

Christoph Niederhauser¹, Sofia Lejon Crottet¹

Genotypisierung von Spendern und Patienten

Mit Hilfe der breiten molekularen Blutgruppengenotypisierung können die Sicherheit von Bluttransfusionen, die Spender-Empfänger-Kompatibilität und die Effizienz der Blutbankverwaltung wesentlich verbessert werden. Präzise molekulargenetische Blutgruppenbestimmungen bringen Vorteile für Blutspendedienste, Spitäler und insbesondere Patienten.

Einleitung

Die Ära, in der Blutgruppen nur serologisch nach den Faktoren AB0 und Rhesus D bestimmt wurden, ist grösstenteils vorbei. Mit dem Einzug der Gel-Technik ab dem Jahr 1990 konnten die serologischen Bestimmungen auf andere Blutgruppenantigene erweitert und gleichzeitig vereinfacht werden. Ein grosses Problem der serologischen Testmethoden ist die Nachfrage nach kommerziell erhältlichen, spezifischen Antikörpern, da hier oftmals ein Mangel herrscht. Seit einigen Jahren werden neue molekularbiologische Technologien für die Genotypisierung von Blutgruppenmerkmalen eingesetzt. Diese ermöglichen es, Blutgruppenmerkmale weitaus genauer zu bestimmen als bisher. In Wirklichkeit gibt es nicht nur die beiden mit den üblichen serologischen Tests bestimmten Blutgruppen-Systeme AB0 und Rhesus, sondern es sind heute 30 Blutgruppensysteme mit mehr als 700 Blutgruppenantigenen bekannt. Jedes Jahr werden in diesen 30 Blutgruppensystemen neue Varianten entdeckt, die teilweise eine gewisse klinische Relevanz haben. Wie aus den Hämovigilanzberichten vieler westlicher Ländern hervorgeht, ist die Bildung von Antikörpern gegen fremde Blutgruppenantigene eine der häufigsten Komplikationen der Transfusion. **Die Bildung dieser Alloantikörper bedeutet für die Patienten eine bleibende Schädigung, weil für sie im Fall von künftigen Transfusionen nur noch eine beschränkte Auswahl an kompatiblen Blutprodukten zur Verfügung steht.** Einmal nachgewiesene Alloantikörper müssen bei späteren Transfusionen immer be-

rücksichtigt werden, da eine Reexposition mit dem Risiko einer potentiell lebensbedrohlichen, hämolytischen Transfusionsreaktion einhergeht.

Die Vielfalt an nachgewiesenen Alloantikörpern 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.

Bei verschiedenen Risikopatienten ist die Transfusion mit breit kompatiblen Erythrozytenkonzentraten sicher von Vorteil; zu diesen Risikogruppen gehören Mädchen und Frauen vor und im gebärfähigen Alter, Personen mit Alloantikörpern gegen andere Antigene, Personen mit einer anti-erythrozytären Autoimmunisierung, Patienten mit chronischer Transfusionsbedürftigkeit und Patienten nach allogener Stammzelltransplantation.

Versorgung von Risikopatienten dank Genotypisierung

Es ist in der Regel sehr schwierig, Patienten mit speziellen Anforderungen mit kompatiblen Blutprodukten zu versorgen. 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 zeitaufwendig, teuer und oftmals sind spezifische Antikörper nicht in genügender Menge oder Qualität verfügbar. Wenn die Transfu-

sionsindikation schon gestellt ist, genügt oft die Zeit nicht, um Erythrozytenkonzentrate nachträglich zu typisieren. Daher ist eine frühzeitige Typisierung von Patienten mit erhöhtem Risiko einer Antikörperbildung vor einer erstmaligen Transfusion oder auch nach der Bildung von Antikörpern wichtig. Falls erneut transfundiert werden muss, kann die Typisierung dazu beitragen, schwierige klinische Situationen zu verhindern.

Voraussetzungen

Um solche Risikopatienten schnell, effizient und ohne grossen finanziellen Aufwand mit kompatiblen Blutprodukten versorgen zu können, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Die wichtigste besteht darin, genügend breit typisierte Blutprodukte an Lager zu haben, damit diese möglichst schnell mit den Ansprüchen der Patienten abgestimmt werden können. Aus diesem Grund hat der Blutspendedienst Bern bereits bei mehreren Tausend Blutspendern mittels molekularen Methoden ein breites Blutgruppenprofil ermittelt (Genotypisierung). Die Bestimmung des Blutgruppenprofil beim Patienten erlaubt eine rasche Auswahl der passenden Erythrozytenkonzentrate.

Eine weitere Voraussetzung ist die entsprechende Technologie, die es erlaubt, sowohl Spender als auch Patienten schnell und kostengünstig zu typisieren. Mit der sogenannten Genotypisierung werden genetische Bestimmungen auf DNA-Stufe vorgenommen. Mit dieser Untersuchung kann der «wahrscheinliche» Phänotyp vorausgesagt werden.

¹ Dr. Christoph Niederhauser, Dr. Sofia Lejon Crottet, Blutspendedienst SRK Bern

Testsysteme

Zunehmend professionalisierte und auf hohen Durchsatz ausgelegte molekulargenetische Methoden werden bisher auf der Spenderseite angewendet. Hierzu zählen zum Beispiel bestimmte Reihenuntersuchungen («Screenings», z.B. Suche nach Blutspendern mit seltenen Antigenkonstellationen, oder Bestätigung «genetischer» D-Negativität). Heute sind bis auf wenige Ausnahmen praktisch alle genetischen Hintergründe der humanen Blutgruppensysteme beschrieben.

Die Vorteile einer genetischen Blutgruppen-Typisierung liegt vor allem in der Automatisierbarkeit, der generellen Anwendbarkeit für die meisten Blutgruppen und der Unabhängigkeit von schwer oder überhaupt nicht erhältlichen Reagenzien. Einzig die Bestimmung der Blutgruppen ABO auf genetischer Ebene scheint derzeit noch zweifelhaft, und für die Blutgruppe Vel sind aktuell noch keine genetischen Grundlagen entdeckt worden.

Die ersten kommerziell erhältlichen Genotypisierungssysteme (BLOODchip, Grifols, Hea bead chip, Immucor und Genome Lab SNPstream, Beckman Coulter) 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, so dass die von der Firma angebotenen Blutgruppenmerkmale getestet werden müssen. Leider unterscheiden sich die Ansprüche aber von Land zu Land, von Region zu Region oder sogar von Blutspendedienst zu Blutspendedienst und den entsprechenden Spitälern resp. Patienten.

Daher haben mehrere Blutspendedienste weltweit eigene «in-house»-Genotypisierungssysteme entwickelt, die auf verschiedenen Technologien beruhen. Da in der Regel «single nucleotide polymorphisms» (SNP) nachgewiesen werden, werden die konventionelle Aagrosegelelektrophorese, die Luminex-Technologie, die Kapillar- oder Kapillargelelektrophorese und die Taqman-Technologie zum Nachweis eingesetzt.

Der Blutspendedienst Bern hat aufgrund seiner Tätigkeit als nationales Referenzlabor für Immunhämatologie schon seit mehreren Jahren eine grosse Anzahl an molekulargenetischen Tests für die Abklärung von schwierigen immunhämatologischen Fällen aufgebaut. Diese grosse Erfahrung wurde genutzt, um ein In-house-Hochdurchsatz-Genotypisierungssystem zu entwickeln, das an das Blutgruppenprofil der Schweizer Spender und Patienten adaptiert ist. Mit diesem flexiblen System können spezifische Anfragen beantwortet werden. Es hat den Vorteil, dass sowohl Massenuntersuchungen von Spendern als auch auf den Patienten abgestimmte Einzeluntersuchungen durchgeführt werden können.

Das System basiert auf einer sequenzspezifischen Primer-PCR (SSP-PCR). Die einzelnen Allele werden in verschiedenen PCR-Multiplexansätzen amplifiziert und mittels einer Kapillargelelektrophorese ausgewertet. Die verschiedenen Multiplex-Reaktionen können wahlweise zusammengesetzt und die Spender und Patienten auf die gewünschten der folgenden 20 klinisch relevanten Blutgruppenmerkmale (22 Allele) typisiert werden (siehe Tabelle).

Zusätzliche Allele für spezielle Patientenkollektive wie zum Beispiel andere Ethnizitäten können auf Anfrage un-

Reaktion 1		Reaktion 2		Reaktion 3		Reaktion 4	
Genotyp	Phänotyp ¹	Genotyp	Phänotyp ¹	Genotyp	Phänotyp ¹	Genotyp	Phänotyp ¹
CO*01	Co(a)	CO*02	Co(b)	FY*01	Fy(a)	FY*02	Fy(b)
FY*null01 ²		FY*265T	Fy ^x	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)				

Tabelle: angebotene Multiplexreaktionen

1 Wahrscheinlicher Phänotyp

2 Homozygotieabklärung auf Anfrage

Genotypage des Gruppen sanguins des donneurs et des patients

Grâce à un génotypage moléculaire étendu des groupes sanguins, on atteint une nette amélioration de la sécurité des transfusions sanguines, de la compatibilité donneur-receveur et de l'efficacité de la gestion des banques de sang. La génétique moléculaire permet une détermination précise des groupes sanguins, qui profite aux services de dons du sang, aux hôpitaux et surtout aux patients.

Introduction

L'ère des groupes sanguins classés selon les seuls facteurs ABO et Rhésus D est en grande partie révolue. Dès 1990, la technique de filtration sur gel a permis d'élargir la détermination sérologique à d'autres antigènes de groupes sanguins tout en simplifiant le procédé d'analyse. Toutefois les anticorps spécifiques ne sont pas toujours disponibles sur le marché, et cette pénurie représente un problème majeur des méthodes de tests sérologiques. Depuis quelques années, de nouvelles techniques de biologie moléculaire s'appliquent au génotypage des groupes sanguins et permettent d'en déterminer les caractéristiques avec une précision inégalée jusqu'ici. De fait, nous connaissons aujourd'hui bien plus de groupes sanguins que les systèmes ABO et Rhésus: 30 systèmes de groupes sanguins et plus de 700 antigènes de groupes sanguins ont été découverts. Chaque année, de nouvelles variantes de systèmes de groupes sanguins s'y ajoutent. Elles peuvent ou non revêtir une certaine importance clinique.

Les rapports d'hémovigilance provenant de nombreux pays occidentaux montrent que lors de transfusions, la formation d'anticorps contre des antigènes de groupes sanguins étrangers représente l'une des complications les plus fréquentes. **La formation de ces allo-anticorps atteint les patients pour le reste de leur vie, car s'ils ont besoin d'une nouvelle transfusion, ils ne sont compatibles qu'avec un choix restreint de produits sanguins.**

tersucht 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)). Die meisten der Systeme für die erwähnten Allele sind schon entwickelt, ein kleiner Teil steht noch in der Entwicklungs- und Validierungsphase.

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 Transfusionsperiode anwendbar. Das Verfahren ermöglicht es, in der

Versorgung erheblich Zeit und Kosten zu sparen, weil die Suche nach passenden Blutprodukten 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 zu erreichen, ohne dass die Kosten steigen.

Schlussbemerkungen

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Genotypisierung eine wichtige Verbesserung der Sicherheit von Blutprodukten mit sich bringt. Die Automatisierung und Standardisierung der Technik und der Datenverwaltung erlaubt es zusätzlich, diesen Qualitätssprung ohne grosse Kostenerhöhung zu machen. Ganz wichtig ist nach wie vor die folgende Regel: **Das richtige Blutprodukt dem richtigen Patienten zum richtigen Zeitpunkt.**

Korrespondenz:
Christoph Niederhauser
Blutspendedienst SRK Bern
Murtenstrasse 133
3008 Bern
Tel. 031 384 23 04
Fax 031 384 23 01
E-Mail christoph.niederhauser@bsd-be.ch

Seeplex® Anyplex™ Magicplex™

 Seegene

- Very cost effective
- Multiple information
- Highly specific and sensitive
- High reproducibility
- Automated results interpretation

Super Multiplex (Real-Time) PCR Products

DPO™ (Dual Priming Oligonucleotide)

DPO technology is a fundamental tool for blocking extension of non-specifically primed templates generating consistently high specificity.

READ™ (REal Amplicon Detection)

READ is a powerful technology that overcomes the limitation of conventional real-time PCR and provides dramatic improvement in sensitivity and specificity.

Products

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| - Respiratory Pathogen Detection | - Meningitis Pathogen Detection |
| - STD Pathogen Detection | - Diarrhea Pathogen Detection |
| - HPV Detection | - UTI Detection |
| - Tuberculosis Detection | - Drug Resistance Detection |
| - HSV Detection | - SNP Detection |
| - Sepsis Pathogen Detection | - Somatic Mutation Detection |

 **BÜHLMANN**

BÜHLMANN Laboratories AG
CH-4124 Schönenbuch/Basel
Phone +41 61 487 12 12
Fax +41 61 487 12 34
E-mail info@buhlmannlabs.ch
www.buhlmannlabs.ch

