

# Genetische Typisierung von Erythrozytenantigenen bei Blutspendern

## 1. Typisierung von Blutspendern auf ein erweitertes Antigenespektrum

Etwa ein bis zwei Prozent der Erythrozytenkonzentrate in Westeuropa und Nordamerika werden für Patienten angefordert, die irreguläre antierythrozytäre Antikörper besitzen (1). Im Normalfall erfolgt die Versorgung mit Blut, welches die jeweiligen korrespondierenden Antigene nicht aufweist. Der Aufwand der Blutbanken, kompatible Erythrozytenkonzentrate zu finden, korreliert sowohl mit der Anzahl typisierter Spender in den Datenbanken als auch mit der Phänotypenhäufigkeit des gesuchten Typs. Eine hohe Anzahl (vor-) typisierter Blutspender garantiert kurze Reaktionszeiten vom Zeitpunkt der Anforderung bis zur Auslieferung an die Krankenhäuser. Sind im Gegensatz dazu nur wenige Typisierungsergebnisse in den Spenderdatenbanken vorhanden, ist das mit einem hohen akuten Typisierungsaufwand sowie schlecht vorhersehbaren Suchergebnissen verbunden (2).

Um derartige Situationen zu vermeiden und im Anlassfall rasch kompatible Blutprodukte zur Verfügung stellen zu können, betreiben die meisten transfusionsmedizinischen Zentren gezielte Typisierungsprogramme, mit denen sie einen Teil der

Mehrfachspender über ABO, RhD, Kell und Rh-Phänotyp hinausgehend bezüglich vieler weiterer relevanter erythrozytärer Antigene typisieren.

### 1.1 Grenzen serologischer Typisierungsansätze

Gerade die Typisierung erythrozytärer Antigene war sehr lange eine rein serologische Domäne. Prinzipiell sind alle Antigene, da sie serologisch definiert sind, der Phänotypisierung zugänglich. Es sind auch für die wichtigsten Spezifitäten Typisierungsreagenzien sehr guter Qualität vorhanden, die nicht kreuzreagieren. Für viele Spezifitäten gibt es monoklonale Reagenzien, die immer in ausreichenden Mengen und mit adäquater Qualität zur Verfügung stehen. Für einige andere Spezifitäten stehen polyklonale Antisera zur Verfügung. Trotzdem ist das Spektrum käuflicher CE-zertifizierter Reagenzien mit etwa 30 Spezifitäten doch limitiert und vor allem größere Zentren haben regelmäßig einige Patienten mit Antikörperspezifitäten zu versorgen, die mit den kommerziellen Reagenzien nicht abgedeckt werden können (z. B.: Anti-Yt<sup>a</sup>). In diesen Fällen müssen CE-zertifizierte Reagenzien durch Patientenmaterial oder Referenzmaterial, dass durch nationale oder internationale Programme (z. B. SCARF) ausgetauscht wird, ersetzt werden.

**Dr. med. Christof Jungbauer**  
Österreichisches Rotes Kreuz  
Blutspendezentrale für Wien, Niederösterreich und Burgenland  
Stellvertretender Medizinischer Leiter  
Laborleiter

### Zusammenfassung

Während des letzten Jahrzehnts haben molekularbiologische Methoden auch bei der routinemäßigen Spendertypisierung von erythrozytären Antigenen in den Blutbanken Einzug gehalten. Das Ziel dieser Typisierung eines Teils der Mehrfachspender bezüglich eines größeren Antigenespektrums ist die adäquate und rasche Versorgung von Patienten mit irregulären antierythrozytären Antikörpern mit geeigneten Blutprodukten. Der Suche nach Spendern mit seltenen Bluttypen kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu. Die genetische Spendertypisierung ist damit neben der patientenseitigen Typisierung als Unterstützung bei der Abklärung komplexer Fälle und der nicht-invasiven pränatalen RHD-Bestimmung bei Feten RhD-negativer Schwangerer eines der drei Hauptanwendungsgebiete erythrozytärer molekularbiologischer Diagnostik.

### Summary

During the last decade molecular methods have been adopted for routine red cell antigen typing of a subset of repeat donors in blood establishments. The aim of typing blood donors for an extended spectrum of red cell antigens is to facilitate an adequate and efficient supply of patients carrying red cell antibodies with suitable blood units. A special task is screening for donors with rare blood types. Donor genotyping is along with patient genotyping as support of the red cell reference laboratory for resolving complex cases and non-invasive prenatal RHD-typing in RhD-negative pregnancies one of three fields of red cell molecular typing.

## ISBT Blutgruppensysteme

No.	Systemname	ISBT Symbol	Anzahl der Antigene	Gennamen	Chromos. Lokalisation	CD Code
1	ABO	ABO	4	<i>ABO</i>	9q34.2	
2	MNS	MNS	46	<i>GYPA, GYPB, GYPE</i>	4q31.21	CD235
3	P1PK	P1PK	2	<i>A4GALT</i>	22q13.2	
4	Rh	RH	52	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11	CD240
5	Lutheran	LU	20	<i>LU</i>	19q13.32	CD239
6	Kell	KEL	32	<i>KEL</i>	7q34	CD238
7	Lewis	LE	6	<i>FUT3</i>	19p13.3	
8	Duffy	FY	5	<i>DARC</i>	1q23.2	CD234
9	Kidd	JK	3	<i>SLC14A1</i>	18q12.3	
10	Diego	DI	22	<i>SLC4A1</i>	17q21.31	CD233
11	Yt	YT	2	<i>ACHE</i>	7q22.1	
12	Xg	XG	2	<i>XG, MIC2</i>	Xp22.33	CD99
13	Scianna	SC	7	<i>ERMAP</i>	1p34.2	
14	Dombrock	DO	7	<i>ART4</i>	12p12.3	CD297
15	Colton	CO	4	<i>AQP1</i>	7p14.3	
16	Landsteiner-Wiener	LW	3	<i>ICAM4</i>	19p13.2	CD242
17	Chido/Rodgers	CH/RG	9	<i>C4A, C4B</i>	6p21.3	
18	H	H	1	<i>FUT1</i>	19q13.33	CD173
19	Kx	XK	1	<i>XK</i>	Xp21.1	
20	Gerbich	GE	11	<i>GYPE</i>	2q14.3	CD236
21	Cromer	CROM	16	<i>CD55</i>	1q32.2	CD55
22	Knops	KN	9	<i>CR1</i>	1q32.2	CD35
23	Indian	IN	4	<i>CD44</i>	11p13	CD44
24	Ok	OK	3	<i>BSG</i>	19p13.3	CD147
25	Raph	RAPH	1	<i>CD151</i>	11p15.5	CD151
26	John Milton Hagen	JMH	6	<i>SEMA7A</i>	15q24.1	CD108
27	I	I	1	<i>GCNT2</i>	6p24.2	
28	Globoside	GLOB	1	<i>B3GALT3</i>	3q26.1	
29	Gill	GIL	1	<i>AQP3</i>	9p13.3	
30	Rh-associated gp	RHAG	3	<i>RHAG</i>	6p21-qter	CD241
31	Forssman	FORS	1	<i>GBGT1</i>	9q34.2	
32	Junior	JR	1	<i>ABCG2</i>	4q22	CD338
33	Langereis	LAN	1	<i>ABCB6</i>	2q36	

**Tabelle 1**

modifiziert nach <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-terminology/>

Oft wird in-house Patientenmaterial zu Screeningzwecken und „kostbares“ Referenzmaterial oder auch

nur sporadisch verfügbare kommerzielle Sera zur Bestätigung eingesetzt. Zusätzlich sind einige dieser Spezifi-

täten nur schwach reaktiv (z. B.: Anti-Do<sup>a</sup>, -Do<sup>b</sup>; Anti-Js<sup>a</sup>, Js<sup>b</sup>) oder treten nur selten als singuläre Spezifität auf.

Die serologischen Typisierungsmethoden stellen auch bei der Typisierung erweiterter Profile mit Testkosten von etwa ein bis zwei Euro pro Antigen noch immer den Standard dar, an denen alternative Methoden gemessen werden.

### 1.2 DNA-basierte Methoden als Alternative zur Serologie

Im Gegensatz zur Serologie gibt es bei den DNA-Methoden keine Einschränkungen bei der Verfügbarkeit der Reagenzien. Das eröffnet die Möglichkeit zur Typisierung eines sehr großen Antigenspektrums (3).

Um für eine genetische Typisierung zugänglich zu sein, muss der Blutgruppenpolymorphismus auf molekularer Ebene bekannt sein. Derzeit erkennt die ISBT mehr als 300 erythrozytäre Antigene an. 287 davon konnten 33 Blutgruppensystemen zugeordnet werden (**Tabelle 1**). Jedes dieser Systeme besteht aus einem oder mehreren Antigenen, die durch ein oder mehrere eng gekoppelte Gene codiert werden. Die meisten der Blutgruppenantigene in den 33 Systemen sind auf Allel-Ebene bekannt und daher für die Genotypisierung zugänglich (4, 5).

Im Folgenden sollen als Beispiele für den oft niedrigeren, teilweise aber

sehr hohen Komplexitätsgrad, nur einige molekulare Grundlagen erythrozytärer Antigene angerissen werden. Genauere Beschreibungen sind einer Vielzahl von Publikationen und Reviews zu entnehmen (6, 7). Die Mehrheit der Blutgruppenpolymorphismen beruht auf Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs). Meistens codiert das Gen dabei den Aminosäurepolymorphismus, der direkt das Antigen darstellt. Ein Beispiel dafür ist das Kell-Antigen am Kell-Protein (8). Im Fall von Zucker-Antigenen codiert ein SNP eine Aminosäure in einem Glykosyltransferasegen, die die Substratspezifität des Enzyms bestimmt (z. B.: ABO). Das übertragene Monosaccharid stellt das eigentliche immunodominante Motiv des Antigens dar. Andere Ursachen für allelischen Polymorphismus sind Insertionen oder Deletionen eines oder mehrerer Nukleotide (oder auch ganzer Gene). So führt zum Beispiel im ABO-Gen die Deletion eines einzigen Nukleotids zu einer Verschiebung des Leserahmens (frame-shift mutation) mit einem vorzeitigen Transkriptionsstop und einem verkürzten katalytisch inaktiven Transferase-Protein (4). Eine wesentlich komplexere Situation findet man im RH-System, wo zwei homologe eng gekoppelte Gene, RHD und RHCE, für das RhD- und RhCE-Protein codieren. Eine Vielzahl von genetischen Variati-

onen führen zu varianten RhD Phänotypen (weak D, partial D, Del-Typen und nicht exprimierte D-Gene) (9). Den über zweihundert Allelen liegen einzelne oder Kombinationen von SNPs, Hybrid-Gene, Deletionen und Insertionen, Splice-Site-Mutationen und vorzeitige Stopcodons zugrunde (Rhesusbase, <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>).

Der Aufwand für die Blutgruppen-genotypisierung ist natürlich auch von der Komplexität des Blutgruppensystems und der Anzahl der zu erfassenden Allele abhängig. Es ist vom Anwender zu entscheiden, wie weit auch sehr seltene Allele (z. B.: in der jeweiligen Population ungewöhnliche Allele) erfasst werden sollen – aus der Sicht des Referenzlabors wäre das vorteilhaft – oder, ob es akzeptabel



ist, nur auf die häufigen oder speziell gesuchte Allele zu fokussieren. Letzteres könnte ein pragmatischer Ansatz im Hochdurchsatz-Screening bei Blutspendern sein. Es steht ein breites Spektrum an technischen Methoden zur Verfügung, die sich unterschiedlich gut für die angeführten Anforderungen eignen. Es sind Plattformen vorhanden, mit denen simultan eine Hochdurchsatz-Typisierung auf tausende Allele pro Probe durchgeführt werden kann (array-Methoden), diese sind zurzeit noch recht kostenintensiv. Es ist naheliegend, dass auch diese Optionen in Zukunft zu erschwinglicheren Preisen zur Verfügung stehen werden.

### 1.3 DNA-basierte Programme zur Spendertypisierung

#### 1.3.1 Auswahl des Antigenspektrums

ABO, RhD, Kell und der Rh-Phänotyp werden im deutschen Sprachraum bei jedem Spender routinemäßig serologisch bestimmt, daher müssten diese Antigene in genetischen Spender-Typisierungsprogrammen nicht primär eingeschlossen werden.

Die ABO-Phänotypisierung ist durch die Kombination der Antigenbestimmung mit der Serumgegen-



probe äußerst gut gegen Fehler abgesichert. Eine ABO-Genotypisierung kann beim antransfunden Patienten mit Mischfeldagglutination oder bei Diskrepanzen sehr nützlich sein, beim Blutspender fehlt aber ein entsprechender Mehrwert.

Bei RhD liegt die Situation anders: es gibt viele D-Varianten mit quantitativ oder qualitativ veränderter D-Expression (weak D-Typen; partial D-Typen) (4-6, 9). Die Genotypisierung ist bei abgeschwächten serologischen Reaktionen oder diskrepanten Befunden das Mittel der Wahl, um die Variante (insbesondere weak D-Typen) eindeutig zu klassifizieren. Im Referenzlabor nimmt die Molekularbiologie damit einen großen Stellenwert ein. Spenderseitig scheint der Nutzen auf den ersten Blick begrenzt zu sein, allerdings führen bereits einige Zentren aus qualitätssichernden Überlegungen routinemäßig RHD-Genotypisierungen bei serologisch (scheinbar) RhD-negativen Spendern durch, um Spender mit äußerst schwacher D-Expression (Del-Typen) zu identifizieren, von de-

ren Blutprodukten ein gewisses Immunisierungspotential ausgeht. Diese Anwendungen werden weiter unten näher betrachtet.

Welche Antigene ein Typisierungsprogramm einschließen soll, wird folgende Überlegungen umfassen:

- Welche Prävalenz besitzt der korrespondierende Antikörper und wie schwierig ist es, entsprechende Spender zu finden?
- Ist der Antikörper klinisch signifikant (10)?
- Gibt es einen zusätzlichen Mehrwert, ein Antigen einzuschließen?

Die Antikörperfrequenz ist abhängig von der Immunogenität und der Prävalenz des Antigens in einer bestimmten Population. Der Großteil der Antigene ist in den meisten Populationen relativ ähnlich verteilt, bei einigen Antigenen variiert die Prävalenz aber in unterschiedlichen ethnischen Gruppen erheblich, und dies kann in Einzelfällen zu Versorgungsproblemen von Antikörperträgern führen (z. B.: Anti-U, Anti-Js<sup>b</sup> bei afrikanischen Patienten) (11).

Die häufigsten bzw. relevantesten Spezifitäten sind identisch mit den in kommerziellen Antikörperdifferenzierungspanel angeführten, beziehungsweise können auch einigen Richtlinien entnommen werden, wie zum Beispiel der Britischen Richtlinie (D, C, c, E, e, K, k, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S, s, M, N, Le<sup>a</sup>) (12).

Wenn es die verwendete technische Plattform zulässt, kann das Spektrum auf seltenere Spezifitäten erweitert werden, bzw. können darüber hinaus Antigene, für die serologische Reagenzien nicht erhältlich sind oder die sehr schwach reagieren (z. B.: Anti-Do<sup>a</sup>, -Do<sup>b</sup>, -Hy, Jo<sup>b</sup>) erweitert werden (13).

### 1.3.1.1 Seltene Bluttypen: multiple Antikörperspezifitäten und Antikörper gegen hochfrequente Antigene

Die Versorgung von Patienten mit mehreren Antikörperspezifitäten (z. B.: Anti -e, -s, -Fy<sup>a</sup>) oder Antikörpern

gegen hochfrequente Antigene (z. B.: Anti-Lu<sup>b</sup>) ist in Abhängigkeit von der Phänotypenhäufigkeit für die Zentren oft gleichermaßen herausfordernd. Abhängig von der Seltenheit des kompatiblen Bluttyps kann es schwierig sein, die Patienten rechtzeitig mit einer ausreichenden Anzahl Erythrozytenkonzentrate (EKs) zu versorgen.

### 1.3.1.2 Hochfrequente Antigene (HFAs)

Als HFAs sind jene Antigene definiert, die in einer Population eine Prävalenz von mehr als 90 Prozent besitzen. Praktisch relevant werden HFAs allerdings erst, wenn mehrere hundert oder tausend Spender typisiert werden müssen, um einen Sonderspender zu finden.

Seltsam et al. haben beschrieben, dass zwei Drittel aller Anti-HFA-Spezifitäten im europäischen Patientenkollektiv Antikörper gegen eine von vier Spezifitäten (Yt<sup>a</sup>, Lu<sup>b</sup>, Vel und Kp<sup>b</sup>) gerichtet sind und dass bei rund einem Drittel dieser Patientengruppe die Versorgung mit EKs nicht im indizierten Ausmaß erfolgen konnte (14). Aus Evidenz-basierten Überlegungen wäre also angebracht, die häufigsten HFA-Antigene in ein genetisches Screening zu inkludieren (für Vel ist dies zurzeit noch nicht möglich).

Das Österreichische Rote Kreuz in Wien bezog sich zum Beispiel für die Auswahl der HFA-Antigene für das Spendergenotypisierungsprogramm auf die Inzidenzliste des SRK Blutspendedienstes Bern, die damals 344 Fälle mit HFA-Antikörpern einschloss (H. Hustinx, persönliche Kommunikation). Die erste Version des PCR-Assays inkludierte 12 HFAs, was 66 % der Berner HFA-Antikörper-Inzidenz entsprach (15).

### 1.3.1.3 Niedrigfrequente Antigene (LFAs)

Antikörper gegen LFAs stellen kein Problem für die Patientenversorgung dar. Mangels Testzellen oder Antisera ist die Diagnostik allerdings vielfach sehr eingeschränkt. Durch ein genetisches Screening können antigenpositive Panelzellen gefunden werden, was in erster Linie für das Referenzlabor besonders im Zusammenhang mit dem Morbus haemolyticus fetalis neonatorum interessant ist.

### 1.3.2 Qualitätskontrolle RhD-negativer Blutspender

Etliche RhD-Varianten mit sehr geringen Antigendichten (DEL-Typen) können im Hämagglutinationstest zu falsch negativen Ergebnissen führen (16). Flegel und Koautoren zeigten,



dass bei 0,21 Prozent der scheinbar RhD-negativen Bevölkerung in Deutschland ein RHD-Gen nachweisbar war (gewöhnlich tragen RhD-negative Individuen in der europäischen Bevölkerung homozygot eine Deletion des gesamten RHD-Genes). Etwa die Hälfte davon wiesen DEL-Allele auf, die geringe D-Expression konnte mittels Adsorptions- und Elutionstechniken dargestellt werden (17). Die schwache D-Expression bei Weak D- und Partial D-Typen kann genetisch durch ein C oder E in trans (Ceppellini 1952) noch weiter abgeschwächt werden (18), daher finden sich bei scheinbar RhD-negativen CDE-positiven Individuen häufiger RHD-Gene als bei CDE-negativen Menschen. In Südostasien ist RhD-negativ per se ein seltener Bluttyp. Zusätzlich finden sich unter den scheinbar D-negativen Individuen bis zu 17 Prozent DEL-Typen (19).

Durch die RHD Genotypisierung können mit relativ geringem Aufwand Blutspender identifiziert werden, die ein DEL-Allel tragen oder bei denen eine minimale Expression von RhD-Proteinen nicht auszuschließen ist und von deren Blutprodukten daher ein gewisses (im Vergleich zu D-positivem Blut) reduziertes (20, 21) Immunisierungspotential für D-negative Empfänger ausgehen könnte.

### 1.3.3 Best Match-Programme

Bei chronisch transfusionsbedürftigen hämatologischen Patienten, wie Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom oder Patienten mit Hämoglobinopathien, wie Sichelzellanämie oder  $\beta$ -Thalassämie gibt es in einigen Zentren seit längerem Bemühungen, die Patienten mit EKs zu transfundieren, die ein möglichst ähnliches Antigenprofil wie der Empfänger aufweisen und von denen die statistisch geringste Immunisierungswahrscheinlichkeit ausgeht (22). Für solche Best- oder Optimal-Match Programme wird vom (antransfunden) Empfänger ein genetisches Antigenprofil erstellt und elektronisch, nach einem nach Immunogenität der einzelnen Antigene gewichtenden Algorithmus, mit den in der Blutbank vorhandenen EKs abgeglichen. Das Österreichische Rote Kreuz führt in Kooperation mit dem

St. Anna Kinderspital ein Optimal-Match Programm für die Patienten mit Hämoglobinopathien durch.

### 1.3.4 Andere Faktoren die für Typisierungsprogramme zu berücksichtigen sind

#### 1.3.4.1 Auswahl der Spender

Ein Spendertypisierungsprogramm verursacht hohe Kosten. Daher sollte das primäre Kriterium für die Typisierung die hohe Spendefrequenz sein und eventuell auch die Blutgruppe O und RhD-negativ überrepräsentiert sein. Weiters ist es für die Versorgung von Patienten mit multiplen Antikörperspezifitäten vorteilhafter, eine Auswahl von Mehrfachspendern auf ein großes Spektrum an Antigenen, statt eine Vielzahl von Spendern auf jeweils nur wenige Antigene zu typisieren.

#### 1.3.4.2 Zuverlässigkeit genetischer Methoden

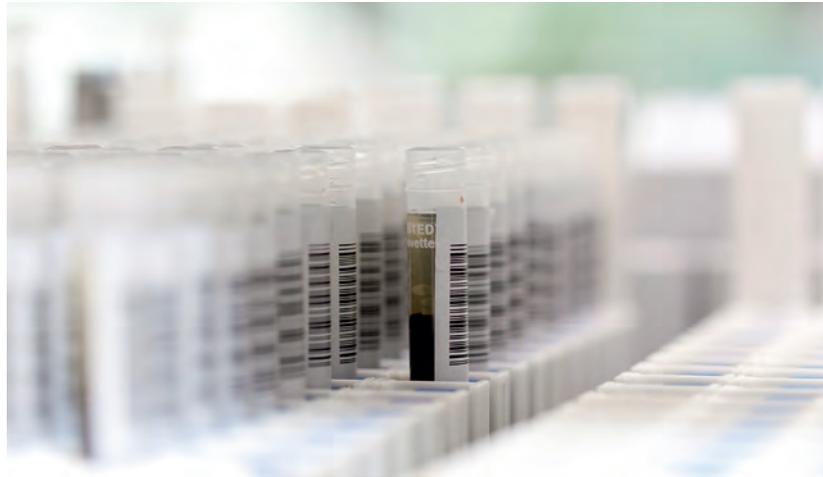
Die Zuverlässigkeit von Genotypisierungsergebnissen ist verhältnismäßig hoch (23). Sie ist für die meisten Antigene mit den serologischen Methoden vergleichbar, in manchen Aspekten weisen DNA-basierte Methoden sogar Vorteile, in anderen Nachteile auf. Die Genotypisierung ist die Voraussage eines bestimmten



Phänotyps auf Basis des Nachweises einer Nukleinsäuresequenz, meistens (wie bei der SSP-PCR Methode) aber nur eines Einzelbasenaustausches (SNP). Dabei werden genetische Veränderungen außerhalb der Primerbindungsregionen grundsätzlich nicht erkannt und eine normale Genexpression vorausgesetzt. Die Wahl des Verfahrens muss entsprechend den spezifischen Anforderungen getroffen werden: sollen sämtliche seltene Allele durch die Diagnostik erfasst werden (Referenzlabor), müssen bei nicht konklusiven Fällen Methoden wie die DNA-Sequenzierung angewandt werden. Ist das primäre Ziel ein Screening nach Antigen-negativen Blutspendern, kann eine Einschränkung auf die häufigsten Allele ein gangbarer Kompromiss sein.

#### 1.3.4.3 Regulatorische Anforderungen für die in-vitro Diagnostik (IVD)

In der erweiterten Antigentypisierung in Blutbanken und im Referenzlabor gibt es oft ein Nebeneinander unterschiedlichster Reagenzien- und Testklassen, dies gilt für den serologischen und molekularbiologischen Bereich. Teilweise sind CE-markierte Reagenzien und Assays vorhanden, dort wo diese fehlen, oder als zusätzliche Evidenz, müssen Patientenma-



terialien und in-house Tests eingesetzt werden. Die Europaratsdirektive 98/79/EC hat die Möglichkeit vorgesehen, hier validierte in-house Verfahren in der Klasse D ohne CE-Zertifizierung einzusetzen.

Weiters können andere Verfahren eingesetzt werden, wenn deren Ergebnisse ausschließlich im Sinne eines Vorscreenings gehandhabt werden und die Blutprodukte gegebenenfalls vor Auslieferung mit für IVD zugelassenen Reagenzien bezüglich des relevanten Antigens bestätigt werden.

#### 1.3.4.4 Datenbank und Algorithmen

Der IT- und Datenbankstruktur kommt ein entscheidender Anteil für das optimale Funktionieren von Typisierungsaktivitäten und Patientenver-

sorgung zu. Im günstigsten Fall unterstützt die IT die Auswahl geeigneter Mehrfachspender, steuert die Präanalytik, erhält die Typisierungsergebnisse über eine automatisierte Schnittstelle, führt zu allen Antigenen Prüfungen auf Differenzen zu historischen Testergebnissen durch und unterstützt die Suche nach kompatiblen EKs, Sonderspendern oder nach EKs mit dem errechnet geringsten Immunisierungspotential für einen konkreten Patienten (Best Match) optimal.

Zum Sicherstellen der Daten- und Produktqualität sollte bei allen Typisierungsdaten gemeinsam mit dem Ergebnis auch die Methode gespeichert werden (z. B.: IVD-Methode 1, IVD-Methode 2, Screeningmethode, historisches Ergebnis aus Altdaten oder auswärtige Typisierungen unbekannter Methodik), damit durch ent-

## Auswahl von Publikationen über Hochdurchsatz-Genotypisierung mit HFAs

Anzahl erythrozytärer Genotypen/Allele	Hochfrequente Antigene	Methode	Studienumfang (n) <sup>§</sup>	Konkordanzrate (%)	Referenz
18	Lub, k, Kpb, Dib	microarray	372 <sup>*</sup>	98-100	(38)
35	Lub, k, FY, LWa, Dib, Coa, Hy, Joa, SC1	microarray	188	100	(33)
#	U, k, Kpb, Joa	microarray	94	#	(37)
16	k, Kpb	microarray	618	97-100	(39)
33,87,9,31 <sup>§</sup>	k, Kpb, Jsb, FY, Dib, Coa	microarray	1000 <sup>p</sup>	99,8	(34)
16	Lub, k, Kpb, Jsb, Dib, Coa	microarray	92	100	(35)
4	Lub, Kpb, Yta, Coa	SSP-PCR	3422		(27)
17	Lub, k, Jsb, Fy0, Hy, Joa	real-time PCR	427	>99	(42)
17	Lub, k, Coa	real-time PCR	200	100	(43)

**Tabelle 2**

<sup>§</sup> Anzahl der Evaluierung mit serologisch typisierten Proben  
<sup>\*</sup> nur für einen Teil der Antigene  
<sup>§</sup> ABO, RHD, RHCE, weitere Antigene  
<sup>#</sup> nicht angegeben für die übrigen erythrozytären Antigene  
 Modifiziert nach (15, 24, 44)

sprechende Regeln das Ausweisen von Antigenen auf dem Produktetikett oder die Nachtestung von Antigentypisierungen bei unzureichender Vorbestimmung angestoßen werden kann.

## 2. DNA-basierte Testmethoden und Eignung als Hochdurchsatzverfahren

Es wird ein breites Spektrum von Methoden und Geräten in der Blutgruppengenotypisierung eingesetzt (**Tabelle 2**): von der konventionellen SSP-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese bis zu Mikroarray-Assays, mit denen (theoretisch) bis zu tausende Allele pro Person simultan bestimmt werden können. Die Eigenschaften dieser Methoden und Geräte unterscheiden sich in Bezug auf

Eignung für Automatisierbarkeit, Hochdurchsatzverfahren sowie die Anzahl der erfassbaren Allele und natürlich gibt es ganz erhebliche Kostenunterschiede. Einige Verfahren sind für die IVD zugelassen (**24-26**).

### 2.1 Konventionelle PCR

Einen erheblichen Anteil stellen noch immer konventionelle PCR Methoden, gewöhnlich mit allel-/sequenzspezifischen Primern (ASP/SSP). SSP-PCRs ermöglichen eine Genotypisierung mit geringen Investitionskosten und sehr günstigen Testkosten (**27-29**). Bei SSP-PCR-Ansätzen können in einem Reaktions-Mix mehrere Reaktionen integriert werden (Multiplex-PCR) wodurch sich die Kosten noch weiter reduzieren lassen. Nach der eigentlichen PCR-

Reaktion ist ein zusätzlicher Detektionsschritt notwendig, der üblicherweise mittels Agarose-Gelelektrophorese oder Kapillarelektrophorese durchgeführt wird. Die Eignung zur Automatisierung oder für Hochdurchsatz ist begrenzt (Gelelektrophorese), der Einsatz der Kapillarelektrophorese zur Detektion führt hier zu wesentlichen Verbesserungen. Es gibt mehrere Anbieter von kommerziellen Testkits (z. B.: InnoTrain, Kronberg, Deutschland; BAG, Lich, Deutschland).

### 2.2 TaqMan basierte und Real-time PCR

Anders als bei der konventionellen PCR findet hier die PCR-Reaktion und der Detektionsschritt in einem Arbeitsgang statt. Die Auswertung

beruht auf einer Änderung eines Fluoreszenzsignals, das der Amplifikation der PCR-Produkte proportional ist. Die Detektion kann entweder in den einzelnen Zyklen, als Endpunktanalyse oder durch die spezifischen Schmelzkurven erfolgen. Die Verfahren sind im niedrigen bis mittleren Durchsatzbereich anzusetzen **(30, 31)**.

### 2.3 Pyrosequenzierung

Im Gegensatz zu den PCR-Verfahren werden bei der DNA-Sequenzierung nicht nur einzelne Positionen im Gen auf das Vorliegen eines bestimmten Einzelbasenpolymorphismus untersucht, sondern die gesamte DNA-Sequenz eines DNA-Fragments, Exons oder Gens erfasst. Bei der Pyrosequenzierung wird im Gegensatz zur Sanger-Technik die Freisetzung von Pyrophosphat detektiert **(32)**.

### 2.4 Mikroarray-Methoden

Mit DNA-Mikroarrays können tausende Reaktionen in einen Einzeltest integriert werden. Die zu untersuchende DNA hybridisiert mit allelspezifischen Sonden des Arrays, die an der festen Phase, auf Chips oder Mikropartikel (Beats) gebunden sind. Die eingesetzten technischen Plattformen können für eine Hochdurchsatztypisierung geeignet sein.

Im Blutbankbereich gibt es zurzeit neben offenen, frei entwickelbaren Systemen auch einige kommerzielle Anbieter, die Gesamtlösungen mit einem bestimmten Antigenespektrum anbieten.

Im Folgenden werden beispielhaft ein paar Methoden und Systeme angeführt.

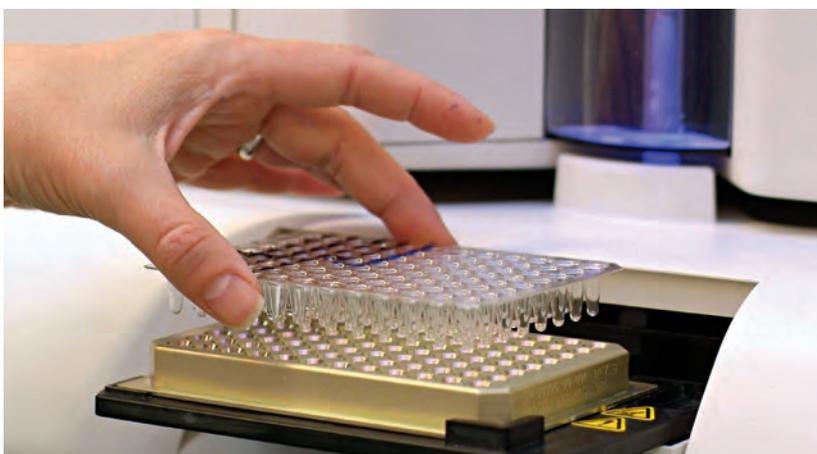
Eines dieser Systeme ist der HEA BeatChip (BioArray Solutions, Warren, NJ, USA; <http://www.immucor.com/bioarray>) mit dem 35 erythrozytäre Antigene typisiert werden können **(33)**.

Der BloodChip (Progenika, Vizcaya, Spain) ist ein kommerzielles System zur Typisierung von 33 erythrozytären und 12 HPA-Antigenen, bei dem insgesamt 128 Polymorphismen untersucht werden (73 davon sind RHD-spezifisch, weiters sind einige ABO-Allele eingeschlossen). Der Assay basiert auf einem Glasträger als feste Phase. Er besitzt eine Zulassung als IVD **(34)**.

Die Luminex Technologie (Luminex, Austin, TX, USA) ist eine auf Beats basierende Methode, eine offene Plattform, die mit Sets von 100 verschiedenen farbcodierten Partikeln arbeitet. Karpasitu et al. haben mit dieser Methode einen Assay zur Typisierung von 16 Erythrozytenantigenen entwickelt **(35)**.

Auch andere Microarrays zur Typisierung von thrombozytären Antigenen oder thrombozytären und erythrozytären Antigenen wurden beschrieben **(36, 37)**.

Ein weiteres System ist GenomeLab SNP stream (Beckman, Brea,



CA, USA). Es arbeitet im 384-well Format. Kanadische und französische Arbeitsgruppen haben Assays für 18 beziehungsweise 16 erythrozytäre Antigene beschrieben (38, 39).

### 2.5 Massenspektrometrie (MS)

Bei diesen Verfahren werden zunächst die DNA-Zielsequenzen in Multiplex-PCRs amplifiziert. Die PCR-Produkte werden danach massenspektrometrisch analysiert (MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption/ionization -time-of-flight), wobei die minimalen Molekulargewichtveränderungen eines DNA-Fragments durch Nukleotidpolymorphismen erfasst werden (40). Das Auflösungsvermögen dieser Methode ist sehr gut, was eine Integration vieler Antigenbestimmungen pro Analyse erlaubt.

Während die Testkosten bei der MS relativ niedrig sind, ist die Anschaffung des Systems mit sehr hohen Kosten verbunden.

## 3. Laufende Spender-Genotypisierungsprogramme

Es gibt zahlreiche Publikationen über neue Methoden für die Spendergenotypisierung. Sie werden ge-

wöhnlich zu einem Zeitpunkt geschrieben, zu dem erst wenige hundert Individuen getestet worden sind. Wesentlich spärlichere Berichte liegen über die Aktivitäten zur Typisierung großer Spenderkollektive vor, deshalb ist die folgende Aufzählung nur beispielhaft:

St. Louis et al. haben berichtet, dass Héma-Québec 21.000 Blutspender auf 22 erythrozytäre und thrombozytäre Antigene untersucht hat (41).

Blutspendedienste des Roten Kreuzes in Deutschland, der Schweiz und Österreich haben in drei Zentren (Springe, Bern und Wien) zusammen bereits mehr als 50.000 Spender mit in-house Methoden typisiert. Dabei wurden in Springe mehr als 30.000 Personen mit Multiplex PCR und Ka-

pillarelektrophorese bezüglich 16 Antigenen typisiert (M/N; S/s; Lua/Lub; Kp<sup>a</sup>/Kp<sup>b</sup>; Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup>; Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>; Yt<sup>a</sup>/Yt<sup>b</sup>; Co<sup>a</sup>/Co<sup>b</sup>) (27) (und FF Wagner: persönliche Kommunikation). In Bern wurden mehr als 1.500 Spender auf 30 Antigene (M/N; S/s; Lu<sup>a</sup>/Lu<sup>b</sup>; K/k; Kp<sup>a</sup>/Kp<sup>b</sup>, Js<sup>a</sup>/Js<sup>b</sup>; Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>; Di<sup>a</sup>/Di<sup>b</sup>; Yt<sup>a</sup>/Yt<sup>b</sup>; Sc1/Sc2; Do<sup>a</sup>/Do<sup>b</sup>, Hy; Co<sup>a</sup>/Co<sup>b</sup>; LW<sup>a</sup>/LW<sup>b</sup>) typisiert (C Niederhauser: persönliche Kommunikation). In Wien wurden bislang mehr als 20.000 Personen auf 35 erythrozytäre Antigene (M/N; S/s; Lu<sup>a</sup>/Lu<sup>b</sup>, LU8/ LU14; K/k, Kp<sup>a</sup>/Kp<sup>b</sup>/Kp<sup>c</sup>, Js<sup>a</sup>/Jsb, KEL11/KEL17; Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup>, Fy<sup>bw</sup> (FYBWK), Fy<sup>0</sup> (FYBES); Jk<sup>a</sup>/Jk<sup>b</sup>; Di<sup>a</sup>/Di<sup>b</sup>, Wr<sup>a</sup>/Wr<sup>b</sup>; Yt<sup>a</sup>/Yt<sup>b</sup>; Do<sup>a</sup>/Do<sup>b</sup>, Co<sup>a</sup>/Co<sup>b</sup> In<sup>a</sup>/In<sup>b</sup>) mit Multiplex-PCR und Gelelektrophorese typisiert (29). Die Zentren planen jährlich zwischen 5.000 und 10.000 weitere Spender zu typisieren.



### 3.1 Effektivität und Kosteneffizienz

Die Effektivität von Spendertypisierungsprogrammen kann durch den Prozentsatz der Blutprodukte für Antikörperträger beschrieben werden, die aufgrund einer Datenbankabfrage versorgt werden können. Eine hohe Anzahl von Typisierungsdaten in der Datenbank wird auch eine höhere Trefferquote geeigneter Blutprodukte zur Folge haben, als ein geringer Typisierungsgrad. Wenn bereits ein hoher Typisierungsanteil erreicht ist, steigt die Effektivität aber nicht mehr in gleichem Maße wie vorher sondern nähert sich asymptotisch dem Maximum. Es gilt also, die optimale Anzahl von Spendern zur Typisierung zu eruieren, bei denen sich die Trefferquote bei Datenbankabfragen und die Typisierungskosten in einem vernünftigen Verhältnis bewegen. So haben Perreault et al. die Situation der Héma Québec analysiert und ermittelt, dass 21.000 typisierte Spender eine Trefferquote von 95 Prozent aller Anforderungen für Antikörperträger ergeben sollten (2).

Bezüglich Kosteneffizienz sind die großen Kostendifferenzen der beschriebenen Methoden und Systeme anzusprechen. Zum einen gibt es in-house Methoden („low-tech“ SSP-PCR), die mitunter geringere Ge-

samtkosten verursachen als die serologische Bestimmung. Andererseits werden automatisierte „high-tech“-Systeme angeboten, die (theoretisch) die simultane Testung auf tausende Allele zulassen würden, deren Kosten zurzeit aber noch ein Vielfaches der Standard-Serologie betragen. Als Beispiel für besonders kostengünstige Methoden wurden von Wagner et al. die Testkosten ihrer in-house Typisierung auf 16 Antigene mit 0,125 Euro pro Antigen (inklusive DNA-Extraktion) angegeben (27). Bei der in Wien angewandten in-house-Methode liegen die Kosten bei 0,14 Euro pro Antigen (29). Beide Verfahren liegen damit kostenmäßig unter den serologischen Methoden.

## 4. Zusammenfassung

Eine ausreichende Anzahl bezüglich eines größeren Spektrums erythrozytärer Antigene ausgewerteter Spender ermöglicht eine rasche und suffiziente Versorgung von Patienten mit irregulären Blutgruppenantikörpern. Darüber hinaus könnte in Zukunft auch prophylaktischen „Best Match“ Programmen, insbesondere für chronisch transfusionsbedürftige hämatoonkologische Patienten, eine bedeutendere Rolle zukommen. Reid fasst darüber hinaus noch weitere Anwendungen zusammen, wie ein prophylaktisches Jka- und Jkb-Mat-

ching, um bei immunisierten Patienten, deren Antikörpertiter unter die Nachweisgrenze gefallen ist, hämolytische Transfusionsreaktionen zu vermeiden oder multipel transfundierte Patienten mit Auto- und Panagglutininen um hier hämolytische Transfusionsreaktionen durch nicht detektierbare Alloantikörper zu verhindern (13).

Das Antigenspektrum von Typisierungsprogrammen sollte sich am tatsächlichen Bedarf der transfusionsmedizinischen Zentren, also der Prävalenz der Erythrozytenantikörper und ihrer klinischen Signifikanz orientieren.

Weiters sollte auch ein Screening nach Sonderspendern mit seltenen HFA-negativen Bluttypen erfolgen. In diesem Zusammenhang ist auch die Versorgung von Patienten mit seltenen Bluttypen in ethnischen Minderheiten zu bedenken, die nicht nur in Bezug auf die verfügbaren Blutprodukte sondern auch diagnostisch noch problematischer sind. Eine intensive Zusammenarbeit der transfusionsmedizinischen Zentren im Rare Blood-Bereich ist notwendig. Plattformen, wie das nun unter die Schirmherrschaft der DGTI gestellte Berner-Register (<http://raredonor.bsd-be.ch/index.php?id=3>; H. Hustinx), ermöglichen, im Bedarfsfall die

rasche überregionale Suche nach geeigneten Spendern.

Die Erfordernisse an das Antigen-spektrum und die Anzahl der eingeschlossenen Allele im Referenzlaborbereich weichen von den Anforderungen im Spenderbereich teilweise ab. Im Spenderbereich ist das primäre Ziel die Datenbanken bei vertretbaren Kosten mit großen Mengen an Typisierungsdaten zu füllen um im Bedarfsfall spezielle Blutprodukte, die bezüglich der angeforderten Antigene negativ sind, zu liefern. Diese Anforderungen sind häufig mit preisgünstigeren Methoden zu erreichen, als wenn eine weitgehende Vollständigkeit in Bezug auf Nachweis von Varianten/Allelen gewünscht wird.

Gleiches gilt für die Kosteneffizienz, auch sie wird primär durch die gewählte Methode bestimmt. Einige in-house Methoden sind kosteneffizienter als die serologischen Standardmethoden, kommerzielle Systeme sind teilweise noch erheblich teurer, manche sind aber für die in-vitro Diagnostik zugelassen. Screening-Programme, deren Testergebnisse ausschließlich einer Vorauswahl der Spender oder Blutprodukte dienen, ermöglichen unter Umständen die Datenbanken kostengünstig zu füllen, machen aber vor der Ausgabe der Erythrozytenkonzentrate eine

Bestätigung des angeforderten Phänotyps mit für IVD zugelassenen Reagenzien nötig. Schließlich ist die Wahl der Methode auch eine Entscheidung in Bezug auf den Automatisierungsgrad der Teilprozesse. Manuelle Schritte können insbesondere zu Verwechslungsfehlern führen, gegen die man sich dann im Gesamtprozess absichern muss.

In Bezug auf RHD können durch die Genotypisierung als qualitätssichernde Maßnahme Spender identifiziert werden, deren äußerst schwach exprimierte DEL-Typen der serologischen Routinebestimmung entgangen sind, von deren Blut aber ein gewisses Immunisierungspotential ausgeht. Die gleichen Überlegungen gelten für andere Antigenvarianten, deren schwache Expression unter Umständen bei der Phänotypisierung zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann (z. B.: FyX).

Da es in den meisten Zentren Überschneidungen von Spendergenotypisierung und Patientengenotypisierung für das Referenzlabor gibt, werden grundsätzlich auch immer Überlegungen bezüglich der Anforderungen in beide Richtungen in Betracht gezogen werden.

Es ist davon auszugehen, dass die genetische Antigenbestimmung in

den Blutbanken in Zukunft an Bedeutung gewinnt. Antigenprofile der Spender und der chronisch transfusionsbedürftigen Patienten, gemeinsam mit gut parametrisierten Blutbank-IT-Systemen sind Voraussetzungen, die einen elektronischen Abgleich beider Profile nahelegen. Die Transfusionsmedizin könnte sich also auch im Blutbankbereich künftig noch mehr in Richtung personalisierte Medizin entwickeln.

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