

# Verbesserung der Versorgung von Patienten mit seltenen Phänotypen durch systematische Spendersuche mit molekularbiologischen Methoden

PD Dr. med. Franz F. Wagner

Institut Springe

DRK-Blutspendedienst NSTOB gemeinnützige GmbH

## Zusammenfassung

Die Aufklärung der molekularen Ursache vieler Blutgruppenantigene und die Entwicklung von Methoden zur Hochdurchsatz-Genotypisierung ermöglichte es in den letzten Jahren, unabhängig von der Verfügbarkeit geeigneter Testseren gezielt Spender, die „seltenes Blut“ besitzen, zu suchen. Auf diese Art wurde die Versorgungssituation für einige vergleichsweise häufig benötigte Spezifitäten wie Lu(b) negativ entscheidend verbessert.

## Summary

In the last few years, the identification of the polymorphisms underlying many blood group antigens and the development of methods for high-throughput genotyping allowed to screen for donors with "rare blood" independent of the availability of suitable test sera. As a result, the standard of support was considerably increased for several often needed specificities like Lu(b) negative.

## Hintergrund

Seit Jahrzehnten ist die Versorgung eines Patienten, der einen Antikörper gegen ein hoch prävalentes Antigen gebildet hat, eine Herausforderung für transfusionsmedizinische Einrichtungen. Typischerweise ist weniger als 1 von 1.000 Blutpräparaten verträglich. Für andere Antikörperspezifitäten übliche Versorgungsstrategien wie Antigenaustestung im Bedarfsfall oder „Durchkreuzen“ versagen hier, da in einem nicht speziell vorbereiteten Blutdepot im Regelfall kein einziges passendes Präparat vorrätig sein wird.

Im Jahr 2002 publizierten A. Seltam et al. (1) eine Beobachtungsstudie zur Versorgungssituation bei derartigen Patienten. Es zeigte sich, dass es in etwa 30 % zu Abweichungen von der initial beabsichtigten Versorgungsstrategie kam: Zunächst angeforderte Blutpräparate wurden als nicht mehr notwendig eingestuft, Indikationen zur Transfusion wurden angesichts der Schwierigkeiten und Kosten bei der Präparatebeschaffung strenger gestellt, diagnostische Eingriffe wurden abgesagt. Auch wenn in der Studie keine ernsthaften Komplikationen beobachtet wurden, entstand der Eindruck, dass die Versorgung derartiger Patienten sich nicht am üblichen Standard messen kann.

Weshalb ist die Versorgung so kompliziert? Im Prinzip kommen drei Probleme zusammen:

1) Nicht jedes Labor ist in der Lage, den entsprechenden Antikörper korrekt zu identifizieren. Es vergeht erhebliche Zeit, bis das Problem überhaupt als solches identifiziert ist und mit der Beschaffung verträglicher Präparate begonnen werden kann. Selbst wenn der Antikörper identifiziert ist, stellt das Ausschließen zusätzlicher Antikörper eine Herausforderung dar. Lösungsansätze für dieses Problem bieten beispielsweise rekombinante Blutgruppenproteine, die einfache Neutralisationstests erlauben (2) und die Laboratorien unabhängig vom Zugriff auf seltene Zellen machen. Diese sind derzeit jedoch noch nicht kommerziell verfügbar.

2) Einige Phänotypen sind so selten, dass es vermutlich nur ganz wenige passende Blutspender gibt. „Bombay“, Rhesus null, p – diese Phänotypen sind durch das Fehlen routinemäßig bestimmter Antigene (bei Rhesus null fehlen die Antigene C, c, D, E und e) oder das obligatorische Vorliegen isoagglutininartiger, starker natürlicher Antikörper (Anti-H bei Bombay, Anti-PP1Pk bei p) derart auffällig, dass es ausgeschlossen erscheint, dass sie bei der Untersuchung einer

Blutspende nicht auffallen. Dennoch haben auch große Blutspendedienste meist nur 1 bis 2 passende Spender. Eine sichere Versorgung der entsprechenden Patienten ist derzeit ohne Rückgriff auf kryokonservierte Präparate nahezu aussichtslos.

**3)** Einige seltene Phänotypen sind genau genommen gar nicht so selten, es ist nur selten, dass sie unter Blutspendern identifiziert werden. In diese Gruppe gehörten genau die Antigene, gegen die in der Studie von Seltsam et al. am häufigsten Antikörper gefunden wurden und bei denen in der Versorgung am häufigsten Probleme auftraten: Anti-Vel mit einer Frequenz von 1:2.000 - 1:5.000; anti-Kp<sup>b</sup> (1:10.000), Anti-Yt<sup>a</sup> (1:500), Anti-Lu<sup>b</sup> (1:1.000). Dies überrascht nicht, da ja nicht nur Spender vergleichsweise häufig sind, sondern auch Patienten, die den entsprechenden Antikörper bilden können. Bei diesen Spezifitäten gründet sich das Versorgungsproblem vor allem auf die mangelhafte Austestung der Spender: Bei jährlich in Deutschland etwa 4 Millionen transfundierten Erythrozytenpräparaten bedeutet selbst eine Frequenz von 1:10.000, wie bei Kp<sup>b</sup>, dass jährlich 400 Antigen-negative Präparate transfundiert werden – also in etwa jeden Tag eines. Das Problem liegt darin, dass der ganz



überwiegende Teil dieser Präparate nicht der Versorgung von Patienten mit Anti-Kp<sup>b</sup> dient, sondern ungezielt an Patienten transfundiert wird, die derartige Präparate überhaupt nicht benötigen.

### Probleme bei der Spendersuche

Die Lösung für die Versorgung von Patienten mit Anti-Vel, Anti-Kp<sup>b</sup>, Anti-Yt<sup>a</sup> und Anti-Lu<sup>b</sup> scheint auf der Hand zu liegen: Es müssen mehr Spender typisiert werden. Wieso wurde das so lange vernachlässigt?

Auch hier kommen wieder eine Reihe von Problemen zusammen. Das Hauptproblem ist jedoch sicher die begrenzte Verfügbarkeit und mäßige Qualität der vorhandenen Antisera:

Die alltägliche Blutgruppenbestimmung in den meisten großen

Blutspendediensten erfolgt mittels direkter Agglutination auf Mikrotiterplatten im Hochdurchsatz. Diese Methode ist hervorragend zur Bestimmung der Antigene des AB0- und Rhesus-Blutgruppensystems geeignet; auch K (Kell) bereitet wenig Probleme. Die verfügbaren Antisera für Kp<sup>b</sup>, Yt<sup>a</sup> und Lu<sup>b</sup> verlangen dagegen den Nachweis im indirekten Coombstest, der sich auf dieser Plattform nicht realisieren lässt. Hochtitriges Anti-Vel ist prinzipiell geeignet, jedoch kaum verfügbar.

Typischerweise ist die Qualität der erhältlichen Antisera derart schlecht, dass an einen verdünnten Einsatz nahezu nicht zu denken ist. Möchte man jedoch in konventioneller Kartentechnik screenen, benötigt man ca. 25 µl Antiserum pro getestetem Spender – das heißt mit 1 ml kann man 40 Spender untersuchen, mit 250 ml (entsprechend der Menge an

Plasma, die über eine Vollblutspende gewonnen werden kann) gerade einmal 10.000 Spender – dies wäre vermutlich ausreichend für das Auffinden von gerade einmal 1 Kp<sup>b</sup>-negativem Spender oder 2 Vel negativen Spendern.

### Spendersuche mit speziell hergestellten monoklonalen Antikörpern

Ein möglicher Lösungsansatz ist die Erzeugung von monoklonalen Antikörpern gegen die hoch frequenten Antigene. Dieser Weg wurde erfolgreich in Japan beschritten. Die monoklonalen Antikörper sind prinzipiell beliebig verfügbar, die Typisierung kann auf konventionellen Blutgruppenautomaten nach spezieller Aufbereitung durchgeführt werden. In Japan wurden mit dieser Technologie beispielsweise Tausende Jr<sup>a</sup>-negativer Spender gefunden. Leider sind für die in Westeuropa benötigten Spezifitäten keine geeigneten monoklonalen Antikörper verfügbar.

### Spendersuche mit molekularen Methoden

Da mittlerweile für die meisten Blutgruppenantigene die ursächlichen Polymorphismen (DNS-Sequenzvarianten) bekannt sind, ergibt sich prinzipiell die Möglichkeit, an Stelle der

## Molekulare und serologische Diagnostik

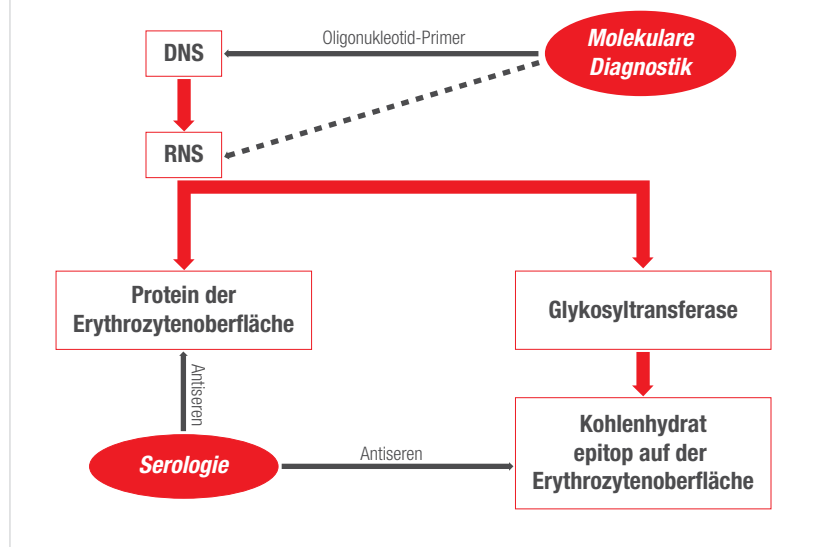


Abbildung 1

Blutgruppenantigene beruhen auf Polymorphismen in Proteinen oder Kohlenhydraten der Erythrozytenoberfläche. Die Erbinformation dazu ist in der DNS enthalten, aus der RNS Proteine synthetisiert werden, die entweder direkt in die Erythrozytenoberfläche gelangen oder als Glykosyltransferasen Veränderungen der Verzuckerung bedingen. Der serologische Nachweis erfordert Antikörper und richtet sich direkt auf die Antigene der Erythrozytenoberfläche, die molekulare Testung benutzt im Regelfall Oligonukleotide und setzt meist bei der DNS (seltener RNS) an.

Antigene den ursächlichen Polymorphismus zu bestimmen (**Abbildung 1**). Gut geeignet für die molekulare Spendersuche sind seltene Phänotypen, die auf dem homozygoten Auftreten eines bestimmten, seltenen Alleles beruhen. Unter den 4 wichtigsten Spezifitäten fallen 3 in diese Kategorie: Der Lu(b<sup>-</sup>)-Phänotyp beruht in Deutschland ganz überwiegend auf dem homozygoten Vorhandensein des *LUA*-Alleles, das sich vom häufigen *LUB*-Allel durch einen einzelnen Nukleotidaustausch unterscheidet, der zu einem Austausch von Arginin in Histidin an Position 77 des BCAM-Proteins führt. Auch der Yt(a<sup>-</sup>)- und der Kp(b<sup>-</sup>)-Phänotyp sind bis auf seltene Ausnahmen Folge eines einzelnen, spezifischen Nukleotidaustauschs.

### Vorteile der molekularen Spendersuche

Der größte Vorteil der molekularen Spendersuche wird gerade bei der Identifizierung von Spendern, denen hoch frequente Antigene fehlen, deutlich: Man ist unabhängig von der Verfügbarkeit qualitativ guter Antisera. Die Identifizierung der Spender beruht auf einem völlig anderen Prinzip (**Abbildung 1**). Die benötigten Oligonukleotidprimer und -sonden lassen sich am Schreibtisch entwerfen und können nach Maß synthetisiert werden. Auch wenn von der Idee bis zum einsatzfähigen Nachweissystem in der Regel einige Zeit vergeht und oft viel Feinschliff erforderlich ist, gibt es kein grundsätzliches Hindernis mehr, die Bestimmung in jedem Labor durchzuführen.

Ein weiterer Vorteil der molekularen Spendersuche ist die Möglichkeit der Multiplex-Bestimmung. Dies bedeutet, dass in einer Untersuchung gleichzeitig auf verschiedene Polymorphismen untersucht wird. Die Auftrennung der Ergebnisse kann über unterschiedliche Längen der PCR-Produkte, unterschiedliche Farben der Fluoreszenz, unterschiedliche Positionen auf einem Chip oder unterschiedliche Form und Farbe von Beads beruhen. Die Möglichkeit der Multiplex-Bestimmung reduziert die Kosten pro untersuchtem Merkmal erheblich. Besonders vorteilhaft für die Suche nach Spendern mit seltenen Phänotypen ist, dass typischerweise die inkrementiellen Kosten bis zu einer bestimmten Anzahl Polymorphismen minimal sind: Ein erheblicher Teil der Kosten entsteht bereits durch das oft spezielle Equipment, DNA-Isolierung und DNA-Polymerase. Der Kostenanteil für Oligonukleotide zur Detektion eines spezifischen Polymorphismus ist demgegenüber oft gering. Mit anderen Worten: Hat man erst einmal beschlossen, überhaupt Spender mit molekularen Methoden zu screenen, entstehen durch die zusätzliche Untersuchung auf weitere Merkmale kaum noch Kosten. Dies erleichtert natürlich die Entscheidung, auch nach seltenen Phänotypen zu suchen, die auf den ersten Blick nicht

besonders wichtig oder wenig aussichtsreich erscheinen.

### Grenzen der molekularen Spendersuche

Nicht in jedem Fall ist mit den derzeit vorhandenen Technologien eine molekulare Spendersuche möglich oder sinnvoll. Vorbedingung ist selbstverständlich, dass die molekulare Ursache bekannt sein muss – dies ist leider noch nicht bei allen seltenen Phänotypen der Fall. Schwierig wird es auch, wenn es keine einheitliche molekulare Ursache gibt, sondern eine Vielzahl unterschiedlicher Ursachen. Dies ist gerade bei sogenannten „Null-Phänotypen“, bei denen ein nicht exprimiertes oder funktionloses Protein vorliegt, öfter der Fall. Eine korrekte Vorhersage des Phänotyps kann in solchen Fällen nur erfolgen, wenn man auf alle möglichen Ursachen untersucht, was mit den derzeit üblichen Techniken sehr aufwändig wird.

### Kommerzielle Verfahren

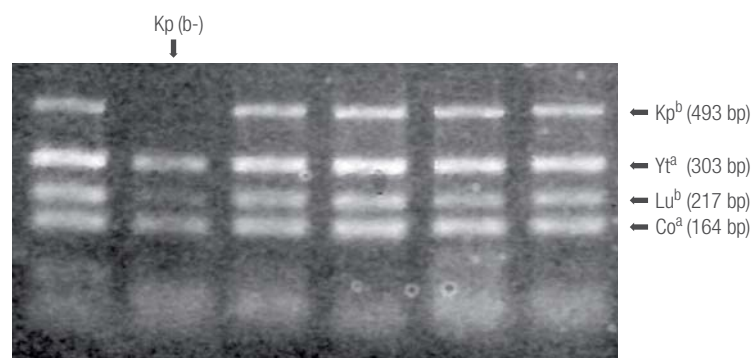
Es sind eine Reihe kommerzieller Testverfahren zur molekularen Hochdurchsatz-Spendertypisierung entwickelt worden. Fast alle erfassen auch einige seltene Phänotypen und können damit zur molekularen Spendersuche benutzt werden.

Goldstandard für die molekulare Spendertypisierung dürfte nach wie vor der BloodChip® sein, der die Identifizierung von über 200 Genotypen und über 60 Phänotypen in 9 Blutgruppensystemen erlaubt. Erkannt werden unter anderem folgende seltene Phänotypen: Kp(b-), Js(b-), Fy(a-b-), Jk(a-b-), U-, Di(b-), Co(a-). Auf Grund der nach wie vor hohen Kosten liegt der Einsatzbereich des BloodChips jedoch eher in der Abklärung von Problemfällen als im groß angelegten Spenderscreening.

Mittlerweile wird vom gleichen Hersteller mit dem ID Core® und ID Core+® -System auf Basis fluoreszenzkodierter Beads (Luminex-Technologie) eine kostengünstigere Alternative angeboten, die im Falle des ID Core+ immerhin noch die Identifizierung von 33 Antigenen erlaubt.

Eine vor allem auf dem amerikanischen Markt gut eingeführte, mittlerweile ebenfalls CE-markierte Alternative ist der HEA-BeadChip®. Auch hier erfolgt die Unterscheidung der einzelnen Reaktionen an Hand unterschiedlich farbkodierter Beads, die Auswertung erfolgt automatisiert mit einem speziellen Mikroskop. Unter anderem werden folgende seltene Phänotypen identifiziert: Kp(b-), Js(b-), Fy(a-b-), Lu(b-), Jo-, Hy-, LW(a-), Di(b-), Co(a-), Sc:-1.

## Identifizierung eines Kp(b-) Spenders mittels Agarosegelelektrophorese



**Abbildung 2**

Bei der Multiplex-PCR werden 4 PCR-Produkte erzeugt, die spezifisch für die häufigen Allele sind, die dem Kp(b+), Yt(a+), Co(a+) und Lu(b+)-Phänotyp zugrunde liegen. In der zweiten Bahn wurde ein Kp(b-) Spender untersucht, hier fehlt die Kp(b)-spezifische Bande, was im Vergleich mit den anderen Bahnen sofort auffällt.

### In house-Verfahren

Ein alternativer Weg bei der molekularen Spendersuche ist die Benutzung von nicht CE-markierten In house-Verfahren zur initialen Identifizierung der Spender, gefolgt von einer serologischen Bestätigung des erwarteten Phänotyps. Vorteile dieses Vorgehens sind der geringere qualitative Aufwand und damit verbunden geringere Kosten.

Im DRK-Blutspendedienst NSTOB haben wir in letzter Zeit zwei derartige Methoden zur molekularen Spendersuche entwickelt:

Multiplex-SSP-PCR im Agarose-Gel und gepoolte Kapillarelektrophorese.

### Multiplex-PCR im Agarose-Gel

Diese Methode (3) ist eine Fortentwicklung der in der Immunhämatologie oft eingesetzten PCR-SSP (PCR mit sequenz-spezifischen Primern) in

Agarose-Gel-Technik. Zwei wesentliche Verbesserungen sind eine vereinfachte DNA-Isolierungstechnik und das Weglassen einer Kontrollreaktion:

An Stelle einer normalen DNA-Isolierung wird lediglich eine krude Aufbereitung in zwei Pipettierschritten (Zufügen von Lyse- und Stopplösung) vorgenommen. Die sonst in der DNA-Isolierung üblichen Fällungs-, Zentrifugations- oder Magnetseparationschritte fallen vollständig weg. Anschließend erfolgt eine Amplifikation in einem einzelnen PCR-Gefäß und eine Auftrennung der PCR-Produkte in einem Agarose-Gel. Die PCR-Produkte werden nach Anfärbung mit Ethidiumbromid mittels Fluoreszenz nachgewiesen. Die Reaktion ist so eingestellt, dass im Normalfall, d. h. beim Vorliegen der häufigen Allele, 4 annähernd gleich starke Banden entstehen. Besitzt ein Spender eines dieser häufigen Allele nicht,

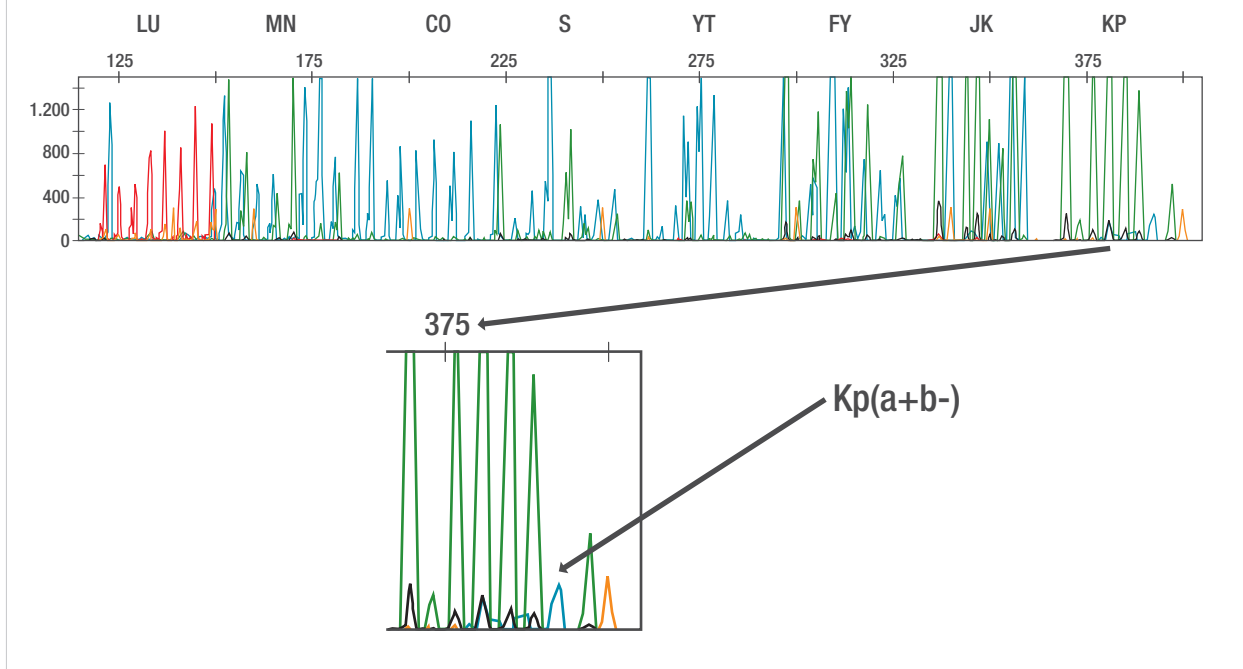
fehlt die entsprechende Bande, was zu einer sehr auffälligen und sofort erkennbaren Veränderung des Bandenmusters führt (Abbildung 2).

Durch systematische Testung von Spendern mit dem Phänotyp 0 Rh neg K neg wurden 10 Yt(a-)-Spender, 6 Co(a-)-Spender, 5 Lu(b-) Spender und 1 Kp(b-) Spender identifiziert.

### Gepoolte Kapillarelektrophorese

Um die Auswertung zu automatisieren, wurde das Verfahren auf Kapillarelektrophorese umgestellt (4). Diese Nachweismethode bietet im Vergleich zur Agarosegelelektrophorese eine deutlich bessere Auflösung, bei dem derzeitigen Verfahren werden 64 unterschiedliche Positionen unterschieden. Jeweils 8 Positionen gehören zu einer Probe (angesetzt in zwei Multiplex-PCRs), der Einsatz von 8 Varianten der Multiplex-PCR, die 8 leicht unterschiedliche Produktgrößen liefern, erlaubt die gleichzeitige Analyse von 8 Proben in einem Lauf. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt nun durch Fluoreszenz, die spezifischen Primer sind mit derartigen Farbstoffen markiert. Je nachdem welches Allel vorliegt, erfolgt die Fluoreszenz in einer von zwei Farben. Der seltene Phänotyp wird somit nicht mehr alleine durch das Fehlen eines Produktes erkannt, sondern

## Identifizierung eines Kp(b-) Spenders mittels gepoolter Kapillarelektrophorese



**Abbildung 3**

**Oberes Panel:** Bei der gepoolten Kapillarelektrophorese werden die PCR-Produkte an Hand der Fluoreszenz erkannt. Aus der groben Position ergibt sich das untersuchte Allelsystem, aus der genauen Position der untersuchte Spender.

**Unteres Panel:** In der Detailvergrößerung erkennt man, dass einer der 8 Spender statt der grünen Kp(b)-Bande lediglich die blaue Kp(a)-Bande besitzt. Dieser Spender ist Kp(a+b-).

durch das Auftreten eines Produktes in einer anderen Farbe, was eine stabilere Detektion erlaubt (**Abbildung 3**). Zudem ist das Verfahren gut geeignet zur automatischen Auswertung.

Durch systematische Testung von Spendern mit gepoolter Kapillarelektrophorese wurden mittlerweile 125 Yt(a-)-Spender, 114 Co(a-)-Spender, 44 Lu(b-) Spender und 8 Kp(b-) Spender identifiziert.

### Auswirkungen auf die Versorgungssituation

Durch die gezielte Suche nach Spendern hat sich die Anzahl von bekannten Spendern mit seltenen Phänotypen innerhalb weniger Jahre

vervielfacht: Die von Spendern mit seltenen Phänotypen gespendeten Präparate werden für ca. 3 Wochen in einem speziellen Laborlager zurückgehalten und gehen erst dann in den freien Verkauf. Dies ermöglicht es mittlerweile, meistens einen relevanten Bestand „seltener“ Präparate auf Lager zu haben. Aktuell (Stand 31.7.11) waren beispielsweise 9 Yt(a-), 8 Co(a-) und 4 Lu(b-) Präparate im Bestand. Da typischerweise noch die Rhesusformel und ABO-Blutgruppe beachtet werden müssen, kann es nach wie vor zu Versorgungsengpässen kommen. Immer öfter aber wird der Idealzustand erreicht, dass auch Patienten mit derartigen Antikörpern ohne Vorlaufzeit mit frischen Präparaten versorgt werden können.

Danksagung

Ich danke Frau R. Bittner für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Die Literaturhinweise finden Sie im Internet zum Download unter: [www.drk-haemotherapie.de](http://www.drk-haemotherapie.de)