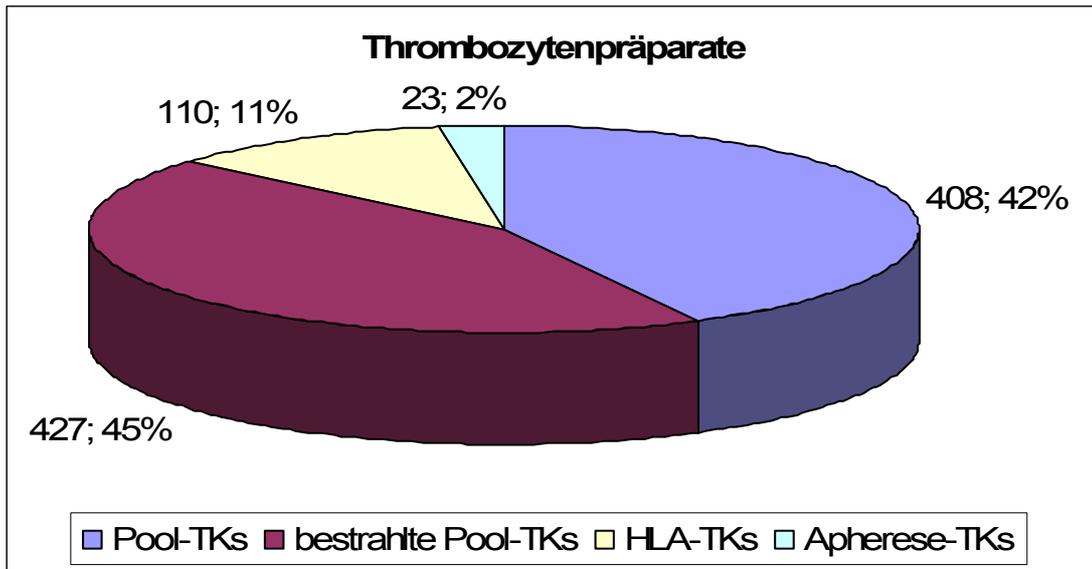


Abbildung 15: Thrombozytenpräparate: Absoluter und prozentualer Anteil der verschiedenen Präparate an allen TKs (n = 968), die den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) im gesamten Beobachtungszeitraum transfundiert wurden. TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate.

Jeweils zum Zeitpunkt der ersten Probenabnahme wurden Thrombozytenzahlen und CCI bestimmt. Bei den Thrombozytenzahlen muss man zwischen Patienten mit einem bzw. zwei transfundierten TKs unterscheiden (siehe Abbildung 16).

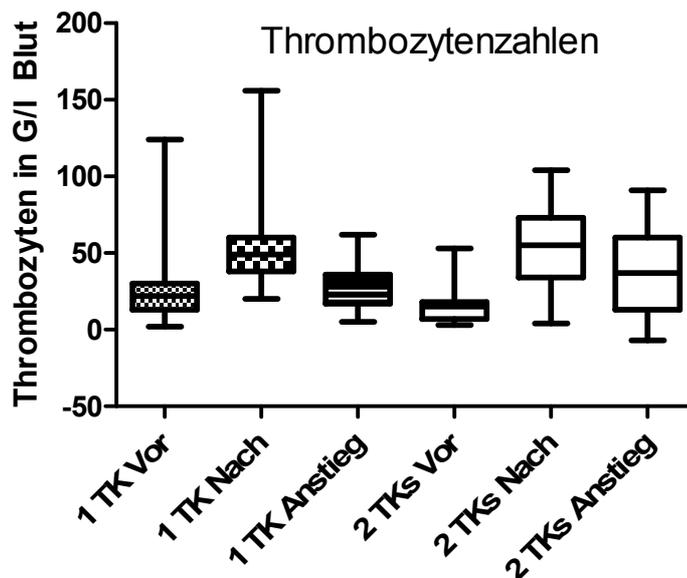


Abbildung 16: Thrombozytenzahlen und Anstieg: Boxplot über die Thrombozytenzahlen der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz vor der Transfusion, nach der Transfusion und dem daraus resultierenden Anstieg (am Tag der ersten Probenentnahme). Es wurden nur 70 Patienten ausgewertet, da bei 4 Patienten zu diesem Zeitpunkt nur eine Blutbildkontrolle erfolgte.

Die Patienten wurden unterteilt, je nachdem ob sie ein (n = 35) oder zwei (n = 35) TKs bekommen haben. TK = Thrombozytenkonzentrat; 1 TK Vor = Thrombozytenzahl vor der Transfusion eines TK; 1 TK Nach = Thrombozytenzahl nach der Transfusion eines TK; 1 TK Anstieg = Anstieg der Thrombozytenzahl durch die Transfusion eines TK; 2 TKs Vor = Thrombozytenzahl vor der Transfusion zweier TKs; 2 TKs Nach = Thrombozytenzahl nach der Transfusion zweier TKs; 2 TKs Anstieg = Anstieg der Thrombozytenzahl durch die Transfusion zweier TKs.

In der Formel des CCI ist dieser Faktor bereits berücksichtigt. Insgesamt zeigte sich bei den Patienten ein medianes CCI von 13130, wobei Patienten ohne HLA-AK ein medianes CCI von 14554 hatten, während die Patienten mit HLA-AK lediglich ein CCI von 10823 zeigten (siehe Abbildung 17). Patienten mit HLA-AK erreichten demnach nur 74 % des CCI der Patienten ohne HLA-AK.

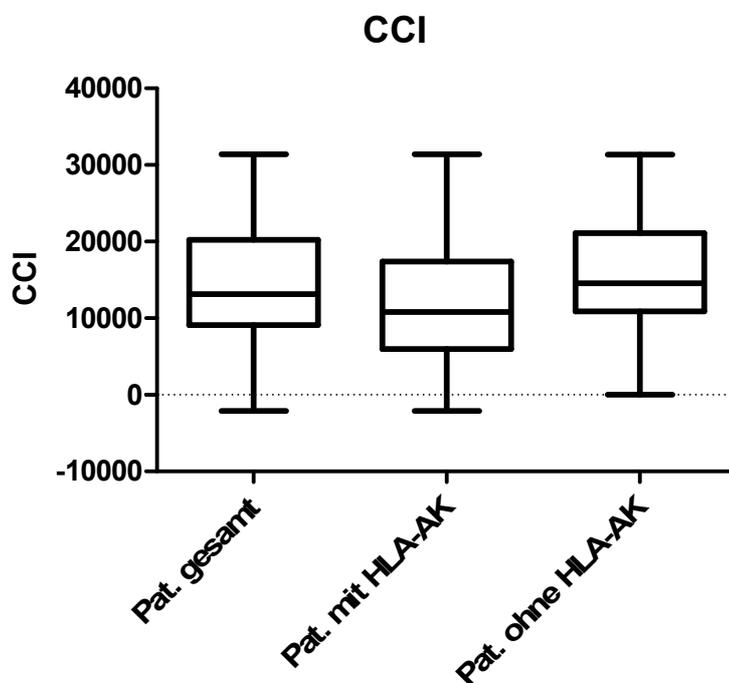


Abbildung 17: CCI: Boxplot über das CCI der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz bei der Transfusion zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme. Es wurden 65 Patienten ausgewertet, da bei 9 entweder die Körperoberfläche nicht bekannt ist, oder nur eine Blutbildkontrolle durchgeführt wurde. Die Patienten wurden zusätzlich in Patienten mit (n = 21) und ohne (n = 44) HLA-AK unterteilt. CCI = Corrected Count Increment; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; Pat. Gesamt = CCIs aller Patienten; Pat. mit HLA-AK = CCIs der Patienten mit positivem HLA-AK-Nachweis in der ersten Probe; Pat. ohne HLA-AK = CCIs der Patienten mit negativem HLA-AK-Nachweis in der ersten Probe.

138 Proben wurde auf Antikörper gegen HLA-Merkmale der Klasse I (LCT und ELISA) und Klasse II (ELISA) getestet. In 5 Fällen konnte nur ein LCT erhoben werden. Demnach wurden insgesamt 143 Proben bearbeitet.

Antikörper gegen HLA-Klasse-I:

Bei 115 von 138 Proben kamen LCT und ELISA zum gleichen Ergebnis. In 98 Fällen waren beide Tests negativ, in 17 positiv.

Bei 23 Seren unterschieden sich die Ergebnisse der beiden Tests. 15-mal war der ELISA positiv und der LCT negativ. Bei 8 Seren war der LCT positiv, während im ELISA keine Antikörper gefunden wurden.

Somit kamen LCT und ELISA in 83 % (115/138) der Fälle zum gleichen Ergebnis, während sie sich in 17 % (23/138) unterschieden. Insgesamt wurden 18 % (25/138) aller Proben im LCT positiv getestet, während dieser Anteil im ELISA bei 23 % lag (32/138) (siehe Abbildung 18).

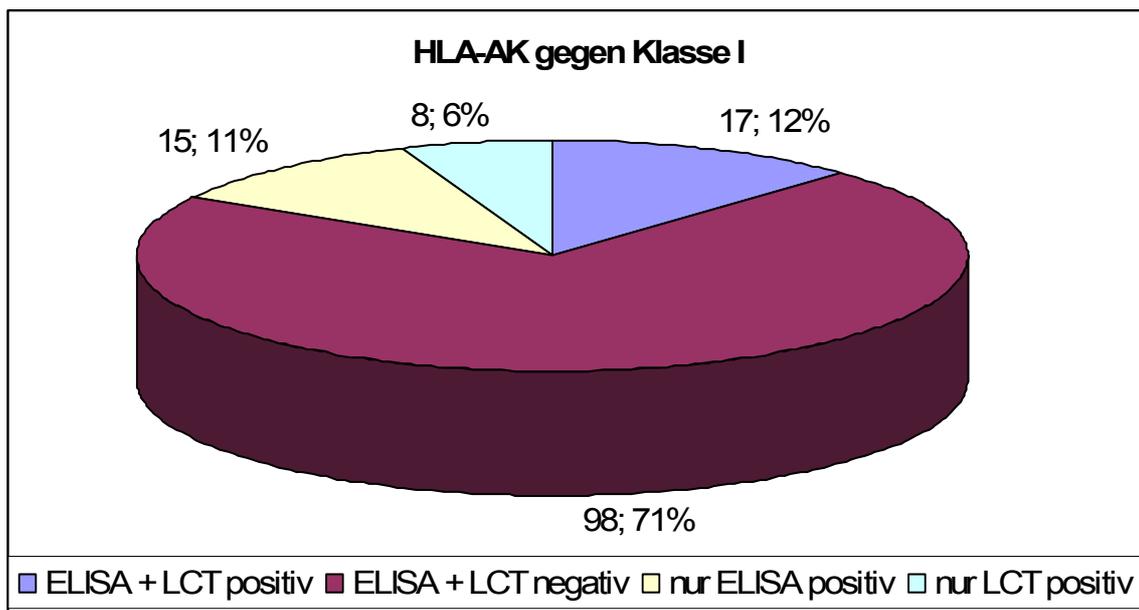


Abbildung 18: Vergleich ELISA/LCT: Absoluter und prozentualer Anteil an Übereinstimmungen bzw. Unterschieden in der Bestimmung von HLA-AK gegen Klasse I im ELISA bzw. LCT. Insgesamt wurden 138 Seren mit beiden Verfahren getestet. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; LCT = Lymphozytotoxizitätstest; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Spezifitäten:

Bei 13 von 74 Patienten wurden zwischenzeitlich spezifische HLA-AK gefunden. Die Abbildungen 19 und 20 geben eine Übersicht über die Anzahl der Patienten mit dem entsprechenden Antikörper. Dabei wurde jeweils die Probe der Patienten ausgewertet, in der die meisten Spezifitäten gefunden wurden. Bei 10 Patienten wurden mehrere spezifische HLA-AK nachgewiesen. Eine Häufung findet man bei Antikörpern gegen A1, A2, A3, A23, A24, A25, A66 sowie B7, B27, B57, und B58.

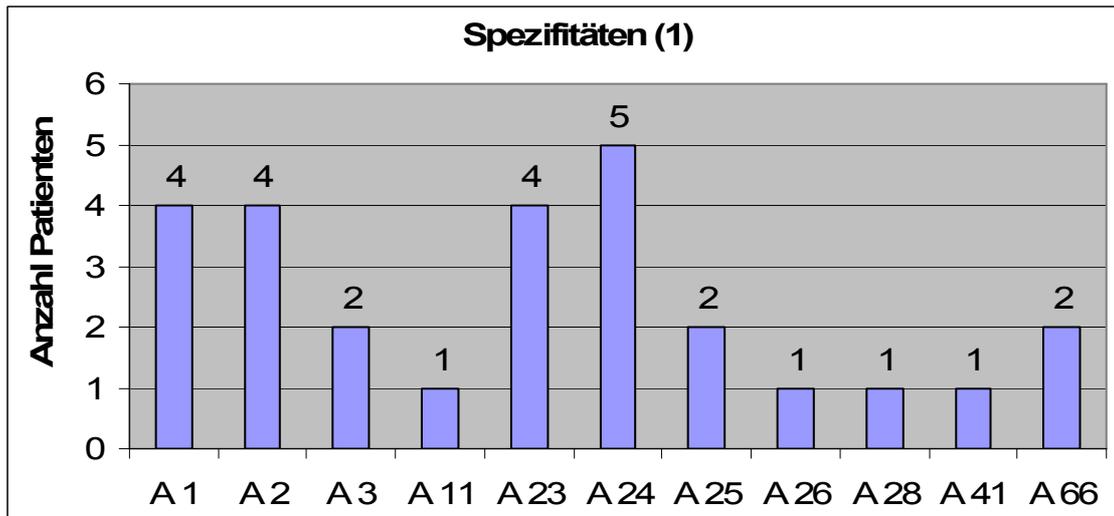


Abbildung 19: Spezifitäten (1): Absolute Anzahl der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit Antikörpern gegen das entsprechende HLA-Merkmal des A-Locus. HLA = Human-Leucocyte-Antigen; AX = entsprechendes Allel des A-Locus im Human-Leucocyte-Antigen-System.

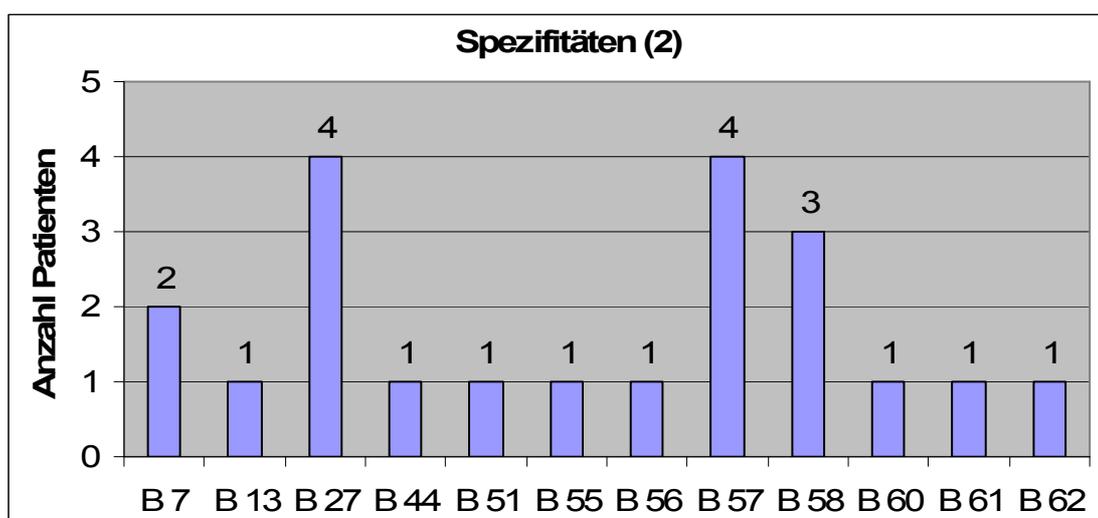


Abbildung 20: Spezifitäten (2): Absolute Anzahl der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit Antikörpern gegen das entsprechende HLA-Merkmal des B-Locus. HLA = Human-Leucocyte-Antigen; BX = entsprechendes Allel des B-Locus im Human-Leucocyte-Antigen-System.

Antikörper gegen HLA-Klasse-II:

Der ELISA konnte in 18 der 138 untersuchten Seren HLA-AK gegen Klasse II nachweisen. Dies entspricht einem Anteil von 13 %.

3.4 Risikofaktoren und HLA-AK zu Beginn

Insgesamt konnte von 74 Patienten eine erste Blutprobe entnommen und ein LCT bzw. ELISA durchgeführt werden. Zusätzlich wurden die Risikofaktoren evaluiert, die schon zu Beginn bestanden. So hatten beispielsweise 55 Patienten bereits vor der ersten Probenentnahme Blutkomponenten erhalten (siehe Abbildung 21).

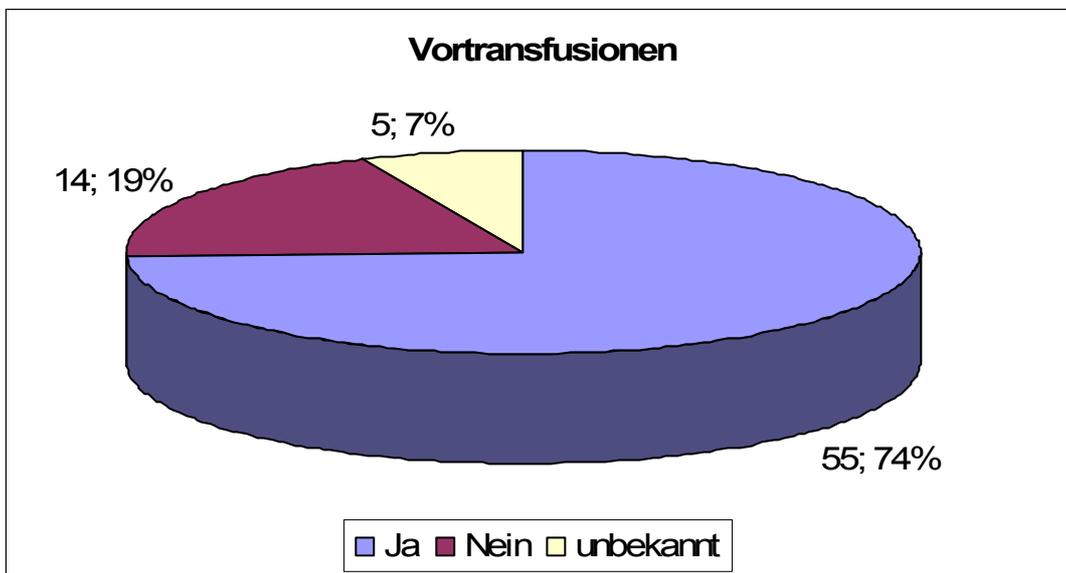


Abbildung 21: Transfusionsanamnese: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit/ohne Transfusionen vor der ersten Probenabgabe bzw. unbekannter Transfusionsanamnese.

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen, welchen Anteil die verschiedenen Präparate an den Vortransfusionen haben:

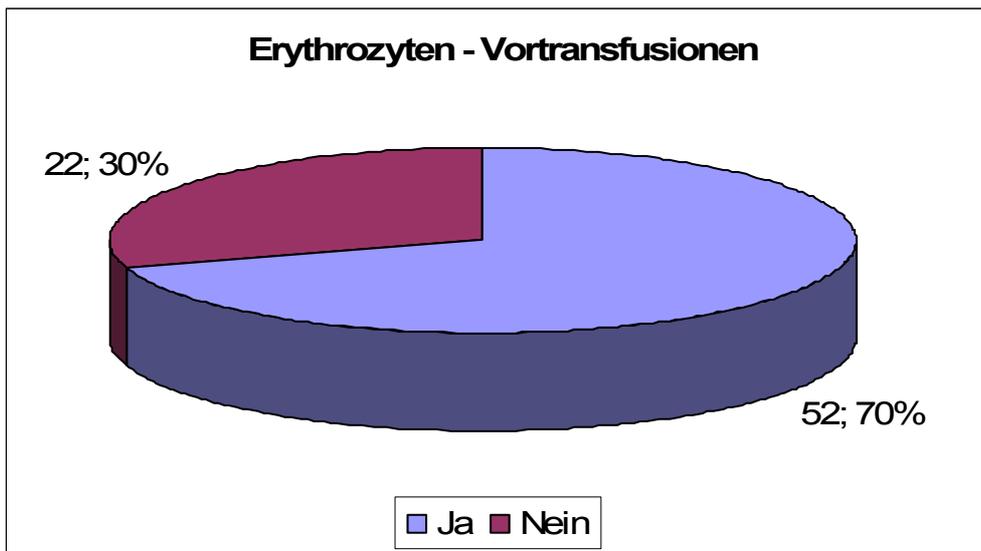


Abbildung 22: EKs vor 1. Blutprobe: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74), die vor der ersten Probe EKs erhalten haben oder nicht. EKs = Erythrozytenkonzentrate.

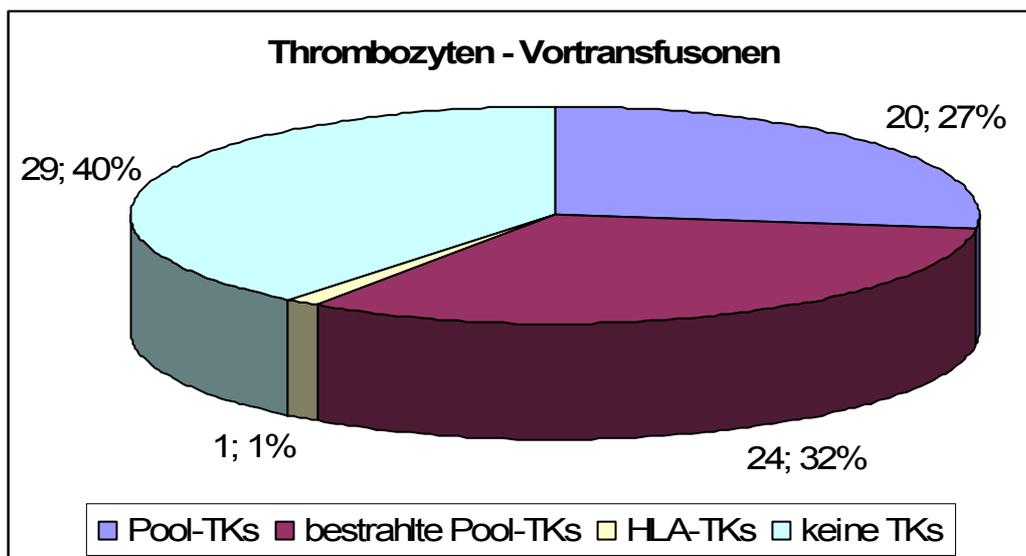


Abbildung 23: TKs vor 1. Blutprobe: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74), die vor der ersten Probe die entsprechenden Thrombozytenkonzentrate erhalten haben. TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate.

Vor der ersten Blutentnahme wurden den Patienten median 4 EKs (Mittelwert 7,2; SD 10,89), 2 Pool-TKs (Mittelwert 5,3; SD 11,7), 0 HLA-TKs (Mittelwert 0,47; SD 3,00) und 0 Apherese-TKs (Mittelwert 0,3; SD 2,6) transfundiert (siehe Abbildung 24).

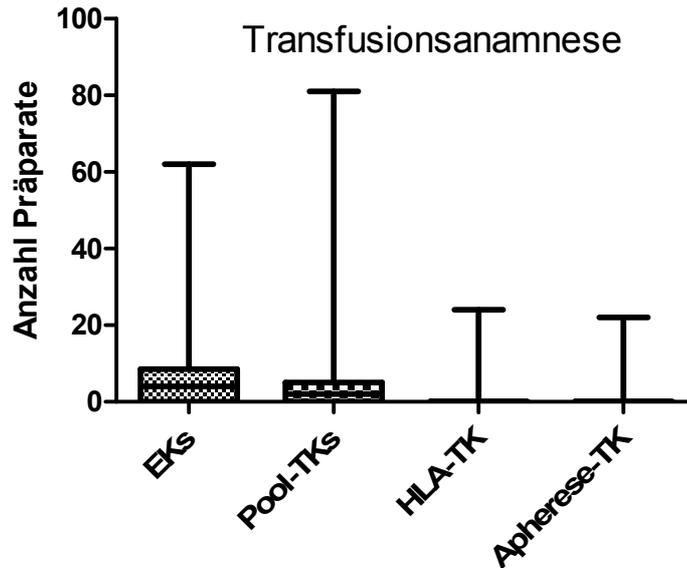


Abbildung 24: Transfusionsanamnese (2): Boxplot über die Anzahl der Präparate, die den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) vor der ersten Blutentnahme transfundiert wurden. EKs = Erythrozytenkonzentrate; TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate; Apherese-TKs = nicht-Human-Leucocyte-Antigen-gerichtete Thrombozytenkonzentrate.

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen die Ergebnisse des LCT und die Scorewerte im ELISA Klasse I und II bei der ersten Probe.

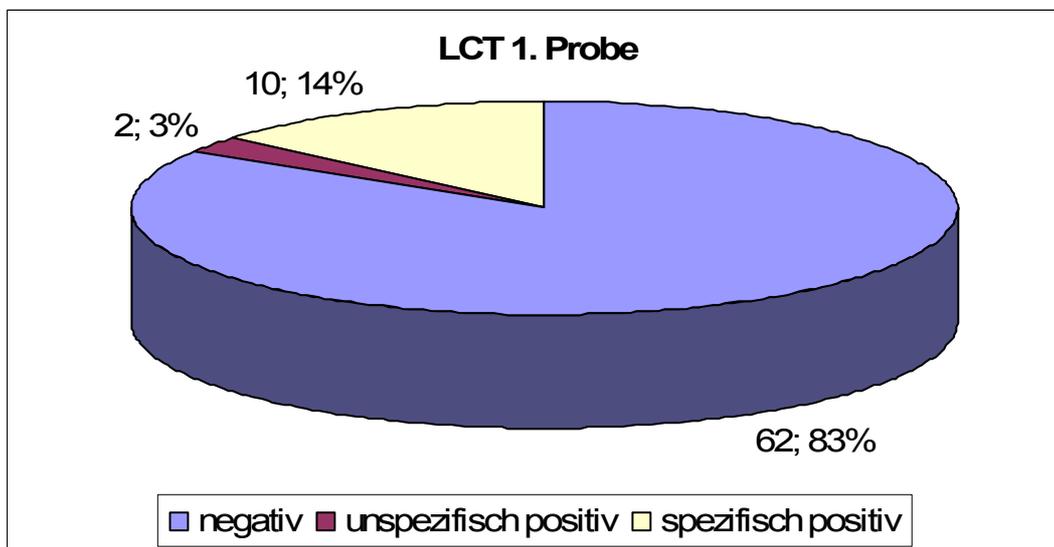


Abbildung 25: LCT 1. Probe: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) die bei der ersten Probe das entsprechende Ergebnis im LCT hatten. LCT = Lymphozytotoxizitätstest.

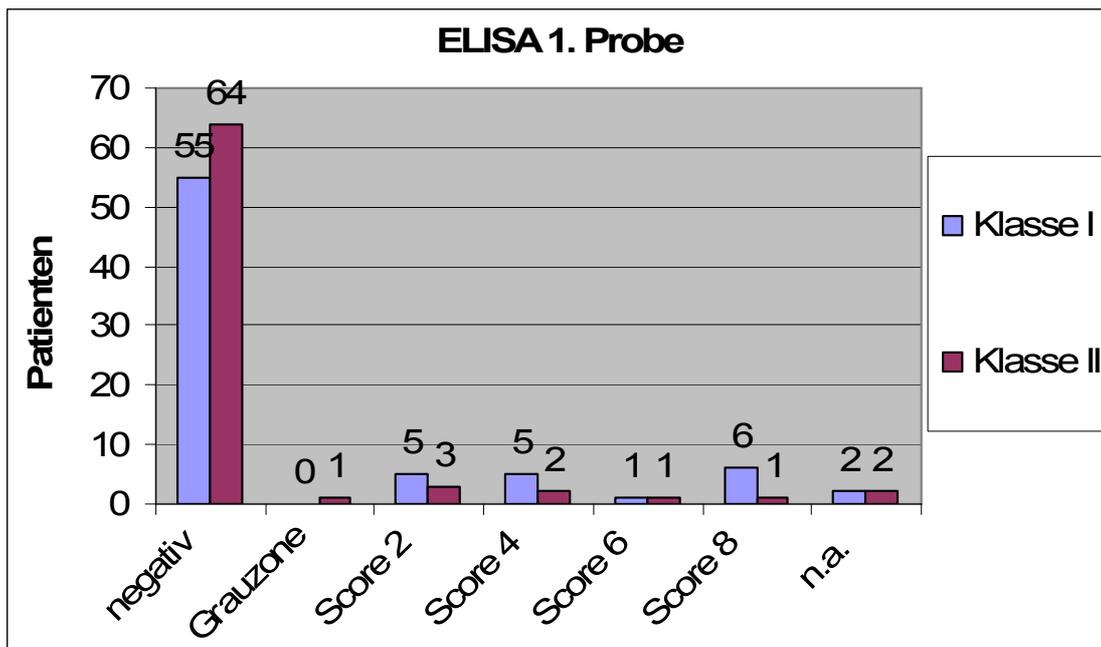


Abbildung 26: ELISA 1. Probe: Absoluter Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) die bei der ersten Probe den entsprechenden Score im ELISA hatten. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; n.a. = not available (kein ELISA durchgeführt).

Abbildung 27 zeigt, mit welcher Art von TKs die Patienten zum Zeitpunkt der ersten Probenabnahme versorgt wurden:

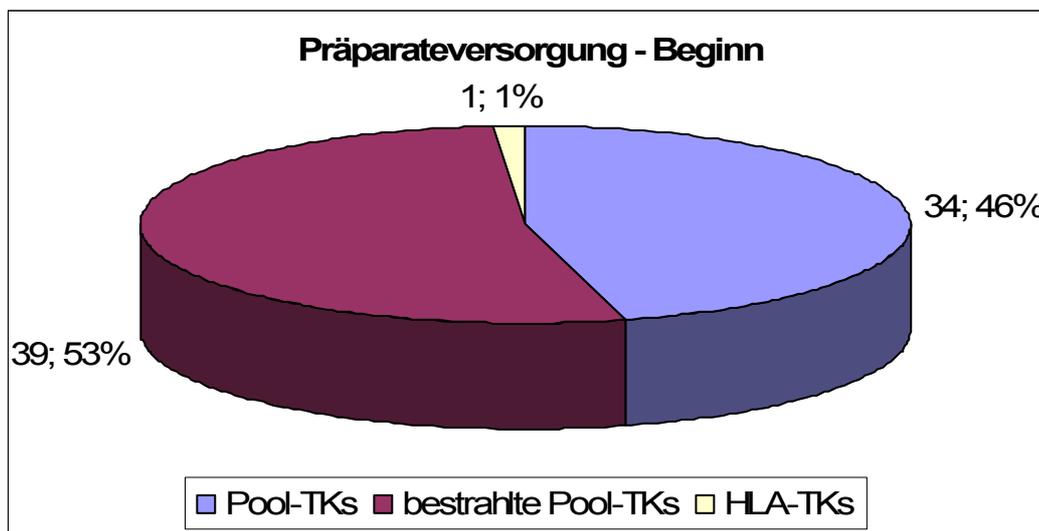


Abbildung 27: Präparateversorgung – Beginn: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74), die zum Zeitpunkt der ersten Probenabnahme mit der entsprechenden Art von TK versorgt wurden. TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate.

In den Ergebnissen der 1. Blutprobe zeigte sich kein signifikanter Unterschied (P-Wert = 1,0; Konfidenzintervall 95 %) in der HLA-AK-Rate zwischen Patienten mit bzw. ohne Vortransfusionen mit zellulären Blutkomponenten (siehe Abbildung 28).

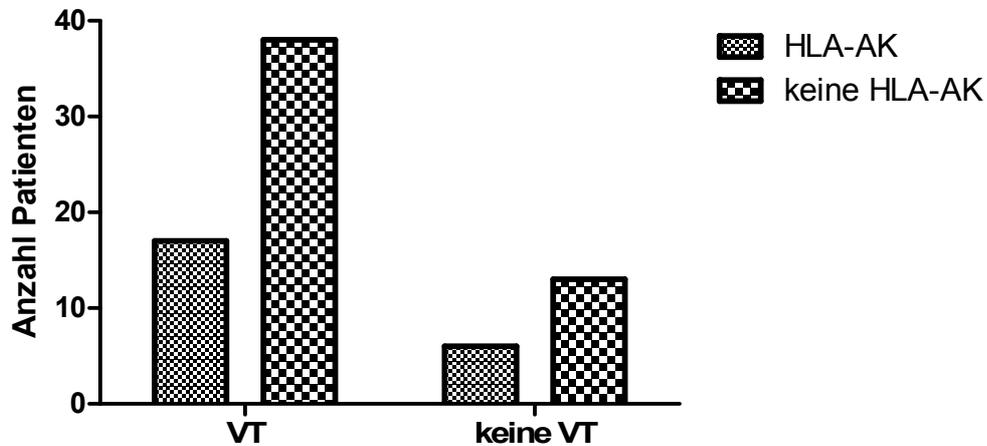


Abbildung 28: Vortransfusionen und HLA-AK: Absolute Anzahl an ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit bzw. ohne Vortransfusionen, bei denen in der 1. Probe HLA-AK nachgewiesen wurden oder nicht. VT = Vortransfusion; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

33 % der Patienten, die schon EKs erhalten hatten, wurden bereits in der 1. Probe positiv getestet (siehe Abbildung 29). Im Vergleich zu den 18 % positiven Patienten, die keine EKs erhalten hatten, ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (P-Wert = 0,17; Konfidenzintervall 95 %).

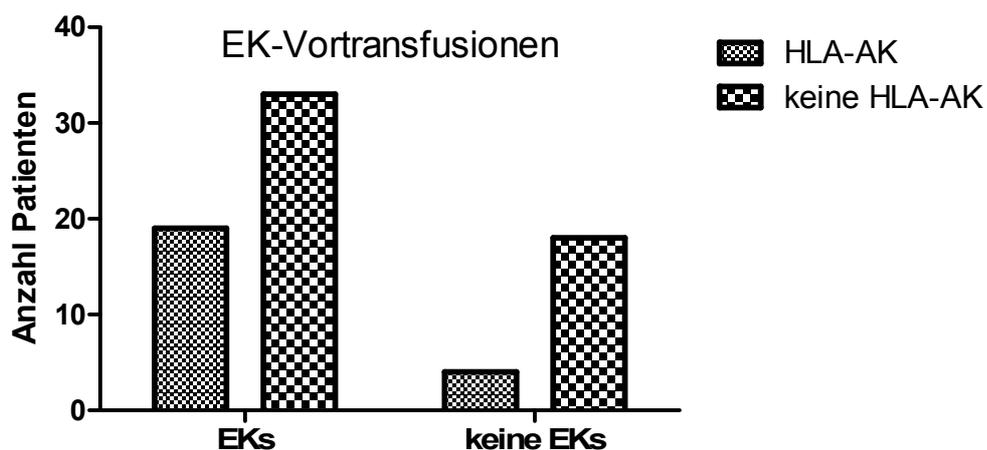


Abbildung 29: EK-Vortransfusionen und HLA-AK: Absolute Anzahl an ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit bzw. ohne EK-Vortransfusionen, bei denen in der 1. Probe HLA-AK nachgewiesen wurden oder nicht. EK = Erythrozytenkonzentrat; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Auch die Transfusionsanamnese mit bestrahlten bzw. unbestrahlten zellulären Blutprodukten (siehe Abbildung 30) zeigt keinen signifikanten Unterschied in der HLA-AK-Entwicklung (P-Wert 0,81; Konfidenzintervall 95 %).

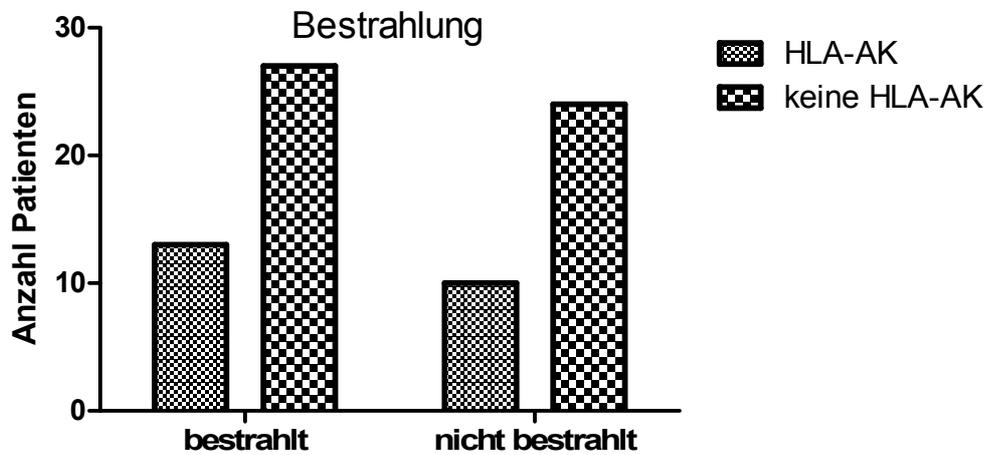


Abbildung 30: Bestrahlung und HLA-AK: Absolute Anzahl an ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) die bestrahlte bzw. unbestrahlte zelluläre Blutprodukte erhielten und bei denen in der 1. Probe HLA-AK nachgewiesen wurden oder nicht. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Unterteilt man die Patienten nach ihren Erkrankungen (siehe Abbildung 31), findet man bei 34 % (22/65) der hämatologischen Patienten HLA-AK in der 1. Probe gegenüber 11 % der Patienten mit anderen Erkrankungen (1/9). Dieser Unterschied ist zwar deutlich, jedoch nicht signifikant (P-Wert = 0,26; Konfidenzintervall 95 %).

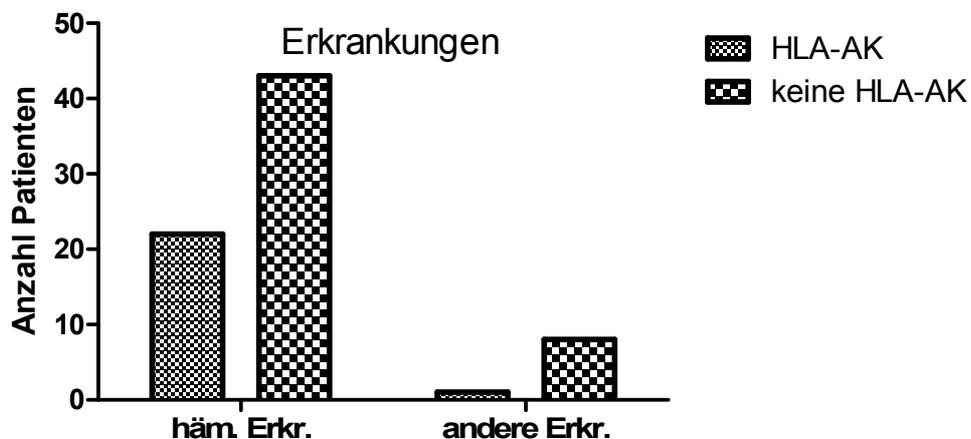


Abbildung 31: Erkrankung und HLA-AK: Absolute Anzahl an ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit hämatologischer bzw. anderer Erkrankung, bei denen in der ersten Probe HLA-AK nachgewiesen wurden oder nicht. häm. Erkr. = hämatologische Erkrankung; andere Erkr. = andere Erkrankung; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Getrennt nach Geschlecht und Schwangerschaftsanamnese zeigten sich bei den unterschiedlichen Patientengruppen ähnliche Raten an positiven Ergebnissen im ersten Test (siehe Tabelle 5). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden.

Tabelle 5: Geschlecht und Schwangerschaftsanamnese: Absoluter und prozentualer Anteil an ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) unterteilt nach Geschlecht und Schwangerschaftsanamnese, bei denen in der ersten Probe HLA-AK nachgewiesen wurden oder nicht. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

	HLA-AK	Keine HLA-AK	Positive Patienten
Männer	12	29	29 %
Frauen mit Schwangerschaften	6	12	33 %
Frauen ohne Schwangerschaften	2	7	22 %
Frauen mit unbekannter Schwangerschaftsanamnese	3	3	50 %

3.5 Risikofaktoren und HLA-AK an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Tabelle 6 gibt die Anzahl der Patienten, HLA-AK-Träger und den Anteil der verschiedenen Risikofaktoren an den drei Untersuchungszeitpunkten wieder.

Tabelle 6: Patientencharakteristika an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten: Absolute Anzahl der getesteten Patienten aus der Transfusionsambulanz am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt. Prozentualer Anteil der verschiedenen Charakteristika bei den getesteten Patienten am entsprechenden Untersuchungszeitpunkt. UZ 1 = Untersuchungszeitpunkt 1; erste Probenabgabe; UZ 2 = Untersuchungszeitpunkt 2; zweite Probenabgabe; UZ 3 = Untersuchungszeitpunkt 3; dritte Probenabgabe. EKs = Erythrozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate; Schw.-Anamnese = Schwangerschaftsanamnese; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

	UZ 1	UZ 2	UZ 3
Anzahl Patienten	74	48	21
Patienten mit HLA-AK	31 %	42 %	19 %
Patienten mit Vortransfusionen	74 %	100 %	100 %
Patienten die EKs erhielten	70 %	92 %	95 %
Patienten mit bestrahlten Präparaten	53 %	54 %	52 %
Patienten mit hämatologischen Erkrankungen	88 %	90 %	95 %
Versorgung mit HLA-TKs	3 %	23 %	33 %
Männer	55 %	56 %	57 %
Frauen mit Schwangerschaften	24 %	23 %	19 %
Frauen ohne Schwangerschaften	12 %	15 %	19 %
Frauen mit unbekannter Schw.-Anamnese	8 %	6 %	5 %

Ausführlichere Angaben zum Untersuchungszeitpunkt 1 wurden in Kapitel 3.4 dargestellt.

Untersuchungszeitpunkt 2:

Zum Untersuchungszeitpunkt 2 konnte von 48 Patienten eine zweite Probe entnommen werden.

Zwischen der ersten und zweiten Probe erhielten sie median 4 EKs und 3,5 Pool-TKs (siehe Abbildung 32)

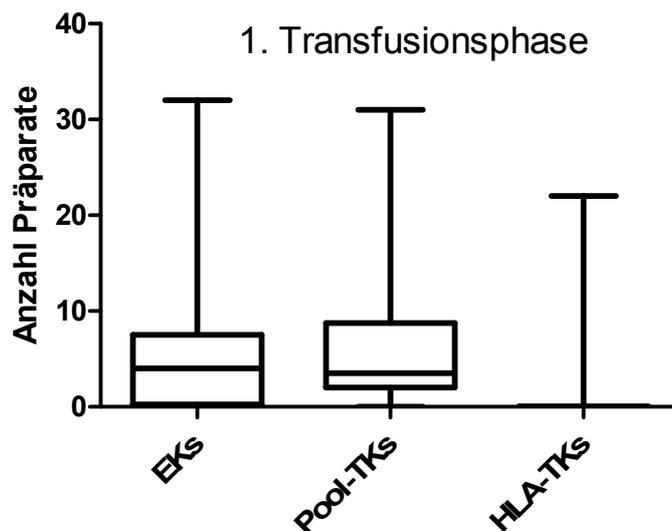


Abbildung 32: 1. Transfusionsphase: Boxplot über die Anzahl der Präparate, die den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz mit mindestens zwei Probenabgaben (n = 48) zwischen der 1. und 2. Blutentnahme verabreicht wurden. EKs = Erythrozytenkonzentrate; TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate.

Die Zeit zwischen den beiden Blutabnahmen betrug median 82,5 Tage (siehe Abbildung 33).

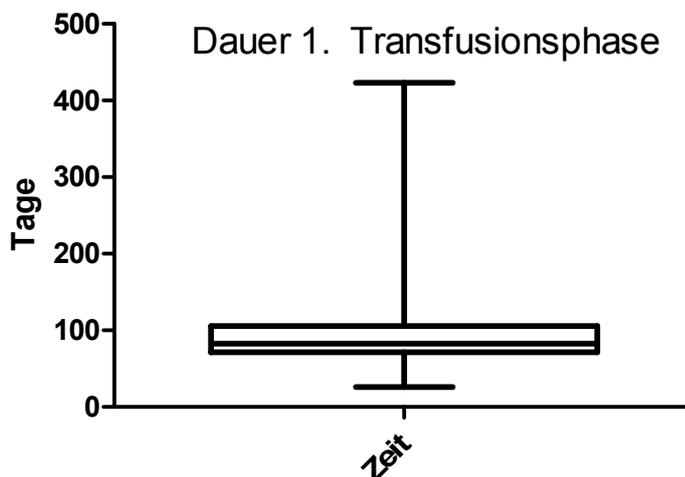


Abbildung 33: 1. Transfusionsphase - Dauer: Boxplot über die vergangenen Tage zwischen der 1. und 2. Blutentnahme bei den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz mit mindestens zwei Probenabgaben (n = 48).

Abbildung 34 stellt die LCT-Ergebnisse der 2. Blutprobe dar. Die spezifisch positiven Seren fielen im Vergleich zum 1. Untersuchungszeitpunkt (siehe

Abbildungen 25 und 34) von 14 % (10/74) auf 10 % (5/48), während die unspezifisch positiven Proben von 3 % (2/74) auf 15 % (7/48) anstiegen.

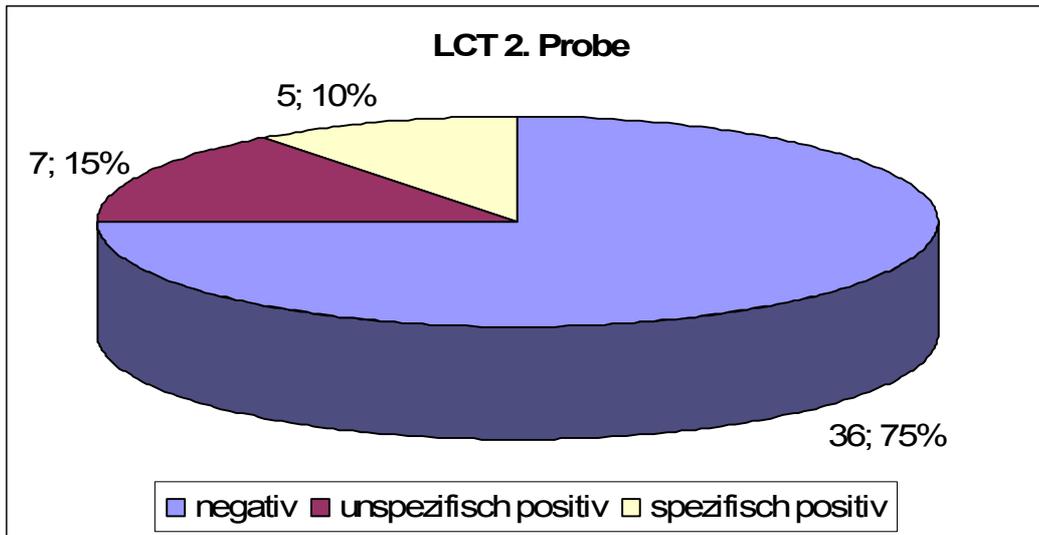


Abbildung 34: LCT 2. Probe: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 48), die bei der zweiten Probe das entsprechende Ergebnis im LCT hatten. LCT = Lymphozytotoxizitätstest.

Im ELISA (siehe Abbildung 35) stieg der Anteil an Proben mit HLA-AK gegen Klasse I von 26 % (19/74) am ersten Untersuchungszeitpunkt (siehe Abbildung 26 und 35) auf 28 % (13/47) zum zweiten Zeitpunkt. Bei HLA-AK gegen Klasse II zeigte sich ein Anstieg von 12 % (9/74) auf 17 % (8/47).

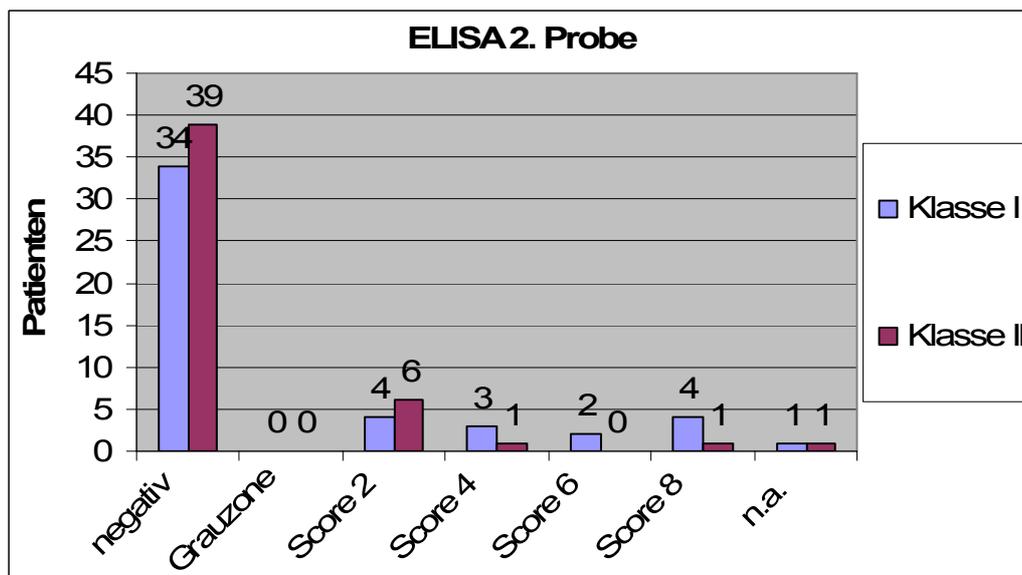


Abbildung 35: ELISA 2. Probe: Absoluter Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 48) die bei der zweiten Probe den entsprechenden Score im ELISA hatten. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; n.a. = not available (kein ELISA durchgeführt).

Bei den 48 Patienten mit 2 Blutentnahmen fanden sich jeweils 20 positive Probanden in der 1. und 2. Probe (siehe Abbildung 36). Somit ergab sich statistisch kein Unterschied.

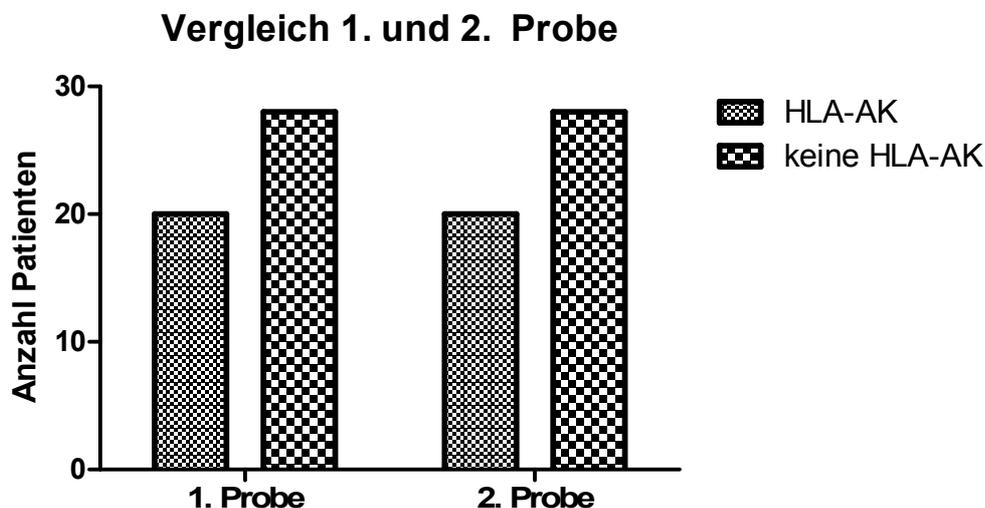


Abbildung 36: HLA-AK-Entwicklung im 1. Transfusionsabschnitt: Absolute Anzahl der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz mit mindestens zwei Probeentnahmen (n = 48) mit bzw. ohne HLA-AK in der 1. und 2. Probe. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Zum Zeitpunkt der zweiten Probenentnahme wurden erneut die Risikofaktoren der Patienten und ihr Einfluss auf die Bildung von HLA-AK verglichen. Dabei zeigte sich mit einer Ausnahme keine signifikante Beeinflussung der HLA-AK-Bildung durch die verschiedenen Risikofaktoren (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Risikofaktoren und HLA-AK am Untersuchungszeitpunkt 2: Absolute Anzahl der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz zum Untersuchungszeitpunkt 2 (n = 48), die die entsprechenden Präparate erhalten haben bzw. die entsprechenden Charakteristika aufweisen und HLA-AK haben oder nicht. Angabe des P-Werts und der Signifikanz des zweiseitigen Fisher-Yates-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95 %. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; EKs = Erythrozytenkonzentrate.

	HLA-AK	Keine HLA-AK	P-Wert	Signifikanz
EKs	17	27	0,29	nein
Keine EKs	3	1		
Bestrahlt	10	16	0,77	nein
Nicht bestrahlt	10	12		
Hämatologische Erkrankung	19	24	0,38	nein
Andere Erkrankung	1	4		
Frauen	13	8	0,02	ja
Männer	7	20		

Im Vergleich zu den männlichen Patienten zeigt sich jeweils eine signifikant erhöhte Rate an HLA-AK bei Frauen mit unbekannter Schwangerschaftsanamnese (P-Wert 0,03; Konfidenzintervall 95 %) und bei Frauen allgemein (siehe Tabelle 7 und Abbildung 37).

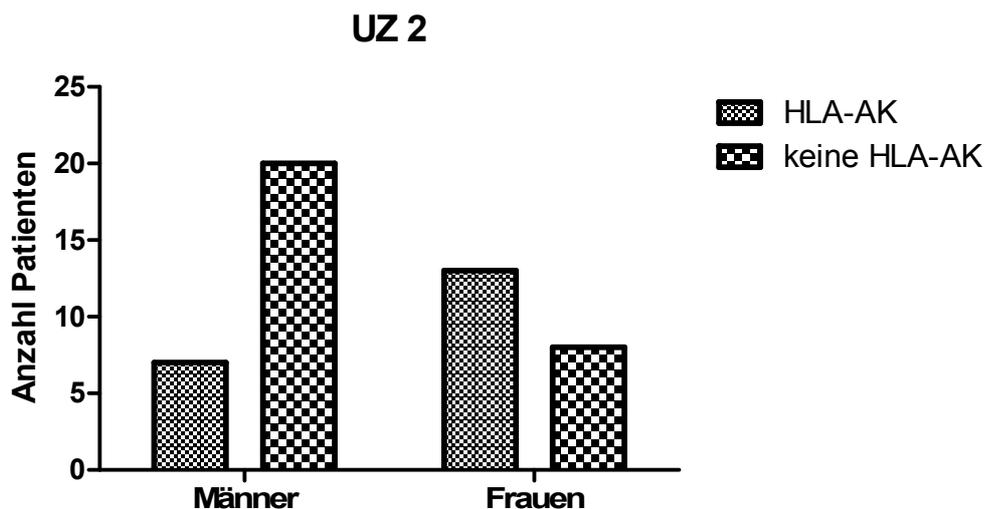


Abbildung 37: Geschlecht und HLA-AK – UZ 2: Absolute Anzahl der ausgewerteten männlichen (n = 27) bzw. weiblichen (n = 21) Patienten aus der Transfusionsambulanz zum Untersuchungszeitpunkt 2, bei denen HLA-AK nachgewiesen wurden. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; UZ 2 = Untersuchungszeitpunkt 2.

Untersuchungszeitpunkt 3:

Zum Untersuchungszeitpunkt 3 konnte von 21 Patienten eine dritte Probe entnommen werden. Zwischen Untersuchungszeitpunkt 2 und 3 wurden ihnen median 4 EKs und 2 Pool-TKs transfundiert (siehe Abbildung 38).

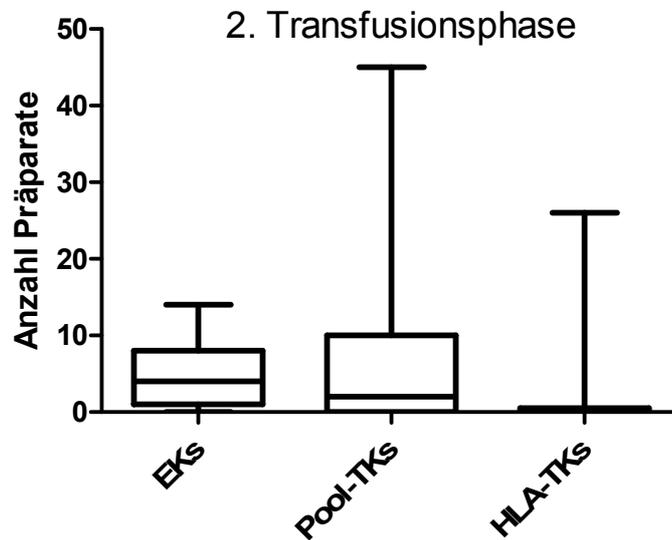


Abbildung 38: 2. Transfusionsphase: Boxplot über die Anzahl der Präparate, die den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 21) zwischen der 2. und 3. Blutentnahme verabreicht wurden. EKs = Erythrozytenkonzentrate; TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate.

Die Transfusionen erstreckten sich hierbei median über einen Zeitraum von 70 Tagen (siehe Abbildung 39).

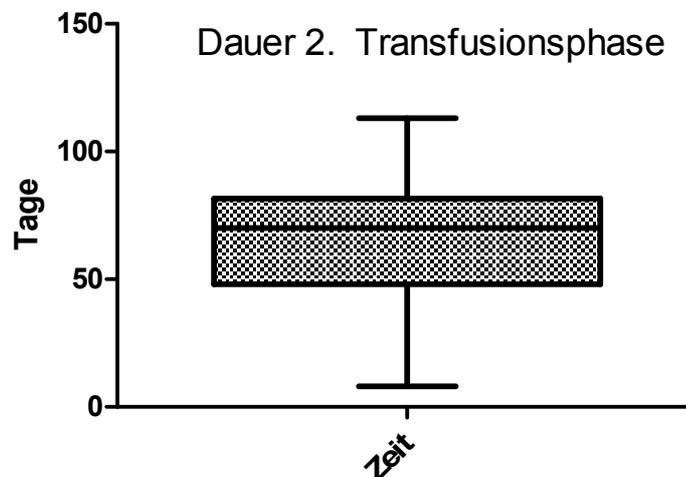


Abbildung 39: 2. Transfusionsphase - Dauer: Boxplot über die vergangenen Tage zwischen der 2. und 3. Blutentnahme bei den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 21).

Im LCT zum Untersuchungszeitpunkt 3 zeigt sich ein ähnliches Bild wie zum 1. Untersuchungszeitpunkt: 14 % (3/21) der Patienten waren spezifisch und 5 % (1/21) unspezifisch positiv (siehe Abbildungen 25 und 40).

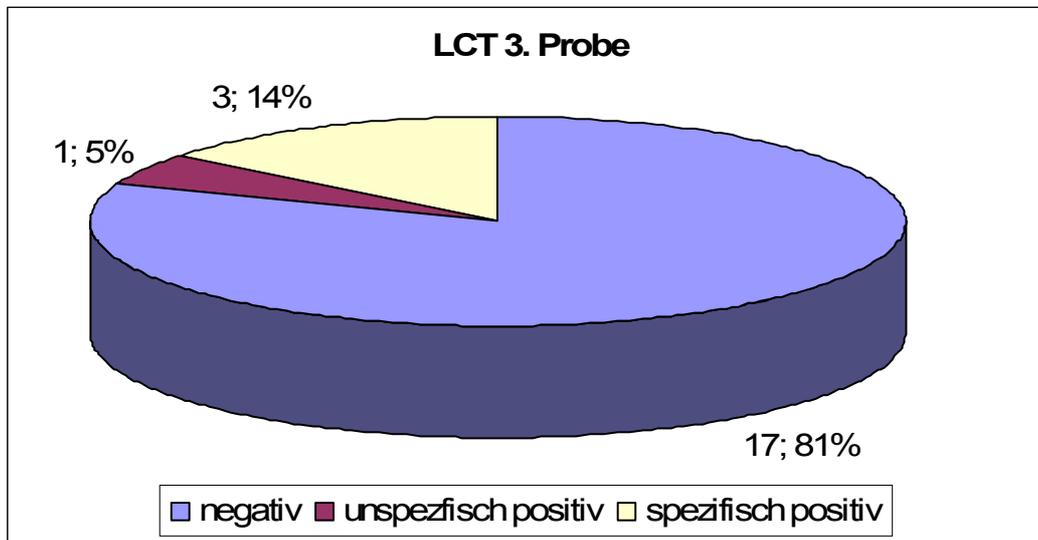


Abbildung 40: LCT 3. Probe: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 21), die bei der dritten Probe das entsprechende Ergebnis im LCT hatten. LCT = Lymphozytotoxizitätstest.

Der Anteil an positiven Ergebnissen im ELISA war zum Untersuchungszeitpunkt 3 mit 11 % (2/19) in beiden Klassen im Vergleich zu den anderen Untersuchungszeitpunkten am geringsten (siehe Abbildungen 26, 35 und 41).

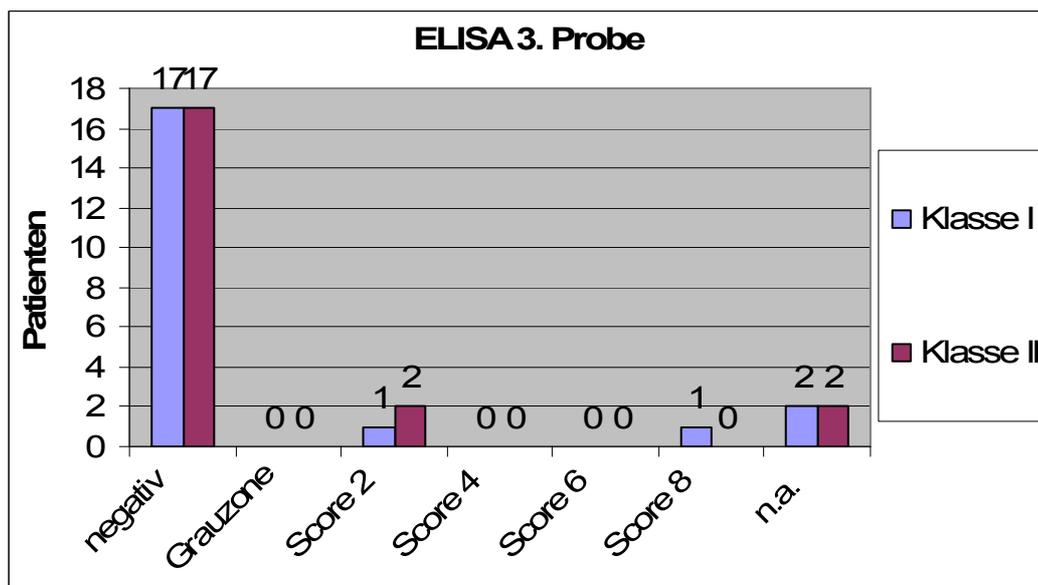


Abbildung 41: ELISA 3. Probe: Absoluter Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 21) die bei der dritten Probe den entsprechenden Score im ELISA hatten. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; n.a. = not available (kein ELISA durchgeführt).

Von den 21 Patienten waren 11 in der zweiten Probe positiv, während in der dritten Probe nur bei 4 Patienten HLA-AK gefunden wurden (siehe Abbildung 42). Dieser Abfall ist zwar deutlich, jedoch im Fisher-Yates-Test nicht signifikant (P-Wert 0,1; Konfidenzintervall 95 %).

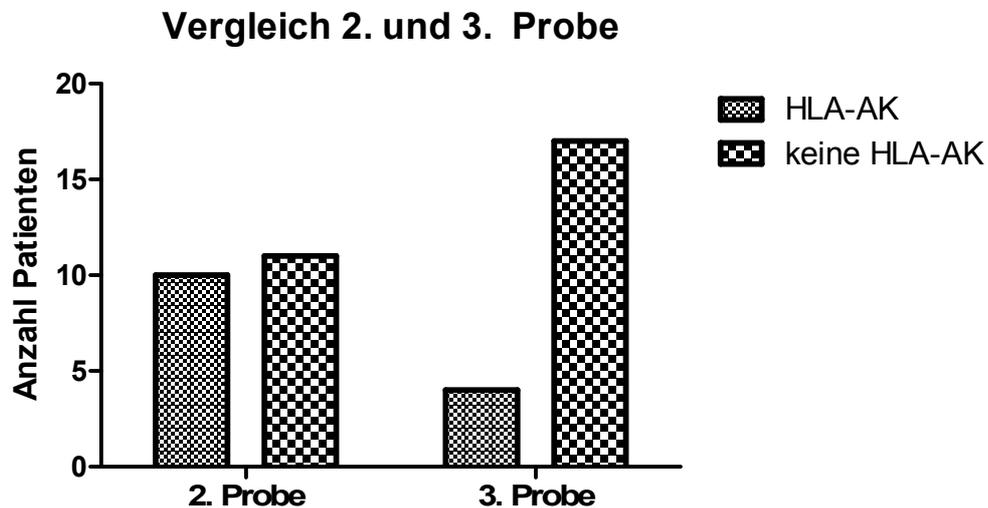


Abbildung 42: HLA-AK-Entwicklung im 2. Transfusionsabschnitt: Absolute Anzahl der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 21) mit bzw. ohne AK in der 2. und 3. Probe. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Auch zum dritten Untersuchungszeitpunkt wurden die Risikofaktoren der Patienten und ihr Einfluss auf die Bildung von HLA-AK verglichen. Hier zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der HLA-AK-Bildung (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Risikofaktoren und HLA-AK am Untersuchungszeitpunkt 3: Absolute Anzahl der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz zum Untersuchungszeitpunkt 3 (n = 21), die die entsprechenden Präparate erhalten haben bzw. die entsprechenden Charakteristika aufweisen und HLA-AK haben oder nicht. Angabe des P-Werts und der Signifikanz des zweiseitigen Fisher-Yates-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95 %. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; EKs = Erythrozytenkonzentrate.

	HLA-AK	Keine HLA-AK	P-Wert	Signifikanz
EKs	3	17	0,19	nein
Keine EKs	1	0		
Bestrahlt	1	10	0,31	nein
Nicht bestrahlt	3	7		
Hämatologische Erkrankung	4	16	1,00	nein
Andere Erkrankung	0	1		
Männer	3	9	0,60	nein
Frauen	1	8		

Zum Untersuchungszeitpunkt 3 hatte die Schwangerschaftsanamnese keinen signifikanten Einfluss auf die HLA-AK-Rate.

3.6 Risikofaktoren und HLA-AK im gesamten Zeitraum

In diesem Abschnitt wird der gesamte Beobachtungszeitraum ausgewertet. Patienten bei denen zu irgendeinem Zeitpunkt HLA-AK nachgewiesen wurden gelten als positiv. Die Ergebnisse der HLA-AK-Testung werden mit den Risikofaktoren korreliert.

Durchschnittlich wurden den Patienten bis zur 3. Probe 11,9 EKs (SD 14,8), 10,9 Pool-TKs (SD 18,4) und 1,7 HLA-kompatible TKs (SD 6,8) transfundiert. Sie erhielten demnach median 7 EKs und 4 Pool-TKs (siehe Abbildung 43).

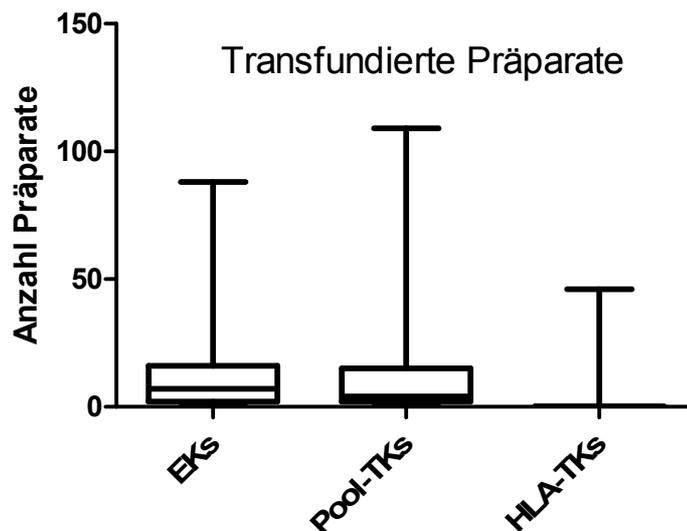


Abbildung 43: Transfundierte Präparate: Boxplot über die Anzahl der verschiedenen Präparate, die den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) verabreicht wurden. EKs = Erythrozytenkonzentrate; TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate.

Gesamt-Antikörper:

Die Abbildungen 44 und 45 legen dar, bei welchem Anteil der Patienten zu irgendeinem Zeitpunkt HLA-AK gefunden wurden. In Abbildung 44 fließen die Ergebnisse beider Tests (LCT und ELISA) in die Auswertung ein, während in Abbildung 45 nur der ELISA berücksichtigt wurde.

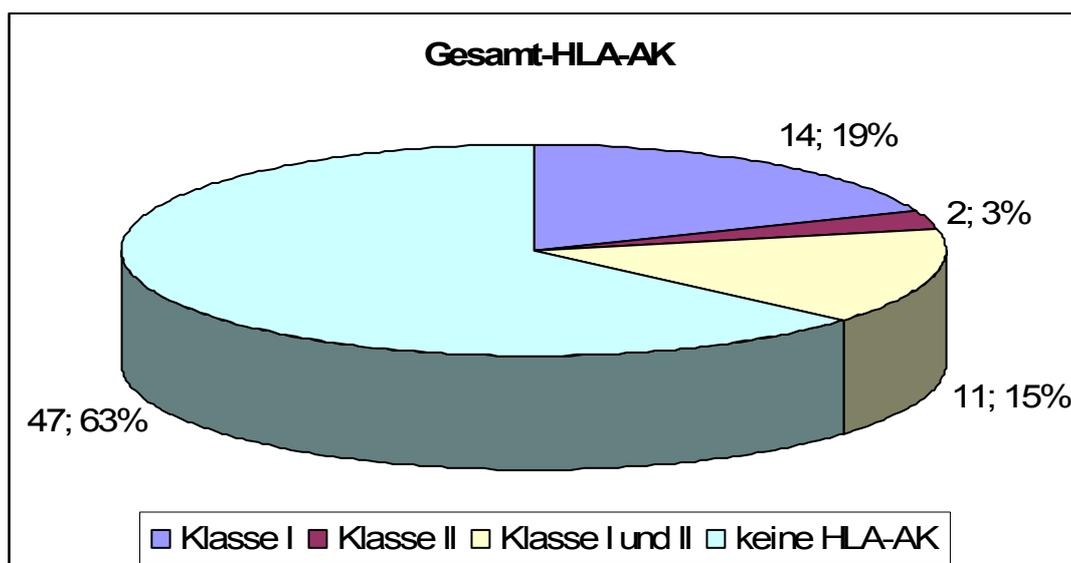


Abbildung 44: Gesamt-HLA-AK: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit HLA-AK gegen Klasse I und/oder II bzw. ohne HLA-AK in LCT und ELISA. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; LCT = Lymphozytotoxizitätstest.

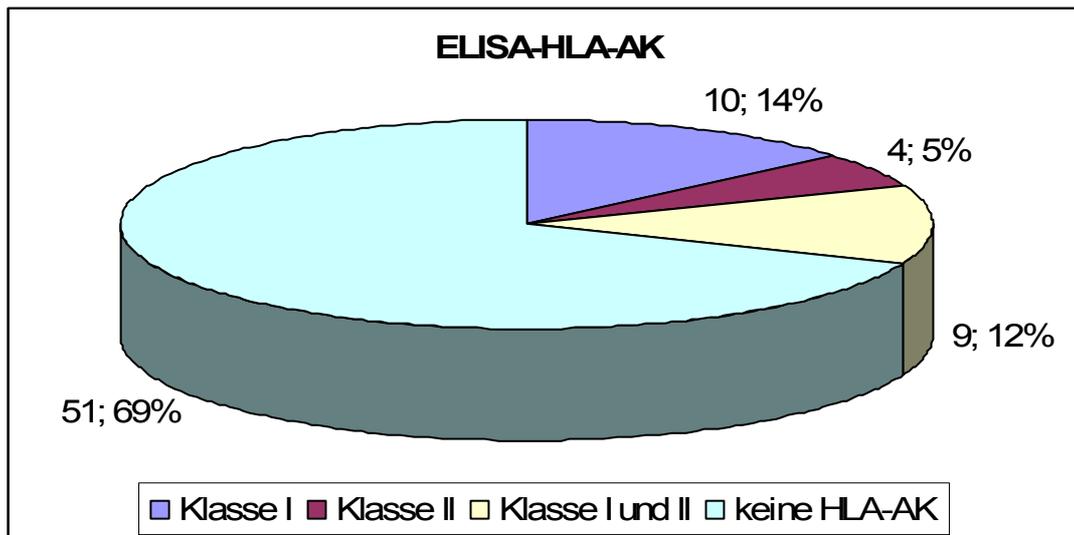


Abbildung 45: ELISA-HLA-AK: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit HLA-AK gegen Klasse I und/oder II bzw. ohne HLA-AK im ELISA. ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Präparateversorgung:

Zum Zeitpunkt der ersten Probenabnahme erhielten 73 Patienten Pool-TKs und eine Patientin HLA-kompatible Konzentrate. Im Verlauf des Beobachtungszeitraums änderte sich dieses Bild, da nun 9 Patienten mit HLA-kompatiblen Präparaten versorgt wurden (siehe Abbildung 46). Zwischenzeitlich wurden auch fünf andere Patienten mit HLA-TKs versorgt, jedoch konnte bei diesen wieder auf normale TKs umgestellt werden. In 63 Fällen wurden zusätzlich EKs transfundiert.

Zum Ende der Untersuchungszeit wurden demnach signifikant mehr Teilnehmer mit HLA-TKs versorgt als am Beginn (P-Wert 0,02; Konfidenzintervall 95 %).

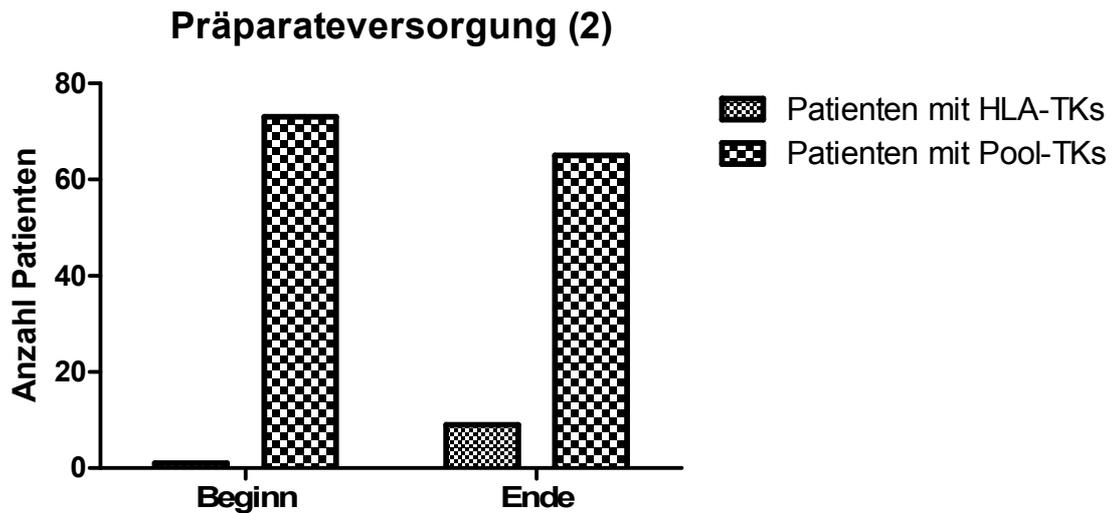


Abbildung 46: Präparateversorgung (2): Absolute Anzahl der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) die am Anfang bzw. Ende des Beobachtungszeitraums mit HLA-TKs bzw. Pool-TKs versorgt wurden. Beginn = Beginn des Beobachtungszeitraum; Ende = Ende des Beobachtungszeitraum; TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate.

Demnach wurden im Laufe des Beobachtungszeitraums zwischenzeitlich 14 Patienten mit HLA-kompatiblen TKs versorgt, bei 11 von Ihnen konnten HLA-AK nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Anteil von 79 % (11/14). Im Gegensatz dazu wurden 28 % (17/60) der Patienten mit normalen TKs positiv auf HLA-AK getestet (siehe Abbildung 47).

Demnach ist die Rate an HLA-AK bei den Patienten mit HLA-kompatibler Versorgung signifikant erhöht (P-Wert 0,001; Konfidenzintervall 95 %).

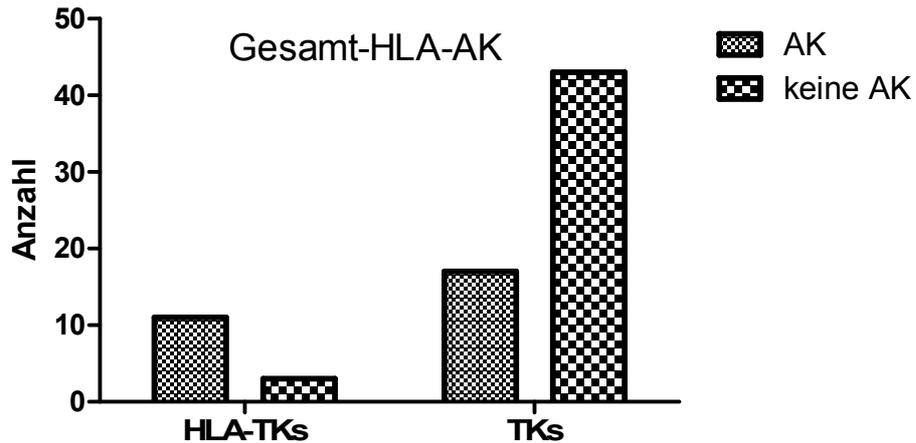


Abbildung 47: HLA-TKs und HLA-AK: Absolute Anzahl der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit bzw. ohne HLA-AK bei den Patienten die mit HLA-TKs bzw. normalen Pool-TKs versorgt wurden. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate.

Dabei wurden bei 11 Patienten HLA-AK gegen Klasse I nachgewiesen, 5 davon trugen zusätzlich AK gegen Klasse II. In keinem Fall wurden nur AK gegen Klasse II festgestellt. Damit wurden bei 79 % (11/14) der HLA-kompatibel versorgten Patienten HLA-AK gegen Klasse I nachgewiesen. Demnach tragen sie signifikant (P-Wert 0,0003, Konfidenzintervall 95 %) mehr HLA-I-AK als die nicht-kompatibel versorgten Patienten (siehe Abbildung 48).

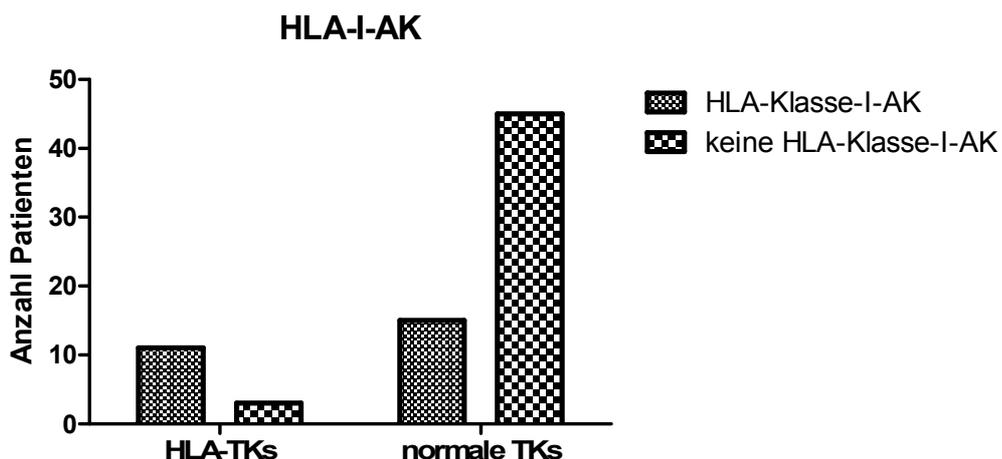


Abbildung 48: HLA-TKs und HLA-AK gegen Klasse I: Absolute Anzahl der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit bzw. ohne HLA-AK gegen Klasse I bei den Patienten die mit HLA-TKs bzw. normalen Pool-TKs versorgt wurden. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-TKs = Human-Leucocyte-Antigen-kompatible Thrombozytenkonzentrate.

Die Risikofaktoren der Patienten und ihr Einfluss auf die Bildung von HLA-AK wurden auch auf den Gesamtzeitraum betrachtet. Jeder Patient mit mindestens einmaligem Nachweis von HLA-AK im Verlauf gilt dabei als positiv. Diese Ergebnisse wurden mit den entsprechenden Risikofaktoren verglichen, wobei sich keine signifikante Beeinflussung der HLA-AK-Bildung zeigte (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Risikofaktoren und HLA-AK im gesamten Beobachtungszeitraum: Absolute Anzahl der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74), die die entsprechenden Präparate erhalten haben bzw. die entsprechenden Charakteristika aufweisen und HLA-AK haben oder nicht. Angabe des P-Werts und der Signifikanz des zweiseitigen Fisher-Yates-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95 %. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; EKs = Erythrozytenkonzentrate.

	HLA-AK	Keine HLA-AK	P-Wert	Signifikanz
EKs	25	38	0,52	nein
Keine EKs	3	8		
Bestrahlt	17	23	0,47	nein
Nicht bestrahlt	11	23		
Hämatologische Erkrankung	27	38	0,14	nein
Andere Erkrankung	1	8		
Männer	13	28	0,24	nein
Frauen	15	18		

Tabelle 10 gibt an, bei wie viel Prozent der Patienten mit dem entsprechenden Merkmal in irgendeiner Probe HLA-AK nachgewiesen werden konnten und mit welcher Anzahl an Präparaten sie median versorgt wurden.

Tabelle 10: Risikofaktoren, HLA-AK-Rate und mediane Transfusionszahl im gesamten Zeitraum: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) mit dem entsprechenden Merkmal bei denen in mindestens einer Probe HLA-AK gefunden wurden. Spalte 3 und 4: Anzahl der median transfundierten EKs und TKs in den entsprechenden Gruppen. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; EKs = Erythrozytenkonzentrate; Median TKs = Median transfundierter Thrombozytenkonzentrate; Median EKs = Median transfundierter Erythrozytenkonzentrate.

	Patienten mit HLA-AK	Median EKs	Median TKs
EKs erhalten	40 % (25/63)	10	8
Keine EKs erhalten	27 % (3/11)	0	2
Bestrahlte Präparate erhalten	43 % (17/40)	6	5,5
Nicht-bestrahlte Präparate erhalten	32 % /11/34)	8	5
Hämatologische Erkrankung	42 % (27/65)	8	6
Andere Erkrankung	11 % (1/9)	6	6
Männer	32 % (13/41)	9,5	8
Frauen	45 % (15/33)	5	4

Insgesamt zeigen sich keine signifikanten Einflüsse von Geschlecht (siehe Tabelle 9) oder Schwangerschaftsanamnese (siehe Tabelle 11) auf die Bildung von HLA-AK.

Tabelle 11: Schwangerschaftsanamnese und HLA-AK-Bildung: Absoluter und prozentualer Anteil der ausgewerteten Frauen aus der Transfusionsambulanz (n = 33) mit der entsprechenden Schwangerschaftsanamnese bei denen HLA-AK nachgewiesen wurden oder nicht. Spalte 3 und 4: Anzahl der median transfundierten EKs und TKs in den entsprechenden Gruppen.. HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper; Schw. = Frauen mit positiver Schwangerschaftsanamnese; Keine Schw. = Frauen mit negativer Schwangerschaftsanamnese; ? = Frauen mit unbekannter Schwangerschaftsanamnese; Median TKs = Median transfundierter Thrombozytenkonzentrate; Median EKs = Median transfundierter Erythrozytenkonzentrate.

	Patienten mit HLA-AK	Median EKs	Median TKs
Schw.	39 % (7/18)	4,5	4
Keine Schw.	44 % (4/9)	4	5
?	67 % (4/6)	10,5	4

Transfusionshäufigkeit:

Den Patienten mit nachgewiesenen Antikörpern wurden bis zu ihrer ersten positiven Probe (Nachweis von HLA-AK in der ersten Probe oder Neubildung von HLA-AK im Verlauf) median 2 EKs und 1 TK (siehe Abbildung 49) transfundiert. Insgesamt bekamen sie während der gesamten Studie median 5 EKs und 6,5 TKs. Im Gegensatz dazu erhielten Patienten ohne HLA-AK bis zu ihrer letzten (negativen) Probe im Median 8 EKs und 5 TKs (siehe Abbildung 49).

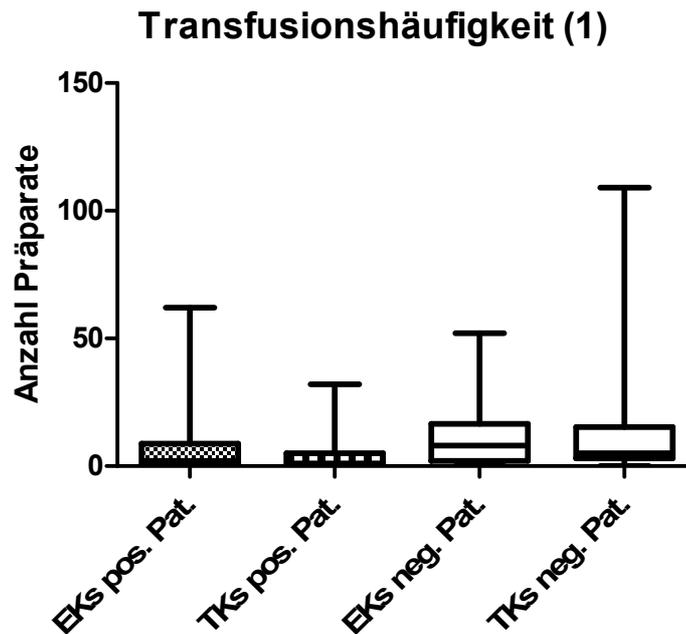


Abbildung 49: Transfusionshäufigkeit (1): Boxplot über die Anzahl der Präparate, die den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz (n = 74) verabreicht wurden: Bei positiven Patienten (n = 28) bis zum ersten positiven HLA-AK-Nachweis. Bei negativen Patienten (n = 46) bis zum Ende des Beobachtungszeitraums EKs pos. Pat. = Erythrozytenkonzentrate der positiven Patienten; TKs pos. Pat. = Thrombozytenkonzentrate der positiven Patienten; EKs neg. Pat. = Erythrozytenkonzentrate der negativen Patienten; TKs neg. Pat. = Thrombozytenkonzentrate der negativen Patienten; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Um einen Einfluss durch Schwangerschaften auszuschließen wurden die gleichen Berechnungen unter Ausschluss aller Patientinnen mit Schwangerschaftsanamnese durchgeführt. Auch hier zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die positiven Patienten erhielten bis zur ersten positiven Probe median 4 EKs und 1 TKs, während negative Patienten mit 8 EKs und 4 TKs transfundiert wurden (siehe Abbildung 50).

Transfusionshäufigkeit (2)

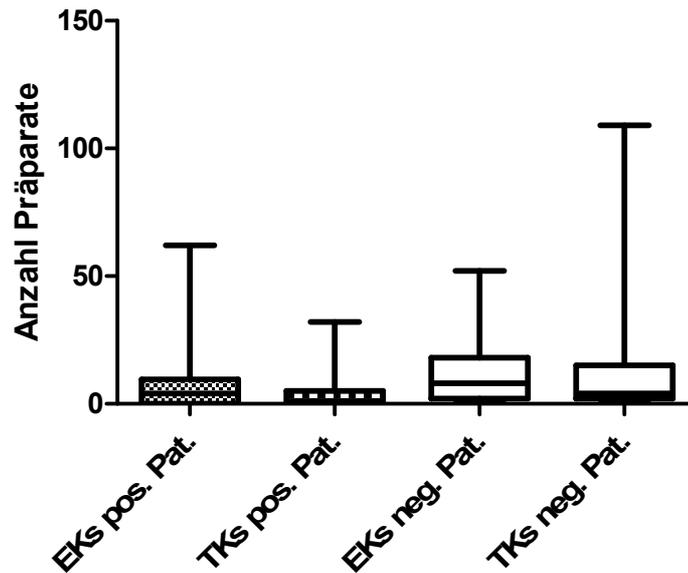


Abbildung 50: Transfusionshäufigkeit (2): Boxplot über die Anzahl der Präparate, die den ausgewerteten Patienten (unter Ausschluss der Patientinnen mit Schwangerschaftsanamnese) aus der Transfusionsambulanz (n = 56) verabreicht wurden: Bei positiven Patienten (n = 21) bis zum ersten positiven HLA-AK-Nachweis. Bei negativen Patienten (n = 35) bis zum Ende des Beobachtungszeitraums EKs pos. Pat. = Erythrozytenkonzentrate der positiven Patienten; TKs pos. Pat. = Thrombozytenkonzentrate der positiven Patienten; EKs neg. Pat. = Erythrozytenkonzentrate der negativen Patienten; TKs neg. Pat. = Thrombozytenkonzentrate der negativen Patienten; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Im dritten Schritt wurden alle weiteren eventuellen Schwangerschaftseinflüsse eliminiert, indem auch Patientinnen mit unbekannter Schwangerschaftsanamnese ausgeschlossen wurden. Demnach wurden in dieser Berechnung nur noch Männer und Frauen ohne Schwangerschaften berücksichtigt. Auch durch diese Maßnahme änderte sich das Bild kaum. Positive Patienten erhielten median 6 EKs und 2 TKs bis zur ersten positiven Probe. Negative Patienten wurden bis zum Ende des Beobachtungszeitraums mit median 8 EKs und 4 TKs transfundiert (siehe Abbildung 51).

Transfusionshäufigkeit (3)

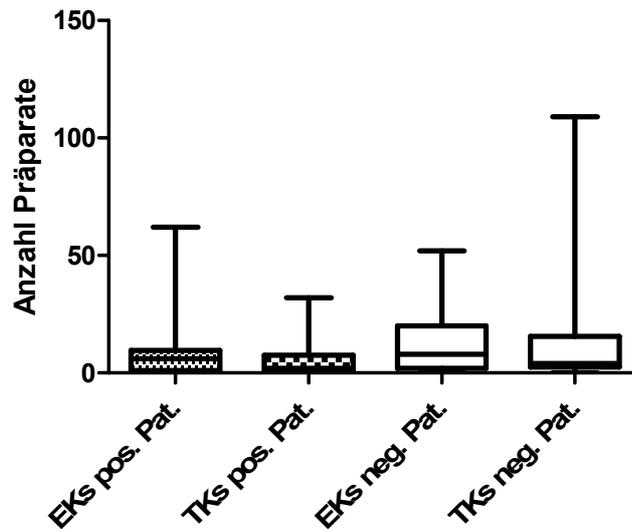


Abbildung 51: Transfusionshäufigkeit (3): Boxplot über die Anzahl der Präparate, die den ausgewerteten Männern und Frauen mit negativer Schwangerschaftsanamnese (n = 50) verabreicht wurden: Bei positiven Patienten (n = 17) bis zum ersten positiven HLA-AK-Nachweis. Bei negativen Patienten (n = 33) bis zum Ende des Beobachtungszeitraums EKs pos. Pat. = Erythrozytenkonzentrate der positiven Patienten; TKs pos. Pat. = Thrombozytenkonzentrate der positiven Patienten; EKs neg. Pat. = Erythrozytenkonzentrate der negativen Patienten; TKs neg. Pat. = Thrombozytenkonzentrate der negativen Patienten; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Entwicklung:

Der Anteil AK-positiver Patienten stieg von der 1. Probe zur 2. Probe von 31 % (23/74) auf 42 % (20/48) um bis zur 3. Probe wieder auf 19 % (4/21) zu fallen. Keine dieser Veränderung war dabei signifikant.

Tabelle 12: Veränderung der Testergebnisse: Veränderungen der Ergebnisse in LCT (n = 48) und/oder ELISA (n = 46) im Verlauf von der ersten zur letzten Probe. ▲ = neuer spezifischer Antikörper oder gestiegene Anzahl an positiven Panels im LCT; Erhöhung des Score im ELISA; ▼ = Verlust eines spezifischen Antikörpers oder gesunkene Anzahl an positiven Panels im LCT; Erniedrigung des Score im ELISA; ► positiv = LCT/ELISA in allen Proben auf gleichem Niveau positiv; ► negativ = LCT/ELISA in allen Proben negativ. Patienten, die in Probe 2 positiv und in Probe 3 wieder negativ waren, wurden unter ► negativ eingeordnet; ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay; LCT = Lymphozytotoxizitätstest.

	▲	▼	► positiv	► negativ
LCT	8	5	0	35
ELISA Klasse I	3	8	3	32
ELISA Klasse II	4	4	0	38

Zwischen der ersten und der letzten Probenabnahme entwickelten sich in 5 Fällen neue spezifische Antikörper im LCT. 3 initial spezifisch positive Patienten waren am Ende polyspezifisch.

Im ELISA zeigten sich eher fallende Scores beim Test auf AK gegen Klasse I, während sich bei Klasse II Anstieg und Abfall die Waage hielten (siehe Tabelle 12).

Tabelle 13: Veränderung der Gesamtantikörper: Entwicklung der Antikörper bei Betrachtung aller Testergebnisse. ▲ = stärkere Reaktionen in Folgeproben; ▼ = schwächere Reaktionen in Folgeproben; ► positiv = gleich bleibend positive Ergebnisse in Folgeproben; ► negativ = gleich bleibend negative Ergebnisse in Folgeproben. Patienten, die in Probe 2 positiv und in Probe 3 wieder negativ waren, wurden unter ► negativ eingeordnet.

	▲	▼	► positiv	► negativ
Gesamt	5	8	8	27

Die Patienten mit Folgeproben kann man in 5 Gruppen unterteilen:

Gruppe 1: Patienten bei denen alle Proben negativ waren (n = 23)

Gruppe 2: Patienten bei denen alle Proben positiv waren (n = 13)

Gruppe 3: Anfangs positive Patienten die negativ wurden (n = 7)

Gruppe 4: Anfangs negative Patienten die positiv wurden (n = 1)

Gruppe 5: Negative Patienten die positiv und dann wieder negativ wurden (n = 4)

Tabelle 14 gibt die Patientencharakteristika der verschiedenen Gruppen wieder:

Tabelle 14: Patientencharakteristika der Patienten mit Folgeproben: Anzahl der Patienten in den 5 verschiedenen Gruppen der ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz mit Folgeproben (n = 48). Prozentualer Anteil der Patienten mit den entsprechenden Charakteristika in den verschiedenen Gruppen. Gruppe 1: Patienten bei denen alle Proben negativ waren (n = 23); Gruppe 2: Patienten bei denen alle Proben positiv waren (n = 13); Gruppe 3: Anfangs positive Patienten die negativ wurden (n = 7); Gruppe 4: Anfangs negative Patienten die positiv wurden (n = 1); Gruppe 5: Anfangs negative Patienten die positiv und dann wieder negativ wurden (n = 4)

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Anzahl Patienten	23	13	7	1	4
Erythrozyten-transfusionen	96 %	85 %	100 %	100 %	100 %
Hämatologische Erkrankung	83 %	92 %	100 %	100 %	100 %
Vortransfusionen	78 %	62 %	100 %	0 %	75 %
Bestrahlung	43 %	46 %	57 %	100 %	75 %

Den Patienten mit nur negativen Proben (**Gruppe 1**; n = 23) wurden median im Beobachtungszeitraum 12 EKs und 10 TKs transfundiert (siehe Abbildung 52), der Anteil an Frauen mit Schwangerschaften lag bei 22 % (5/23).

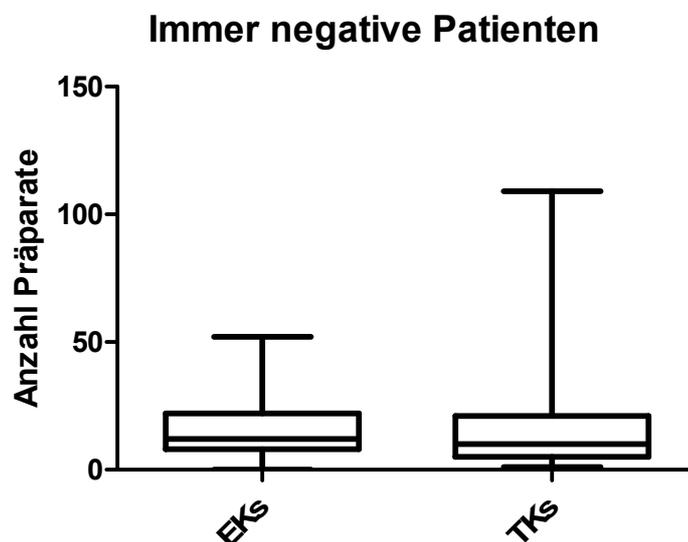


Abbildung 52: Immer negative Patienten: Boxplot über die Anzahl der transfundierten Präparate bei den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz, bei denen alle Proben negativ waren (n = 23). EKs = Erythrozytenkonzentrate; TKs = Thrombozytenkonzentrate.

Die 13 Patienten mit nur positiven Proben (**Gruppe 2**) erhielten median 3 EKs und 9 TKs (siehe Abbildung 53). Hier lag der Anteil der Frauen mit Schwangerschaftsanamnese bei 38 % (5/13).

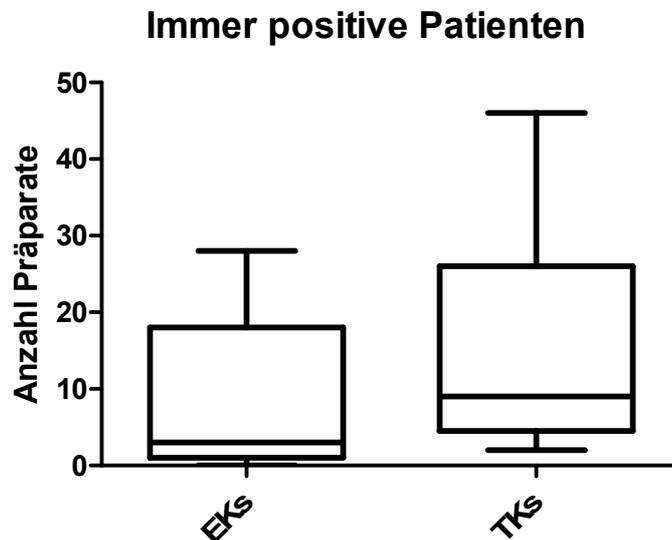


Abbildung 53: Immer positive Patienten: Boxplot über die Anzahl der transfundierten Präparate bei den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz, bei denen alle Proben positiv waren (n = 13). EKs = Erythrozytenkonzentrate; TKs = Thrombozytenkonzentrate.

Sieben anfangs positive Patienten wurden im Verlauf negativ (**Gruppe 3**), sie hatten median 19 EKs und 12 TKs erhalten (siehe Abbildung 54). In dieser Gruppe gab es keine Patientin mit positiver Schwangerschaftsanamnese.

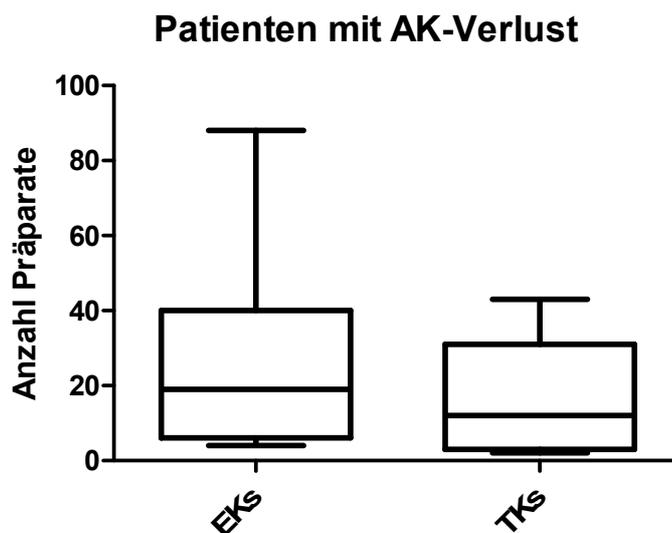


Abbildung 54: Patienten mit HLA-AK-Verlust: Boxplot über die Anzahl der transfundierten Präparate bei den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz, die zunächst positiv und in den Folgeproben negativ waren (n = 7). EKs = Erythrozytenkonzentrate; TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

Ein Patient (**Gruppe 4**) war anfangs negativ und wurde im Verlauf positiv getestet. Ihm waren 12 EKs und 17 TKs transfundiert worden.

Insgesamt gab es vier anfangs negative Patienten die in der zweiten Probe positiv und in der dritten Probe wieder negativ wurden (**Gruppe 5**). Diesen Patienten wurden median 10,5 EKs und 15,5 TKs transfundiert (siehe Abbildung 55).

Bei 25 % (1/4) konnten vergangene Schwangerschaften festgestellt werden.

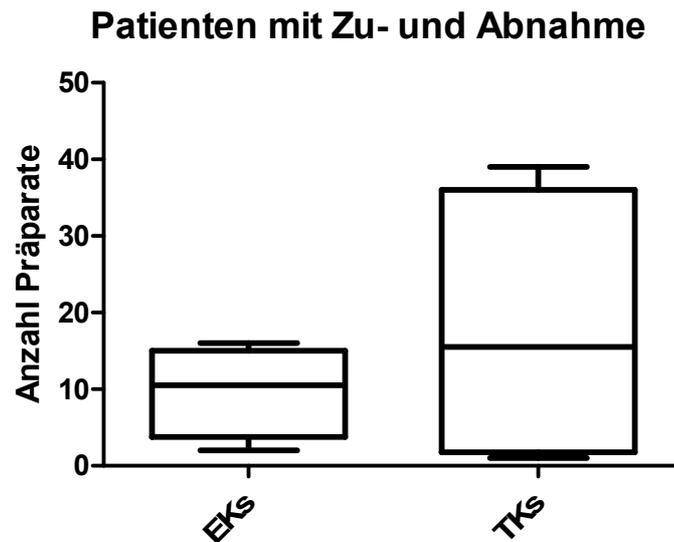


Abbildung 55: Patienten mit Zu- und Abnahme: Boxplot über die Anzahl der transfundierten Präparate bei den ausgewerteten Patienten aus der Transfusionsambulanz mit Zu- und Abnahme der HLA-AK (n = 4). Diese Patienten waren zunächst negativ, wurden in der zweiten Probe positiv und in der dritten Probe wieder negativ. EKs = Erythrozytenkonzentrate; TKs = Thrombozytenkonzentrate; HLA-AK = Human-Leucocyte-Antigen-Antikörper.

4 Diskussion

4.1 Patientencharakteristika, Transfusionen, Testmethoden

Alter:

Das mediane Alter der Patienten ist mit 59 Jahren nicht verwunderlich, da die meisten an Krankheiten mit Erkrankungsgipfeln im höheren Lebensalter leiden. Beispielsweise treten die meisten Leukämien, das Myelodysplastische Syndrom, das Multiple Myelom sowie Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome bevorzugt im höheren Alter auf (Herold et al. 2009). Deshalb überrascht es nicht, dass ein großer Teil der Erkrankten (48 %) älter als 60 Jahre ist.

Gewicht und BMI:

Der BMI der Patienten ist mit einem unteren Quartil von $21,55 \text{ kg/m}^2$ und einem Median von $23,9 \text{ kg/m}^2$ sehr gut. Demnach sind über 75 % der Patienten laut der Definition des BMI normalgewichtig oder übergewichtig. Dies kann als Zeichen für eine gute supportive Therapie der Patienten mit Medikamenten und Blutkomponenten gesehen werden. Trotz der zumeist sehr schweren Erkrankungen ist der größte Teil der Patienten nicht untergewichtig oder gar kachektisch.

Blutgruppen:

Die Blutgruppen verteilen sich in einem ähnlichen Verhältnis auf die Patienten unserer Untersuchung wie in der deutschen Bevölkerung üblich. Einen genauen Vergleich liefert Tabelle 15.

Tabelle 15: Vergleich der Blutgruppenhäufigkeit: Prozentualer Anteil der Patienten bzw. der deutschen Bevölkerung (DRK-Blutspendedienst West 2010) mit der entsprechenden Blutgruppe. 0 = Blutgruppe 0; A = Blutgruppe A; B = Blutgruppe B; AB = Blutgruppe AB.

	0	A	B	AB
Patienten	40 %	42 %	12 %	5 %
Deutsche Bevölkerung	41 %	43 %	11%	5 %

Auch der Anteil Rhesus-positiver Patienten liegt mit 81 % in der Nähe des bundesdeutschen Durchschnitts von 85 % (DRK-Blutspendedienst West 2010).

Was die Verteilung von Blutgruppen und Rhesusfaktor angeht, stellen unsere Patienten demnach eine repräsentative Stichprobe der deutschen Bevölkerung dar.

Probenabgabe:

Auffällig ist, dass viele Patienten nur eine oder zwei Blutproben abgegeben haben. Leider liegt dies zum Teil an der sehr hohen Sterberate der beteiligten Patienten. Viele der Patienten leiden bzw. litten an sehr ernsten Erkrankungen, was in vielen Fällen (n = 15) zu einem Ableben vor dem Ende des Beobachtungszeitraums führte. Andere Patienten waren nach der ersten Probenabgabe nur noch kurze Zeit auf Transfusionen angewiesen. Das Blutbild dieser Patienten stabilisierte sich derart, dass sie keine weiteren Termine in der Transfusionsambulanz benötigten. Dies kann sich z.B. nach einer Knochenmarktransplantation oder dem Ende einer ablativen Chemotherapie ergeben.

Diagnosen:

Der hohe Anteil hämatologischer Erkrankungen unter den Patienten zeigt, dass besonders diese für ihr Überleben auf Thrombozytentransfusionen angewiesen sind. Die Träger solider Tumoren benötigen die unterstützende Behandlung wegen ihrer Chemotherapie und der damit verbundenen Thrombozytopenie. Interessant wird sein, ob die Erkrankungen auch einen Einfluss auf die Bildung von AK haben.

Vortransfusionen:

Leider hatte der größte Teil der rekrutierten Patienten bereits vor der ersten Probenentnahme Blutkomponenten erhalten. Dadurch wird es schwieriger abzuschätzen, in welchem Maß Bluttransfusionen für eine HLA-Alloimmunisierung verantwortlich sind. Allerdings muss erwähnt werden, dass auch in der TRAP-Studie nur 12 % der Patienten keine Risikoanamnese (Transfusionen oder Schwangerschaften) hatten (The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997).

Transfusionen:

Die Transfusionen bei der Abnahme der ersten Probe wurden bei einer medianen Thrombozytenzahl von 17000 pro μl Blut durchgeführt. Die Patienten wurden demnach bei einem höheren Wert transfundiert, als in den deutschen Leitlinien vorgesehen (Ebell et al. 2009). Ein Grund für diese frühzeitigen Transfusionen sind Blutungszeichen, die bei einigen Patienten schon bei Thrombozytenzahlen auftraten, die weit über der Grenze für prophylaktische Transfusionen (5000 Thrombozyten pro μl Blut) liegen. Auch das ambulante Setting erfordert teils frühere Transfusionen, um beispielsweise eine ausreichende Hämostase über das Wochenende zu garantieren. Im Falle der Patientin, die mit 124000 Plättchen pro μl Blut nur wenig unter dem Normwert lag, gab es jedoch einen anderen Grund für die Transfusion. Sie litt an einer Thrombozytopathie und sollte mit funktionsfähigen Spenderthrombozyten auf eine anstehende Operation vorbereitet werden. Transfusionen bei Blutungszeichen haben mit 35 % einen großen Anteil an den insgesamt verabreichten TKs. Dies zeigt erneut, dass viele Patienten schon mit Blutungszeichen auf ihre Thrombozytopenie reagieren, bevor die Leitliniengrenze für prophylaktische Transfusionen erreicht ist.

Der Median des Thrombozytenanstiegs nach erfolgter Transfusion betrug 30000 pro μl Blut (Mittelwert 28430) bei der Transfusion eines TK und 37000 bei 2 TKs (Mittelwert 38630). Dies entspricht einem CCI von über 13000. Damit liegt der Anstieg bei den meisten Patienten deutlich über dem Wert (5000), der in den großen Studien als Grenze für den Refraktärzustand gilt (The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997). In vielen Publikationen wird ein CCI von über 10000 als adäquat angesehen (Rebulla 2002). CCIs von unter 5000 bei zwei einander folgenden Transfusionen, werden oft als Definition des Refraktärzustandes verwendet (The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997; Rebulla 2002). Da auch das untere Quartil mit 9109 deutlich über dieser Grenze liegt, kann der größte Teil der durchgeführten Transfusionen als erfolgreich angesehen werden. Mit einem Mittelwert von 14338 liegt das CCI in ähnlichen Bereichen wie in der TRAP-Studie, hier betrug es für Pool-TKs 12700 und für Apherese-TKs 14700 (The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997). Unterteilt man die Patienten in Träger von HLA-AK und nicht-immunisierte Patienten, zeigt sich eine Auswirkung der HLA-AK auf das CCI der

Transfusionen. Bei Patienten mit positivem Test in der 1. Probe zeigte sich bei der Transfusion am Tag der Probenabnahme ein medianes CCI von 10800. Patienten ohne HLA-AK hatten hingegen mit median über 14500 ein deutlich höheres CCI. Zu diesem Zeitpunkt wurden mit einer Ausnahme alle Patienten mit Pool-TKs versorgt. Die Daten zeigen demnach, dass Patienten mit HLA-AK schlechter auf eine Transfusion mit Pool-TKs reagieren als Patienten ohne HLA-AK. Dieses Ergebnis wird auch durch andere Arbeiten bestätigt (Slichter et al. 2005). HLA-AK können demnach ein ausreichendes Ansprechen der Patienten auf Thrombozytentransfusionen gefährden und im schlimmsten Fall dafür sorgen, dass auf eine Versorgung mit HLA-kompatiblen TKs umgestellt werden muss. In der Untersuchung wurde nicht ausgewertet, wie lange die TKs vor den Transfusionen gelagert wurden. Es wurde jedoch gezeigt, dass man mit Präparaten, die maximal 48 Stunden gelagert wurden, bessere Thrombozytenanstiege erzielen kann (Slichter et al. 2005). Bei Lagerung über 4 Tagen waren diese in der Praxis bereits signifikant erniedrigt (Novotny et al. 1992). Nach über 5 Tagen Lagerung kann man auch in vitro eine Abnahme der Thrombozytenqualität beobachten (Bessos et al. 1996). Somit stellt das Alter der TKs ein Störfaktor in der Auswertung dar. Durch Zufall könnten gerade bei den Patienten mit HLA-AK Präparate verwendet worden sein, die bereits längere Zeit gelagert wurden. In unserer Studie wird der CCI zur Beurteilung des Transfusionserfolges verwendet, auch wenn er in anderen Arbeiten abgelehnt wird. In einer dieser Publikationen wird z.B. bemängelt, dass die Herstellung der TKs, das Volumen der einzelnen Präparate und andere beeinflussende Faktoren (Veränderungen der Milz, Infekte, usw.) im CCI nicht berücksichtigt werden (Davis et al. 1999). In Einzelfällen konnte man einen extrem geringen Anstieg bzw. teilweise sogar einen Abfall der Thrombozyten feststellen. Diese Werte sind mit einem immunologischen oder nicht-immunologischen Refraktärzustand gegenüber den TKs zu erklären, wobei laut Fachliteratur Letztere überwiegen (Doughty et al. 1994; Murphy, Waters 1990; Legler et al. 1997; siehe auch Kapitel 4.3 - HLA-kompatible TKs). Durch die TKs (und eventuell zusätzlich transfundierte EKs) kommt es zu einer Verdünnung des Blutes, was in einigen Fällen zu einem negativen Increment (Abfall der Plättchen im Blutbild) führte.

Testmethoden:

Die beiden verschiedenen Tests weisen jeweils einige Vor- und Nachteile auf. Durch den LCT gelingt oftmals die Ermittlung von Spezifitäten, was für die weitere Versorgung der Patienten von großer Bedeutung ist. Leider kann man durch den LCT jedoch nur sehr eingeschränkt eine Aussage über die Konzentration der gebildeten HLA-AK im Blut machen, da durch verschiedene Panelzusammensetzung die Repräsentation einzelner Merkmale variiert (siehe auch Kapitel 4.3 - HLA-AK im Verlauf). Wie auch in der Literatur beschrieben, ist besonders für die Beurteilung unter dem Mikroskop und dem anschließenden Bestimmen der Spezifitäten ein hoher Aufwand von geschultem Personal vonnöten (Stroncek et al. 2007). Jede Patientenprobe muss auf einer eigenen Platte angesetzt werden, wodurch jeweils die entsprechenden Inkubationszeiten anfallen. Durch diesen zeitlichen und personellen Aufwand ist der LCT zum Screening einer größeren Anzahl an Proben kaum geeignet. Beim ELISA der Firma Biotest können viele Proben gleichzeitig getestet und somit Inkubationszeiten gespart werden. Daraus resultieren ein geringerer personeller Aufwand sowie ein geringerer Verbrauch an Positiv- bzw. Negativkontrollen. Diese Punkte machen den ELISA zu einem schnellen Test, der v. a. für das Screening geeignet ist. Vorteil des ELISA ist der mögliche Nachweis von Antikörpern gegen HLA-Antigene der Klasse II sowie komplementunabhängiger Antikörper gegen Klasse I. Monien und Kollegen zeigten, dass im LCT negative Proben teilweise im ELISA positiv sind. Für den AbScreen der Firma Biotest errechneten sie eine Sensitivität von 76,5 % für Klasse I und 88,3 % für Klasse II. Die Spezifität lag bei 96,8 % bzw. 95,5 % (Monien et al. 2006). Die Firma Biotest gibt in ihren Anleitungen für Klasse I eine Spezifität von 87,6 % und eine Sensitivität von 97,5 % an, für Klasse II eine Spezifität von 97,8 % und eine Sensitivität von 97,2 %. De Capei und Kollegen sehen es jedoch als Nachteil, dass moderne ELISA-Testmethoden keine IgM-Antikörper nachweisen können und deutlich teurer sind als der herkömmliche LCT (Uboldi de Capei et al. 2002). Hier wurden jedoch nur die Kosten für die Testplatten und weniger der personelle Aufwand berücksichtigt. Leider kann man mit dem ELISA jedoch keine HLA-AK-Spezifitäten bestimmen, um passende Präparate für den HLA-AK-positiven Patienten zu finden. Im IKT Ulm wird deshalb der ELISA zum Screening und der LCT zur weiteren Analyse positiver Patienten verwendet. Dies deckt sich mit den Empfehlungen in der

Literatur (Stroncek et al. 2007). Die höhere Sensitivität des ELISA im Vergleich zum LCT ist ein weiterer Grund, weshalb er als Screeningtest geeigneter ist (Levin et al. 2003; Monien et al. 2006).

Antikörper gegen HLA-Klasse-I

Die geringere Anzahl positiver Seren im LCT im Vergleich zum ELISA kann mehrere Gründe haben. Wie bereits erwähnt, hat der ELISA eine höhere Sensitivität als der LCT (Levin et al. 2003; Monien et al. 2006). Es kann jedoch auch daran liegen, dass sie teilweise verschiedene HLA-AK detektieren. Der LCT weist lediglich komplementabhängige HLA-AK nach, während im ELISA auch komplementunabhängige HLA-AK zu einer positiven Reaktion führen können. Andererseits können im LCT IgM-AK bestimmt werden, welche vom ELISA der Firma Biotest nicht erfasst werden.

Antikörper gegen Klasse-II:

Insgesamt fanden sich in weniger Proben HLA-AK gegen Klasse II, die außerdem zumeist im ELISA einen geringen Score hatten (siehe Kapitel 4.3).

Spezifitäten:

In der Literatur findet man HLA-AK gehäuft gegen HLA-A-Antigene (Laundy et al. 2004, Zimmermann et al. 1999). In unseren Resultaten bestätigt sich dieses Ergebnis, jedoch finden sich in den Proben nur wenig mehr spezifische HLA-AK gegen Antigene des A-Locus als gegen den B-Locus (27 zu 21). Ebenso wie bei Sanz und Kollegen zeigte sich eine Häufung an HLA-AK gegen HLA-A2 (Sanz et al. 2001). Dies könnte daran liegen, dass HLA-A2 das in der weißen Bevölkerung mit der höchsten Frequenz vorkommende HLA-Merkmal ist (Kiefel 2005). Demnach wäre dieses Merkmal auch in den transfundierten Pool-TKs und bei der Übertragung durch Schwangerschaften am häufigsten vertreten.

4.2 HLA-AK der Kontrollgruppen

Bei den Kontrollgruppen stellt sich ein widersprüchlicher Zusammenhang zwischen Risikoanamnese und tatsächlich gefundenen HLA-AK dar. Bei den männlichen Kontrollgruppen zeigte sich bei den Patienten mit Vortransfusionen

keine erhöhte Rate an HLA-AK. Transfusionen scheinen nach diesen Daten keinen signifikanten Effekt auf die Bildung von HLA-AK zu haben. Dabei konnte allerdings nicht erhoben werden, um welche Art von Blutkomponenten es sich handelte. Diese Erkenntnis deckt sich jedoch mit einigen anderen Publikationen über leukozytendepletierte Transfusionen generell (Triulzi et al. 2009, Kakaiya et al. 2010) bzw. TK-Transfusionen (van Marwijk Kooy et al. 1991). Die Daten aus zahlreichen anderen Arbeiten können nicht mit unseren Ergebnissen verglichen werden, da damals noch Präparate verwendet wurden, die nicht leukozytendepletiert waren. Eine Risikoanamnese mit diesen immunogeneren TKs führte zu einer deutlichen Erhöhung der AK-Rate bei den Teilnehmern dieser Studien (Taaning et al. 1997; Doughty et al. 1994; Friedman et al. 1996).

Bei den Frauen bietet sich ein anderes Bild. So findet man eine signifikante Erhöhung der HLA-AK allgemein und der HLA-AK gegen Klasse I in der Risikogruppe. Die AK gegen Klasse II sind ebenfalls erhöht, jedoch nicht signifikant. Den offensichtlichsten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Gruppen stellt die Immunisierung durch Schwangerschaften dar. Der Grund für die gesteigerte Alloimmunisierung ist demnach wohl in diesem Bereich zu suchen. Damit werden zahlreiche Studien gestützt, die besagen, dass Schwangerschaften einen großen alloimmunisierenden Effekt haben (Triulzi et al. 2009, Denmore et al. 1999, Kakaiya et al. 2010, Maślanka et al. 2007, The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997). Bei Frauen mit doppeltem Risiko (Schwangerschaft und Transfusion) könnte es auch zur Reaktivierung von Schwangerschafts-HLA-AK durch die Transfusionen gekommen sein (Rebibou et al. 2002; Novotny et al. 1995). Auffällig ist die ebenfalls gesteigerte Rate an HLA-Antikörpern in der weiblichen Kontrollgruppe ohne Risiko. Dies ist wohl auf eine unsichere Risikoanamnese zurückzuführen. Wird das Risiko verneint, obwohl keine Anamnese durchgeführt wurde, so ist es nicht unwahrscheinlich, eine Frau mit Schwangerschaften falsch einzuordnen. Die fehlende Signifikanz bei HLA-AK gegen Klasse II könnte aus mehreren Gegebenheiten resultieren. Es könnte daran liegen, dass Thrombozyten nur HLA-Merkmale der Klasse I auf ihrer Oberfläche tragen. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass v. a. die kontaminierenden Leukozyten für eine HLA-AK-Bildung verantwortlich sind und weniger die HLA-Merkmale auf den Thrombozyten selbst (Claas et al. 1981). Gegen diese Theorie spricht auch eine erhöhte Rate an HLA-

AK gegen Klasse II in der Gruppe ohne Risiko. Die fehlende Signifikanz ist demnach nicht durch eine niedrige HLA-AK-Bildung in der Risikogruppe (z.B. durch fehlende Klasse II Merkmale auf Thrombozyten) sondern durch eine erhöhte HLA-AK-Bildung in der Gruppe ohne Risiko bedingt. Während die Rate an HLA-AK gegen Klasse I und II bei der Risikogruppe also ungefähr gleich ist, findet man in der Gruppe ohne Risiko mehr Trägerinnen von HLA-AK gegen Klasse II als gegen Klasse I. Eine falsche Einordnung der Patientinnen in die Nicht-Risiko-Gruppe könnte demnach diese Rate erhöht und dadurch eine fehlende Signifikanz hervorgerufen haben. Die Ergebnisse könnten jedoch auch durch sogenannte „natürliche“ AK verändert worden sein. Für deren Entstehung werden Kreuzreaktionen mit Epitopen auf Mikroorganismen, Proteinen und Allergenen verantwortlich gemacht. Man findet sie auch bei Menschen ohne immunisierendes Ereignis in der Anamnese (Morales-Buenrostro et al. 2008).

Zusammenfassend kann man durch die Ergebnisse der Kontrollgruppen sagen, dass v. a. Schwangerschaften ein Risiko für eine Immunisierung gegen HLA-Merkmale darstellen. Transfusionen hingegen scheinen, wenn überhaupt, nur in Kombination mit Schwangerschaften die Bildung von Antikörpern zu begünstigen. Besonders bei den männlichen Gruppen konnte keine erhöhte HLA-AK-Bildung durch eine positive Transfusionsanamnese gesehen werden. Unsere Erkenntnisse aus den Kontrollgruppen decken sich mit den Ergebnissen von Reil und Kollegen, die ebenfalls kaum HLA-AK in männlichen Blutspendern (teilweise trotz Vortransfusionen) gefunden haben. Auch sie fanden eine deutlich erhöhte Rate an HLA-AK bei Frauen mit positiver Schwangerschaftsanamnese (Reil et al. 2008).

4.3 HLA-AK-Bildung durch Hämotherapie

Gesamt-HLA-AK:

Bei 15 % aller Patienten fanden sich AK gegen beide Merkmalsklassen, bei 19 % konnte man nur HLA-AK gegen Klasse I finden und lediglich 3 % hatten nur Klasse-II-HLA-AK gebildet. Somit tragen 34 % aller Patienten HLA-AK gegen Klasse I und 18 % gegen Klasse II. Vergleicht man diese Zahlen mit der entsprechenden Literatur, bestätigt sich ein Trend, nach dem vermehrt HLA-AK gegen Klasse I gebildet werden (Maślanka et al. 2007, Reil et al. 2008, Norris et al. 2009).

In unserer Arbeit könnte dies natürlich auch daran liegen, dass die Patienten mit zwei verschiedenen Verfahren auf Klasse-I-HLA-AK getestet wurden. So fließen bei HLA-AK gegen Klasse I durch den LCT auch IgM-HLA-AK in die Gesamtzahl mit ein. Betrachtet man jedoch nur die Ergebnisse des ELISA-Screenings, so zeigt sich auch hier mit 26 % eine erhöhte Rate an HLA-AK gegen Klasse I im Vergleich zu Klasse II (17 %). In der Literatur wurde zwar schon vor Jahrzehnten beschrieben, dass insbesondere kontaminierende Leukozyten für die Immunisierung verantwortlich sind (Claas et al 1981), jedoch tragen auch Thrombozyten HLA-Merkmale der Klasse I (Brown et al. 1979; Santoso et al. 1993; Santoso et al. 1986). Merkmale des A- und B-Lokus sind dabei in hoher Dichte vorhanden, während die Genprodukte des C-Lokus nur spärlich anzutreffen sind (Mueller-Eckhardt et al. 1980). Sie scheinen deshalb auch nur eine untergeordnete Rolle bei der Entwicklung eines Refraktärzustand gegen Thrombozytentransfusionen zu spielen (Datema et al. 2000). Die mittlere Konzentration an HLA-Molekülen auf Thrombozyten beträgt 9,3fg (+/- 2,9 fg) pro Thrombozyt (Kao 1987). Die Thrombozyten tragen je nach Individuum zwischen 50.000 und 120.000 HLA-Heterodimere (Kao et al. 1986). Bei Thrombozytentransfusionen kommt es demnach zu einem vermehrten Kontakt des Empfänger-Immunsystems mit HLA-Merkmalen der Klasse I (auf Leukozyten und Thrombozyten) verglichen mit HLA-Molekülen der Klasse II (nur auf Leukozyten). Dies könnte die Erklärung für die häufigere Bildung von HLA-AK gegen Klasse I sein.

Vortransfusionen:

Es zeigt sich eine leichte erhöhte Rate an HLA-AK-Trägern bei den Patienten mit Vortransfusionen, wobei diese Erhöhung jedoch nicht signifikant ist. Damit bestätigen sich sowohl die Zahlen aus unseren Kontrollgruppen, als auch die Ergebnisse einiger Studien, nach denen Personen mit Transfusionsanamnese kein signifikant erhöhtes Risiko für eine AK-Bildung haben. Die Prävalenz von HLA-Antikörpern bei Männern ist laut Triulzi und Kollegen sehr gering, egal ob sie Transfusionen erhalten haben (1,7 %) oder nicht (1,0 %) (Triulzi et al. 2009). Im Jahr 2010 wurde eine Studie veröffentlicht, wonach das zusätzliche Risiko einer HLA-Alloimmunisierung durch frühere Transfusionen mit 0,8 % nicht signifikant ist

(Kakaiya et al. 2010). Kiefel und Kollegen publizierten mit 42,9 % eine sehr hohe Rate an HLA-Antikörpern bei hämatologischen oder onkologischen Patienten die zelluläre Blutprodukte erhielten (Kiefel et al. 2001). In anderen Studien wurde prospektiv gezeigt, dass es durch Bluttransfusionen zur Bildung von HLA-AK kommt. So stieg die Rate bei Taaning und Kollegen von 2,6 % auf 15,4 % nach intraoperativer Transfusion von verschiedensten Blutprodukten (Taaning et al. 1997). In einer anderen Publikation entwickelten 20 % der Patienten unter Thrombozytentransfusion (nicht-depletiert) HLA-Antikörper (Doughty et al. 1994). Unter Therapie mit EKs und TKs fand sich in einer Publikation von 2007 ein Anstieg der Immunisierungsrate von 32 % auf 42,5 % (Fontão-Wendel et al. 2007). Auch Friedman und Kollegen fanden in 85 % aller häufig mit Thrombozyten transfundierten Patienten eine Antikörperbildung gegen HLA-Antigene (Friedman et al. 1996). Die stark abweichenden Ergebnisse der verschiedenen Studien, kommen vor allem durch die Verwendung verschiedener TKs und EKs zustande. In der TRAP-Studie wurde 1997 gezeigt, dass leukozytendepletierete TKs zu deutlich geringerer Antikörperbildung führen als herkömmliche Präparate. In diesen TKs wurde durch Filtration oder UVB-Bestrahlung der Gehalt an Restleukozyten auf höchstens 5×10^6 gesenkt. 45 % der Patienten, die normale Präparate erhielten, bildeten Antikörper. Bei den Empfängern leukozytendepletierter TKs geschah dies (je nach Art der Depletion) nur in 17-21 %. Auch die TRAP-Studie zeigte, dass abgelaufene Schwangerschaften starke immunisierende Ereignisse darstellen und ehemals schwangere Frauen öfter mit HLA-AK-Bildung auf Thrombozytentransfusionen reagieren. Der positive Effekt der Leukozytendepletion ist jedoch unabhängig von früheren Transfusionen oder Schwangerschaften (The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997). Bereits im Jahre 1988 wurde durch eine prospektive Studie nachgewiesen, dass durch den Einsatz von Leukozyten-Filtern bei der Herstellung von TKs und EKs die Immunisierungsrate von 50 % auf 15 % gesenkt werden kann (Sniecinski et al. 1988). 1991 wurde diese Tendenz mit einer Reduzierung von 42 % auf 7 % bei der Verwendung leukozytendepletierter TKs bestätigt (van Marwijk Kooy et al. 1991). Die Meta-Analyse zahlreicher Arbeiten zur Thrombozytentransfusion ergab eine Alloimmunisierung in 7- 44 % der Empfänger leukozytenreduzierter TKs und 20-50 % bei Verwendung unbehandelter Präparate (Vamvakas 1998). Zahlreiche Studien zum Thema Leukozytendepletion bei

Blutprodukten (generell) wurden auch von Bordin und Kollegen zusammengefasst, es zeigte sich ein Abfall der Immunisierungsrate durch Depletion von 48,3 % auf 14,7 % (Bordin et al. 1994). Auch wenn die Filterung der TKs und EKs erst kurz vor der Transfusion erfolgt (bedside-Filtration), zeigt sich ein schützender Effekt auf die Bildung von HLA-AK (Williamson 1994). Zu einem ganz anderen Ergebnis kommen Sintnicolaas und Kollegen, die bei Patientinnen mit Schwangerschaftsanamnese eine Immunisierungsrate von 43 % bei gefilterten und 44 % bei ungefilterten Apherese-TKs angeben. Damit hätte eine Leukozytendepletion bei ehemals schwangeren Frauen keinen signifikanten Effekt (Sintnicolaas et al. 1995). Eine positive Entwicklung konnte man jedoch nach Einführung der generellen Leukozytendepletion von TKs und EKs in Kanada ausmachen. Hier sank der Anteil an Patienten die HLA-Antikörper entwickelten von 19 % auf 7 %. Auch hier war der Erfolg unabhängig von früheren Transfusionen oder Schwangerschaften (Seftel et al. 2004). Es finden sich noch weitere Publikationen, die diese Daten für TKs (Fisher et al. 1985; Brand et al. 1988) oder Blutprodukte allgemein bestätigen (Murphy et al. 1986; Eernisse, Brand 1981). Eine Bestrahlung der TKs mit UVB-Strahlen soll laut Grijzenhout und Kollegen keinen positiven Effekt auf die HLA-Immunisierung haben (Grijzenhout et al 1994). In der TRAP-Studie konnte jedoch eine Reduktion der Alloimmunisierung durch UVB-Bestrahlung erzielt werden (The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997).

Die Präparate, die den Patienten der Transfusionsambulanz verabreicht wurden, waren allesamt leukozytendepletiert. Sowohl die Apherese-TKs, als auch die Pool-TKs enthalten maximal 1×10^6 Restleukozyten (DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen 2010a; DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen 2010b). Es ist davon auszugehen, dass auch bei auswärtigen Vortransfusionen leukozytendepletierte Blutkomponenten verwendet wurden, da in Deutschland seit Oktober 2001 nur noch depletierte Präparate transfundiert werden dürfen (Paul-Ehrlich-Institut 2000). Die Ergebnisse unserer Kontrollgruppen und der ausgewerteten Patienten können demnach mit den Studien verglichen werden, in denen leukozytendepletierte Blutkomponenten verwendet wurden. Sowohl die Kontrollgruppen als auch die Patienten zu Beginn zeigen, dass Vortransfusionen zu keinem signifikanten Anstieg der HLA-AK-Rate führen. Dieses Ergebnis wird durch zahlreiche Studien mit leukozytendepletierten

TKs (und EKs) bestätigt (Triulzi et al. 2009, Kakaiya et al. 2010). Demnach scheint das DRK durch die Leukozytendepletion von TKs für einen wirkungsvollen Schutz vor HLA-Alloimmunisierung zu sorgen.

Bestrahlte TKs:

Entsprechend den deutschen Querschnitts-Leitlinien wurden die Präparate unter anderem bei folgenden Indikationen bestrahlt:

- Alle HLA-identischen Präparate
- Patienten mit angeborener Immunschwäche
- Für mindestens 3 Monate bei Patienten nach autologer Stammzelltransplantation
- Nach allogener Stammzelltransplantation
- Patienten mit Morbus Hodgkin oder einem Non-Hodgkin-Lymphom
- Patienten unter Therapie mit Purinanaloga (Bein, Sachs 2009b)

Bei 43 % der Patienten mit bestrahlten TKs und EKs wurden im gesamten Beobachtungszeitpunkt in mindestens einer Probe HLA-AK nachgewiesen. Patienten die mit unbestrahlten Konzentraten versorgt wurden, hatten nur in 32 % einen positiven HLA-AK-Nachweis. Somit findet man eine (wenn auch nicht signifikant) erhöhte Rate an HLA-AK bei Patienten, die mit bestrahlten Präparaten transfundiert wurden. Hier ist die Frage, ob der Unterschied durch die Präparate hervorgerufen wird oder durch die Immunsuppression, welche die Indikation für bestrahlte Blutpräparate darstellt. Die Empfänger bestrahlter TKs leiden zumeist an ähnlichen Erkrankungen oder haben ähnliche Therapien erhalten (Stammzelltransplantation, Purinanaloga, usw.). Die gesteigerte Immunisierungsrate könnte demnach durch die Erkrankungen bzw. Therapien verursacht worden sein. Durch die Bestrahlung wird den Restleukozyten ihre Teilungsfähigkeit genommen, sie werden jedoch nicht aus dem Präparat entfernt. Auch bestrahlte TKs enthalten demnach fremde HLA-Merkmale, die zu einer Alloimmunisierung führen können. Die Bestrahlung reduziert dabei die Anzahl proliferationsfähiger Leukozyten um 5-6 Logarithmen, sie reagieren jedoch weiterhin mit den Immunzellen des Empfängers (Marschner et al. 2010). Für eine Erhöhung der Immunisierungsrate gibt es demnach keine Erklärung auf zellulärer Ebene, da der Gehalt an HLA-tragenden Zellen nicht verändert ist. Auch zeigt sich

an sämtlichen Untersuchungszeitpunkten keine signifikante Beeinflussung der HLA-AK-Bildung durch die Bestrahlung der Präparate. Die Empfänger bestrahlter und unbestrahlter Präparate wurden median mit einer ähnlichen Zahl an Blutkomponenten versorgt, sodass hier kein Grund für die Erhöhung der HLA-AK-Rate zu finden ist. Insgesamt ist eher die indikationsverursachende Immunsuppression als ursächlich für die höhere Rate an HLA-AK anzunehmen.

Erythrozytenkonzentrate:

Nur 27 % der Patienten ohne EK-Transfusionen hatten zu irgendeinem Zeitpunkt HLA-AK, während dieser Anteil bei den Patienten mit EKs bei 40 % liegt. Weiterhin ist der Anteil der EK-Empfänger bei den Patienten mit HLA-AK höher als bei denen ohne HLA-AK. Daraus könnte man schließen, dass auch EKs einen immunisierenden Effekt haben. Dieser könnte z.B. durch kontaminierende Leukozyten und Thrombozyten entstehen, denn die Erythrozyten selbst tragen als kernlose Zellen keine HLA-Merkmale auf ihrer Oberfläche. Eine ähnliche Beobachtung wurde in einer Publikation aus dem Jahr 2005 gemacht, in der ebenfalls eine HLA-Immunsierung durch EKs nachgewiesen werden konnte (Lo et al. 2005). Es muss allerdings ergänzt werden, dass ein EK in dieser Studie eine Restleukozytenzahl von ungefähr $3,3 \times 10^8$ enthielt. Für Präparate des Deutschen Roten Kreuzes besteht dagegen eine Vorgabe von weniger als 1×10^6 Restleukozyten pro Transfusionseinheit (DRK Baden-Württemberg – Hessen 2010c). Auch Taaning und Kollegen fanden in 11,4 % der Patienten Antikörper gegen HLA-Merkmale, obwohl diese nur EKs erhielten (Taaning et al. 1997). Patienten, die Antikörper gegen rote Blutkörperchen tragen, haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von HLA-Antikörpern (Sanz et al. 2010). Da die Patienten unserer Untersuchung nicht auf diese Antikörper getestet wurden, kann hier jedoch keine Korrelation untersucht werden. Es wäre jedoch möglich, dass einige unserer Patienten Antikörper gegen rote Blutkörperchen und gegen HLA-Merkmale tragen. Gegen all diese Thesen spricht die Betrachtung unserer Patienten mit besonders vielen EK-Transfusionen. Von allen Patienten, die deutlich über dem Median (7) transfundierter EKs liegen, entwickelte lediglich ein Patient HLA-Antikörper, die zusätzlich im Verlauf der Beobachtung wieder abgebaut wurden. Insgesamt haben die EK-Empfänger median deutlich mehr TKs erhalten als Patienten, die keine EKs erhalten haben (8 TKs gegenüber 2 TKs).

Geht man davon aus, dass die 40 Patienten der männlichen Kontrollgruppe mit Transfusionsanamnese auch teilweise EKs bekommen haben, so hatten die EKs hier ebenfalls keinen Einfluss auf die HLA-AK-Bildung (siehe Tabelle 5). Weiterhin findet sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine signifikante Beeinflussung der HLA-AK-Rate durch EK-Transfusionen. Unsere Auswertungen zeigen demnach, dass es durch die Transfusion von EKs zu keiner signifikanten Immunisierung gegen HLA-Moleküle kommt. Vor dem Hintergrund, dass v.a. kontaminierende Leukozyten für eine HLA-Immunisierung verantwortlich sind (Claas et al. 1981), scheint die starke Reduzierung der Leukozyten in EKs des DRK (DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen 2010c) ein zuverlässiger Schutz vor einer Alloimmunisierung durch EK-Transfusionen zu sein.

HLA-kompatible TKs:

Im Laufe der Studie musste bei 8 zusätzlichen Patienten die Versorgung auf HLA-kompatible TKs umgestellt werden. Diese Umstellung erfolgt, wenn sich ein ungenügendes CCI bei der Transfusion mit Pool-TKs zeigt und ein Test auf HLA-AK positiv ist. Sind die Spezifitäten der Antikörper bekannt, kann man ein Thrombozytenkonzentrat auswählen, dessen HLA-Merkmale nicht im Antikörper-Spektrum enthalten sind. Dies erleichtert das Auffinden eines geeigneten TKs, man riskiert jedoch weitere Immunisierungen gegen zusätzliche HLA-Merkmale. Bei Patienten mit polyspezifischen oder unbekanntem HLA-AK sollten Thrombozyten eines Spenders verwendet werden, dessen HLA-Merkmale mit dem Empfänger HLA-identisch sind. Eine weitere Möglichkeit ist die Durchführung einer Kreuzprobe von Empfängerplasma und möglichen Spenderthrombozyten zur Identifikation geeigneter Präparate (Engelfriet et al. 1997; Moroff et al. 1992). In Laufe der Untersuchung stieg die Rate an Patienten, die refraktär auf Pool-TKs reagierten, signifikant von 1,4 % auf 12 %. In der TRAP-Studie entwickelten 7-8 % der Empfänger filtrierter TKs einen Refraktärzustand gegen Pool-TKs (The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997). In unserer Auswertung zeigt sich demnach ein vergleichbarer Anstieg der refraktären Patienten wie in dieser großen Vergleichsstudie. Die Definition des Refraktärzustandes ist dabei sicherlich von der entsprechenden Klinik und dem transfundierenden Personal abhängig. Unsere Untersuchung bestätigt dennoch, dass es bei der Hämotherapie mit Thrombozytenkonzentraten über ein längeres Zeitintervall zu einem

signifikanten Anstieg an Patienten mit einem Refraktärzustand gegen nicht-HLA-gerichtete TKs kommt.

Die unterschiedliche Verteilung der HLA-kompatiblen Versorgung auf die zwei Gruppen (mit/ohne HLA-AK) ergibt sich aus der Indikation für diese Präparate. HLA-kompatible Präparate werden vor allem dann gegeben, wenn ein Patient bereits HLA-AK entwickelt hat. Durch die Umstellung der Präparate sollen auch weiterhin ausreichende Thrombozytenanstiege erreicht werden. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass man in der Studie eine signifikante Korrelation zwischen HLA-TKs und HLA-AK sieht. Allerdings sind in diesem Fall die HLA-AK der Grund für die HLA-TK-Versorgung, und nicht die HLA-TKs der Grund für die HLA-AK-Bildung. Wie bereits erwähnt, zeigte sich im Verlauf jedoch eine signifikante Zunahme an Patienten, die mit HLA-TKs versorgt werden. Diese Zunahme ist durch HLA-AK bedingt, die einen ausreichenden Thrombozytenanstieg verhinderten und deshalb eine Indikation für HLA-TKs darstellten. So finden sich bei 11 der 14 Patienten (78,6 %), die jemals HLA-TKs erhielten, HLA-AK. Wirft man einen genaueren Blick auf diese HLA-AK, findet man eine signifikant erhöhte Rate an Klasse-I-HLA-AK im Vergleich zu HLA-AK gegen Klasse II. Demnach scheinen v.a. HLA-AK gegen Klasse I für einen Refraktärzustand gegen Pool-TKs verantwortlich zu sein. Diese Tatsache ist einerseits bereits aus der Literatur bekannt (Blumberg et al 2010), andererseits auch mit der Oberflächenbeschaffenheit der Thrombozyten erklärbar. Plättchen tragen nur HLA-Merkmale der Klasse I auf ihrer Oberfläche, weshalb nur HLA-Klasse-I-AK an die Blutplättchen binden und zu einem Refraktärzustand führen können. Bei vier Patienten wurden nur HLA-AK gegen Klasse II gefunden. Alle vier Patienten konnten jedoch weiterhin mit Pool-TKs versorgt werden, da damit nach wie vor zufriedenstellende Transfusionsergebnisse erzielt werden konnten. HLA-AK gegen Klasse II haben demnach keinen Einfluss auf den Erfolg von Thrombozytentransfusionen. Da Thrombozyten keine HLA-Merkmale der Klasse II auf ihrer Oberfläche tragen, haben diese HLA-AK keine Möglichkeit an die Blutplättchen zu binden.

In einer Studie von Doughty aus dem Jahr 1994 waren in 67 % nicht-immunologische Faktoren für den Refraktärzustand verantwortlich. In 21 % war eine Kombination aus nicht-immunologischen und immunologischen Faktoren verantwortlich und nur in 4 % immunologische Faktoren allein. In 83 % der HLA-

immunisierten Patienten wurde ein schlechtes Ansprechen auf Transfusionen beobachtet (Doughty et al. 1994). In einer anderen Publikation hatten mit 30 % deutlich weniger Immunisierte diese Probleme (Murphy, Waters 1990). Legler und Kollegen kamen 1997 zu ähnlichen Ergebnissen: In 62,5 % waren nicht-immunologische, in 17,5 % immunologische und in 20 % eine Kombination aus beiden Faktoren für den Refraktärzustand verantwortlich (Legler et al. 1997). Die Umstellung auf HLA-TKs kann nur dann zu einer Verbesserung der supportiven Therapie führen, wenn ein immunologischer Refraktärzustand vorliegt. Ob es zur Entwicklung eines Refraktärzustandes durch HLA-AK kommt, hängt entscheidend von der Art der verwendeten Präparate ab. So konnte gezeigt werden, dass durch den Gebrauch leukozytendepletierter TKs die Alloimmunisierung und die Rate an Patienten mit Refraktärzustand sinkt (Eernisse, Brand 1988; Sniecinski 1988; Saarinen et al. 1990; Seftel et al. 2004; The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group 1997).

Transfusionshäufigkeit:

Auffällig ist, dass die Patienten mit nachgewiesenen HLA-AK diese schon nach median 2 EKs und einem TK entwickelten, während Patienten ohne HLA-AK mit median 8 EKs und 5 TKs (bis zum Ende des Beobachtungszeitraums) bereits eine deutlich höhere Anzahl an Transfusionen erhalten hatten. Diese Daten zeigen, dass es nicht von der Zahl der transfundierten Präparate abhängt, ob ein Patient Antikörper entwickelt. Eine für eine Immunisierung benötigte Mindestanzahl an Transfusionen, wie sie von Saarinen und Kollegen veröffentlicht wurde, konnten wir in unserer Studie ebenfalls nicht feststellen (Saarinen et al. 1990). Um eine Verfälschung dieses Ergebnisses durch den Störfaktor Schwangerschaften auszuschließen, wurden weitere Berechnungen durchgeführt. Beispielsweise hätte eine ungleiche Verteilung der Patientinnen mit positiver Schwangerschaftsanamnese die geringe Zahl an transfundierten Präparaten bei den Patienten mit positiven Testergebnissen erklären können. Bei Ausschluss dieser Patientinnen aus der Berechnung zeigte sich jedoch erneut, dass es keine Dosis-Wirkungs-Korrelation zwischen Transfusionen und HLA-AK-Bildung gibt. Positive Patienten erhielten hier bis zum ersten HLA-AK-Nachweis median 4 EKs und 1 TK. Die entsprechenden negativen Patienten erhielten mit median 8 EKs und 4 TKs deutlich mehr Blutkomponenten während des gesamten

Beobachtungszeitraums. Um den Einfluss einer unbekannteren Schwangerschaftsanamnese ebenfalls auszuschließen, wurden in einem dritten Schritt auch diese Patientinnen aus der Berechnung genommen. Hierbei zeigte sich mit 6 EKs und 2 TKs gegenüber 8 EKs und 4 TKs ebenfalls ein deutlicher Unterschied. Betrachtet man zusätzlich die Patienten mit Folgeproben, so zeigt sich bei Patienten mit nur positiven Proben eine mediane Transfusionszahl von 3 EKs und 9 TKs. Patienten bei denen in keiner Probe HLA-AK nachgewiesen wurden, erhielten median jedoch 12 EKs und 10 TKs. Es ist weiterhin zu berücksichtigen, dass bei 23 der 28 Patienten mit HLA-AK diese bereits in der ersten Probe nachgewiesen wurden. Demnach könnte es sein, dass die Patienten ihre HLA-AK bereits weit vor der ersten Probenentnahme entwickelt haben. In diesem Fall wäre der Median der transfundierten Präparate bis zur Immunisierung sogar noch niedriger. All diese Ergebnisse zeigen, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl der transfundierten Konzentrate und der Bildung von HLA-AK gibt. Bei allen Auswertungen sieht man, dass Patienten mit HLA-AK diese schon nach dem Erhalt weniger TKs und EKs entwickelten, während negative Patienten deutlich mehr Präparate erhalten haben und es zu keiner Immunisierung kam. Somit scheinen andere Faktoren die Patienten für eine (frühe) Immunisierung zu prädisponieren. Unsere Datenlage deckt sich damit mit zwei Publikationen, in denen ebenfalls nachgewiesen wurde, dass es kein Dosis-Wirkungs-Prinzip zwischen der Anzahl der transfundierten Blutkomponenten und HLA-AK-Bildung gibt (Dutcher et al. 1981a, Schiffer et al. 1976). Damit können wir die Daten einer anderen Studie, in der eben diese Korrelation beobachtet wurde, nicht bestätigen (Taaning et al. 1997). Ähnliche Ergebnisse fand man auch schon zu Zeiten, in denen die Konzentrate nicht generell leukozytendepletiert wurden und demnach noch immunogener waren. So beobachteten Dutcher und Kollegen ebenfalls eine große Gruppe von Patienten, die trotz einer enormen Anzahl an Transfusionen keine HLA-AK entwickelten (Dutcher et al. 1981b).

HLA-AK im Verlauf:

Betrachtet man die Gruppen der Patienten mit Folgeproben (Gruppe 1-5), findet sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der transfundierten Präparate und der HLA-AK-Entwicklung. Die Patienten mit nur negativen Proben (median 12 EKs und 10 TKs) und die Patienten mit AK-Verlust während den

Folgeproben (median 19 EKs und 12 TKs) haben im Median mehr Blutkomponenten erhalten als die Patienten, bei denen in allen Proben HLA-AK gefunden wurden (3 EKs und 9 TKs). Dies zeigt erneut, dass es trotz der Transfusion zahlreicher TKs und EKs bei vielen Patienten zu keiner Immunisierung bzw. sogar zum Abbau von HLA-AK kommt. Patienten, deren HLA-AK in allen Folgeproben bestätigt wurden, haben hingegen weniger Blutkomponenten erhalten. Es ergibt sich demnach auch in dieser Auswertung keine Dosis-Wirkungs-Korrelation zwischen Transfusionen und HLA-AK-Bildung. Auch die vier Patienten, die im Verlauf positiv und dann wieder negativ wurden, haben vergleichsweise viele Transfusionen erhalten (median 10,5 EKs und 15,5 TKs). Daran sieht man, dass auch eine höhere Zahl an Präparaten nicht zu einer dauerhaften Immunisierung der Patienten führen muss. Drei dieser vier Patienten waren zudem lediglich im LCT positiv. Da der ELISA negativ war, könnte es sich bei den zwischenzeitlich gefundenen HLA-AK um IgM-AK handeln, die lediglich im LCT nachgewiesen werden können und eine kürzere Verweildauer im Blut haben. Bei dem Patienten mit positivem ELISA war dieser nur schwach positiv (Score 2). Von den Patienten, die zu Beginn der Studie keine HLA-AK (n = 51) hatten, wurden 10 % (5/51) im Verlauf positiv. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Novotny und Kollegen (Novotny et al. 1995). In deren Studie entwickelten 2,7 % der Patienten ohne und 31 % der Patienten mit Risikoanamnese HLA-Antikörper. Damit wurden insgesamt 12 % aller Patienten im Verlauf ihrer Transfusionsstudie positiv. In unserer Untersuchung wurden jedoch 4 der 5 Patienten in einer weiteren Folgeprobe wieder negativ getestet, sodass sich größtenteils nur eine kurzzeitige Immunisierung zeigte.

Bei positiven Patienten mit mehrmals durchgeführtem LCT waren diese in keinem Fall identisch. Bei Verlust oder neuem Auftreten eines spezifischen HLA-AK ist dies ein eindeutig erklärbares Ergebnis, bei polyspezifischen Patienten kann es jedoch mehrere Gründe haben. Ein Grund ist selbstverständlich die Bildung neuer bzw. der Verlust von HLA-AK, wodurch die Polyspezifität zu- oder abnimmt. Es gibt jedoch auch zwei Ungenauigkeiten, die für diese Veränderungen verantwortlich sein können. Einerseits mag es an der subjektiven Auswertung unter dem Mikroskop liegen, die bei den Proben im Verlauf vielleicht teilweise voneinander abweicht. Es kann durchaus sein, dass Panels mit ähnlichem Anteil an zerstörten Lymphozyten einmal mit Score 2 (negativ) und einmal mit Score 4

(positiv) bewertet werden. Dies führt logischerweise zu einer Veränderung der Panelreaktivität bei polyspezifischen Patienten. Der andere Grund ist, dass in jeder Charge LCT-Platten, die von der Firma Biotest geliefert werden, die einzelnen HLA-Merkmale verschieden auf die Panels verteilt sind. So kann bei einem Patienten bei der ersten Probe eine Charge mit HLA-A2 Merkmalen in 15 Panels vorliegen, während bei der zweiten Probe eine Platte mit 20 A2-Panels verwendet wird. HLA-AK gegen HLA-A2 würden dann unabhängig von anderen HLA-AK im ersten Fall in 27 % und im zweiten Fall in 36 % der Panels eine positive Reaktion auslösen. Hier sieht man erneut die Vorteile der verschiedenen Testmethoden. Mit dem LCT können Spezifitäten der HLA-AK bestimmt werden, was im ELISA nicht möglich ist. Um jedoch zu klären, wie reaktiv die HLA-AK sind und wie hoch ihr Gehalt im Serum ist, ist der LCT ungeeignet. Hierfür stellt der ELISA mit seiner objektiven Messung bei gleichen Bedingungen die bessere Alternative dar.

In 4 Fällen wurden Patienten mit vormals spezifischen HLA-AK im Verlauf polyspezifisch positiv. Bei zwei Patienten sind weitere spezifische HLA-AK hinzugekommen, obwohl die Patienten eigentlich mit HLA-TKs versorgt wurden. Dies könnte einerseits durch die zusätzliche Gabe von EKs induziert worden sein. EKs werden nicht an die HLA-Antikörper der Patienten angepasst und enthalten ebenfalls kontaminierende Leukozyten, die demnach auch eine weitere Immunisierung auslösen können. Oft werden immunisierte Patienten aber auch nicht mit HLA-TKs von HLA-identischen Spendern versorgt. Sie erhalten stattdessen Präparate, deren HLA-Merkmale nicht von den Spezifitäten ihrer HLA-AK erfasst werden. Dadurch kommt es zum Kontakt mit weiteren HLA-Merkmalen und nachfolgender HLA-AK-Bildung. Ein Beispiel hierfür findet sich bei einer Patientin, die vermutlich durch ihre 6 Schwangerschaften HLA-AK gebildet hat. Trotz der Versorgung mit HLA-TKs kamen während der Therapie laufend neue Spezifitäten hinzu, was wohl auf den eben erläuterten Sachverhalt zurückzuführen ist.

Betrachtet man alle Testergebnisse zusammen, zeigt sich eine eher abnehmende Tendenz. Bei 5 Patienten konnten in Folgeproben stärkere Reaktionen beobachtet werden, während sie sich bei 8 Patienten abschwächten (siehe Tabelle 13). Zwischen den ersten beiden Blutentnahmen konnten zwar Neubildungen und Verlust von HLA-Antikörpern beobachtet werden, insgesamt blieb der Anteil

positiver Patienten jedoch identisch. Bis zur 3. Blutentnahme konnte eine Abnahme der positiven Patienten beobachtet werden, die jedoch ebenfalls nicht signifikant war. Durch die Transfusionen zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten kam es demnach zu keinen signifikanten Veränderungen der HLA-AK-Raten bei den ausgewerteten Patienten (siehe Abbildung 36 und 42). Nachdem Vortransfusionen bereits keinen Effekt auf die HLA-AK-Bildung hatten, konnte damit gezeigt werden, dass auch die Transfusionen während des Beobachtungszeitpunktes die Alloimmunisierung nicht beeinflussten. Somit zeigten unsere Auswertungen, dass die Transfusion leukozytendepletierter Blutkomponenten zu keiner signifikanten Beeinflussung der HLA-AK-Bildung führt.

4.4 HLA-AK-Bildung durch andere Risikofaktoren

Erkrankung:

Es scheint einen Effekt von hämatologischen Erkrankungen auf die Bildung der HLA-Antikörper zu geben, da der Anteil an Antikörperträgern unter den hämatologischen Patienten mit 42 % deutlich höher ist als bei Patienten mit anderen Erkrankungen (11 %). Die mediane Transfusionszahl ist bei den Patienten mit hämatologischer Erkrankung (8 EKs und 6 TKs; siehe Tabelle 10) nahezu identisch wie bei den Patienten mit anderen Erkrankungen (6 EKs und 6 TKs; siehe Tabelle 10). Dies spricht dafür, dass die Gründe für die höhere Immunisierungsrate bei der Grunderkrankung zu suchen sind. Im Jahr 1994 erschien eine Studie, in der ebenfalls eine erhöhte HLA-Antikörperbildung bei Patienten mit AML beobachtet wurde (Williamson et al. 1994). Dies könnte damit zusammenhängen, dass hämatologische Patienten meist über einen langen Zeitraum mit häufigen Transfusionen behandelt werden. Jedoch hat unsere Untersuchung ebenso wie andere Publikationen (Dutcher et al. 1981a, Schiffer et al. 1976) gezeigt, dass es keine Korrelation zwischen der Anzahl der transfundierten Präparate und der HLA-AK-Bildung gibt. Demnach könnte die erhöhte HLA-AK-Bildung bei hämatologischen Patienten auch mit den unterschiedlichen Therapien und Medikationen zusammenhängen. Die Medikamente zur Behandlung hämatologischer Erkrankungen haben oft eine

starke Wirkung auf das Immunsystem und können somit auch Einfluss auf die HLA-AK-Bildung nehmen. Das ausschließliche Vorkommen spezifischer HLA-AK bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen deutet ebenfalls darauf hin, dass diese Erkrankungen einen besonderen Einfluss auf die Bildung von HLA-AK haben. Zwar findet man zu einzelnen Untersuchungszeitpunkten und auf den gesamten Beobachtungszeitraum gesehen eine erhöhte Rate an HLA-AK-Trägern unter den Patienten mit hämatologischen Patienten, diese ist jedoch nicht signifikant. Um den Einfluss der Erkrankungsart besser zu evaluieren, wäre eine Untersuchung mit einer größeren Patientenzahl notwendig. Besonders die Anzahl der Patienten mit ausschließlich nicht-hämatologischen Erkrankungen ist mit 9 von 74 (12 %) nicht besonders hoch und sollte für eine genauere Untersuchung des Erkrankungseinflusses erhöht werden.

Geschlecht und Schwangerschaften:

Frauen haben ein höheres Risiko HLA-AK zu entwickeln als Männer (Sanz et al. 2010). Bei 45 % der Patientinnen unserer Untersuchung wurden in mindestens einer Probe HLA-AK nachgewiesen, während dieser Anteil bei den männlichen Patienten bei 32 % lag (siehe Tabelle 10). Frauen entwickelten demnach häufiger HLA-AK obwohl sie median mit 5 EKs und 4 TKs weniger Transfusionen erhielten als die Männer (9,5 EKs und 8 TKs; siehe Tabelle 10). In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass dabei Schwangerschaften ein stark immunisierendes Ereignis darstellen (Triulzi et al. 2009; Kakaiya et al. 2010; Powers et al. 2008; Denmore et al. 1999; Maślanka et al. 2007). In unserer Arbeit finden sich bei den Frauen mit positiver Schwangerschaftsanamnese jedoch weniger Patientinnen mit HLA-AK als in der Gruppe ohne Schwangerschaften. Durch Bluttransfusionen ist dieser Unterschied nicht zu erklären, da beide Gruppen median eine ähnliche Anzahl an TKs und EKs erhalten haben (siehe Tabelle 11). Die Abweichung lässt sich höchstens durch die Gruppe der Frauen mit unbekannter Schwangerschaftsanamnese erklären. Hier liegt der Anteil der HLA-AK-Trägerinnen bei über 67 % und am zweiten Untersuchungszeitpunkt zeigt sich sogar eine signifikante Erhöhung der HLA-AK-Rate bei Patientinnen mit unbekannter Schwangerschaftsanamnese. Es ist anzunehmen, dass dieser Gruppe einige Frauen mit abgelaufenen Schwangerschaften zugerechnet wurden.

Bei einer korrekten Schwangerschaftsanamnese aller Patientinnen würde sich womöglich eine signifikante Erhöhung der HLA-AK-Rate durch Schwangerschaften zeigen. Es wurde auch nicht genau erhoben, ob die Schwangerschaften mit einer erfolgreichen Geburt endeten. Sollten unter den registrierten Schwangerschaften einige Frühaborte sein, könnte dies den Einfluss des Risikofaktors Schwangerschaften gemildert haben. Laut Triulzi und Kollegen haben Frühaborte keinen Einfluss auf die HLA-Immunsierungsrate (Triulzi et al. 2009). In einer anderen Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass erst mehrere Frühaborte (ohne eine erfolgreiche Geburt) zu einer Immunsierung führen, während eine einzelne nicht-erfolgreiche Schwangerschaft keinen Einfluss hat (Kakaiya et al. 2010).

Auf Grund dieser Ungenauigkeiten kann auf den gesamten Zeitraum gesehen kein Zusammenhang zwischen Schwangerschaften und HLA-AK-Bildung nachgewiesen werden, den Powers und Kollegen publiziert hatten (Powers et al. 2008). Einen (wenn auch nicht signifikanten) Hinweis auf eine schwangerschaftsinduzierte HLA-Immunsierung kann man bei den Patienten mit Folgeproben finden. In der Gruppe mit nur positiven Proben findet man mit 38 % eine höhere Rate an Frauen mit Schwangerschaften als in der Gruppe mit nur negativen Proben (22 %). Es wurde bereits gezeigt, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Transfusionen und dem Ergebnis der Folgeproben gibt. Demnach könnten bei diesen 38 % auch die Schwangerschaften für eine langanhaltende Immunsierung verantwortlich sein. In unseren Kontrollgruppen stellt sich ein deutlicheres Bild dar. Hier kam es durch Schwangerschaften zu einer signifikanten Erhöhung von HLA-AK gegen Klasse I und HLA-AK allgemein. Viele andere Veröffentlichungen zeigen ebenfalls, dass es einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Schwangerschaften und der Entwicklung von HLA-AK gibt. Dabei korreliert die Anzahl der Schwangerschaften signifikant mit der Häufigkeit an HLA-Antikörpern. So steigt die Rate von 1,7 % bei Frauen ohne Schwangerschaft über 11,2 %, 22,3 % und 27,5 % (bei einer, zwei und drei Schwangerschaften) auf eine Alloimmunsierungsrate von 32,2 % bei Frauen mit 4 oder mehr Schwangerschaften (Triulzi et al. 2009). Die ersten zwei Schwangerschaften stellen dabei die größten immunsierenden Ereignisse dar (Triulzi et al. 2009). Diese Ergebnisse werden durch Densmore und Kollegen bestätigt, die bei 26,3 % aller Frauen mit drei oder mehr Schwangerschaften HLA-

Antikörper nachweisen konnten, jedoch nur bei 14,6 % der Frauen mit einer oder zwei Schwangerschaften (Densmore et al. 1999). Auch in einer neuen Veröffentlichung wurde ein bis zu 32,4 % erhöhtes Risiko einer HLA-Alloimmunisierung bei Frauen mit vier oder mehr Schwangerschaften nachgewiesen (Kakaiya et al. 2010). Maślanka und Kollegen untersuchten ebenfalls Blutspender auf HLA-AK und fanden diese in 9,8 % der Frauen. Auch hier stieg der Anteil der Frauen mit HLA-AK mit der Anzahl der Schwangerschaften (Maślanka et al. 2007). Mit einer Sensitivität von 87,9% und einem negativen Vorhersagewert von 93,5% scheint die Schwangerschaftsanamnese eine gute Screening-Frage zu sein, um eventuelle Risikopersonen zu identifizieren (Powers et al. 2008). Demnach unterstützen alle wichtigen Publikationen die Ergebnisse unserer Kontrollgruppen, die eine HLA-Alloimmunisierung durch Schwangerschaften nachweisen konnten. Durch eine genauere Schwangerschaftsanamnese oder eine größere Stichprobenzahl könnte eventuell auch in unserer Untersuchung eine Immunisierung durch Schwangerschaften nachgewiesen werden.

4.5 Schlussfolgerung

Heutzutage sind viele Patienten auf eine Langzeitversorgung mit Blutkomponenten angewiesen. Um diese Langzeitversorgung zu garantieren, ist es von großer Bedeutung, Faktoren zu kennen, die einer erfolgreichen Therapie im Wege stehen. Einer dieser Faktoren ist die Bildung von HLA-AK, die zu einem Refraktärzustand der Patienten gegenüber TKs führen können. In dieser Arbeit wurden verschiedene Einflussgrößen untersucht, die eine Bildung von HLA-AK begünstigen könnten.

Bei Betrachtung der retrospektiven Kontrollgruppen zeigt sich ein erhöhtes Risiko für die HLA-AK-Bildung bei Patientinnen mit Schwangerschaften in der Anamnese. Eine Transfusionsanamnese hingegen erhöht die Rate der HLA-AK-Bildung nicht. Aus den verschiedenen HLA-AK-Tests der Patienten der Transfusionsambulanz lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Vortransfusionen stellen keinen signifikanten Risikofaktor für die Bildung von HLA-AK dar, damit werden die Ergebnisse der Kontrollgruppen bestätigt.

Während der Studie zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Patienten, die einen Refraktärzustand gegen Pool-TKs entwickelt hatten und mit HLA-TKs versorgt werden mussten. In dieser Gruppe fällt eine signifikant erhöhte Rate an HLA-AK gegen Klasse I auf. HLA-AK gegen Klasse I haben einen weitaus größeren Einfluss auf das Ansprechen gegenüber Thrombozytentransfusionen und scheinen für die Entstehung eines Refraktärzustandes verantwortlich zu sein. So zeigt sich beispielsweise ein geringeres CCI bei Patienten, die HLA-AK gegen Klasse I tragen und mit Pool-TKs versorgt werden. Betrachtet man die Entwicklung bzw. den Verlust von HLA-AK während der Studienzeit, zeigt sich eine eher abnehmende Tendenz.

Es gibt keine Dosis-Wirkungs-Korrelation zwischen der Anzahl der verabreichten TKs bzw. EKs und der Bildung von HLA-AK. So entwickelten positive Patienten ihre HLA-AK bereits nach wenigen Transfusionen, während negative Patienten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums deutlich mehr Präparate erhielten. Patienten, die in allen abgenommenen Proben positiv waren, haben median weniger Transfusionen erhalten als Patienten mit nur negativen Tests. Somit scheinen andere Faktoren die Patienten für eine frühe Bildung von HLA-AK zu prädisponieren. Hier müssten weitere Tests durchgeführt werden, um die entsprechenden Faktoren zu ermitteln. Die Patienten entwickelten mehr HLA-AK

gegen Klasse I als gegen Klasse II. Die Gabe bestrahlter Präparate oder die zusätzliche Transfusion von EKs hat keinen signifikanten Effekt. Vergleicht man Geschlecht und Schwangerschaftsanamnese bei den Patienten, findet sich lediglich zu einem Untersuchungszeitpunkt eine signifikant erhöhte Rate an HLA-AK-Trägern unter Frauen. Eine unsichere Schwangerschaftsanamnese könnte dafür verantwortlich sein, dass keine signifikante Beeinflussung der HLA-AK-Bildung durch Schwangerschaften gezeigt werden konnte. Im Allgemeinen ist die HLA-AK-Bildung durch Schwangerschaften in der Fachliteratur unumstritten. Nur Patienten mit einer hämatologischen Erkrankung entwickelten spezifische HLA-AK, außerdem war die Rate an HLA-AK-Trägern in dieser Gruppe deutlich (wenn auch nicht signifikant) erhöht. Die Erkrankung und die entsprechende Behandlung (z.B. Medikamente) spielten demnach wohl ebenfalls eine große Rolle bei der Alloimmunisierung. Um in diesen Bereichen zu einem signifikanten Ergebnis zu kommen, wären größere Stichproben nötig.

Schlussfolgernd ergibt sich ein erwiesener Zusammenhang zwischen HLA-AK gegen Klasse I und dem Refraktärzustand gegen Pool-TKs. Weder konnte eine HLA-AK-Bildung durch leukozytendepletierte Blutkomponenten festgestellt werden, noch gibt es einen Zusammenhang zwischen Anzahl der transfundierten Präparate und der Entwicklung von HLA-AK. Durch die generelle Leukozytendepletion der EKs und TKs des DRK auf maximal 1×10^6 Restleukozyten konnte ein wirkungsvoller Schutz vor HLA-Immunsierung erzielt werden.

Vielmehr scheint es andere Faktoren zu geben, die das Risiko einer Alloimmunisierung unserer Patienten erhöht haben.

5 Zusammenfassung

Die Transfusion von Blutkomponenten stellt einen der Hauptpfeiler in der Therapie von thrombozytopenischen Patienten dar. Ursache sind oft hämatologische Erkrankungen und/oder eine Chemotherapie. Das HLA-System (Human Leucocyte Antigen System) hat dabei eine große Bedeutung beim Ansprechen von Patienten auf Thrombozytentransfusionen. Die HLA-Merkmale präsentieren körperfremde Peptidfragmente dem eigenen Immunsystem und leiten somit eine adaptive Immunantwort ein. Durch Schwangerschaften oder beim Übertragen von Blutbestandteilen kann es zur Bildung von HLA-AK (Human-Leucocyte-Antigen-Antikörpern) gegen HLA-Merkmale der Klasse I und/oder II kommen. Bei Transfusionen sind vor allem die kontaminierenden Leukozyten in den Präparaten für die HLA-AK-Bildung verantwortlich. Deshalb wurde die Anzahl immunisierter Patienten durch die Einführung der generellen Leukozytendepletion im Jahr 2001 drastisch gesenkt. Die HLA-AK können bei weiteren Transfusionen einen ausreichenden Anstieg der Thrombozyten bei den Empfängern verhindern. Dadurch kann sich ein Refraktärzustand gegenüber TKs (Thrombozytenkonzentraten) ausbilden, der eine aufwendige Versorgung mit HLA-kompatiblen TKs erfordert. Diese Arbeit sollte klären, welche Faktoren zur Bildung von HLA-AK führen. Besonderes Augenmerk lag dabei auf Art und Menge der transfundierten Blutkomponenten. Dafür wurden zunächst aus der Knochenmark- und Zellspenderdatei Ulm vier Kontrollgruppen erstellt und anhand ihrer ELISA-Ergebnisse (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ermittelt, ob vergangene Transfusionen oder Schwangerschaften die HLA-AK-Bildung begünstigen. Im zweiten Teil wurden LCT (Lymphozytotoxizitätstest) und ELISA bei Patienten der Transfusionsambulanz des IKT Ulm (Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm) durchgeführt. Aus den Patientenakten wurden mögliche Risikofaktoren ermittelt und zu verschiedenen Zeitpunkten des Beobachtungszeitraums mit den Testergebnissen verglichen. Hierfür wurde von 74 TK-Empfängern eine Blutprobe entnommen. Von 48 Patienten konnte eine Zweite und von 21 eine Dritte gewonnen werden. Mit dem LCT können komplementabhängige AK gegen HLA-Merkmale der Klasse I nachgewiesen werden, die zur Zerstörung der entsprechenden Lymphozyten auf der Testplatte führen. Beim ELISA kommt es zu einer Farbreaktion, falls HLA-AK der Klasse I oder II gegen hochgereinigte HLA-Glykoproteine der Teststreifen vorhanden sind.

Die Kontrollgruppen zeigten, dass Schwangerschaften das Risiko für HLA-AK-Bildung erhöhen, während eine positive Transfusionsanamnese keinen signifikanten Effekt hat. Im Verlauf des Beobachtungszeitraums mussten signifikant mehr Patienten wegen eines Refraktärzustandes mit HLA-kompatiblen TKs versorgt werden. Der Refraktärzustand wurde dabei durch HLA-AK gegen Klasse I hervorgerufen, da Thrombozyten nur Klasse-I-Merkmale auf ihrer Oberfläche tragen. Insgesamt zeigte sich bei den Patienten mit mehreren Proben eine eher abnehmende Tendenz der HLA-AK (nicht signifikant). Entwickelten Patienten HLA-AK, so geschah dies bereits, nachdem sie im Median weniger Präparate erhalten hatten als die negativen Patienten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Weiterhin wurden Patienten mit HLA-AK in sämtlichen Folgeproben im Median mit weniger TKs und EKs transfundiert als Patienten mit nur negativen Proben. Es gibt demnach keine Dosis-Wirkungs-Korrelation zwischen der Anzahl der transfundierten Konzentrate und der Bildung von HLA-AK. Somit scheinen andere Faktoren einen Einfluss auf die HLA-AK-Bildung zu haben. Im Hinblick auf Geschlecht und Schwangerschaftsanamnese zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang. Dies könnte jedoch auch an einer unsicheren Risikoanamnese liegen, denn die HLA-AK-Bildung durch Schwangerschaften ist in der Literatur allgemein unbestritten. Auch Vortransfusionen, Bestrahlung der Präparate und die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten erhöhte die Rate an HLA-AK nicht signifikant. Eine (nicht signifikant) gesteigerte HLA-AK-Bildung fand man bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen. Außerdem wurden nur bei diesen Patienten spezifische Antikörper gefunden. Der Einfluss all dieser Faktoren könnte in einer teilnehmerstärkeren Arbeit genauer evaluiert werden.

Zusammenfassend zeigt diese Untersuchung, dass HLA-Klasse-I-AK zu einem Refraktärzustand gegen Thrombozytentransfusionen führen können. Leukozytendepletierte Blutkomponenten stellen allerdings keinen signifikanten immunogenen Reiz für die HLA-AK-Bildung dar. Vielmehr scheinen andere Faktoren (Grunderkrankung, begleitende Therapien) diese Alloimmunisierung zu begünstigen. Diese Faktoren müssten genauer untersucht werden, um die Alloimmunisierung der Patienten weiter zu senken und eine Optimierung der Transfusionstherapie zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

1. Andreu G, Dewailly J: Prevention of HLA alloimmunisation by using leukocyte-depleted components. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* 60: 29-40 (1994)
2. Batalia MA, Collins EJ: Peptide binding by class I and class II MHC molecules. *Biopolymers* 43: 281-302 (1997)
3. Beck S, Trowsdale J: The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1: 117-137 (2000)
4. Bein G, Sachs U: Transfusionsassoziierte Graft-versus-Host-Krankheit. In: Bundesärztekammer (Herausgeber): Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. 4. überarbeitete Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln: S. 247-248 (2009a)
5. Bein G, Sachs U: Empfehlung zur Bestrahlung von Blutprodukten. In: Bundesärztekammer (Herausgeber): Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. 4. überarbeitete Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln: S. 250-254 (2009b)
6. Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE: Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med* 175: 305-308 (1992)
7. Bessos H, Atkinson A, McGill A, Baillie J, Seghatchian J, Vickers M, Bishop D, Tandy N, Murphy WG: Apheresis platelet concentrates: correlation of day one levels of in vitro quality markers with corresponding levels on days two to five of storage. *Thromb Res* 84: 367-372 (1996)

8. Blumberg N, Heal JM, Phillips GL: Platelet transfusions: trigger, dose, benefits, and risks (vom 27.01.2010). (<http://f1000.com/reports/m/2/5>). Download: 06.12.2010 19:48 Uhr (2010)
9. Böck M, Rahrig S, Kunz D, Lutze G, Heim MU: Platelet concentrates derived from buffy coat and apheresis: biochemical and functional differences. *Transfus Med* 12: 317-324 (2002)
10. Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA: Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products. *Blood* 84: 1703-1721 (1994)
11. Brand A, Claas FH, Voogt PJ, Wasser MN, Eernisse JG: Alloimmunization after leukocyte-depleted multiple random donor platelet transfusions. *Vox Sang* 54: 160-166 (1988)
12. Brown G, Biberfeld P, Christensson B, Mason DY: The distribution of HLA on human lymphoid, bone marrow and peripheral blood cells. *Euro J Immunol* 9: 272-275 (1979)
13. Bux J, Sachs UJ: The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br J Haematol* 136: 788-799 (2007)
14. Claas FH, Smeenk RJ, Schmidt R, van Steenbrugge GJ, Eernisse JG: Alloimmunization against the MHC antigens after platelet transfusions is due to contaminating leukocytes in the platelet suspension. *Exp Hematol* 9: 84-89 (1981)
15. Datema G, Stein S, Eijssink C, Mulder A, Claas FH, Doxiadis II: HLA-C expression on platelets: studies with an HLA-Cw1-specific human monoclonal antibody. *Vox Sang* 79: 108-111 (2000)
16. Davis KB, Slichter SJ, Corash L: Corrected count increment and percent platelet recovery as measures of posttransfusion platelet response: problems and a solution. *Transfusion* 39: 586-592 (1999)

17. Densmore TL, Goodnough LT, Ali S, Dynis M, Chaplin H: Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion* 39: 103-106 (1999)
18. Doughty HA, Murphy MF, Metcalfe P, Rohatiner AZ, Lister TA, Waters AH: Relative importance of immune and non-immune causes of platelet refractoriness. *Vox Sang* 66: 200-205 (1994)
19. Dreger P, Schmitz N: Bildung, Aufbau, Funktion und Kinetik hämatopoetischer Zellen. In: Mueller-Eckhardt C, Kiefel V (Herausgeber): *Transfusionsmedizin* 3. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York: S. 19-39 (2004)
20. DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen: Endproduktspezifikation – Thrombozytenkonzentrat / Apherese. (http://www.blutspende.de/transfusionsmedizin/produkte/thrombozytenkonzentrate_apharese.php). Download: 12.12.2010 20:41 Uhr (2010a)
21. DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen: Endproduktspezifikation – Thrombozytenkonzentrat. (<http://www.blutspende.de/transfusionsmedizin/produkte/thrombozytenkonzentrate.php>). Download: 12.12.2010 20:45 Uhr (2010b)
22. DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen: Endproduktspezifikation – Erythrozytenkonzentrat. (<http://www.blutspende.de/transfusionsmedizin/produkte/erythrozytenkonzentrate.php>). Download: 29.12.2010 15:26 Uhr (2010c)
23. DRK-Blutspendedienst West: Blutgruppenverteilung. (<http://www.blutspendedienst-west.de/blutspende/blutbedarf/blutgruppenverteilung.php>). Download: 19.12.2010 21:24 Uhr (2010)

24. Dutcher JP, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH: Alloimmunization following platelet transfusion: the absence of a dose-response relationship. *Blood* 57: 395-398 (1981a)
25. Dutcher JP, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH: Long-term follow-up patients with leukemia receiving platelet transfusions: identification of a large group of patients who do not become alloimmunized. *Blood* 58: 1007-1011 (1981b)
26. Ebell W, Greinacher A, Salama A: Thrombozytenkonzentrate. In: Bundesärztekammer (Herausgeber): Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. 4. überarbeitete Auflage. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln: S.31-55 (2009)
27. Eckstein R: Das Thrombozytenkonzentrat. In: Eckstein R (Herausgeber): Immunhämatologie und Transfusionsmedizin 4. Auflage. Urban & Fischer, München Jena: S. 90-92 (2001)
28. Eernisse JG, Brand A: Prevention of platelet refractoriness due to HLA antibodies by administration of leukocyte-poor blood components. *Exp Hematol* 9: 77-83 (1981)
29. Engelfriet CP, Reesink HW, Aster RH, Brand A, Tomson B, Claas FH, Contreras M, Navarrete C, Jørgensen J, Murphy MF, Curtis R, Waters AH, Panzer S, Kurz M, Höcker P, Mayr WR, Schiffer CA: Management of alloimmunized, refractory patients in need of platelet transfusions. *Vox Sang* 73: 191-198 (1997)
30. Fischer G, Mayr WR: Das HLA-System. In: Mueller-Eckhardt C, Kiefel V (Herausgeber): Transfusionsmedizin 3. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York: S. 209-225 (2004)

31. Fisher M, Chapman JR, Ting A, Morris PJ: Alloimmunisation to HLA antigens following transfusion with leucocyte-poor and purified platelet suspensions. *Vox Sang* 49: 331-335 (1985)
32. Fontão-Wendel R, Silva LC, Saviolo CB, Primavera B, Wendel S: Incidence of transfusion-induced platelet-reactive antibodies evaluated by specific assays for the detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. *Vox Sang* 93: 241-249 (2007)
33. Friedman DF, Lukas MB, Jawad A, Larson PJ, Ohene-Frempong K, Manno CS: Alloimmunization to platelets in heavily transfused patients with sickle cell disease. *Blood* 88: 3126-3222 (1996)
34. Grijzenhout MA, Aarts-Riemens MI, de Gruijl FR, van Weelden H, van Prooijen HC: UVB irradiation of human platelet concentrates does not prevent HLA alloimmunization in recipients. *Blood* 84: 3524-3531 (1994)
35. Hanson SR, Slichter SJ: Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. *Blood* 66: 1105-1109 (1985)
36. Heal JM, Singal S, Sardisco E, Mayer T: Bacterial proliferation in platelet concentrates. *Transfusion* 26: 388-390 (1986)
37. Heddle NM, Arnold DM, Boye D, Webert KE, Resz I, Dumont LJ: Comparing the efficacy and safety of apheresis and whole blood-derived platelet transfusions: a systematic review. *Transfusion* 48: 1447-1458 (2008)
38. Herold G, Germing U, Montemurro M, Röth A: In: Herold G (Herausgeber): *Innere Medizin 2009*. Herold, Köln: S. 61-97 (2009)
39. Hod E, Schwartz J: Platelet transfusion refractoriness. *Br J Haematol* 142: 348-360 (2008)

40. Kakaiya RM, Triulzi DJ, Wright DJ, Steele WR, Kleinman SH, Busch MP, Norris PJ, Hillyer CD, Gottschall JL, Rios JA, Carey P, Glynn SA: Prevalence of HLA antibodies in remotely transfused or alloexposed volunteer blood donors. *Transfusion* 50: 1328-1334 (2010)
41. Kao KJ, Cook DJ, Scornik JC: Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. *Blood* 68: 627-632 (1986)
42. Kao KJ, del Rosario ML: Role of class-II major histocompatibility complex (MHC)-antigen-positive donor leukocytes in transfusion-induced alloimmunization to donor class-I MHC antigens. *Blood* 92: 690-694 (1998)
43. Kao KJ: Plasma and platelet HLA in normal individuals: quantitation by competitive enzyme-linked immunoassay. *Blood* 70: 282-286 (1987)
44. Kao KJ, Scornik JC, Small SJ: Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies—an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation* 55: 192-196 (1993)
45. Kiefel V: HLA und Transplantation (vom 09.08.2005). (<http://www.tmed.med.uni-rostock.de/hla.pdf>). Download: 10.03.2011 20:45 (2005)
46. Kiefel V, König C, Kroll H, Santoso S: Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion* 41: 766-770 (2001)
47. Laundry GJ, Bradley BA, Rees BM, Younie M, Hows JM: Incidence and specificity of HLA antibodies in multitransfused patients with acquired aplastic anemia. *Transfusion* 44: 814-825 (2004)
48. Legler TJ, Fischer I, Dittmann J, Simson G, Lynen R, Humpe A, Riggert J, Schleyer E, Kern W, Hiddemann W, Köhler M: Frequency and causes of refractoriness in multiply transfused patients. *Ann Hematol* 74: 185-189 (1997)

49. Levin MD, de Veld JC, van der Holt B, van't Veer MB: Screening for alloantibodies in the serum of patients receiving platelet transfusions: a comparison of the ELISA, lymphocytotoxicity, and the indirect immunofluorescence method. *Transfusion* 43: 72-77 (2003)
50. Lo SC, Chang JS, Lin SW, Lin DT: Platelet alloimmunization after long-term red cell transfusion in transfusion-dependent thalassemia patients. *Transfusion* 45: 761-765 (2005)
51. Maniatis A: Criteria for clinical transfusion practice. In: Rouger P, Hossenlopp C (Herausgeber): *Blood transfusion in Europe--- the white book 2005*. Elsevier, Paris: S. 205-212 (2005)
52. Marschner S, Fast LD, Baldwin Iii WM, Slichter SJ, Goodrich RP: White blood cell inactivation after treatment with riboflavin and ultraviolet light. *Transfusion* 50: 2489-2498 (2010)
53. Maślanka K, Michur H, Zupańska B, Uhrynowska M, Nowak J: Leucocyte antibodies in blood donors and a look back on recipients of their blood components. *Vox Sang* 92: 247-249 (2007)
54. Monien S, Salama A, Schönemann C: ELISA methods detect HLA antibodies with variable sensitivity. *Int J Immunogenet* 33: 163-166 (2006)
55. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberú J: "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 86: 1111-1115 (2008)
56. Moroff G, Garratty G, Heal JM, MacPherson BR, Stroncek D, Huang ST, Ho W, Petz LD, Leach MF, Lennon SS, Rowe JM, Saleh MN, Arndt P, Foley K, Masei D, Postoway N: Selection of platelets for refractory patients by HLA matching and prospective crossmatching. *Transfusion* 32: 633-640 (1992)

57. Mueller-Eckhardt G, Hauck M, Kayser W, Mueller-Eckhardt C: HLA—C antigens on platelets. *Tissue Antigens* 16: 91-94 (1980)
58. Murphy MF, Metcalfe P, Thomas H, Eve J, Ord J, Lister TA, Waters AH: Use of leucocyte-poor blood components and HLA-matched-platelet donors to prevent HLA alloimmunization. *Br J Haematol* 62: 529-534 (1986)
59. Murphy MF, Metcalfe P, Ord J, Lister TA, Waters AH: Disappearance of HLA and platelet-specific antibodies in acute leukaemia patients alloimmunized by multiple transfusions. *Br J Haematol* 67: 255-260 (1987)
60. Murphy MF, Waters AH: Platelet transfusions: the problem of refractoriness. *Blood Rev* 4: 16-24 (1990)
61. Murphy K, Travers P, Walport M: Der Haupthistokompatibilitätskomplex und seine Funktionen. In: Murphy K, Travers P, Walport M (Herausgeber): *Janeway – Immunologie 7. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: S.247-267 (2009a)
62. Murphy K, Travers P, Walport M: Die Erzeugung von T-Zell-Rezeptor-Liganden. In: Murphy K, Travers P, Walport M (Herausgeber): *Janeway – Immunologie 7. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: S.228-247 (2009b)
63. Norris PJ, Lee JH, Carrick DM, Gottschall JL, Lebedeva M, de Castro BR, Kleinman SH, Busch MP: Long-term in vitro reactivity for human leukocyte antigen antibodies and comparison of detection using serum versus plasma. *Transfusion* 49: 243-251 (2009)
64. Novotny VM, van Doorn R, Rozier Y, D'Amaro J, Harvey MS, Brand A: Transfusion results of filtered and subsequently stored random platelet suspensions prepared from buffy coats. *Vox Sang* 63: 23-30 (1992)

65. Novotny VM, van Doorn R, Witvliet MD, Claas FH, Brand A: Occurrence of allogeneic HLA and non-HLA antibodies after transfusion of prestorage filtered platelets and red blood cells: a prospective study. *Blood* 85: 1736-1741 (1995)
66. Novotny VM: Prevention and management of platelet transfusion refractoriness. *Vox Sang* 76: 1-13 (1999)
67. Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, Champion MH, Snyder EL: Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to universal prestorage leukoreduction. *Transfusion* 44: 16-24 (2004)
68. Paul-Ehrlich-Institut: Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Instituts über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Einführung der Leukozytendepletion von zellulären Blutprodukten zur Transfusion (vom 18. August 2000).
(http://www.pei.de/cIn_092/nn_155904/SharedDocs/bekanntmachungen/2000/banz-174-14-09-2000-s18396.html). Download: 12.12.2010 20:55 Uhr (2000)
69. Peters PJ, Raposo G, Neefjes JJ, Oorschot V, Leijendekker RL, Geuze HJ, Ploegh HL: Major histocompatibility complex class II compartments in human B lymphoblastoid cells are distinct from early endosomes. *J Exp Med* 182: 325-334 (1995)
70. Powers A, Stowell CP, Dzik WH, Saidman SL, Lee H, Makar RS: Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy. *Transfusion* 48: 2549-2558 (2008)
71. Rebibou JM, Chabod J, Alcalay D, Coussediere MC, Deteix P, Touchard G, Dupont I, Thévenin C, Chalopin JM, Tiberghien P: Flow cytometric evaluation of pregnancy-induced anti-HLA immunization and blood transfusion-induced reactivation. *Transplantation* 74: 537-540 (2002)

72. Rebutta P: Refractoriness to platelet transfusion. *Curr Opin Hematol* 9: 516-520 (2002)
73. Regan L, Braude PR, Hill DP: A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy. *Hum Reprod* 6: 294-298 (1991)
74. Reil A, Keller-Stanislawski B, Günay S, Bux J: Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors. *Vox Sang* 95: 313-317 (2008)
75. Saarinen UM, Kekomäki R, Siimes MA, Myllylä G: Effective prophylaxis against platelet refractoriness in multitransfused patients by use of leukocyte-free blood components. *Blood* 75: 512-517 (1990)
76. Sachs U, Bux J: Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Blutkomponenten. In: Mueller-Eckhardt C, Kiefel V (Herausgeber): *Transfusionsmedizin* 3. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York: S. 247-270 (2004)
77. Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiss T, Sibelius U, Bux J: Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood* 107: 1217-1219 (2006)
78. Saito S, Ota S, Seshimo H, Yamazaki Y, Nomura S, Ito T, Miki J, Ota M, Fukushima H, Maeda H: Platelet transfusion refractoriness caused by a mismatch in HLA-C antigens. *Transfusion* 42: 302-308 (2002)
79. Santoso S, Mueller-Eckhardt G, Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: HLA antigens on platelet membranes. In vitro and in vivo studies. *Vox Sang* 51: 327-333 (1986)

80. Santoso S, Kalb R, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: The presence of messenger RNA for HLA class I in human platelets and its capability for protein biosynthesis. *Br J Haematol* 84: 451-456 (1993)
81. Sanz C, Freire C, Alcorta I, Ordinas A, Pereira A: Platelet-specific antibodies in HLA-immunized patients receiving chronic platelet support. *Transfusion* 41: 762-765 (2001)
82. Sanz C, Ghita G, Franquet C, Martínez I, Pereira A: Red-blood-cell alloimmunization and female sex predict the presence of HLA antibodies in patients undergoing liver transplant. *Vox Sang* 99: 261-266 (2010)
83. Sayeh E, Aslam R, Speck ER, Le-Tien H, Lazarus AH, Freedman J, Semple JW: Immune responsiveness against allogeneic platelet transfusions is determined by the recipient's major histocompatibility complex class II phenotype. *Transfusion* 44: 1572-1578 (2004)
84. Schiffer CA, Lichtenfeld JL, Wiernik PH, Mardiney MR Jr, Joseph JM: Antibody response in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer* 37: 2177-2182 (1976)
85. Schrezenmeier H, Seifried E: Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sang* 99: 1-15 (2010)
86. Seftel MD, Grawe GH, Petraszko T, Benny WB, Le A, Lee CY, Spinelli JJ, Sutherland HJ, Tsang P, Hogge DE: Universal prestorage leukoreduction in Canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness. *Blood* 103: 333-339 (2004)
87. Serious hazards of transfusion annual report: Summary. (<http://www.shotuk.org/wp-content/uploads/2010/06/SHOT-2009-Summary.pdf>). Download: 03.02.2011 21:55 Uhr (2009)

88. Sintnicolaas K, van Marwijk Kooij M, van Prooijen HC, van Dijk BA, van Putten WL, Claas FH, Novotny VM, Brand A: Leukocyte depletion of random single-donor platelet transfusions does not prevent secondary human leukocyte antigen-alloimmunization and refractoriness: a randomized prospective study. *Blood* 85: 824-828 (1995)
89. Slichter SJ: Understanding the effects of different types of white cells on patient's responses to transfusion: immunization versus tolerization. *Vox Sang* 83: 421-424 (2002)
90. Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, Kickler T, Lee E, McFarland J, McCullough J, Rodey G, Schiffer CA, Woodson R: Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood* 105: 4106-4114 (2005)
91. Sniecinski I, O'Donnell MR, Nowicki B, Hill LR: Prevention of refractoriness and HLA-alloimmunization using filtered blood products. *Blood* 71: 1402-1407 (1988)
92. Stroncek DF, Fadeyi E, Adams S: Leukocyte antigen and antibody detection assays: tools for assessing and preventing pulmonary transfusion reactions. *Trans Med Rev* 21: 273-286 (2007)
93. Stroncek DF, Rebullia P: Platelet transfusions. *Lancet* 370: 427-438 (2007)
94. Sullivan MT, Wallace EL: Blood collection and transfusion in the United States in 1999. *Transfusion* 45: 141-148 (2005)
95. Taaning E, Simonsen AC, Hjelms E, Svejgaard A, Morling N: Platelet alloimmunization after transfusion. A prospective study in 117 heart surgery patients. *Vox Sang* 72: 238-241 (1997)

96. Terasaki PI, McClelland JD: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204: 998-1000 (1964)
97. The MHC sequencing consortium: Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401: 921-923 (1999)
98. The Trial to Reduce Alloimmunization to Platelets Study Group: Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelet transfusions. *N Engl J Med* 337: 1861-1869 (1997)
99. Toy P, Lowell C: TRALI--definition, mechanisms, incidence and clinical relevance. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 21: 183-193 (2007)
100. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, Glynn SA, Hillyer CD, Carey P, Gottschall JL, Murphy EL, Rios JA, Ness PM, Wright DJ, Carrick D, Schreiber GB: The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion* 49: 1825-1835 (2009)
101. Uboldi de Capei M, Praticò L, Curtioni ES: Comparison of different techniques for detection of anti-HLA antibodies in sera from patients awaiting kidney transplantation. *Eur J Immunogenet* 29: 379-382 (2002)
102. Vamvakas EC: Meta-analysis of randomized controlled trials of the efficacy of white cell reduction in preventing HLA-alloimmunization and refractoriness to random-donor platelet transfusions. *Trans Med Rev* 12: 258-270 (1998)
103. van Marwijk Kooy M, van Prooijen HC, Moes M, Bosma-Stants I, Akkerman JW: Use of leukocyte-depleted platelet concentrates for the prevention of refractoriness and primary HLA alloimmunization: a prospective, randomized trial. *Blood* 77: 201-205 (1991)

104. Waßmuth R: Genetik, Polymorphismus und Nomenklatur des HLA-Systems. In: Waßmuth R: Einführung in das HLA-System. Ecomed Medizin, Landsberg: S. 11-31 (2005a)
105. Waßmuth R: HLA-Moleküle und Gene. In: Waßmuth R: Einführung in das HLA-System. Ecomed Medizin, Landsberg: S. 31-38 (2005b)
106. WHO Nomenclature Committee: HLA Alleles Numbers. (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>). Download: 07.02.2011 15:52 Uhr (2011)
107. Williamson LM, Wimperis JZ, Williamson P, Copplesstone JA, Gooi HC, Morgenstern GR, Norfolk DR: Bedside filtration of blood products in the prevention of HLA alloimmunization--a prospective randomized study. Alloimmunisation Study Group. Blood 83: 3028-3035 (1994)
108. Yazer MH, Podlosky L, Clarke G, Nahirniak SM: The effect of prestorage WBC reduction on the rates of febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelet concentrates and RBC. Transfusion 44: 10-15 (2004)
109. Yu Y, Feng Q, Zhang T, Ma CY, Zhang XJ, Ge GF, Lin ZL, Pan JC, Wang DQ, Luo Q, Tian YP: The effect of leukocyte depletion by filtration on the quality of apheresis platelets (Abstract). Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 17: 1067-1070 (2009)
110. Zimmermann R, Wittmann G, Zingsem J, Blasczyk R, Weisbach V, Eckstein R: Antibodies to private and public HLA class I epitopes in platelet recipients. Transfusion 39: 772-780 (1999)
111. Zupanska B, Uhrynowska M, Michur H, Maslanka K, Zajko M: Transfusion-related acute lung injury and leucocyte-reacting antibodies. Vox Sang 93: 70-77 (2007)

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst allen Patientinnen und Patienten, die durch ihre Teilnahme diese Arbeit erst ermöglichten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schrezenmeier und Frau Dr. Höchsmann für die Überlassung des Themas, die stets freundliche und geduldige Betreuung, sowie der großartigen Möglichkeit die Daten beim XXXI internationalen Kongress der ISBT in Berlin präsentieren zu dürfen.

Für das Sammeln der Blutproben gilt mein Dank dem gesamten Team der Transfusionsambulanz und im Besonderen Frau Schmid und Frau Müller.

Die Auswertung der Proben wäre ohne das Team des HLA-Labors unter Leitung von PD Dr. Mytilneos nicht möglich gewesen, hierfür herzlichen Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Pabst und Frau Fischer, die mich jederzeit geduldig, freundlich und mit größtem Einsatz unterstützt haben.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die Ermöglichung des Medizinstudiums und dieser Promotionsarbeit herzlichst bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank noch meiner Freundin S. Pflughar für ihr Verständnis und die soziale Unterstützung.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version entfernt.