

Molekulare Diagnostik in der Immunhämatologie

Wenn die Serologie nicht mehr ausreicht

Zusammenfassung

Die Molekulare Diagnostik ist heutzutage eine wichtige Ergänzung der serologischen Diagnostik. Im Artikel wird ein Überblick über die Grundlagen der Antigene gegeben und anschließend beispielhaft an Hand von Thrombozyten- und Neutrophilenantigenbestimmung, Abklärung von erythrozytenseriologischen Problemfällen, weak D Diagnostik zur Festlegung der Transfusions- und Prophylaxestrategie, Pränataler Blutgruppenbestimmung aus dem Blut der Mutter, Testung D negativer Spender auf DEL mittels *RHD* PCR und Hochdurchsatz-Genotypisierung von Blutspendern der aktuelle Stellenwert dargestellt. Abschließend werden aktuelle Grenzen des Verfahrens aufgezeigt.

Summary

Nowadays, molecular diagnostic methods are an important complementat of serologic diagnostic methods. In this manuscript, after an introductory survey on the molecular basis of antigens is given, the significance of molecular methods is exemplified for determination of antigens of platelets and neutrophils, analysis of serologic enigmas, analysis of weak D to determine the transfusion and prophylaxis strategy, prenatal antigen determination from maternal blood, testing of D negative donors for DEL by *RHD* PCR and high-throughput genotyping of blood donors. In addition, current limitations of the methods are illustrated.

EINLEITUNG

Blutzellen tragen unterschiedliche Strukturen auf ihrer Oberfläche, die bei Übertragung von einem zum anderen Organismus eine Immunisierung hervorrufen können und deshalb als Alloantigene bezeichnet werden. Die Folgen einer Immunisierung können unterschiedlich sein und reichen von der Ausbildung spezifischer Antikörper ohne weitere Symptomatik bis hin zu akuten Abstoßungsreaktionen mit Zerstörung der antigentragenden Zellen. Die Diagnostik im Zusammenhang mit solchen immunologischen Vorgängen besteht meist aus der Kombination einer immunologischen Bestimmung der Antikörperspezifität und einer serologischen und/oder molekulargenetischen Bestimmung der Antigenkonstellationen. Insgesamt ist die Entwicklung moderner Laborverfahren für die genetische Bestimmung zahlreicher Antigensysteme von Blutzellen weit vorangeschritten. Für die verschiedenen Fragestellungen und Anwendungen stehen eine Reihe unterschiedliche Verfahren zur Verfügung.

Bis vor etwa 20 Jahren wurden die erythrozytären Blutgruppen allein durch die Agglutination von Erythrozyten mit Antikörpern bekannter Spezifität bestimmt. Heute gewinnen ergänzende molekularbiologische Methoden der Blutgruppenbestimmung zunehmend an Bedeutung (**Abbildung 1**). Die Blutgruppenbestimmung auf DNA-Basis wird insbesondere zur Vorhersage des Phänotyps

genutzt. Häufig liegen bei den Blutgruppenallelen nur geringe Unterschiede in der DNA vor. Wenn nur ein einzelnes Nukleotid verändert ist, spricht man von einem Einzelnukleotidpolymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP). Aufgrund der Identifizierung eines Blutgruppenspezifischen SNP wird das entsprechende Antigen (Phänotyp) vorhergesagt. Auch wenn in aller Regel diese Vorhersage zutrifft, können in seltenen Einzelfällen zusätzliche Veränderungen in dem betreffenden Gen vorkommen, die falsch positive oder falsch negative Ergebnisse und somit eine Diskrepanz zwischen Phänotyp und Genotyp zur Folge haben können.

Ein falsch negatives Ergebnis kommt beispielsweise zu Stande, wenn auf der DNA in Nachbarschaft zu dem Blutgruppenspezifischen SNP eine weitere, nicht bekannte oder vom angewendeten Test nicht erfasste Genveränderung vorliegt. Hierdurch wird die Detektion des Blutgruppenspezifischen SNP gestört. Falsch negative Genotypisierungsergebnisse sind insbesondere im Rahmen der Blutspendertypisierung oder der fetalen Blutgruppenbestimmung klinisch relevant. Falsch positive Ergebnisse können entstehen, wenn beispielsweise durch eine zusätzliche, bisher nicht bekannte, Grenzveränderung ein Stop-Codon eingeführt wird, so dass bei der Translation nur ein Proteinfragment oder kein Protein synthetisiert wird. Als Folge kann in die Erythrozytenmembran kein Protein eingebaut werden, es liegt ein so genanntes Null-

Allel vor. Null-Allele stellen für die Typisierung der Blutspender kein Risiko dar, sind aber bei der Typisierung des Patienten problematisch. Eine noch höhere Stufe der Genauigkeit ist mit der Sequenzierung des gesamten Gens zu erreichen. Aber auch in DNA-Bereichen außerhalb des Gens können Mutationen auftreten, die das Gen und damit die Expression des Proteins beeinflussen. Da diese zusätzlichen Genveränderungen ausgesprochen selten sind, verlässt man sich normalerweise auf die SNP-Bestimmung und sucht nur bei zusätzlichen unerwarteten Befunden nach seltenen Varianten, beispielsweise dann, wenn Antikörper unerwarteter Spezifität aufgedeckt werden. Die eher geringen Unsicherheiten der molekularbiologischen Vorhersage und deren Konsequenzen muss man bei der spezifischen Befunderstellung kennen und berücksichtigen. Diskrepanzen zwischen Genotyp und Phänotyp sind immer verdächtig für das Vorliegen eines neuen Allels. Je besser eine ethnische Gruppe hinsichtlich der vorkommenden Allele durchtypisiert ist, desto genauer ist die Phänotyp-Vorhersage. Zwar ist für die Bestimmung des Phänotyps nach wie vor die Serologie der Goldstandard, dennoch sind molekularbiologische Methoden zu Hilfsmitteln in der Transfusionsmedizin geworden, auf die kein größeres Labor mehr verzichten möchte.

Im Folgenden werden zunächst die molekularen Mechanismen der Entstehung von Blutgruppenantigenen näher betrachtet und anschließend ein Überblick über aktuelle Anwendungen der molekularen Typisierung in der Immunhämatologie gegeben.

MOLEKULARE MECHANISMEN DER ENTSTEHUNG VON BLUTGRUPPEN-ANTIGENEN UND PHÄNOTYPEN

Von einem Blutgruppenantigen spricht man, wenn eine Struktur der Erythrozytenoberfläche bei einem anderen Individuum die Bildung eines Antikörpers auslösen kann. Dies setzt voraus, dass das betroffene Individuum diese Struktur nicht oder in veränderter Form besitzt. Einem solchen Polymorphismus liegen in der Regel Veränderungen des korrespondierenden Gens zu Grunde. Die fehlende Expression eines Blutgruppenantigens (Null-Phänotyp) kann an einer Veränderung der Gensequenz liegen, die beispielsweise ein vorzeitiges Stop-Codon eingeführt hat. Es kann aber auch ein unverändertes Gen vorliegen, dessen Expression durch andere Mechanismen gestört ist. So verhindert der Austausch des Nukleotids Thymin durch Cytosin an Position -67 im Promotorbereich des *FY*B* Alleles dessen Transkription und damit die Expression des *Fy^b*-Antigens auf den Erythrozyten.

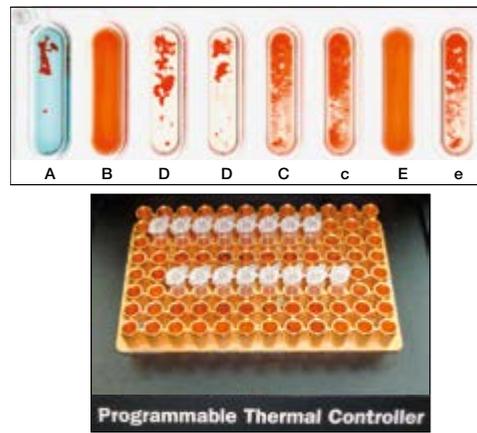


Abbildung 1: Blutgruppenbestimmung alt und neu

Seit über hundert Jahren wird die Agglutination immer noch erfolgreich zur Bestimmung der Blutgruppe genutzt (obere Bildhälfte). Heute steht ihr für Problemfälle mit der molekularen Typisierung ein kompetenter Partner zur Seite (untere Bildhälfte).

Die genetischen Veränderungen, denen Blutgruppenvarianten zugrunde liegen, sind verschiedenster Art. Eine Reihe von Blutgruppenvarianten kommt durch den Austausch einer einzelnen Base im codierenden Bereich des Gens zustande (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Der Basenaustausch hat den Einbau einer anderen Aminosäure in das Protein und damit eine veränderte antigene Struktur zur Folge. Beispiele hierfür sind die Blutgruppenantigene *Jk^a* und *Jk^b* (**Abbildung 2**).

Bei Polysaccharid-Antigenen wirkt sich die Veränderung nicht unmittelbar auf das Antigen aus. Durch den Austausch einzelner oder mehrerer Nukleotide wird vielmehr die Substrat- oder Reaktionsspezifität des Enzyms verändert, das die Synthese des Polysaccharidantigens bewerkstelligt. Als prominentes Beispiel seien die ABO-Blutgruppen genannt: Das Gen der Glykosyltransferase, welches das ABO-Antigen B erzeugt (kurz: B-Transferase), unterscheidet sich vom Gen der A-Transferase durch sieben Nukleotidaustausche. Drei davon sind stumm, vier führten zu einer Aminosäuresubstitution. Die so veränderte B-Transferase hat nun D-Galaktose als Substrat anstelle von N-Acetyl-Galaktosamin, statt Blutgruppe A wird Blutgruppe B aus der H-Substanz erzeugt.

Nukleotidaustausche in der Spleiß-Region können sich störend auf die Verknüpfung der Transkripte zur mRNA auswirken. Die daraus resultierende unvollständige mRNA hat eine fehlerhafte Proteinsynthese zur Folge. Veränderungen in der Spleiß-Region können daher Ursache von Null-Phänotypen sein. So stört im *RHD*-Gen die Substitution des Guanin durch ein Adenin an der ersten Position im Intron 8 (*IVS8+1G>A*)¹ die Spleißvorgänge so nachhaltig, dass kein RhD-Protein exprimiert wird.

Der Verlust (Deletion) oder die Einfügung (Insertion) von Nukleotiden verschiebt den Leserahmen. Durch die Veränderung der Codons werden ab einer solchen Stelle andere Aminosäuren eingebaut oder es kommt zu einem vorzeitigen Stop-Codon mit Abbruch der Proteinsynthese. Die Deletion des Guanin an Position 261 im Gen der A-Transferase führt zu einem vorzeitigen Stop-Codon. Das resultierende Protein ist funktionslos und kann die H-Substanz nicht in das Antigen A umwandeln. Diese genetische Variante (*ABO*O.01.01*) ist eine Ursache der Blutgruppe O. Die Deletion einer Sequenz von 17 Nukleotiden aus Exon 3 des Small Integral Membrane Protein 1 (SMIM1) ist Ursache des Vel-negativen Phänotyps. Rh D-negative Afrikaner sind häufig Träger einer 37 Basenpaare großen Duplikation in Exon 4 des *RHD*-Allels (*RHDΨ*), die den Leserahmen verschiebt und ein vorzeitiges Stop-Codon bewirkt². Die häufigste molekulare Ursache des Rh D-negativen Phänotyps ist jedoch die Deletion des gesamten *RHD*-Gens². Gerbich-Phänotypen entstehen durch Deletion ganzer Exone. Die Deletion von Exon 2 verursacht den Phänotyp GE:-2,3,4 (früher: Yus), das Fehlen von Exon 3 ist Ursache des Phänotyps GE:-2,-3,4 (früher: Ge). Typisch für den Lan-negativen Blutgruppenphänotyp ist das Vorliegen von Stop-Mutationen. Durch den Austausch einer einzelnen Base im entsprechenden Genabschnitt wird keine Aminosäure eingebaut, sondern die Proteinsynthese wird unmittelbar gestoppt.

Schließlich wurden noch Genkonversionen als Ursache von Blutgruppenpolymorphismen beschrieben. Bei der

Genkonversion wird durch Fehlpaarung von DNA-Strängen eine Sequenz des einen DNA-Stranges auf den zweiten übertragen. Die Allele der partial D-Phänotypen der Kategorie VI sind dafür ein Beispiel. Bei der Bildung einer Haarnadel-Struktur der DNA kamen das *RHD* und *RHCE* Gen in unmittelbare Nachbarschaft, so dass korrespondierende Exon-Abschnitte des *RHCE* Gens durch den Mechanismus der Genkonversion in das *RHD*-Gen eingebracht wurden (**Abbildung 3**).

ANWENDUNGSBEREICHE DER BLUTGRUPPEN-GENOTYPISIERUNG

Die Phänotyp-Vorhersage mittels molekularbiologischer Methoden ist insbesondere nützlich für die Antikörperdiagnostik und die Auswahl kompatibler Präparate zur Transfusion. Die Hämotherapie-Richtlinien schreiben im Rahmen von Schwangerschaften oder bei Bluttransfusionen die Bestimmung erythrozytärer Alloantikörper vor. Wenn ein Antikörper nachgewiesen wird, ist die Spezifität des Antikörpers zu klären. Da normalerweise keine Alloantikörper gegen Antigene gebildet werden, die man selbst besitzt, kann die Phänotyp-Vorhersage die Antikörperdifferenzierung unterstützen. Die molekularbiologische Phänotyp-Vorhersage wird insbesondere dann angewendet, wenn bei Vortransfusion des Patienten oder bei Vorliegen von Autoantikörpern die serologische Antigenbestimmung kein verlässliches Ergebnis liefert. Für die Bestimmung einiger Antigene wie z. B. Dombrock stehen keine

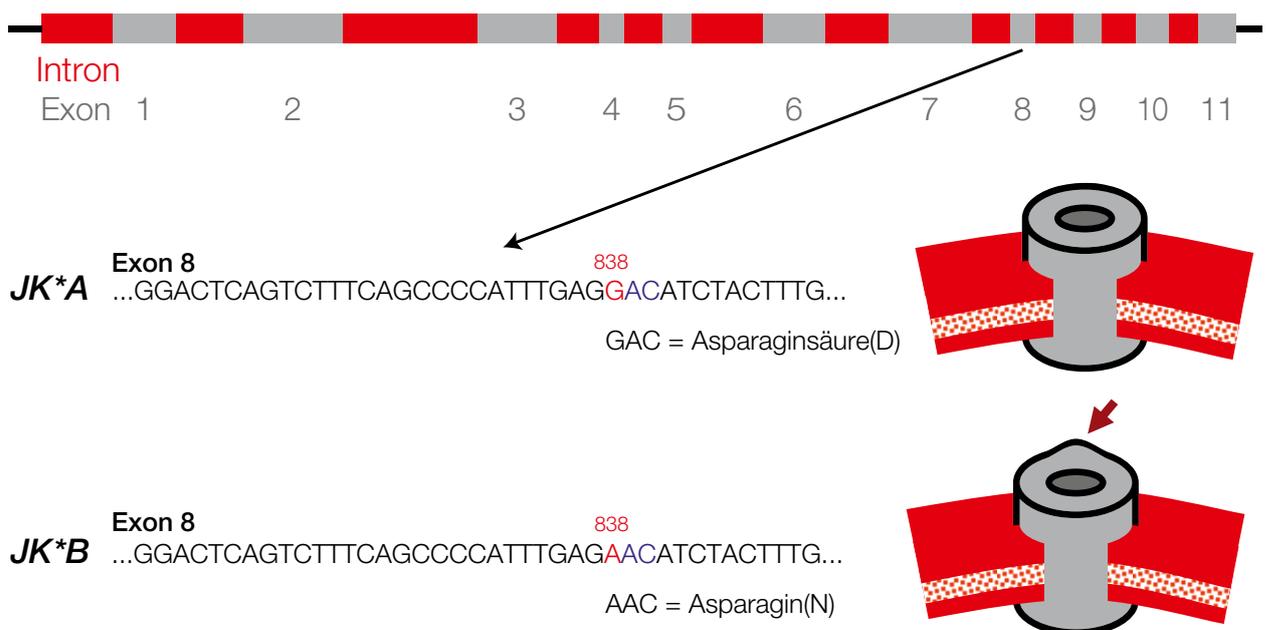


Abbildung 2: Nukleotidaustausch als Ursache eines Blutgruppenpolymorphismus.

In Exon 8 des JK-Gens bewirkt der Nukleotidaustausch, dass anstelle der Asparaginsäure ein Asparagin in das Kidd-Protein eingebaut wird. Diese Veränderung am Protein unterscheidet die Blutgruppenantigene Jk^a und Jk^b.

	Phänotypisierung	Genotypisierung
Welche Antigene sind zugänglich?	Prinzipiell alle Antigene; Praktisch gibt es nur für die wichtigsten 25 Antigene kommerzielle Typisierungsreagenzien in ausreichenden Mengen.	Eingeschränkt auf die Antigene, deren molekulare Basis bekannt ist, das sind etwa 300 Antigene.
Vorteile der Methode	<ul style="list-style-type: none"> • Direktheit der Antigen-Antikörperreaktion • Nachweis der Genexpression 	<ul style="list-style-type: none"> • Antigene, für die keine kommerziellen Reagenzien verfügbar sind, werden für die Typisierung zugänglich. • Goldstandard für die Typisierung von weak D-Typen. • Screening von serologisch D-negativen Spendern auf potentielle minimale D-Expression.
Nachteile der Methode	Störung durch Autoantikörper	<ul style="list-style-type: none"> • Indirekte Methode: ein bestimmter Genotyp wird für die Voraussage eines Phänotyps herangezogen.
Kosten	Standard	In Abhängigkeit von der verwendeten Methode (in-house versus kommerzielle Assays) günstiger oder teurer als serologische Tests.

Tabelle 1: Vor- und Nachteile von Phäno- und Genotypisierung im Vergleich

geeigneten Seren zur Antigenbestimmung zur Verfügung und für die Bestimmung seltener Blutgruppen sind Seren häufig nur im internationalen Austausch der Referenzlabore erhältlich. Hier stellt die Genotypisierung eine geeignete Alternative zur Identifikation geeigneter Spender dar.

In Zukunft wird eine Massen-Genotypisierung von Spenderblutgruppen eine zunehmende Rolle spielen. Ziel ist es einerseits, die Versorgung mit seltenen Blutgruppen zu verbessern und andererseits bezüglich „normaler Blutgruppen“ typisierte Spenden vorzuhalten. Eine Durchtypisierung von Spendern hinsichtlich der „normalen“ Allele erlaubt einen raschen Zugriff auf Präparate für Antikörper-Träger, auch bei schwierigen Antigenkonstellationen. Zudem ist es eher möglich, einen Patienten mit chronischer Transfusionsbedürftigkeit kompatibel bezüglich der klinisch wichtigsten Antigene zu versorgen. Dies gilt insbesondere für Patienten mit Thalassämie oder Sichelzellenanämie.

Die molekulare Blutgruppenbestimmung ist darüber hinaus ein wertvolles Hilfsmittel zur Identifizierung von Schwangerschaften, bei denen ein Risiko für eine kindliche Erythroblastose besteht. Die Blutgruppengenotypisierung mit fetaler DNA aus Amnionzellen ist eine etablierte Methode. Zunehmend wird für die Vorhersage D positiver Feten auch kindliche DNA genutzt, die aus dem Plasma D negativer Mütter isoliert werden kann. RhD ist das Blutgruppenprotein mit der weitaus höchsten Immunogenität und für die fetale Erythroblastose immer noch der größte Risikofaktor. Etwa 15 % der deutschen Bevölkerung weist eine Deletion des *RHD*-Gens auf und

ist somit Rh negativ. Bei Vätern von Risiko-Feten kann molekularbiologisch eine Zygotiebestimmung für *RHD* vorgenommen werden, um die Wahrscheinlichkeit einer Problemschwangerschaft vorherzusagen.

Serologie und molekulare Typisierung haben unterschiedliche Vor- und Nachteile (**Tabelle 1**) und ergänzen sich daher häufig hervorragend. Im Folgenden werden einige Anwendungen näher dargestellt.

MOLEKULARGENETIK IN DER THROMBOZYTEN- UND GRANULOZYTENDIAGNOSTIK

Alloantikörper gegen Thrombozyten und Granulozyten können fetomaternale Inkompatibilitäten (Neonatale Alloimmunthrombozytenopenie = NAIT bzw. Neonatale Immunneutropenie = NIN) bedingen, Refraktärzustände gegen Transfusionen verursachen sowie schwere Transfusionsreaktionen (granulozytäre Antikörper => TRALI, thrombozytäre Antikörper => Posttransfusionspurpura) auslösen.

Durch die Induktion einer Antikörperbildung wird eine Struktur erst zum Antigen, daher steht am Beginn einer Antigentypisierung naturgemäß immer der Antikörper/das Antiserum, also die Serologie. Anders als in der erythrozytären Immunhämatologie sind aber zur Bestimmung der Thrombozyten (HPA)- und Granulozytenantigene (HNA) geeignete Typisierungsseren äußerst rar und schon gar nicht kommerziell erhältlich. Soweit die mo-

lekulare Grundlage eines Antigens bekannt ist, ist daher eine DNA-Typisierung der einfachere Weg der Antigenbestimmung. Heute werden also mit Ausnahme des granulozytären Antigens HNA-2 sowohl HPA- als auch HNA-Antigene routinemäßig mit molekularbiologischen Methoden bestimmt. Molekularbiologisch liegen bei den meisten HNA- und HPA-Antigenen singuläre Basenaustausche zugrunde, die beispielsweise durch eine PCR mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP) oder eine PCR mit anschließendem Restriktionsverdau (PCR-RFLP) nachgewiesen werden können.

Bei den Thrombozyten unterscheidet man derzeit 26 HPA-Antigene⁴. Klinisch relevant sind hauptsächlich die Antigene HPA-1 bis HPA-5 sowie HPA-15 (**Tabelle 2**). Bei den anderen HPA-Antigenen handelt es sich im Wesentlichen auch um biallele Systeme mit jeweils einem sehr häufigen und einem sehr seltenen Allel, bei denen sich aber bisher nur jeweils die seltene Variante als Antigen erwiesen hat (sogenannte Privatantigene). Die meisten HPA-Antigene sind auf dem Glykoproteinkomplex IIb/IIIa lokalisiert. Antikörper gegen HPA-1a und HPA-5b sind mit 85 % bzw. 10 % der Fälle die häufigsten Auslöser einer NAIT⁴, auch für eine PTP ist typischerweise Anti-HPA-1a verantwortlich; anti-HPA-5b ist der häufigste HPA-Antikörper überhaupt.

Bei den Granulozyten unterscheidet man derzeit fünf Antigen-Systeme (**Tabelle 3**)⁵. Im Gegensatz zur HPA-Nomenklatur, die Antigen-basiert ist, ist die HNA-Nomenklatur Protein-basiert, d.h. jeder Nummer im HNA-System liegt ein anderes Protein zugrunde, die antigenen Varianten eines Proteins werden durch Buchstaben gekennzeichnet. Die Antigene HNA-1 und -2 sind granulozyten-spezifisch, HNA-3, -4 und -5 kommen auch auf anderen Zellen vor. HNA-4 und HNA-5 liegen einfache Punktmutationen zugrunde, die mittels PCR-SSP gut nachweisbar sind. HNA-3 konnte bis 2009 nur serologisch und auch nur eingeschränkt typisiert werden, da die molekulare Struktur des Antigens bis dahin noch unbekannt war. Anti-HNA-3a ist der häufigste HNA-Antikörper, somit gab es zumindest in spezialisierten Labors meist die Möglichkeit, zwischen HNA-3a-positiv und HNA-3a-negativ zu unterscheiden. Heterozygote ließen sich aber nicht erkennen. Anti-HNA-3b war zwar bei der Erstbeschreibung des Antigen-systems gefunden worden, stand aber später als Typisierungsserum nicht mehr zur Verfügung. Seit 2009 ist die molekulare Grundlage von HNA-3 aufgeklärt, auch hier handelt es sich um eine Punktmutation, die mittels PCR-SSP nachweisbar ist⁵. Somit ist auch die HNA-3-Typisierung außerhalb spezialisierter Labors möglich geworden. HNA-2 ist ein Isoantigen. Antikörper gegen die-

ses Antigen bilden Individuen, die HNA-2 nicht besitzen. Das Fehlen von HNA-2 basiert auf einem Expressionsdefekt, das Gen selbst ist auch bei HNA-2-negativen Individuen vorhanden⁵. Dieses Antigen ist daher einer PCR-Typisierung nicht zugänglich, sondern kann nur serologisch bestimmt werden.

Bei HNA-1 ist die Situation relativ kompliziert. Bisher kennt man vier Antigene, die von mindestens drei Allelen codiert werden⁵. Allerdings besteht keine eins-zu-eins-Beziehung zwischen Allel und Antigen (siehe **Tabelle 2**). Beispielsweise wird HNA-1b von zwei Allelen codiert, HNA-1c nur von einem. Mit *FCGR3B*02* codiert ein Allel für zwei Antigene⁵. Bei *FCGR3B* kann es zudem durch ungleiches Crossing-over zur Gendelektion und Genduplikation kommen, so dass ein Individuum zwischen 0 und 4 Allele von *FCGR3B* besitzen kann. Auf dem Gen *FCGR3B* gibt es sechs Nukleotide, die für fünf Aminosäureaustausche codieren, die wiederum für die Antigene verantwortlich sind. *FCGR3B*01* und *FCGR3B*02* unterscheiden sich an fünf Nukleotidpositionen, *FCGR3B*03* weicht um einen weiteren Basenaustausch von *FCGR3B*02* ab. Die derzeit angewandte Typisierungstechnik (PCR-SSP) weist jeweils ein oder zwei charakteristische Nukleotide pro Allel nach, was in den allermeisten Fällen ausreichend ist, um die für die HNA-1-Antigene charakteristischen Aminosäuren zu bestimmen. Der Nachweis aller fünf zu einem Allel gehörenden polymorphen Nukleotide wird durch die Existenz des sehr ähnlichen Gens für den Fcγ-Rezeptor IIIa (*FCGR3A*) erschwert, dessen Amplifikation immer ausgeschlossen werden muss. Eine solche „Allel-Typisierung“ erfordert eine Sequenzierung⁵.

Wie kann die Molekularbiologie die erythrozytenserologischen Untersuchungen bei Patienten unterstützen?

Bei prätransfusionellen Patientenabklärungen werden gelegentlich Diskrepanzen bzw. unklare Resultate bei der Bestimmung von ABO, RhD, RhCE und weiteren Blutgruppenantigenen beobachtet. Es kann sich dabei um Diskrepanzen handeln wie z.B. zwischen Antigen- und Isoagglutininbestimmung (ABO), Diskrepanzen zwischen Phänotyp und Genotyp, oder unklare Resultate wegen Abschwächungen bei der Antigenbestimmung. Die Aufklärung solcher Fälle ist meistens eine interdisziplinäre Zusammenarbeit, die sowohl die Serologie als auch die Molekularbiologie mit einschließt. In den letzten Jahren wurden Hilfsmittel entwickelt, um diese Fälle einfacher abklären zu können. So kann z.B. die Abklärung beim Vorliegen von Antikörpern gegen hochfrequente Antigene (HFA) durch rekombinante Blutgruppenantigene und molekularbiologische Bestimmung (Genotypisierung) un-

Antigen	Synonym	Lokalisation	Allele	Antigenfrequenz [%]
HPA-1a HPA-1b	Zw ^a , PIA ¹ Zw ^b , PIA ²	GP11a	ITGB3*176T ITGB3*176C	97,50 30,80
HPA-2a HPA-2b	Ko ^b Ko ^a , Sib ^a	GP1b α	GP1BA*482C GP1BA*482T	99,80 11,80
HPA-3a HPA-3b	Bak ^a , Lek ^a Bak ^b	GP11b	ITGA2B*2621T ITGA2B*2621G	86,14 62,92
HPA-4a HPA-4b	Yuk ^b , Pen ^a Yuk ^a , Pen ^b	GP11a	ITGB3*506G ITGB3*506A	> 99,90 < 0,10
HPA-5a HPA-5b	Br ^b , Zav ^b Br ^a , Zav ^a	GP1a	ITGA2*1600G ITGA2*1600A	98,79 20,65
HPA-15a HPA-15b	Gov ^b Gov ^a	CD109	CD109*2108C CD109*2108A	77,30 74,87

Tabelle 2: Klinisch relevante HPA-Antigene

Antigen	Lokalisation	Allele	Klinische Bedeutung	Bemerkung
HNA -1a -1b -1c -1d	Fc γ R11b = CD16b	<i>FCGR3B</i> *01 <i>FCGR3B</i> *02 und *03 <i>FCGR3B</i> *03 <i>FCGR3B</i> *02	NIN + TRALI	Allele unterscheiden sich in mehreren Nukleotiden voneinander
HNA-2	CD177	GP1BA*482C GP1BA*482T	NIN + TRALI	Isoantigen, Expressionsdefekt
HNA-3a, -3b	CTL2	SLC44A2*461G, *461A	TRALI	Punktmutation
HNA-4a, -4b	CD11b	ITGAM*230G, *230A	NIN	Punktmutation
HNA-5a, -5b(w)	CD11a	ITGAL*2372G, *2372C	NIN	Punktmutation

Tabelle 3: HNA-Antigene

terstützt werden. Mit folgenden Fallbeispielen aus dem Schweizerischen Referenzlabor wird das Zusammenspiel von Serologie und Molekularbiologie erläutert.

Fallbeispiel 1 (ABO): Die Probe wird zur Abklärung aufgrund fehlender Isoagglutinine gegen A1- und A2- Testerythrozyten eingesendet. Die Wiederholung der Antigenbestimmung der Antigene A- und B fällt negativ aus. Die Isoagglutininbestimmung gegen B-Testerythrozyten fällt positiv aus, während die Isoagglutininbestimmung gegen A1- und A2-Testerythrozyten negativ ist. Es könnte sich hier um eine A-Untergruppe handeln, die serologisch nicht zu detektieren ist. DNA von der Probe wird extrahiert und ein ABO-Kit (ABO Type, BAGene, BAGHealthcare)

angesetzt. Die Testergebnisse zeigen, dass es sich um die ABO-Variante *ABO**AEL.01 handelt. Der Genotyp ist *ABO**O.01.01/*AEL.01. Früher konnte diese Variante (Ael, el für Elution) nur mittels Adsorption-Elution detektiert werden, heutzutage gilt die molekularbiologische Untersuchung als Gold-Standard. Patienten mit dieser ABO-Variante wird Blut der Gruppe O verabreicht.

Fallbeispiel 2 (RhE): Die folgende Probe wurde uns wegen einer Abschwächung bei der RhE- Antigenbestimmung zugewiesen. Der Patient war positiv für die Antigene RhC, Rhc und Rhe. Die RhE-Antigenbestimmung zeigte mit einem monoklonalen Anti-E Antikörper (ID-Gel) ein abgeschwächtes Resultat, während das Resultat mit

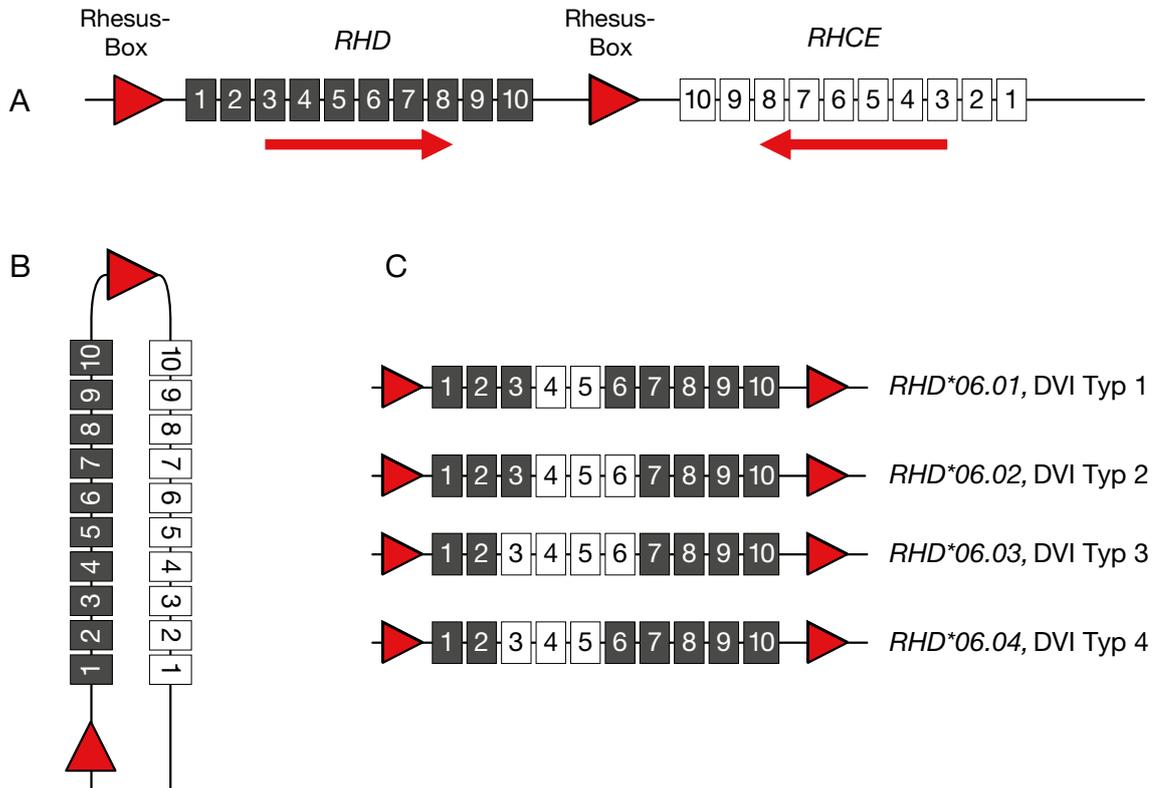


Abbildung 3

Die Gene *RHD* und *RHCE* befinden sich in gegenläufiger Orientierung auf Chromosom 1 (A). Bei Duplikations- oder Reparaturvorgängen kann sich eine Haarnadelformation ausbilden, bei der die Gene nebeneinander zu liegen kommen (B). Liest die Polymerase streckenweise vom falschen DNA-Strang ab, werden dessen Sequenzen in den parallel gegenüberliegenden Strang eingebaut. Die Varianten des partial D Kategorie VI sind durch derartige Konversionsvorgänge entstanden (C).

polyklonalen humanen Anti-E Antikörpern (ID-Gel) sogar negativ ausgefallen ist. Weitere monoklonale Anti-E Antikörper ergaben unterschiedliche Resultate. Diese Reaktionen ließen auf eine RhE-Variante schließen. Aus diesem Grund wurde das *RHCE*-Gen sequenziert. Im Exon 3 sind drei Mutationen, 361A>T, 380C>T und 383A>G, vorhanden, die bei der Allel-Variante *RHCE*03.15.02* (*RHCE*cEJU*) bekannt sind. Patienten mit dieser RhE-Variante wird RhE-negatives Blut verabreicht.

Fallbeispiel 3 (Anti-Lu13): Die Probe wurde uns von einem regionalen Blutspendedienst mit dem Verdacht auf einen Antikörper gegen ein hochfrequentes Antigen zugewiesen. Die Blutgruppe und der Phänotyp des Patienten war B Rhccdde. Der direkte Antihumanglobulintest mit polyvalentem Serum und mit Anti-IgG ergab ein negatives Resultat. Das Serum des Patienten reagierte positiv mit allen Testzellen im indirekten Antihumanglobulintest (IAT) und im Enzymtest mit Papain. Dagegen zeigte das Patientenserum im IAT mit Testzellen, die mit dem Enzym Trypsin behandelt wurden, negative Resultate. Aufgrund dieser Resultate kommen am ehesten Antikörper gegen HFAs des Lutheran-Systems (Lu) in Betracht. Der am häufigsten vorkommende Antikörper gegen ein HFA im Lu-System ist Anti-Lu(b). Der Patient ist jedoch Lu(a-b+).

Zur weiteren Abklärung wurden Testerythrozyten mit dem seltenen Phänotyp In(Lu) verwendet. Bei diesem Phänotyp sind unter anderem alle Antigene im Lu-System so stark unterdrückt, dass der Phänotyp als Lu(a-b-) erscheint. Diese Zellen zeigten mit dem Patientenserum negative Resultate. Des Weiteren konnten Antikörper gegen Lu6, Lu8 und Lu23 ausgeschlossen werden. Nur mit einer Lu13 negativen Testzelle konnte ein negatives Resultat beobachtet werden. Zur Bestätigung eines Anti-Lu13 wurden die Exone 11 und 13 des *LU*-Gens sequenziert. Die Sequenzierung zeigte die Mutationen, 1340C>T und 1742A>T, die für die Allel-Variante *LU*02.-13* bekannt sind. Da die klinische Relevanz dieses Antikörpers nicht eindeutig ist (wenig bekannte Fälle), wird die Transfusion von Lu13 negativem Blut, wie z. B. Lu(a-b)-Blut, empfohlen.

WEAK D-DIAGNOSTIK ZUR FESTLEGUNG DER TRANSFUSIONS- UND PROPHYLAXESTRATEGIE

Einen festen Stellenwert in der Diagnostik besitzt mittlerweile die Abklärung des D-Status von Personen mit schwachen oder diskrepanten Reaktionen bei der Antigen D Bestimmung mittels PCR.

Bei einem rein serologischen Vorgehen besteht das Problem, dass eine ganze Reihe unterschiedlicher D Formen bei der serologischen Untersuchung auffallend schwach reagiert:

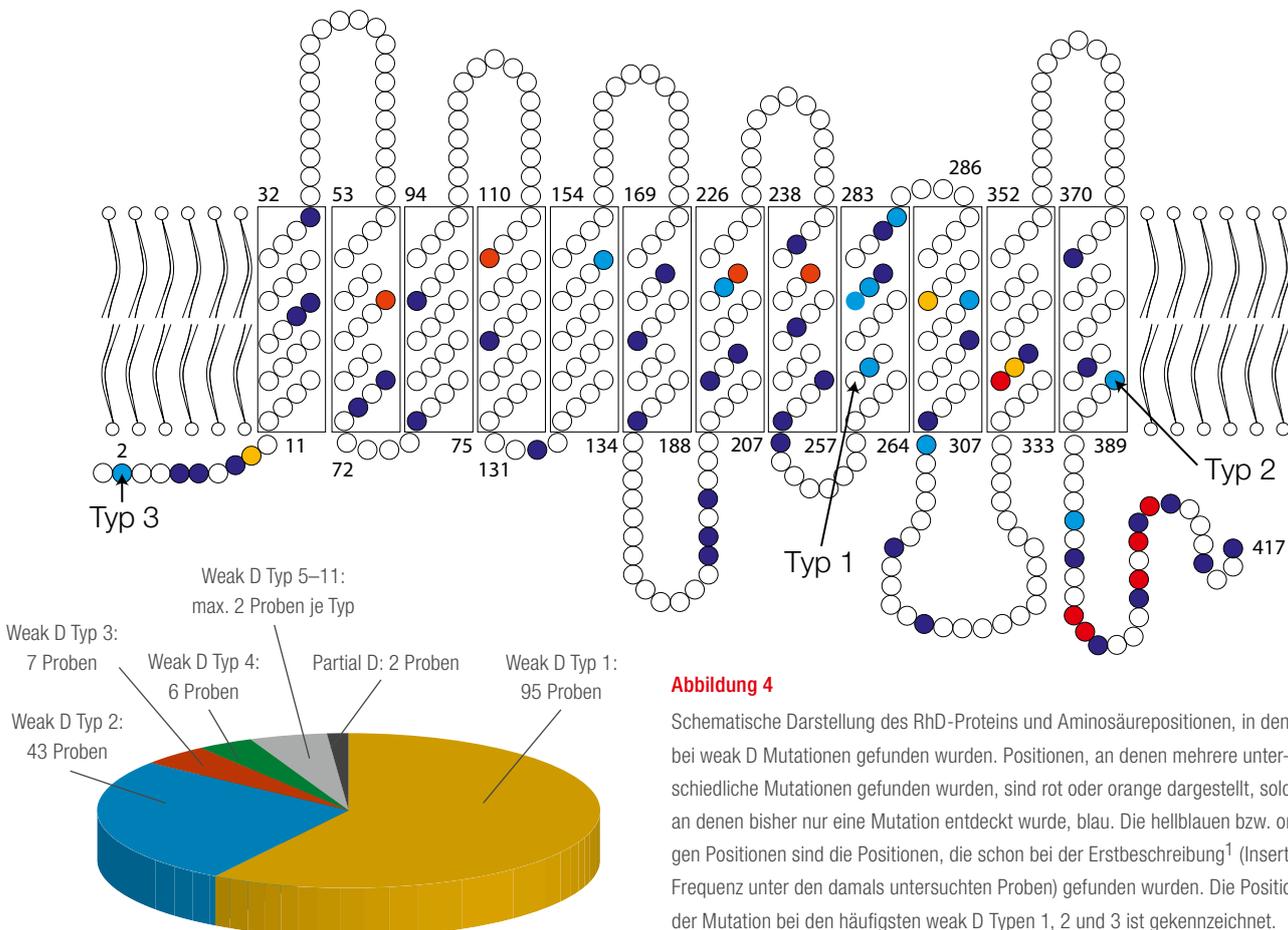
- Die „häufigen“ weak D Typen Typ 1, Typ 2, Typ 3. Diese weak D Typen sind vergleichsweise häufig, werden auf Grund ihrer noch einigermaßen hohen Antigendichte öfters D positiv transfundiert und trotzdem wurde bisher noch keine Allo-Anti-D-Immunsierung nachgewiesen. Die D positive Transfusion von Personen mit weak D Typ 1, Typ 2 und Typ 3 gilt daher als sicher.
- Weak D Typen, bei denen eine Anti-D-Immunsierung beobachtet wurde, wie weak D Typ 11, Typ 15, Typ 33. Hier ist es offensichtlich, dass eine D negativ Transfusionsstrategie gewählt werden muss.
- Zahlreiche andere weak D Typen (**Abbildung 4**); in der „RhesusBase“ (<http://www.rhesusbase.info>) sind über 100 weak D Typen bzw. Subtypen gelistet. Bei diesen Typen gibt es im Regelfall keine Information, ob ihre Träger D positiv transfundiert werden können, da zwar einerseits keine Anti-D-Immunsierung beschrieben wurde, sie aber andererseits so selten sind, dass man dies auch nicht erwarten kann, oder eine derart niedrige Antigendichte besitzen, dass man davon ausgehen muss, dass ihre Träger bisher stets D negative Präparate erhalten haben. Ein Sonderfall ist weak D

Typ 4; hier gibt es unterschiedliche Subtypen (siehe unten).

- Partial D Formen mit geringer Antigendichte. Insgesamt sind in der „RhesusBase“ über 100 Partial D Formen gelistet, von denen allerdings nicht alle eine niedrige Antigendichte haben.

Die serologische Abklärung des „schwachen oder diskrepanten D“ endet spätestens mit dem Einsatz von Panels unterschiedlicher monoklonaler Antikörper. Diese Panels sind bei mehreren Herstellern erhältlich und gut geeignet, die typischen Partial D wie D Kategorie IV, V, VI, VII, DHAR oder DFR zu erkennen. Eine Unterscheidung der unterschiedlichen weak D Typen ist jedoch nicht möglich, und selbst eine sichere Abtrennung mancher Partial D mit niedriger Antigendichte (z. B. DHMi) ist oft kaum machbar. Da Partial D nur eine Minderzahl der Proben zugrunde liegt, die mit den Anti-D schwach oder diskrepant reagieren, bleibt bei der Mehrzahl der Proben nach serologischer Abklärung nur die Aussage „Könnte ein häufiger weak D Typ sein – muss es aber nicht“.

Mit molekularen Methoden ist es dagegen möglich, ganz gezielt auf die Polymorphismen (Veränderungen der Nukleotidsequenz) zu testen, die bei den häufigen weak D Typen verändert sind. Man muss somit nicht nach dem Ausschlussprinzip arbeiten, sondern kann mit drei Tests – dem Test auf weak D Typ 1, dem Test auf weak D Typ 2



und dem Test auf weak D Typ 3 – in über 90 % das Allel des Patienten bestimmen und somit zu einer Aussage kommen. Das ist natürlich wesentlich befriedigender als die serologisch zu erzielende Aussage. In der Praxis enthalten die entsprechenden Kits zudem meist noch Nachweisreaktionen für weitere wiederholt beobachtete weak D und Partial D mit geringer Antigendichte. In der großen Mehrzahl der Proben erhält man so durch relativ geringen Aufwand ein eindeutiges Ergebnis.

Insgesamt besteht zum Vorgehen international weitgehender Konsensus (**Abbildung 5**). Lediglich drei, allerdings wesentliche Punkte, sind Gegenstand z.T. heftiger Diskussionen:

1. Soll in jedem Fall eine molekulare Diagnostik durchgeführt werden, wenn abgeschwächte oder diskrepante Reaktionen auftreten? Hier reicht die Palette der Antworten von „in jedem Fall“⁷ über „bei Frauen vor der Menopause oder langfristigem Transfusionsbedarf“⁸ bis zu „eine Klärung ist anzustreben“. Letztlich ist es eine Frage nach Aufwand und Nutzen. Auch wenn die molekulare Untersuchung auf den ersten Blick teuer erscheint, zeigten Berechnungen, dass sich beispielsweise bei europäischen Frauen vor der Menopause durch den Wegfall unnötiger Rhesusprophylaxen die Versorgung kostengünstiger werden würde.⁹

2. Falls auf die molekulare Diagnostik verzichtet wird, wie soll dann weiter vorgegangen werden? Auf den ersten Blick erscheint hier eine D negative Versorgung die sicherere Variante, sie impliziert jedoch einen unnötig hohen Verbrauch D negativer Präparate und unnötige Gaben von Rhesusprophylaxen (falls man nicht ohnehin in diesem Fall stets die molekulare Abklärung wählt). Aus diesem Grund sehen viele Empfehlungen unter bestimmten Bedingungen (z.B. in den deutschen Richtlinien von 2010: eindeutig positive Reaktionen mit beiden Antikörpern) für diesen Fall eine D positive Transfusionsstrategie vor. Dies impliziert jedoch, dass gelegentliche Anti-D-Immunisierungen in Kauf genommen werden, was besonders bei Frauen im gebärfähigen Alter unglücklich wäre.

3. Bei weak D Typ 4 ist die optimale Versorgungsstrategie umstritten. Bei weak D Typ 4.0 wurden ein(zelne) Fall/Fälle von Anti-D-Immunsierung beobachtet, was ein Expertengremium bewog, sich nicht für eine D positive Transfusionsstrategie auszusprechen. Für weak D Typ 4.1 ist die Beweislage dagegen analog weak D Typ 1 bis 3: Es ist einigermaßen häufig (etwa 1 % aller Spender mit Rhesusformel ccD.ee), wird nahezu immer als D positiv bestimmt und entsprechend transfundiert und bisher wurde trotzdem noch nie eine Anti-D-Immunsierung bei weak D Typ 4.1 beobachtet. Bei



weak D Typ 4.2 ist es gerade umgekehrt: Personen mit weak D Typ 4.2 können leicht gegen normales D immunisiert werden und benötigen D negative Versorgung und ggf. Rhesusprophylaxe.

Tendenziell dringen die in den letzten Jahren formulierten Empfehlungen auf eine molekulare Abklärung zumindest bei Frauen im gebärfähigen Alter.

Pränatale Blutgruppenbestimmung aus dem Blut der Mutter

Eine Blutgruppenunverträglichkeit zwischen einer Schwangeren und dem ungeborenem Kind stellt eine schwerwiegende Komplikation innerhalb der Schwangerschaft dar. Möglich ist eine solche Unverträglichkeit für jedes Blutgruppensystem, über 90% der Fälle betreffen allerdings das sogenannte Rhesus-D Merkmal. Liegt die Konstellation einer Rhesus-D-negativen Mutter und eines Rhesus-D-positiven Kindes vor, kommt es bei der Mutter zu einer Immunantwort. Der mütterliche Organismus bil-

det Antikörper gegen Rhesus-D-positive fetale Blutzellen. Diese Antikörper können durch die Plazenta in den kindlichen Kreislauf gelangen und sich dort mit Rhesus-D-positiven roten Blutkörperchen des Feten verbinden, die dadurch zerstört (hämolytisch) werden. Sind viele Antikörper durch die Mutter gebildet worden, kann es zu einer massiven Hämolyse kommen, die dann eine schwere Blutarmut des ungeborenen Kindes zur Folge hat. Die pränatale Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors (oder anderer Blutgruppen) ist daher von klinischer Bedeutung. Ziel der pränatalen Diagnostik ist neben der Bestimmung des Schweregrades der kindlichen Anämie auch die Analyse der fetalen Blutgruppe mittels molekulargenetischer Methoden.

Das Vorhandensein freier fetaler DNA im Plasma bzw. Serum von Schwangeren wurde bereits 1997 von Lo und Mitarbeitern beschrieben¹⁰. Die Untersuchung dieser DNA wird seitdem zunehmend als nicht-invasive Alternative zu bekannten Techniken wie Chorionzottenbiopsie,

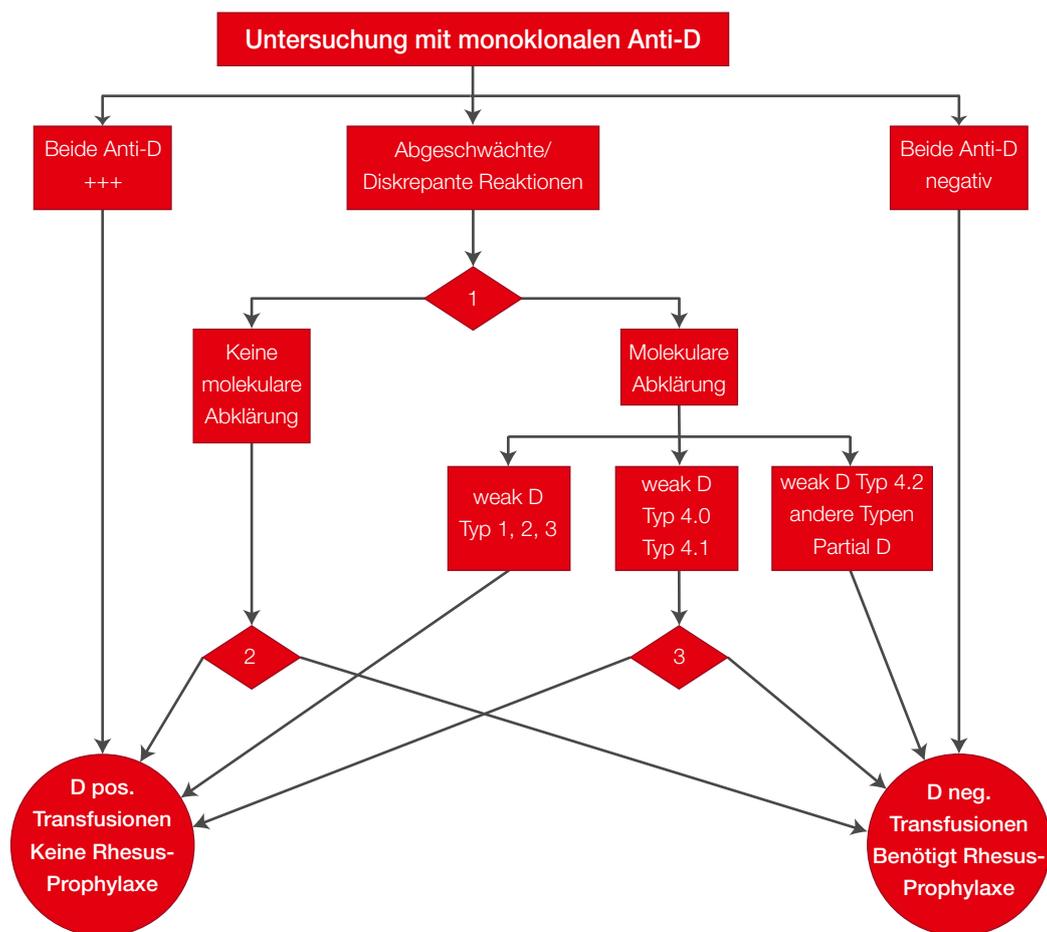


Abbildung 5

Entscheidungsschema zur serologischen und molekularen D-Diagnostik. Dargestellt ist einerseits der aktuelle interanationale Konsens – molekulare Abklärung bei abgeschwächten/diskrepanzen Reaktionen, D positive Transfusionsstrategie für weak D Typ 1, Typ 2 und Typ 3, D negative Transfusionsstrategie für Partial D und seltene weak D, – als auch die derzeit wesentlichen Kontroversen (siehe auch Text): 1: In welchen Fällen soll die molekulare Abklärung erfolgen, 2: Welche Transfusionsstrategie soll ohne molekulare Abklärung eingeleitet werden und 3: Wie soll bei weak D Typ 4.0 und Typ 4.1 vorgegangen werden.

Amniosentese oder Cordozentese genutzt. Unabhängig von der Technik, invasiv oder nicht-invasiv, unterscheidet sich die pränatale Blutgruppendiagnostik in einem Punkt sehr deutlich von einer normalen Patientendiagnostik: während bei der Genotypisierung von Patienten meistens die Ergebnisse einer serologischen Untersuchung vorliegen, sind diese Informationen bei einer pränatalen Untersuchung nicht vorhanden. Demzufolge ist eine Plausibilitätskontrolle der Ergebnisse nicht möglich.

Die Vorgehensweise bei der nicht-invasiven pränatalen Blutgruppenbestimmung ist recht einfach: mit einer simplen venösen Blutentnahme kann zellfreie DNA isoliert und durch den Einsatz eines PCR-Verfahrens vervielfältigt werden (**Abbildung 6A**). Grundsätzlich kann nur ein Blutgruppenmerkmal bestimmt werden, für das die Schwangere selber negativ ist, da die isolierte zellfreie DNA eine Mischung aus mütterlicher und fetaler DNA darstellt.

Für die Bestimmung des Rhesus-D Merkmals bedeutet dies, dass jede Rhesus-D positive Reaktion auf die Blutgruppe des Feten hinweist, da die Mutter Rhesus-D negativ ist. Problematischer sind die Proben, in denen der Fetus scheinbar Rhesus-D negativ ist. Hier sind Kontrollen notwendig, die das Vorhandensein fetaler DNA beweisen. Für männliche Feten ist die gleichzeitige Vervielfältigung Y-spezifischer DNA-Sequenzen (z.B. *Y-AMEL*) ausreichend, um mütterliche und fetale DNA zu unterscheiden. In Teil B der **Abbildung 6** sind mögliche Ergebnisse einer Untersuchung auf das fetale Rhesus-D Merkmal dargestellt. Hier zeigt sich in der **Teilabbildung 6B(d)** ein negatives Ergebnis sowohl für das Rhesus-D Merkmal als auch für die Y-spezifischen Sequenzen. Es kann als Rhesus-D negativer, weiblicher Fetus interpretiert werden, denkbar ist aber auch eine nicht ausreichende Menge an fetaler DNA in der PCR bzw. ein technisches Versagen der Nachweismethode. Eine solche Probe kann

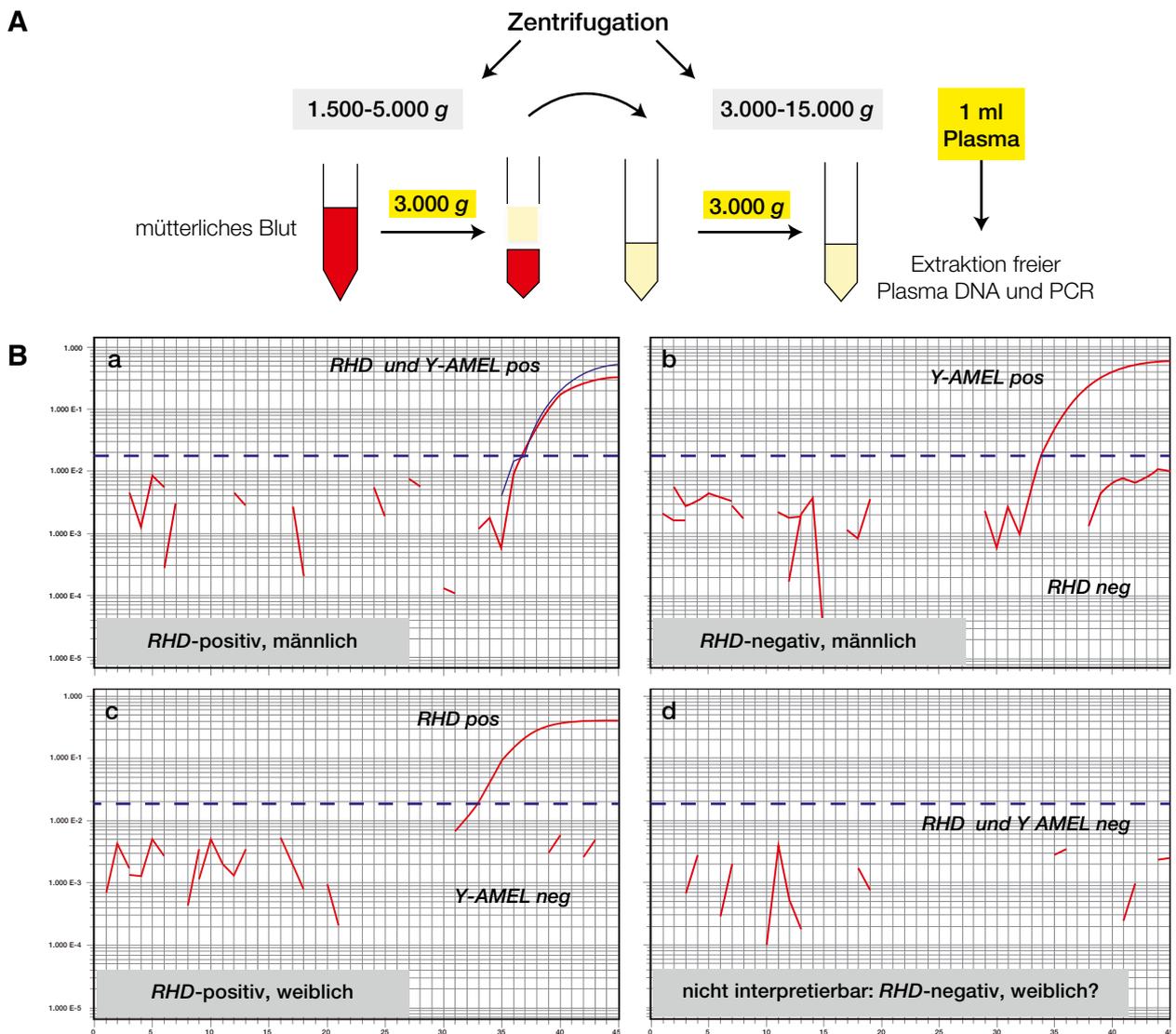


Abbildung 6A: A) Vorgehensweise zur Gewinnung zellfreier DNA und B) Nachweis des kindlichen Rhesus-D Merkmals mittels PCR.

Die Interpretation der Ergebnisse ist in Grau unterlegt.

nur durch weiterführende Untersuchungen interpretiert werden. Hierfür werden natürlich vorkommende Varianten auf dem menschlichen Erbgut als interne Kontrolle genutzt. Das Muster der mütterlichen Varianten wird mit dem des ungeborenen Kindes verglichen, ohne dass eine väterliche Blutprobe vorhanden sein muss. Jedes positive Signal aus der PCR der Plasma DNA, das nur beim Kind nicht aber bei der Mutter zu finden ist, muss demnach vom Vater herrühren und folglich fetalen Ursprungs sein.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse einer fetalen Rhesus-D Genotypisierung aus dem Plasma der Mutter sehr gut mit dem tatsächlichen Phänotypen übereinstimmen. Durch die Einführung von Kontrollen für das Vorhandensein fetaler DNA kann eine sichere pränatale Rhesus-D Bestimmung des ungeborenen Kindes durchgeführt werden, ohne dass hierfür eine Fruchtwasserpunktion nötig ist¹⁰⁻¹³. Dieses Vorgehen hat zwei große Vorteile:

1. Eine Fruchtwasserpunktion wird der Pränatalmediziner erst ab der 15. Schwangerschaftswoche durchführen. Die Isolierung freier fetaler DNA aus dem Blut der Mutter ist aber schon ab der 11. Schwangerschaftswoche möglich, in einzelnen Fällen konnte die Blutgruppe bereits in der 9. Woche bestimmt werden.
2. Insbesondere in Fällen, in denen die Mutter bereits Antikörper aus vorangegangenen Schwangerschaften besitzt, ist die neue Methode von großem Vorteil. Durch die Fruchtwasserpunktion können vorhandene Antikörper so stimuliert werden, dass eine noch stärkere Produktion einsetzt, die das Wohlergehen des Feten massiv gefährdet.

TESTUNG RHESUS D NEGATIVER BLUTSPENDER AUF SPUREN VON D-ANTIGEN MITTELS RHD PCR

Unter den irregulären Antikörpern nimmt Anti-D eine Sonderstellung ein, da es nach wie vor die häufigste Ursache eines schweren Morbus hämolyticus neonatorum/fetalis ist. Glücklicherweise existiert mit der Anti-D-Prophylaxe eine effektive Methode der Primärprophylaxe, Verfahren zur Sekundärprophylaxe haben dagegen das experimentelle Stadium noch nicht verlassen.

Daraus ergibt sich die besondere Bedeutung der Vermeidung der Anti-D-Immunsierung: Wurde eine Patientin erst einmal beispielsweise durch eine Transfusion Anti-D immunisiert, so kann auch eine korrekt gegebene Anti-D-Prophylaxe den Kreislauf zunehmender Boosterung des

Anti-D im Verlauf von Schwangerschaften nicht mehr durchbrechen. Aus dieser Erkenntnis leitet sich die Forderung ab, transfusionsbedingte Anti-D-Immunsierungen bei prämenopausalen Frauen so gut wie möglich zu vermeiden. Voraussetzung dazu ist selbstverständlich, dass als D negativ deklarierte Präparate tatsächlich D negativ sind.

Hier stellt sich die Frage, „wie wenig“ D-Antigen noch immunogen sein kann. Kaum jemand bezweifelt, dass die Transfusion eines Erythrozytenpräparates mit weak D oder DEL ein deutlich geringeres Anti-D-Immunsierungsrisiko als die Transfusion eines typischen D positiven Präparates verursacht. Es werden jedoch immer wieder Fälle von Anti-D-Immunsierung durch für D negativ gehaltene weak D oder DEL Präparate berichtet. Dabei wurde zumindest ein Teil der verursachenden weak D Präparate beim D Nachweis im indirekten Coombstest übersehen. Die Antwort auf die Frage lautet daher „so wenig, dass es mit serologischen Methoden nicht mehr sicher erfasst werden kann“.

Mit DEL bezeichnet man D-Varianten, bei denen sich das Antigen D nur mit Adsorption/Elution nachweisen lassen. DEL wurde anfangs für eine ganz vorwiegend im asiatischen Raum auftretende Besonderheit gehalten, mittlerweile ist jedoch klar, dass auch in Zentraleuropa die Frequenz unter scheinbar D negativen Blutspendern bei 1:350 bis 1:2.000 liegt¹⁴. Mittlerweile unterscheidet man über dreißig unterschiedliche Formen, wobei es jedoch bei einigen Formen nicht klar ist, ob sie nicht doch eher D negativ oder ein weak D sind. Typische Ursache sind Mutationen an Spleißstellen, die die Ausbildung eines normalen RhD-Proteins behindern. Besonders häufig ist DEL unter C positiven, serologisch D negativen Spendern.

Der serologische Nachweis von DEL mittels Adsorption/Elution ist extrem aufwändig und für das Routine-Spenderscreening nicht geeignet. Durch die *RHD* PCR der Blutspender ergibt sich hier ein völlig neuer Ansatz. Das *RHD*-Gen von Personen mit weak D oder DEL unterscheidet sich bei den meisten Formen nur in minimalen Details von dem *RHD*-Gen von „normal“ D positiven Personen. Bei der Untersuchung mit den allermeisten *RHD* PCR Verfahren ist es daher praktisch nicht möglich, diese Spender mit den „typischen“ D negativen Spendern (die kein *RHD*-Gen besitzen) zu verwechseln. Das Problem besteht eher darin, D negative Spender, die ein inaktives *RHD*-Gen besitzen, nicht für D positiv zu halten. Die Testung der Blutspender mittels *RHD* PCR ist somit die ideale Ergänzung zur serologischen D Testung, um die Sensitivitätslücke zu schließen.

Mittlerweile hat eine ganze Reihe von Blutspendediensten die *RHD* PCR in der einen oder anderen Form in das Spenderscreening aufgenommen. Dabei gibt es im Detail unterschiedliche Vorgehensweisen: Einige Blutspendedienste konzentrieren sich auf Erstspender, was logistisch besonders einfach ist, andere haben auch ihre Altspender untersucht. Einige konzentrieren sich auf Spender mit „C“ oder „E“, da hier DEL besonders häufig ist, andere testen auch ccddee Spender, um z.B. weak D Typ 4.3 zu entdecken. Führt man die *RHD* PCR zusätzlich zur „offiziell ausreichenden“ serologischen Testung im indirekten Coombstest durch, kann man ein sehr einfaches und billiges System benutzen, andererseits spart man die Kosten des indirekten Coombstests, wenn die *RHD* PCR so ausgelegt ist, dass sie ihn vollständig ersetzen kann. Dieser Ansatz wurde in der Schweiz übernommen, dort ist die *RHD* PCR der Blutspender mittlerweile obligatorisch.

Nicht unerwähnt bleiben sollte der größte Nachteil der *RHD* PCR: es fallen auch D negative Spender auf, die ein inaktives *RHD*-Gen tragen, und die Abgrenzung dieser Spender von DEL kann sehr aufwändig werden, vor allem wenn nicht eines der „häufigeren“ Formen inaktiver *RHD*-Gene vorliegt. Die Frequenz derartiger Spender ist vergleichbar mit der Frequenz von DEL-Spendern. Diese aufwändigen Abklärungen haben damit nur wenig Auswirkung auf die Gesamtkosten der Spenderdiagnostik.

Hochdurchsatz-Genotypisierung von Blutspendern

Warum müssen Blutspendedienste große Kohorten ihrer Spender auf ein weites Antigenspektrum typisieren?

Rund zwei Prozent der Erythrozytenkonzentrate (EK) werden für die Versorgung von Patienten mit irregulären antierythrozytären Antikörpern benötigt.

Um diese Antikörperträger im Bedarfsfall rasch und adäquat mit EKs versorgen zu können, müssen Blutspendedienste einen Teil ihrer Spender, neben den routinemäßig bestimmten Antigenen ABO, Rh D, Kell und RhCcEe-Phänotyp, auf etliche weitere Antigene insbesondere im Kell-, Kidd-, Duffy- und MNS-Blutgruppensystem typisieren. Nur eine große Anzahl typisierter Spender bzw. Antigene in den Datenbanken garantiert, dass im Anlassfall Antikörperträger rasch mit kompatiblen Blut versorgt werden können. Je seltener der kompatible Bluttyp in der Spenderpopulation vorkommt, desto aufwendiger wird die Suche für die Blutspendedienste. Einerseits können solche niedrigen Prävalenzen von passenden Bluttypen

durch kombinierte Antikörperspezifitäten gegen die üblichen (polymorphen) Antigene zustande kommen (bei einer Kombination von Anti-C, -M, -Fy^a liegt die Prävalenz des verträglichen Bluttyps z.B. bei 2%), oder es handelt sich um Antikörperspezifitäten gegen hochfrequente Antigene (HFA; der HFA-negative Typ ist dann per se ein „seltener Bluttyp“).

Wo liegen die Vorteile der genetischen Spendertypisierung?

Grundsätzlich ist egal, ob Spendertypisierungsprogramme serologisch oder molekularbiologisch durchgeführt werden. Die Routineparameter ABO, Rh-Phänotyp, Kell sind Domänen der Serologie (bei Rh D, insbesondere bei Varianten, ist dies allerdings schon differenzierter zu betrachten, siehe entsprechende Kapitel dieses Artikels), bei der Typisierung eines erweiterten Spektrums von Antigenen ist man serologisch praktisch aber auf etwa 25 Antigene eingeschränkt, für die kommerzielle Reagenzien zur Verfügung stehen (siehe auch **Tabelle 1**).

Molekularbiologisch gibt es diese Einschränkungen bezüglich Verfügbarkeit von Reagenzien nicht. Hier können all jene Antigene typisiert werden, die molekular, respektive auf DNA- bzw. Allel-Ebene charakterisiert sind und das ist derzeit bereits für etwa 300 Antigene der Fall. Aber nicht alle diese Antigene sind in der Praxis gleichermaßen wichtig.

Welche Antigene werden üblicherweise in Spendertypisierungsprogrammen eingeschlossen?

Spendertypisierungsprogramme schließen meistens die wichtigsten Antigene des RH-, MNS-, Kell-, Kidd- und Duffy-Systems ein, gegen die in der Praxis häufig Antikörper gebildet werden. Das sind jene Antigene, die typischerweise z.B. auch in den kommerziellen Antikörperdifferenzierungspanels angeführt werden. Neben diesen „polymorphen“ Antigenen ist die Typisierung der Blutspender bezüglich einiger hochfrequenter Antigene (HFA) wichtig, um HFA-negative Sonderspender, also Menschen mit seltenen Bluttypen (Rare Blood), zu finden. Dabei decken die fünf HFA-Spezifitäten, k, Yt^a, Kp^b, Vel und Lu^b, zusammen rund drei Viertel der HFA-Antikörperprävalenz bei Europäern ab. Die Suche ist aufwendig: um einen negativen Spender zu finden, müssen im Falle von Vel etwa 4.000, im Falle von Kp^b etwa 10.000 Personen untersucht werden. Insbesondere für die Suche nach Menschen mit diesen seltenen Bluttypen sind kommerzielle serologische Reagenzien nicht in ausreichender Menge verfügbar, hier bietet die genetische Spendertypisierung deutliche Vorteile.

Population	Getestete „D negative“ Spender	Gefundene DEL	Frequenz DEL unter „D neg“
Dänemark	5.058 (4.932 Ergebnisse)	2*	1:2.029
Norddeutschland	46.756	76	1:615
Südwestdeutschland	46.133	47	1:982
Oberösterreich	23.330	66	1:353

Tabelle 4: Populationsstudien zu DEL in Zentraleuropa (modifiziert nach [14])

*Zuzüglich einem Spender mit RHD (IVS3+1G>A), der als D negativ charakterisiert wurde.

	DRK Springe	SRK Bern	SRK Zürich	ÖRK Wien	DRK Hagen
Typisierte Spender	60.000	22.000	37.000	25.000	7.500
Eingeschlossene Antigene/davon HFA	16/4	20/6	46/13	35/12	22/7
Antigene, HFA sind hervorgehoben	M, N, S, s Lu ^a , Lu^b Kp ^a , Kp^b Fy ^a , Fy ^b Jk ^a , Jk ^b Yt^a , Yt ^b , Co^{a*} , Co ^{b*} *Statt Co ^a wurde bei den letzten 15.000 Personen Vel getestet	M, N, S, s Lu ^a , Lu^b K, k , Kp ^a , Kp^b Fy ^a , Fy ^b , Fy ^{bWK} , Fy0 Jk ^a , Jk ^b Yt^a , Yt ^b Co^a , Co ^b Do ^a , Do ^b	M, N, S, s, He, U* K, K _{mod} , k, Kp ^a , Kp^b Fy ^a , Fy ^b , Fy ^{bWK} , Fy0 Jk ^a , Jk ^b , Jk ^{ab} , JK_{null} Di^a , Di ^b , Wr^a , Wr ^b Yt^a , Yt ^b Co^a , Co ^b LW^a , LW ^b In^a , In ^b SC:1 , SC:2 Do ^a , Do ^b Vel, Vel_{null} ABO D, C, c, E, e, Cw *teilweise Abdeckung	M, N, S, s Lu ^a , Lu ^b , Lu8, Lu14 K, k, Kp ^a , Kp ^b , Js ^a , Js^b K11 , KEL17, Kpc Fy ^a , Fy ^b , Fy ^{bWK} , Fy0 Jk ^a , Jk ^b Di ^a , Di ^b , Wr ^a , Wr ^b Yt^a , Yt ^b Co^a , Co ^b In^a , In ^b Do ^a , Do ^b	M, N, S, s Lu ^a , Lu^b , Lu8 , Lu14 Kp ^a , Kp^b Fy ^a , Fy ^b Jk ^a , Jk ^b Yt^a , Yt ^b Co^a , Co ^b , AQP1-Def. Do ^a , Do ^b Vel
Methode	Multiplex-PCR; Kapillar-Gel-Elektrophorese	Multiplex-PCR; Kapillar-Gel-Elektrophorese	Multiplex-PCR; MALDI-TOF	Multiplex-PCR; Gel-Elektrophorese	Multiplex-PCR; MALDI-TOF
High-throughput	++	++	+++	+	+++
Materialkosten	0,14 €/Antigen	0,3 €/Antigen	k. A.	0,14 €/Antigen	k. A.

Tabelle 5: Genetische Spendertypisierung im deutschen Sprachraum

Genetische Spender-typisierungsprogramme

International haben bereits etliche Blutspendedienste genetische Spendertypisierungsprogramme implementiert. Im deutschen Sprachraum dominieren verschiedene „in-house“-Verfahren (Tabelle 5), Eigenentwicklungen der Institute, die teilweise deutliche Kostenvorteile gegenüber den kommerziellen Tests, aber auch gegenüber der Phänotypisierung aufweisen. Diese Kosteneffizienz ist not-

wendig, um derart große Spenderkollektive mit vertretbarem Aufwand durchtypisieren zu können.

Die derzeit verwendeten Assays sind alle, allerdings in unterschiedlichem Maße, für eine Hoch-Durchsatz-Typisierung geeignet, das bedeutet, dass pro Arbeitstag mit den Methoden bis mehrere tausend Antigene typisiert werden können (z. B.: 96 Spender á 35 Antigene ergibt 3.360 Typisierungsergebnisse).



Große Kollektive typisierter Spender sind die Methode der Wahl um ausreichend Sonderspender mit seltenen HFA-negativen Bluttypen zu finden und für eine rasche und adäquate Versorgung von Antikörperträgern.

Wie tauglich ist die genetische Blutgruppen-Bestimmung für die Routine-Nutzung?

Diskrepanze Resultate zwischen der serologischen Blutgruppenbestimmung (Phänotyp) und der Genotypisierung (Genotyp) fallen vor allem bei der Untersuchung hoher Probenzahlen (Hochdurchsatz wenige 100 bis mehrere 1.000 Proben pro Tag) beinahe schon mit vorhersagbarer Regelmäßigkeit und in jedem Blutgruppensystem an. Grundsätzlich sollten derartige Diskrepanzen an frischen Zweitproben serologisch und genetisch überprüft werden. Diskrepanzen bleiben seltene Beobachtungen mit z.B. 0 Kell, 1 Kp^a, 3 Kidd und 32 (!) Duffy „Diskrepanzen“ beim Vergleich von Daten bezüglich 4.000 Blutspendern, die mittels Routine-Serologie und MALDI-TOF MS basierender Genotypisierung untersucht wurden¹⁵. Dabei stellte sich heraus, dass „serologische Fehler“ meistens auf (sehr) schwach exprimierte Antigen-Varianten (28 der insgesamt 32 beobachteten Diskrepanzen waren schwach exprimierte Fy^{bweak}, auch bekannt als Fy^X), Übertragungsfehler und auf echte Fehlbestimmungen zurückzuführen waren, während es sich bei den genetischen Fehlbestimmungen bisher ausnahmslos um neue genetische Allel-Varianten oder Allele, die für die Gendiagnostik nicht explizit berücksichtigt worden waren,

handelte. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch im Blutgruppensystem MNSs gemacht. In der Tat sind diese „Genotypisierungs-Fehler“ also keine „eigentlichen Fehlbestimmungen“, sondern technisch korrekte Signale und gleichzeitig hoch spezifische Indikatoren für das Vorliegen sehr seltener, meist neuer Blutgruppen-Varianten. Alle „Genotypisierungs-Fehler“ der oben erwähnten Studie und auch der an 6.000 Blutspendern durchgeführte Ser/Geno-Vergleich am Blutgruppensystem MNSs (Manuskript in Vorbereitung), waren immer seltener, oder höchstens gleich selten, wie „serologische Fehler“.

Zusätzlich ist die vorläufige Konzentration der Technologie im Hochdurchsatz auf Blutspender, nicht jedoch auf Empfänger ausgerichtet. Empfänger, oder Patienten benötigen oft sehr detaillierte Analysen und sind zeitsensitiv. Bei Spendern hingegen, sind die vielgefürchteten Null-Allele, mit Ausnahme des ABO-Systems (!) ohne Bedeutung, da sie lediglich eine „Pseudo-Heterozygotität“ vorspiegeln und somit bei Transfusion auf Heterozygote keine Immunisierung verursachen würden. Gegenwärtig werden in Zürich Spender mittels MALDI-TOF MS basierender Genotypisierung voruntersucht, und die, für die Versorgung immunisierter Patienten interessanten Treffer, serologisch nachvalidiert. Bei diesem Vorgehen vereinigen sich die Vorteile beider Technologien, Serologie und Genetik, und liefern kostengünstig und in hoher Zahl, breit untersuchte Spender mit validen Blutgruppenbestimmungen.

AUSBLICK: WELCHE PROBLEME STEHEN DEM ERSATZ DER SEROLOGISCHEN TESTUNG DURCH EINE GENOTYPISIERUNG NOCH IM WEG?

Wird eines Tages die Serologie vollständig den Rückzug antreten und durch eine molekulare Testung verdrängt? Bei einigen „rare“ Antigenen ist dieser Zustand schon erreicht. Für die Gesamtheit der Erythrozytenserologie müssen jedoch noch einige Probleme gelöst werden:

Das Geschwindigkeitsproblem

Die serologische Bestimmung der AB0-Blutgruppe im Direktansatz dauert wenige Minuten, eine Genotypisierung mit konventionellen Methoden über eine Stunde. Gerade für die Abklärung von Notfällen ist die Genotypisierung häufig noch nicht schnell genug, zumal sie in vielen Fällen eine Weitergabe der Probe an ein anderes Labor bedingt.

Die nicht getesteten Varianten

Aktuelle Genotypisierungsverfahren beruhen meist auf der Untersuchung einiger weniger „diagnostischer“ Polymorphismen. Alle anderen Veränderungen im Gen werden schlichtweg nicht beachtet. Für einige Gene sind aber hunderte Allelvarianten bekannt, von denen man viele nur findet, wenn man spezifisch auf sie untersucht. Beispielsweise sind für *RHD* in der Rhesusbase über 50 D negative Allele gelistet, die man nur von „normalen“ D positiven Allelen unterscheiden kann, wenn man auf die spezifische Mutation in diesen Allelen (meist Stop-Codons, Spleißmutationen oder Verschiebungen des Leserahmens) untersucht. Hier liegt ein wesentliches Problem im Vergleich zur Serologie: Bei der Abarbeitung von Diskrepanzen zwischen serologischer Untersuchung und molekularer Vorhersage zeigt sich immer wieder, dass viele Fehler durch eine fehlerhafte Serologie bedingt sind. Die serologischen Fehler treten aber typischerweise bei schwachen Antigenen auf, und wenn ein schwaches Antigen übersehen wird, hat es meist keine katastrophalen Folgen. Die molekularen Diskrepanzen betreffen dagegen durchaus voll ausgeprägte Antigene: Wird ein seltenes *RHD*-Allel beim Patienten nicht erkannt, so wird er als normal D positiv vorhergesagt, ist aber in Wirklichkeit D negativ. Da in der Mehrzahl der Fälle die Diskrepanz dem Schema „Vorhersage Antigen positiv – Wirklichkeit Antigen negativ“ folgt, ist diese Problematik besonders bei der Untersuchung von Patienten bedeutsam. Allerdings kann auch der umgekehrte Fall auftreten, wenn beispielsweise eine Mutation, die keine Auswirkung auf die serologische Antigenausprägung hat, die Bindung des entsprechenden Primers behindert: Hier ergibt sich die Kombination „Vorhersage Antigen negativ – Wirklichkeit Antigen positiv“.

Die nicht bekannten Varianten

Selbst wenn man alle bekannten Varianten in ein Testsystem packen würde, käme es immer wieder zu Fehlvorhersagen: Manche Varianten sind so selten oder regional so beschränkt, dass sie in den Validierungstudien nicht gefunden werden. Weak D Typ 1.1 wurde nur in einer kleinen Region in Norddeutschland gefunden. In der Blutgruppenserologie kennen wir Phänotypen, die mit einer Frequenz von unter 1:100.000 auffallen. Das mag auf den ersten Blick vernachlässigbar erscheinen, aber was passiert, wenn wir bei einem Patienten molekular den Phänotyp „A“ bestimmen und in Wirklichkeit ist er „O“?

Die nicht betrachteten Gene

Um beim A/O-Beispiel zu bleiben: Was hilft es uns, wenn wir bei einem Patienten den Phänotyp „A“ vorhersagen, und in Wirklichkeit handelt es sich um einen Patienten mit dem seltenen Bombay-Phänotyp? Dieser wird durch Veränderungen im H-Gen ausgelöst, und man kann das AB0-Gen so intensiv untersuchen wie man will, das Ergebnis ist immer falsch. Diese Abhängigkeiten sind weit verbreitet: Die Expression der Rhesusantigene hängt nicht nur von den Rhesusgenen, sondern auch vom RHAG (Rhesus-assoziiertes Glykoprotein) ab. Kell benötigt das KX-Protein, der *LU(a-b-)*-Phänotyp ist nicht durch Veränderungen im Lutheran-Protein, sondern durch Mutationen in einem Regulationsprotein bedingt. Will man eine vollständige Vorhersage, muss man alle diese Gene mit betrachten.

Der Preis?

Manch einer wird sich wundern, dass der Preis noch nicht als Argument gegen eine generelle Genotypisierung aufgeführt wurde. Das liegt daran, dass der Preis pro vorhergesagtes Antigen bei paralleler Untersuchung sehr niedrig sein kann. Nicht umsonst wird die molekulare Vorhersage der Spenderantigene mittels Hochdurchsatz-Genotypisierung breitflächig eingesetzt und nicht die serologische Typisierung der Spender für alle denkbaren hochfrequenten Antigene. Betrachtet man alle denkbaren Antigene, ist daher oft die Genotypisierung das kostengünstigere Verfahren. Das gilt allerdings nicht für die „einfachen“ Antigene wie AB0 oder „normales“ D: Hier sind die serologischen Kosten minimal und der molekulare Aufwand zur sicheren Vorhersage enorm.

Next generation sequencing - Licht am Ende des Tunnels?

Ein prinzipieller Lösungsansatz zur Erkennung unerwarteter Varianten und Einflussfaktoren liegt in der Sequenzierung großer Genomabschnitte oder am besten des gesamten Genoms mit Hilfe von Hochdurchsatz-Verfahren

(Next-Generation-Sequencing, NGS). Sequenziert man alles, so kann man keine Mutation übersehen. Mit dem NGS stehen Verfahren zur Verfügung, die das prinzipiell bewältigen könnten. Bei optimaler Auslastung der Analysekapazität, d. h. möglichst viele Genabschnitte gleichzeitig bei vielen Individuen, ist eine umfangreiche Genotypisierung kosteneffizient möglich. Im Vergleich zu herkömmlichen Sequenzierungsverfahren liegen die Kosten pro Kilobase DNA-Sequenz etwa um den Faktor 10.000 niedriger. Jedoch bleiben auch beim NGS noch Probleme: Für einen Routineeinsatz in der Patientendiagnostik sind die Analysezeiten noch zu lang und die Kosten für die Analysen von Einzelproben sind noch zu hoch. Je nach

Technologie sind die Sequenzierungslängen noch zu gering, um bei biallelen Systemen die inaktivierende Mutation dem richtigen Allel zuzuordnen. Zudem erfordert eine sichere Antigenvorhersage die Kenntnis aller Zusammenhänge, und es könnte durchaus passieren, dass man eines Tages alle Informationen besitzt, sie aber nicht richtig interpretieren kann. Die Methoden werden jedoch von Jahr zu Jahr besser, und man sollte nicht vergessen, dass noch um das Jahr 2000 die Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms eine Herausforderung war, während man aktuell auf die Ergebnisse eines „1.000-Genom-Projekts“ zurückgreifen kann.

Die Autoren



PD Dr. med. Franz Wagner
DRK-Blutspendedienst NSTOB gemeinnützige GmbH, Institut Springe

Mitwirkung: Abschließende Zusammenstellung, weak D Diagnostik, Testung D negativer Blutspender, Ausblick



Dr. rer. nat. Andrea Döscher
DRK-Blutspendedienst NSTOB gemeinnützige GmbH, Institut Bremen-Oldenburg

Mitwirkung: Pränatale Blutgruppenbestimmung aus dem Blut der Mutter



Dr. med. Christof Jungbauer
ÖRK Blutspendezentrale für Wien, Niederösterreich und Burgenland

Mitwirkung: Hochdurchsatz-Genotypisierung von Blutspendern



Dr. phil. nat. Sofia Lejon Crottet
Interregionale Blutspende SRK AG

Mitwirkung: Analyse von Problemfällen



Dr. med. Angelika Reil
DRK-Blutspendedienst West gemeinnützige GmbH, Zentrum für Transfusionsmedizin Hagen, Labor für Leukozyten- und Thrombozytenimmunologie

Mitwirkung: Thrombozyten- und Granulozytendiagnostik



Dr. med. Christof Weinstock
DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gemeinnützige GmbH, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm (IKT)

Mitwirkung: Molekulare Mechanismen



PD Dr. med. Christoph Gassner
Regionale Blutspende Zürich, SRK, Abteilung für Molekulare Diagnostik und Forschung und Entwicklung (MOC), Zürich-Schlieren, Schweiz

Mitwirkung: Tauglichkeit der genetischen Blutgruppen-Bestimmung für die Routine-Nutzung



Prof. Dr. med. Peter Bugert
DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gemeinnützige GmbH, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Mannheim

Mitwirkung: Anwendungsbereiche



Dr. med. Christof Geisen
DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gemeinnützige GmbH, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt am Main

Mitwirkung: Initiale Idee, Einleitung, Anwendungsbereiche

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum Download unter: www.drk-haemotherapie.de

Welche Zentren führen genetische Typisierungen von Blutgruppenantigenen (Patienten, Spender, NIPD) durch?

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gemeinnützige GmbH

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt am Main

Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt
Dr. med. Christof Geisen

Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim

Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim
Prof. Peter Bugert

Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm (IKT)

Helmholtzstraße 10
89081 Ulm
Dr. med. Christof Weinstock

Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes gemeinnützige GmbH

Institut München

Herzog-Heinrich-Str. 4
80336 München
Dr. med. Gabriele Fauchald

DRK-Blutspendedienst Nord-Ost gemeinnützige GmbH

Institut für Transfusionsmedizin Berlin

Am Großen Wannsee 80
14109 Berlin
Dr. med. Roland Karl

Institut für Transfusionsmedizin Lütjensee

Hamburger Straße 24
22952 Lütjensee
Dr. med. Sabine Kraas

Institut für Transfusionsmedizin Dresden

Blasewitzer Straße 68/70
01307 Dresden
Prof. Dr. med. Torsten Tonn

DRK-Blutspendedienst NSTOB gemeinnützige GmbH

Institut Dessau

Altener Damm 50
06847 Dessau
Dr. med. Hartmut Kroll

Institut Bremen-Oldenburg

Brandenburger Straße 21
26133 Oldenburg
Dr. rer. nat. Andrea Döscher

Institut Springe

Eldagsener Straße 38
31830 Springe
PD Dr. med. Franz Wagner

DRK-Blutspendedienst West gemeinnützige GmbH

Zentrum für Transfusionsmedizin Hagen

Labor für Immunhämatologie
Feithstraße 182
58097 Hagen
Dr. med. Burkhard Just

Labor für Leukozyten- und Thrombozytenimmunologie

Feithstraße 182
58097 Hagen
Dr. med. Angelika Reil

Zentrum für Transfusionsmedizin Breitscheid

Abteilung für Immunhämatologie und HLA-Diagnostik
Linneper Weg 1
40885 Ratingen
Dr. med. Gabriele Bringmann

Zentrum für Transfusionsmedizin Bad Kreuznach

Labor für Immunhämatologie und Thrombozytenimmunologie
Burgweg 5–7
55543 Bad Kreuznach
Dr. med. Andreas Opitz, PD Dr. Brigitte Flesch, Anastasia Karnot

Österreich

Medizinische Universität Wien

Institut für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin
Prof. Dieter Schwartz

Universität Innsbruck

Institut für Transfusionsmedizin und Immunologische Abteilung
Prof. Harald Schennach

Paracelsus Medizinische Privatuniversität Salzburg

Institut für Transfusionsmedizin
Dr. med. Christoph Grabmer

Österreichisches Rotes Kreuz

Blutzentrale Linz
Prim. Dr. Christian Gabriel

Österreichisches Rotes Kreuz

Blutspendezentrale für Wien, Niederösterreich und Burgenland
Dr. med. Christof Jungbauer

Schweiz

Blutspende Zürich

PD Dr. med. Christoph Gassner

Interregionale Blutspende SRK AG

Dr. med. Christoph Niederhauser