

# Antikörpernachweis bei der Notfalltransfusion

## Ein Vergleich von 3 unterschiedlichen Methoden

M.U. Heim<sup>1</sup>, K. Alraun<sup>1</sup>, E. Hansen<sup>2</sup>, U. Pachmann<sup>1</sup>, M. Böck<sup>1</sup> und W. Mempel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Transfusionszentrum (Leiter: Prof. Dr. W. Mempel)  
 der Medizinischen Klinik III (Direktor: Prof. Dr. W. Wilmanns),

<sup>2</sup> Institut für Anaesthesiologie (Direktor: Prof. Dr. K. Peter), Klinikum Großhadern  
 der Ludwig-Maximilians-Universität München

### Transfusion in emergency situations Comparison of different techniques for antibody detection

**Abstract.** We compared the manual Polybrene technique to three standard methods (albumin/Coombs, LISS/Coombs, and enzyme/papain) on 113 red cell antibodies. Polybrene identified 8 antibodies of the Rhesus system missed by standard methods, whereas 3 antibodies could only be detected by the standard techniques. Four antibodies were identified only in saline solution at room temperature; 6 were found by use of Polybrene exclusively in the additional Coombs phase. In addition, 61 antibodies were tested by 4 different LISS. No considerable differences in the quality of the various LISS were seen. The manual Polybrene test appears to be suitable for crossmatching and rapid antibody identification in emergency situations.

Um eine Fremdbluttransfusion ohne die Gefahr eines hämolytischen Transfusionszwischenfalls durchführen zu können, ist neben der Blutgruppenbestimmung die Anwendung einer sensiblen Technik für die Kreuzprobe und den Antikörpersuchtest erforderlich. Für die Durchführung dieser unerläßlichen Maßnahmen besteht in der überwiegenden Anzahl der Fälle genügend Zeit. So sollten bereits bei der Aufnahme von Patienten, die einer Operation zugeführt werden sollen, Blutproben zur Blutgruppenbestimmung ins Labor eingesandt werden. Parallel zur Blutgruppenbestimmung sollte ein Antikörpersuchtest durchgeführt werden, wie es in den neuerstellten Richtlinien für die Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion gefordert wird [7]. Je nach Patientengut können so bei ca. 0,8–1,2% der Patienten irreguläre Antikörper nachgewiesen und differenziert werden, so daß frühzeitig kompatibles Blut ausgetestet und bereitgestellt werden kann [6, 8].

In der Regel werden mit einer sensiblen Nachweisttechnik zu diesem Zeitpunkt nahezu alle Antikörper erfaßt, so daß bei der Kreuzprobe nur noch in seltenen Fällen unerwartete Reaktionen auftreten. Daher kann die Zahl der gekreuzten und für die Operation ausgegebenen Konserven auf ein Mindestmaß beschränkt bleiben, da bei Blutungskomplikationen rasch und ohne serologische Probleme weitere Konserven zur Verfügung gestellt werden können. In diesen Fällen muß aber gewährleistet sein, daß mit einer ebenso schnellen wie sicheren Methode möglichst alle transfusionsmedizinisch relevanten Antikörper erfaßt werden [3]. Dies gilt ganz besonders für neu aufgenommene Patienten, die ohne ausreichende Zeit für die regulär durchzuführenden Untersuchungen bei akuten Blutverlusten rasch stabilisiert werden müssen. Die Durchführung einer Transfusion, ohne das endgültige Ergebnis einer Kreuzprobe abwarten zu können, sollte jedoch durch Einführung einer Schnellkreuzprobe zur seltenen Ausnahme werden.

Obwohl durch den Einsatz von LISS (low-ionic-strength solution) als Supplement anstelle von Albumin im Drei-Stufen-Test die Wärmeinkubation von 30–45 auf 5–15 min verkürzt werden konnte, blieb das zeitraubende 3malige Waschen und die anschließende Antihumanglobulinzugabe (Coombstest) unerläßlich, so daß eine sichere Transfusion ohne größeren Zeitverlust bisher nicht möglich war.

Bereits 1968 beschrieb Lalezari eine für alle Formen des Antikörpernachweises geeignete Methodik, die mehrere Verstärkerfaktoren für eine Hämagglutination in sich vereinigt [4]. Damit sollte ermöglicht werden, auf die bisher notwendige Antihumanglobulinzugabe zur Darstellung der angelagerten Antikörper zu verzichten. Nach der Antikörperbeladung der Erythrozyten mit LISS wird nunmehr durch Einbringung quarternärer Ammonium-Polymere die Oberflächenladungsdichte (Zetapotential) so drastisch erniedrigt, daß es zu einer unspezifischen Aggregation der Erythrozyten kommt. Im Anschluß wird mit einer hypertonen

Salzlösung der allergrößte Teil unspezifischer Bindungen aufgelöst, bevor auch die prinzipiell reversiblen Antikörper-bedingten Verbindungen angegriffen werden. Durch Vergleich mit einer Antikörper-freien Negativkontrolle kann das positive Ergebnis durch die verzögerte Auflösung der Agglutinate im Antikörper-haltigen Ansatz registriert werden. Obwohl schon lange Zeit diese Methode für die halb- und vollautomatische Maschinenanwendung eingesetzt worden war, wurde erst 1980 der Aggregationsvermittler Polybrene® (Fa. Merz & Dade) für die manuelle Testform empfohlen [5].

In der nachfolgenden Darstellung werden wir über unsere Ergebnisse mit der Polybrene-Technik im Vergleich mit den herkömmlichen Testverfahren wie LISS, Albumin und Enzym berichten.

## Material und Methoden

Mit 4 verschiedenen Testverfahren (Albumin/Coombs, LISS/Coombs, Enzym/Papain und Polybrene+/-Coombs) wurden 113 Antikörper-haltige Patientenserum untersucht, wovon 93 Antikörper bereits in unserem Routinescreening bei der Patienten-Blutgruppenbestimmung identifiziert worden waren. Die Lagerung bis zur Testung erfolgte bei  $-60^{\circ}\text{C}$ . 20 Antikörper wurden bei einem Parallelscreening frischer Patientenserum mit den o.g. 4 Methoden bei 200 Kreuzproben und 800 Antikörper-suchtesten nachgewiesen. Bei fehlendem Nachweis im LISS-Ansatz (Dialiss) wurde der Test mit 3 weiteren LISS-Lösungen (Reaktin/Ortho, MLB/Biotest und ENLISST/M&D/AHS) wiederholt. Zusätzlich wurden weitere 61 Antikörper (ebenfalls aus dem Routinescreening) nach Tiefkühlagerung mit den o.g. 4 LISS-Lösungen im Vergleich nachgetestet.

Die Inkubation mit LISS bei  $37^{\circ}\text{C}$  dauerte ca. 10 min. Im Albumin-Ansatz (Wärmeinkubation ca. 45 min) fand 22%iges Rinderalbumin Verwendung, bei fehlendem Nachweis bekannter Antikörper wurde der Test mit 3 anderen Albumin-lösungen verschiedener Hersteller wiederholt.

Vor dem Albumin- und LISS-Ansatz wurden die Seren mit der 5%igen Erythrozytensuspension 5–10 min bei  $20^{\circ}\text{C}$  inkubiert, zentrifugiert und die Ergebnisse dokumentiert.

Der Polybrene-Ansatz wurde wie folgt durchgeführt: 2 Tr Patientenserum (für die Negativkontrolle Antikörperfreies AB-Serum) wurden mit 1 Tr Testerythrozytensuspension und 1 ml LISS vermischt. Nach ca. 1 min Inkubation bei  $20^{\circ}\text{C}$  erfolgte die Zugabe von 2 Tr Polybrene-Lösung. Nach 15 bis maximal 60 s wurden die Ansätze zentrifugiert, der Überstand abgekippt, das Erythrozytensediment aufgeschüttelt und 2 Tr Resuspensionslösung hinzugefügt. Unter leichter Bewegung der Röhren wurde innerhalb einer Minute die im Gegensatz zur Negativkontrolle verzögerte Auflösung der Agglutinationen beobachtet.

Der Einstufen-Enzymtest erfolgte mit Papain (PAP) der Firma Biotest unter Inkubation der Erythrozytensuspension, Serum und Papainlösung bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 30 min.

Nach Abschluß aller vorgehend beschriebenen Ansätze erfolgte nach 3maligem Waschen die Zugabe von Antihumanglobulin (Seren verschiedener Hersteller nach Prüfung der Reaktivität), Zentrifugation und erneutes Ablesen der Reaktionen.

## Ergebnisse

Von den 113 identifizierten Antikörpern (Ak) ließen sich 8 Rhesus-Ak (6 Anti-D, 1 Anti-C und 1 Anti-e) *nur* mit Polybrene nachweisen (Tabelle 1). 6 weitere Ak (2 Anti-M und 4 Anti-Le<sup>a</sup>),

**Tabelle 1.** Rh-Antikörper

Spezifität	Anzahl <i>n</i>	Nachweis mit			
		POL	Alb	Liss	PAP
Anti-D	16	+	+	+	+
	6	+	○	○	○
	1	+	+	○	+
	1	+	○	+	+
Anti-C	1	+	+	+	+
	1	+	○	○	○
Anti-CD	1	+	+	+	+
Anti-C <sup>w</sup>	3	+	+	+	+
Anti-c	1	+	+	(+)	+
Anti-E	6	+	+	+	+
	1	+	○	(+)	+
Anti-e	1	+	○	○	○
Summe	39	39	29	30	31

**Tabelle 2.** Komplette Antikörper

Spezifität	Anzahl <i>n</i>	Nachweis mit			
		POL	Alb	Liss	PAP
Anti-M	1	+	+	+	○
	2 <sup>a</sup>	+	○	○	nd
	1 <sup>a</sup>	○	○	○	nd
Anti-N	1	+	+	+	nd
	1 <sup>a</sup>	○	○	○	nd
Anti-S	2	+	+	+	nd
Anti-Le <sup>a</sup>	14 (10) <sup>a</sup>	+	+	+	+
	4 <sup>a</sup>	+	○	○	○
	2 <sup>a</sup>	○	+	+	nd
Anti-Le <sup>b</sup>	3	+	+	+	+
Anti-P <sub>1</sub>	4 <sup>a</sup>	+	nd	nd	nd
	1 <sup>a</sup>	○	nd	nd	nd
Anti-HI	2	+	nd	nd	+
Anti-I	1 <sup>a</sup>	○	○	○	+
Summe	39	33			

<sup>a</sup> auch in der  $20^{\circ}\text{C}$  NaCl-Phase nachweisbar

+ = deutlich positive Reaktion; (+) = schwach positive Reaktion; ○ = keine Reaktion nachweisbar; nd = nicht durchgeführt

die ebenfalls nur im Polybrene-Ansatz reagierten, führten auch in der dem Albumin/LISS-Ansatz vorgeschalteten NaCl-Phase zu Agglutinationen (Tabelle 2). 4 Ak waren überhaupt nur in der NaCl-Phase nachweisbar (1 Anti-M, 1 Anti-N, 1 Anti-P<sub>1</sub> und 1 Anti-I). 2 mit Albumin und LISS coombsreaktive Lewis<sup>a</sup>-Ak zeigten keine Agglutinationen mit Polybrene. Ebenso entzog sich 1 Anti-K dem Polybrene-Nachweis. Wie aus den Tabellen 2 und 3 zu ersehen ist, ergaben sich im Polybrene-Ansatz *ohne* anschließende Antihumanglobulinzugabe Nachweisdefizite bei den Kell-(K), Kidd-(JK<sup>a</sup>), Lutheran-(Lu<sup>a</sup>) und Duffy-(Fy<sup>a</sup>)-Ak. 1 Anti-k (Cellano) ließ sich im Albumin-Ansatz nur mit homozygoten, mit Polybrene dagegen auch mit heterozygoten Zellen identifizieren, während

**Tabelle 3.** Inkomplette Antikörper

Spezifität	Anzahl <i>n</i>	Nachweis mit			
		POL	Alb	Liss	PAP
Anti-K	4	+	+	+	+
	2	+	+	+	○
	1	○	+	+	nd
	2	+ <sup>a</sup>	+	+	nd
Anti-k	1	+	(+)	○	nd
Anti-Kp <sup>d</sup>	1	+	+	+	○
Anti-Jk <sup>a</sup>	3	+	+	+	○
	2	+ <sup>a</sup>	+	+	○
	1	+	(+)	+	○
	1	+ <sup>a</sup>	(+) <sup>b</sup>	+ <sup>b</sup>	○
nti-Jk <sup>b</sup>	1	+	○	+	○
	1	+	+	+	○
Anti-Fy <sup>d</sup>	8	+ <sup>c</sup>	+	+	○
	1	+	○	+	nd
	1	+	+	○	nd
Anti-Lu <sup>a</sup>	1	+ <sup>a</sup>	+	+	nd
Anti-s	1	+	+	+	nd
Anti-Yt <sup>d</sup>	2	+	+	+	○
Summe	35	34	32	33	

<sup>a</sup> nur in der zusätzlichen Coombsphase nachweisbar

<sup>b</sup> nur gegen homozygote Zellen nachweisbar

<sup>c</sup> davon 1 Ak nur in der zusätzlichen Coombsphase nachweisbar

+ = deutlich positive Reaktion; (+) = schwach positive Reaktion; ○ = keine Reaktion nachweisbar; nd = nicht durchgeführt

mit keinem der 4 LISS-Medien eine Reaktion gelang.

Die zusätzlich mit 4 verschiedenen LISS getesteten 61 Ak ließen sich mit allen LISS-Lösungen nachweisen: 15 Anti-D, 2 Anti-C, 1 Anti-c, 2 Anti-E, 1 Anti-e, 3 Anti-C<sup>w</sup>, 29 Anti-K, 3 Anti-Fy<sup>a</sup>, 1 Anti-Jk<sup>a</sup>, 1 Anti-Jk<sup>b</sup>, 1 Anti-Le<sup>a</sup>, 1 Anti-Le<sup>b</sup>, 1 Anti-Di<sup>b</sup>.

In der Untersuchungsreihe waren mehrere Ak, die in der einen oder anderen Methode zu keiner Agglutination führten. Dabei ist wichtig zu beachten, daß bei fehlendem Nachweis im LISS- oder Albumin-Ansatz jeweils Lösungen von 4 verschiedenen Herstellern mit gleichem Ergebnis eingesetzt wurden.

Unspezifische Agglutinationen traten bei der Untersuchung der 1000 Patientenserum (200 Kreuzproben und 800 Antikörpersuchteste) mit Polybrene in 1,3% und mit LISS in 0,5% der Fälle auf.

## Diskussion

Der neue Aggregationsvermittler Polybrene zeigte bei den von uns untersuchten Ak bereits nach der ca. 5minütigen Raumtemperaturphase sehr hohe Quoten positiver Agglutinationsreaktionen. Die auch schon von anderen Autoren publizierte erhöhte Nachweisbarkeit von Rhesus-Ak sowie der

bessere Nachweis von einzelnen Ak mit heterozygoten Testzellen weist die Polybrene-Technik im Vergleich zu LISS und Albumin als die Methode mit der höchste Sensitivität aus [1]. Dies konnte in einer früheren Untersuchung mit Titrationsvergleichen von uns bestätigt werden [2]. Die bisher zur Verfügung stehenden Medien führen bei der Kreuzprobe zu erheblichen Zeitverzögerungen. Mit der Polybrene-Technik (20° C – ohne Coombsphase) lassen sich jedoch die meisten Antikörper nahezu ohne Zeitverlust nachweisen. Die wegen der Nachweisdefizite (z.B. im Kell-System) anschließend notwendige Antihumanglobulin-Zugabe erbrachte in unserer Untersuchung nur in wenigen Fällen einen zusätzlichen Antikörpernachweis, so daß bereits nach 3–5 min eine Transfusion mit hoher Sicherheit für den Patienten durchgeführt werden kann. In den seltenen Fällen zusätzlicher Reaktionen nach der Coombsphase bleibt in der Regel noch genügend Zeit, die Transfusion für einzelne Konserven aussetzen zu lassen, falls die Konserven wegen höchster Dringlichkeit vor Abschluß der Coombsphase (Dauer 6–8 min) ausgegeben werden mußten.

Das Ergebnis einer Polybrene-Notfallkreuzprobe muß jedoch durch eine Routinemethode abgesichert werden. Da vereinzelt Ak nur in der NaCl-Raumtemperaturphase nachgewiesen werden konnten, sollte ein entsprechender Ansatz parallel durchgeführt werden, der dann zur Bestätigung der Schnellkreuzprobe im Routineprogramm als LISS- oder Albumin-Drei-Stufentest fortgeführt werden kann.

## Schlußfolgerungen

Da es beim derzeitigen Stand der serologischen Testverfahren keine Technik gibt, die bei vertretbarem Aufwand alle Ak identifiziert, ist eine Kombination verschiedener Nachweisverfahren dringend erforderlich. Daher verwenden wir für große Reihenuntersuchungen (z.B. Ak-Screening bei der ersten Blutgruppenbestimmung) die Albumintechnik, da hier die langen Wärmeinkubationszeiten keine Rolle spielen. Die schnellere LISS-Technik entspricht den Anforderungen am Kreuzplatz am besten, wobei wir deutliche Unterschiede beim Einsatz verschiedener LISS-Lösungen im Gegensatz zu anderen Autoren nicht feststellen konnten [3].

Mit ausreichender serologisch technischer Erfahrung und Übung erbringt die Polybrene-Technik gute Ergebnisse. Sie kann insbesondere für die rasche Abklärung von zweifelhaften Reaktionen bei der Antikörperidentifizierung empfohlen werden. Durch den Einsatz bei der Kreuzprobe in Notfallsituationen läßt sich auch bei höchster Dringlichkeit die Gabe „ungekreuzter“ Blutkonserven meist vermeiden. Für die Transfusionspraxis ergibt sich daraus der große Vorteil, daß sich

der Anaesthetist bei der Konservenanforderung für die Operationen auf die erfahrungsgemäß notwendige Mindestmenge beschränken kann, da bei unerwarteten Blutungskomplikationen ausreichend getestete Konserven rascher als bisher zur Verfügung gestellt werden können.

Ein erheblicher Nachteil erschwert den routinemäßigen Einsatz von Polybrene bei der Kreuzprobe: Da sich die Antikörper-bedingten Agglutinate nach kurzer Zeit wieder auflösen, erfordert die Bewertung eine erhöhte Sorgfalt und Übung. Zusätzlich ist die aus forensischen Gründen erforderliche Kontrolle und Gegenzeichnung der Ergebnisse durch eine 2. Person meist nicht realisierbar. Bei Notfällen ist dies allerdings nicht von Bedeutung, da dort ohnehin nur selten ein Gegenlesen der Ergebnisse gewährleistet werden kann.

Mit der Einführung von Polybrene in der Transfusionsmedizin können auch in höchst akuten Situationen ausreichend getestete Blutkonserven zur Verfügung gestellt werden, so daß auch für den Notfall-Patienten ein Höchstmaß an Sicherheit gewährleistet ist.

**Zusammenfassung.** In der vorliegenden Untersuchung wird die manuelle Polybrene-Methode mit 3 Standardtechniken (Albumin/Coombs, LISS/Coombs und Enzym/Papain) beim Nachweis von 113 erythrozytären Antikörpern verglichen. 8 Rhesusantikörper wurden nur mit Polybrene nachgewiesen. Polybrene versagte bei 3 Antikörpern im Gegensatz zu den Standardmethoden. 4 Antikörper ließen sich nur in der Raumtemperaturphase (NaCl) nachweisen. 6 Antikörper zeigten mit Polybrene nur nach der anschließenden Antihumanglobulinzugabe eine positive Reaktion.

Zusätzlich wurden 61 Antikörper mit 4 verschiedenen LISS getestet, ohne beträchtliche Unterschiede in der Qualität feststellen zu können. Der manuelle Polybrene-Test erscheint für die Kreuzprobe und rasche Antikörpersuche insbesondere in Notfallsituationen geeignet.

## Literatur

1. Fisher GA (1983) Use of the manual polybrene test in the routine hospital laboratory. *Transfusion* 23:151
2. Heim MU, Alraun K, Eckstein R, Pachmann U, Leeping M, Mempel W (1987) Polybrene® zum Nachweis erythrozytärer Antikörper. *Lab Med* 11:108
3. Kretschmer V, Gerdes R, Bähr E, Koßmagn A (1987) Schnellkreuzprobe. *Lab Med* 11:53
4. Lalezari P (1968) A new method for detection of red cell antibodies. *Transfusion* 8:372
5. Lalezari P, Jiang AF (1980) The manual Polybrene test: a simple and rapid procedure for detection of red cell antibodies. *Transfusion* 23:151
6. Maurer C, Büttner J (1975) Die Häufigkeit irregulärer Erythrozyten-Antikörper. *Dtsch Med Wochenschr* 100:1567
7. Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Neufassung 1987) Wiss. Beirat der BÄK und vom BGA. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln
8. Schönitzer D, Rosmanith, Kilga-Nogler S (1985) Aktuelle Probleme der Bluttransfusion – Die Verantwortlichkeit des transfundierenden Arztes. *Infusionstherapie* 12:170

Eingegangen am 8. Oktober 1987

Dr. M.U. Heim  
Medizinische Klinik III  
Klinikum Großhadern  
Marchioninistraße 15  
D-8000 München 70