

# Erweiterte molekulare Blutgruppenbestimmung (Hochdurchsatz-Genotypisierung)

Heute sind 30 Blutgruppensysteme mit mehr als 600 Blutgruppenantigenen bekannt. Jedes Jahr werden in diesen 30 Blutgruppensystemen immer wieder neue Varianten entdeckt, die bezüglich ihrer klinischen Relevanz mehr oder weniger wichtig sind. Trotzdem erfolgt die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten in den meisten Fällen nur unter Berücksichtigung des ABO-Blutgruppensystems und des Rhesus-D-Antigens. Es erstaunt deswegen nicht, dass die Bildung von Antikörpern gegen fremde Blutgruppenantigene eine der häufigsten Komplikationen der Transfusion ist, wie die Hämovigilanzberichte aller westlichen Länder zeigen.

## Alloantikörper und ihre Auswirkungen

Die Bildung dieser Alloantikörper ist für den Patienten eine bleibende Schädigung, weil für den Fall von künftigen Transfusionen eine beschränkte Auswahl an kompatiblen Blutprodukten zur Verfügung steht; bei Frauen im gebärfähigen Alter besteht zusätzlich das Risiko eines Morbus haemolyticus neonatorum (MHN). Einmal nachgewiesene Alloantikörper müssen bei späteren Transfusionen immer berücksichtigt werden, da eine Reexposition mit dem Risiko einer potentiell lebensbedrohlichen, hämolytischen Transfusionsreaktion einhergeht.

Die Vielfalt an nachgewiesenen Alloantikörper ist gross. Es finden sich Alloantikörper gegen die Rhesus-Blutgruppenantigene D, E, e, C und c und gegen weitere Blutgruppenantigene wie Kell, Lutheran, Duffy etc. In ungefähr 15% der Fälle entwickeln sich Alloantikörper gegen mehrere Blutgruppenantigene.

## Risikosituationen und Risikopatienten

Die Version 2009 der Empfehlungen des Blutspendedienstes SRK (Immunhämatologische und prätransfusionelle Untersuchungen an Patientenproben, Kapitel 8.1.3.1 und 8.1.3.2) legt deswegen verschiedene Situationen fest, bei denen zusätzliche Blutgruppenantigene berücksichtigt werden sollen. Rh-Phänotyp und K-Antigen müssen bei folgenden Indikationen berücksichtigt werden:

- Mädchen und Frauen vor und im gebärfähigen Alter (0 bis 50 Jahre)
- Vorliegen von Alloantikörpern gegen andere Antigene
- Anti-erythrozytäre Autoimmunisierungen
- Chronische Transfusionsbedürftigkeit
- Patienten nach allogener Stammzelltransplantation.

Der Blutspendedienst Bern bestimmt Rh-Phänotyp und K-Antigen bei allen seinen Spendern.

Bei besonderen Risikopatienten, die wiederholt transfundiert werden, müssen zusätzliche Blutgruppenantigene berücksichtigt werden. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass diese Antigene bei einer genügenden Anzahl Spender bekannt sind.

## Versorgung von Risikopatienten dank Genotypisierung

Die Versorgung von Patienten mit speziellen Anforderungen mit kompatiblen Blutprodukten ist in der Regel sehr schwierig. So gibt es zum Beispiel Patienten mit multiplen Alloantikörpern, starken Autoantikörpern, seltenen Alloantikörpern oder Alloantikörper-Kombinationen gegen hochfrequente Antigene (Kp(b), k, Vel, Lu(b), Co(a), Yt(a), etc.). Die prätransfusionelle Abklärung und die Suche nach geeigneten Erythrozytenkonzentraten sind in diesen Fällen

sehr zeitaufwändig und teuer. Wenn die Transfusionsindikation schon gestellt ist, genügt oft die Zeit nicht, um Erythrozytenkonzentrate nachträglich zu typisieren. Ein weiteres grosses Problem stellt die Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern dar. Oftmals stehen diese nicht in genügender Menge oder Qualität zur Verfügung.

Die frühzeitige Typisierung von Patienten mit erhöhtem Risiko einer Antikörperbildung vor einer erstmaligen Transfusion oder auch nach der Bildung von Antikörper, falls weiter transfundiert werden muss, kann dazu beitragen, schwierige klinische Situationen zu verhindern. Aus diesem Grund hat der Blutspendedienst Bern bereits bei mehreren Tausenden Blutspendern mittels molekularen Methoden ein breites Antigenprofil ermittelt (Genotypisierung). Die Bestimmung des Antigenprofils beim Patienten erlaubt eine rasche Auswahl der passenden Erythrozytenkonzentrate.

### **Ablauf der Abklärungen**

Dank der Genotypisierung von Blutspendern verfügt der Blutspendedienst Bern über Vorräte an Erythrozytenkonzentraten mit bekanntem Blutgruppenprofil. Sollte ein Risikopatient eine Transfusion benötigen, wird seine Blutprobe wie in der Routine analysiert und zusätzlich das genetische Blutgruppenprofil ermittelt. Auf dieser Basis können die passenden Erythrozytenkonzentrate direkt gewählt und nach Testung der Kompatibilität nach den BSD SRK Empfehlungen verabreicht werden. Je nach Dringlichkeit ist dieses Verfahren in der ersten oder der nachfolgenden Transfusionsepisode anwendbar.

Das Verfahren ermöglicht es, in der Versorgung erheblich Zeit und Kosten zu sparen, weil die Suche nach passenden Produkten mit serologischen Techniken bei Patienten mit vielen Antikörpern oftmals zeitraubend und teuer ist. Die Automatisierung und Standardisierung der Technik und der Datenverwaltung erlaubt zusätzlich, diese Qualitätsverbesserung ohne Kostenerhöhung zu erreichen.

### **Testsysteme**

Die ersten kommerziell erhältlichen breiten Genotypisierungssysteme stehen vor der Markteinführung oder sind schon erhältlich. Diese Systeme haben aber einige nicht zu vernachlässigende Nachteile. Einerseits sind die Kosten für die Anschaffung der Systeme und im Besonderen für die Reagenzien sehr hoch, andererseits ist auch die Flexibilität in Bezug auf die Auswahl von bestimmten Blutgruppenmerkmalen nicht gegeben. Es müssen die von der Firma angebotenen Blutgruppenmerkmale getestet werden. Leider unterscheiden sich die Ansprüche aber oftmals von Land zu Land, von Region zu Region oder sogar von Blutspendedienst zu Blutspendedienst und den entsprechenden Spitälern resp. Patienten. Mit unserem in-house entwickelten, flexiblen, an das Antigenprofil der Schweizer Spender und Patienten adaptierten System können spezifische Anfragen befriedigt werden.

Das System basiert auf einer sequenzspezifischen Primer-PCR (SSP-PCR). Die einzelnen Allele werden in verschiedenen PCR-Multiplexansätzen amplifiziert und mittels einer Kapillarelektrophorese ausgewertet. Die verschiedenen Multiplex-Reaktionen können wahlweise zusammengesetzt und die Spender und Patienten auf die gewünschten unter den folgenden 22 klinisch relevanten Blutgruppenmerkmalen typisiert werden.

## Multiplexreaktionen:

Reaktion 1		Reaktion 2		Reaktion 3		Reaktion 4	
CO*01	Co (a)	CO*02	Co (b)	FY*01	Fy (a)	FY*02	Fy (b)
FY*null01	Fy (a- b-)	FY*265T	Fy bx	MNS*01	M	MNS*02	N
KEL*01	K	KEL*02	k	MNS*03	S	MNS*04	s
KEL*03	Kp (a)	KEL*04	Kp (b)	DO*01	Do (a)	DO*02	Do (b)
LU*01	Lu (a)	LU*02	Lu (b)	JK*01	JK (a)	JK*02	JK (b)
YT*01	Yt (a)	YT*02	Yt (b)				

Zusätzliche Allele für spezielle Patientenkollektive wie zum Beispiel andere Ethnizitäten können auf Anfrage untersucht werden. Dabei handelt es sich um die folgenden Allele: KEL\*07 (Js(a)), KEL\*08, KEL\*11 (K11), KEL\*17 (K17), LU\*08 (Lu8), LU\*14 (Lu14) (Js(b)), DO\*04(Hy), LW\*05 (LW(a)), LW\*07 (LW(b)), SC\*01 (Sc1), SC\*02 (Sc2,) DI\*01 (Di(a)), DI\*02 (DI(b)), DI\*03 (Wr (a)), DI\*04 (Wr (b)).

Blutspendedienst SRK Bern AG, im Juni 2011