

Sinn und Unsinn molekularbiologischer Methodik zur Blutgruppenbestimmung

Diether Schönitzer

Unter Blutgruppenbestimmung im Allgemeinen versteht man die Bestimmung der erblichen Merkmale des ABO-Systems sowie den Nachweis bzw. Ausschluss des Rhesusmerkmals D. Die ABO-Faktorenbestimmung zusammen mit der Serumgegenprobe macht die komplette ABO-Bestimmung aus, während bezogen auf das Rh-System, zumindest für problemlose Fälle, der Nachweis des Rh-D-Merkmals für die Vorbereitung einer Bluttransfusion ausreichend ist. Das Fehlen des Merkmals D führt entsprechend den Richtlinien zur Aufschlüsselung des gesamten Rh-Phänotyps (C, c, E, e, evtl. Cw) und für den Fall, dass eines dieser genannten Merkmale vorhanden ist, zum Nachweis/Ausschluss eines Dweak mittels indirekten Antiglobulintests.

Die angeführten Bestimmungen des ABO- und Rhesus-Systems und die entsprechende Blutkonservenauswahl in Verbindung mit einem negativen Antikörper-Suchtest und einer negativen Kreuzprobe (sofern nicht «type and screen» akzeptiert wird) garantieren die serologische Verträglichkeit der ausgewählten Erythrozytenkonzentrate. Diese Vorgangsweise fürs Labor klingt relativ einfach und ist es auch, so lange die Be-

stimmung der Blutgruppeneigenschaften bei Einhaltung der Standard-Techniken keine Probleme macht und sofort zu einem schlüssigen Ergebnis führt und darüber hinaus keine irregulären Antikörper vorliegen und der direkte Verträglichkeitstest zwischen Empfänger-Serum und Spender-Erythrozyten (Kreuzprobe) eine negative Reaktion zeigt.

Routinefälle lassen sich mit klassischen Tests eindeutig abklären

Individuelle Besonderheiten, wie erbliche Varianten von Blutgruppeneigenschaften oder das Fehlen erwarteter ISO-Agglutinine im Serum, führen zur Verunsicherung des Untersuchers und lassen den Wunsch nach einer anderen Untersuchungsmethode aufkommen. Eine solche Methode besteht in der molekulargenetischen Abklärung der Blutgruppenmerkmale, wodurch nach Auffinden entsprechender Gene, die phänotypisch zu einer schwachen Antigenausprägung führen, gelegentlich das Fehlen von ISO-Antikörpern erklärt werden kann. Wenn eine Klärung der Situation auf DNA-Basis möglich ist, so stellt sich die Frage, warum nicht gleich DNA-Analysen gemacht werden sollen und auf die klassische Serologie, beruhend auf Antigen-Antikörper-Reaktionen, verzichtet werden kann.

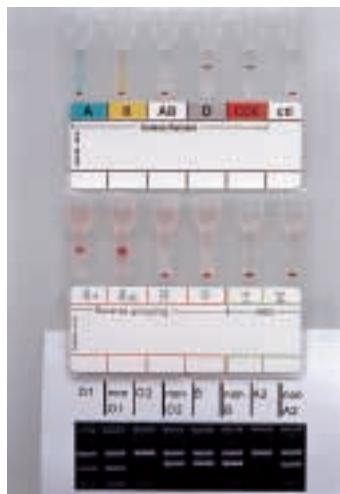
Routinefälle lassen sich mit den klassischen Test-Seren oder -Reagenzien bzw. mit Test-Zellen relativ billig, rasch und eindeutig abklären. Die so genannten Säulen-Agglutinations-Techniken (z.B. ID-Microtyping-System – Dia-Med Switzerland – oder Bio-Vue, Ortho-Diagnostics) haben zu grösstmöglicher Standardisierung und sicherer Interpretierbarkeit der Ergebnisse beigetragen. Die DNA-Techniken ermöglichen bei zweifelhafter Expression von Blutgruppen-

eigenschaften auf der Erythrozyten-Membran (Protein- bzw. Zucker-Ebene) den sicheren Nachweis des relevanten Gens (Nukleotid-Ebene). Mit den DNA-Methoden kann jedoch nicht der Nachweis einer Blutgruppen-Spezifität eines Antikörpers erbracht werden. Damit können weder Antikörper-Suchtest noch Kreuzprobe durch DNA-Analysen ersetzt werden. Blutgruppen-spezifische Antikörper können nur mit räumlich intakten Antigenen der Erythrozyten nachgewiesen werden.

Entscheidend in der täglichen Transfusionsroutine ist, dass bei den meisten Problemen eine Lösung auf serologischer Basis gefunden wird, wenn zumindest nachweisbaren Antikörpern durch Bereitstellung Antigen-negativer Erythrozyten-Konzentrate (EK) Rechnung getragen werden kann. Wenn hingegen bei Vorliegen von Antikörper-Gemischen in Verbindung mit einem positiven direkten Coombs-Test eine Antigen-Bestimmung über das ABO- und Rh-System hinaus Schwierigkeiten bereitet, kann eine DNA-Analyse der Gene der wichtigsten Blutgruppensysteme einerseits behilflich sein, die Spezifitäten der multiplen Antikörper leichter zu identifizieren, andererseits wird dadurch eine weitgehende Antigen-Übereinstimmung bei der Auswahl von EK erleichtert. Wenn man von letzterem Fall absieht, wird eine auch notfallmässige Versorgung der Patienten ohne DNA-Analyse möglich sein, so lange durch gezielte Auswahl der EK sowohl den ISO-Agglutininen als auch irregulären Antikörpern ausgewichen werden kann. Verbleibt in solchen Fällen ein unklarer serologischer Gesamtbefund, sollte eine endgültige Klärung mit DNA-Methoden erfolgen, um die Dokumentation zu vervollständigen.

Gelegentlich sind die Antigene des ABO-Systems, welches ein Histokompatibilitäts-System darstellt, nur in den Körpergeweben, nicht aber an den Ery-

Bei der ABO-Bestimmung in Gel-Karten zeigt sich bei der Faktorenbestimmung die Blutgruppe 0, in der Serumgegenprobe ist jedoch nur Anti-A nachweisbar, während das zu erwartende Anti-B fehlt. Die DNA-Analyse zeigt jedoch ein B-Gen an. Durch B-spezifische Prägung der Körpergewebe ist das Fehlen des Anti-B im Serum zu erklären.



throzyten exprimiert. Ihre Präsenz im Organismus führt jedoch durch Immuntoleranz zum Fehlen entsprechender ISO-Antikörper im Serum. Der Nachweis eines A- bzw. B-Gens auf DNA-Ebene klärt den Zusammenhang und den Befund. Auch können schwache Varianten der Blutgruppen A oder B, die wegen der Anwesenheit eines wenn auch sehr schwachen Antigens ebenso zum Fehlen der entsprechenden Antikörper führen, serologisch übersehen werden. Auch in diesen Fällen klärt der Nachweis des entsprechenden Gens den Befund. Neben den erblichen Blutgruppeneigenschaften gibt es auch erworbene Merkmale. So können Menschen der Blutgruppe A, welche an Infektionen mit Deacetylase-bildenden Bakterien leiden, eine scheinbare B-Eigenschaft erwerben, da manche Anti-B-Reagenzien den der Blutgruppe B ähnlichen Zucker erkennen, welcher nach Abspaltung der Acetyl-Gruppe der Blutgruppe A durch das bakterielle Enzym entsteht.

Ein weiteres diagnostisches Problem, welches sowohl das ABO- als auch das Rh-System betreffen kann, besteht im Auftreten so genannter 2-Zell-Populationen, die früher als Mischfeld-Agglutination aufgefallen sind (oder übersehen wurden!), bei Verwendung der Säulen-Agglutinations-Teste jedoch als «Oben-unten-Reaktionen» erkennbar werden. Hinter diesem Erscheinungsbild können sich Blut-Chimären bzw. -Mosaik verbergen, wenn nicht ganz einfach nach dem Universalspenderschema, zum Beispiel 0 negativ, auf eine andere Blutgruppe transfundiert wurde. Zur Klärung, ob Chimarismus oder Mosaizismus vorliegt, ist die Anamnese hilfreich.

Bei Zwillings- oder dispermischem Chimarismus sind meist mehrere Blutgruppensysteme betroffen, in welchen sich mit den entsprechenden Test-Reagenzien 2-Zell-Populationen nachweisen lassen. In den letzten Jahren werden durch Verwendung der Säulen-Agglutinations-Teste in steigendem Masse Doppelpopulationen erkannt, die sich ausschliesslich auf das Rhesus-System beziehen. In der Anamnese finden sich bei den Betroffenen häufig Malignome des hämatopoetischen Systems. Personen, die oft seit Jahren als normal D positiv bekannt waren, verlieren mit Fortschreiten des Grundleidens mehr und mehr die Rh-D-

Eigenschaft, wobei zugleich eine begleitende C- oder E-Eigenschaft abgeschwächt erscheint. Es ist in diesen Fällen somit ein gesamter Rhesus-Haplotyp des Individuums betroffen.

Das Rh-System ist seit der Sequenziermöglichkeit seiner 2 Gene zur Spielweise der Molekularbiologen geworden. Die Auffindung einer neuen Mutation am Rh-D-Gen, welche zu einer Abschwächung zu Dweak Anlass geben kann, hat Ähnlichkeiten mit dem Erfolgserlebnis eines Philatelisten, der eine seltene Briefmarke entdeckt. Wissenschaftlich gesehen macht der Nachweis dieser Punktmutationen sowie das Auffinden ganzer Exon-Austausche sicher Sinn, um die Vielfalt molekularer Veränderungen darzustellen, die zum phänotypischen Erscheinungsbild «schwaches D» oder Dweak führen.

Serologisch unklare Befunde lassen sich molekularbiologisch meist klären

Die Molekularbiologie wird uns verstehen helfen, wie das Rhesus-Protein in der Zellmembran verankert ist bzw. durch welche nachbarschaftlichen Beziehungen zu anderen Membraneigenschaften bzw. zum Cytoskelett die Expression des Rhesus-Faktors beeinflusst wird – aber brauchen wir die Rhesus-DNA-Analyse, um sichere Transfusionsmedizin zu betreiben? Nach den Richtlinien werden Rh-D-positive Empfänger D-positiv, Rh-D-negative Empfänger D-negativ transfundiert. Probleme wirft meist nur die Versorgung von Dweak-Patienten auf. Hinter dem serologischen Erscheinungsbild Dweak können sich sowohl D-Kategorien als auch Punktmutationen verbergen. Auf die D-Kategorien kann heute bereits serologisch getestet werden (entsprechende Reagenzien-Sets von DiaMed und Diagast). Definitionsgemäss sind Kategorien jene D-Eigenschaften, deren Träger zur Allo-Anti-Bildung befähigt sind. Daher sind Kategorien D negativ zu transfundieren. Es gibt auch Punkt-Mutationen, die dem Träger dieser Variante die Möglichkeit geben, nach Exposition mit D ein Allo-Anti-D zu bilden. Punkt-Mutationen, die zur Abschwächung von D führen, wer-



Bei der Rhesusfaktorenbestimmung in der Gel-Karte zeigt sich eine abgeschwächte Reaktion mit Anti-D. Dahinter können sich Rhesus-D-Kategorien oder Punktmutationen im Rhesus-D-Gen verbergen. Die unten im Bild befindliche DNA-Analyse zeigt das Fehlen von D-Exons an, so dass es sich in diesem Fall um eine D-Kategorie VI handelt.

den als Dweak-«Typen» bezeichnet. Unter diesen zählen nach heutigem Wissensstand die Typen 4,2 und 15 zu potentiellen Allo-Anti-D-Bildnern.

Für die tägliche Transfusions-Praxis bei Dweak-Individuen kann nach wie vor die alte Transfusions-Regel «als Spender positiv, als Empfänger negativ» verwendet werden. Nach unseren eigenen Untersuchungen sind etwa 10% der als Dweak bestimmten Personen potentielle Allo-Anti-D-Bildner. Es soll nicht verschwiegen werden, dass es auch Blutproben gibt, die ohne jeden Zweifel als Rh-D-positiv in der Serologie bestimmt werden und trotzdem ein Allo-Anti-D bilden können, wie zum Beispiel die Kategorie D VII. (Der Nachweis der Kategorie D VII ist zum Beispiel mit dem ID-partial D-Typing Set [DiaMed, Switzerland] serologisch möglich.) Diese Untersuchung ist jedoch nur sinnvoll und finanziell vertretbar, wenn ein Allo-Anti-D bei einem scheinbar normal Rh-D-positiven Individuum nachgewiesen wurde.

Die transfusionsmedizinische Versorgung der Patienten ist daher mit herkömmlichen serologischen Methoden fast ausnahmslos möglich. Serologisch unklare Reaktionen bestimmter Blutproben, die selbst dann, wenn für einen bestimmten Blutempfänger kompatible Blutprodukte gefunden werden, zu einer Verunsicherung des Laborpersonals Anlass geben, lassen sich molekularbiologisch meist abklären, so dass ein schlüssiger Befund dokumentierbar wird.

Primarius Univ. Prof. Dr. Diether Schönitzer
Zentralinstitut für Bluttransfusion und
Immunologische Abteilung; A.ö. Landeskrankenhaus
Universitätskliniken Innsbruck
Anichstr. 35, A-6020 Innsbruck
E-Mail: diether.schoenitzer@tilak.or.at