

Persönliche PDF-Datei für Christoph Gassner

Mit den besten Grüßen vom Georg Thieme Verlag

www.thieme.de

Molekulare Blutgruppenbestimmung

DOI 10.1055/s-0043-104615

Transfusionsmedizin 2017; 7: 87–94

Dieser elektronische Sonderdruck ist nur für die Nutzung zu nicht-kommerziellen, persönlichen Zwecken bestimmt (z. B. im Rahmen des fachlichen Austauschs mit einzelnen Kollegen und zur Verwendung auf der privaten Homepage des Autors). Diese PDF-Datei ist nicht für die Einstellung in Repositorien vorgesehen, dies gilt auch für soziale und wissenschaftliche Netzwerke und Plattformen.

Verlag und Copyright:

© 2017 by
Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
ISSN 2191-8805

Nachdruck nur
mit Genehmigung
des Verlags



Molekulare Blutgruppenbestimmung

Blood Group Genotyping

Autor

Christoph Gassner

Institut

Blutspende Zürich, SRK, Zürich-Schlieren, Schweiz

Schlüsselwörter

Blutgruppe, Gen, Genotyp, molekulare Blutgruppenbestimmung, Blutgruppen-Genotypisierung

Key words

blood group, gene, genotype, molecular blood group typing, blood group genotyping

Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0043-104615>

Transfusionsmedizin 2017; 7: 87–94 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York | ISSN 2191-8805

Korrespondenzadresse

PD Mag. Dr. rer. nat. Christoph Gassner
Blutspende Zürich, SRK, Zürich-Schlieren, Schweiz
Rütistrasse 19, 8952 Schlieren, Schweiz
c.gassner@zhbsd.ch

ZUSAMMENFASSUNG

Die erste molekulare Analyse einer menschlichen Blutgruppe erfolgte 1983 mittels eines Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) am System Xg. Seither wurden in unzähligen Studien die molekularen Ursachen für Blutgruppen und deren Antigene erforscht, und das resultierende Wissen für eine ständige Verbesserung der entsprechenden Analysemethoden verwendet. Die Untersuchung kausaler Punktmutationen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) aller 36 von der International Society for Blood Transfusion (ISBT) anerkannten Blutgruppensysteme erlaubt heute eine der Serologie ebenbürtige, exakte Vorhersage der Blutgruppenantigene. In Patienten wird die molekulare Blutgruppenbestimmung bevorzugt in Form von Einzelprobenanalytik für die Diagnose von RhD-Varianten eingesetzt, um damit transfusionsrelevante Entscheidungen bezüglich RhD zu treffen und um die Rh-Prophylaxe noch zielsicherer zu steuern. An Spenderproben und im Hochdurchsatz ermöglicht die Blutgruppen-Genotypisierung die Schaffung einer ausreichenden

Anzahl von Spender-Datensätzen, um immunisierte Patienten bestverträglich zu transfundieren oder deren Immunisierung bereits im Ansatz zu vermeiden. Gleichzeitig werden heutzutage an den gleichen Proben zusätzlich eine Vielzahl weiterer SNPs zur Identifikation von Spendern mit seltener Negativität für hochfrequente Antigene getestet. Derartig umfassende Spender-Datensätze werden bereits ideal genutzt für „In-silico-Kreuzproben“ eingesetzt. Next Generation Sequencing (NGS) ist auch in der Transfusionsmedizin der „neue Stern am Horizont“ und wird vermutlich innert weniger Jahre eine wichtige Rolle in der Analyse kompletter Blutgruppen Genome (chronischer) Empfänger spielen. Blutgruppenbestimmung als frühestes Beispiel echter personalisierter Medizin wird in ihrer molekularen Version mit dazu beitragen, den gebührenden Platz der Transfusionsmedizin in der modernen Medizin zu behaupten.

ABSTRACT

The first molecular analysis of a human blood group was performed using a Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) on Xg in 1983. Since then, a panoply of studies addressing the genetic background of human blood groups has enormously broadened knowledge, with steady improvement of blood group genotyping procedures. Targeting Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of all 36 human blood group systems, as currently recognized by the International Society for Blood Transfusion ISBT, allows for exact blood group antigen predictions, with accuracies comparable to those of serology. Blood group genotyping in patients is mainly done for the discrimination of RhD-variants due to their relevance for blood transfusion and in order to improve guided Rh prophylaxis. Among donors, high-throughput genotyping is used to assure supply of well-matched blood to recipients with existent allo-antibodies, or to avoid allo-immunizations up front. Capability of modern techniques for the simultaneous analysis of dozens of SNPs, allows for parallel identification of donors with rare negativity for high-frequency-antigens. Comprehensive donor-data sets have already been used in an ideal way for “in silico-matching” approaches. Next Generation Sequencing is a new star on the horizon and is envisioned for improved (chronic) recipient blood group analysis. Using molecular techniques, transfusion medicine the earliest example of truly personalized medicine, will keep its place in modern medicine.

Chronologie zur Beschreibung der molekularen Blutgruppen

Der erste als „molekulargenetisch“ einzustufende Bericht über den Zusammenhang einer individuellen genetischen Veranlagung mit einem Blutgruppen-Phänotyp stammt aus dem Jahr 1983 und behandelt die Blutgruppe Xg (International Society for Blood Transfusion, ISBT 012) [1]. Kurz darauf folgten 1986 die ersten genetischen Beschreibungen von Varianten der Blutgruppensysteme Gerbich (ISBT 020) und MNSs (ISBT 002), deren Antigene sich auf den Glykophorinen C, bzw. A (MN) und B (Ss) befinden [2, 3]. Interessanterweise bleibt ausgerechnet Xg das letzte Blutgruppensystem, bei dem die molekulare Ursache seiner Phänotypen noch immer unklar ist [4, 5].

Die insgesamt 36 heute von der ISBT anerkannten Blutgruppensysteme erstrecken sich von ABO (ISBT 001) über RhD (ISBT 004), Kell (ISBT 006), Duffy (ISBT 008), und Kidd (ISBT 009) und wurden von Geoff Daniels und Marion Reid im Jahr 2010, zeitgleich mit der Anerkennung von RhAG als ISBT 030, zusammengefasst dargestellt [6, 7]. Zeitlich abgesetzt erschienen dann ab 2012 bis 2015 die bis heute vorläufig letzten Berichte bezüglich neuer Blutgruppensysteme und deren genetische Beschreibung. Junior, Langereis, und Vel wurden ausnahmslos in hochrangigen wissenschaftlichen Fachzeitschriften und immer gleichzeitig durch verschiedene Forschungsgruppen beschrieben [8–14]. Ebenfalls hochrangig publiziert, zeichnen sich die restlichen Systeme, Forssman und CD59, und in etwas geringerem Ausmaß auch Augustine, vor allem auch durch die extreme Seltenheit eines ihrer beiden Phänotypen aus [15–18].

Grundsätzlich werden neue Blutgruppensysteme von der ISBT nur dann als solche anerkannt, wenn

1. sie ein Antigen aufweisen, für das ein natürlicher menschlicher Antikörper bekannt ist,
2. das betreffende Antigen nachweislich vererbt wird,
3. das entsprechende Gen und der für das Antigen ursächliche Polymorphismus bekannt ist und sequenziert wurde, und
4. sich das entsprechende Gen eindeutig von allen bisher anerkannten Genen unterscheidet und auch kein Homologes hiervon ist.

Für die Anerkennung neuer Antigene gelten idente Anforderungen. Neben jenen der Blutgruppensysteme existieren weitere bekannte Antigene, die jedoch die Kriterien 1–4 nicht gänzlich erfüllen und deshalb in den Tabellen der sogenannten „collections“ (200 series), „low incidence antigens“ (700 series) und „high incidence antigens“ (901 series) verwaltet werden [5].

Molekulare Ursachen der Blutgruppen

Analysiert man anhand der 3 willkürlich gewählten Blutgruppensysteme Lutheran, Kell und RhD und deren entsprechenden ISBT Allel-Tabellen (Versionen vom November 2016 [5]) die Anzahl und Arten von Polymorphismen, welche die Antigene bzw. deren Fehlen verursachen, so wird schnell eines klar: Punktmutationen, im Englischen auch Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ge-

nannt, also unterschieden von nur einer Base zwischen 2 Sequenzen, kodieren für 79% aller Blutgruppenvarianten (► **Tab. 1**). Nur weitere 3% aller Polymorphismen werden durch einen genetischen Unterschied von 2 Basen in Folge verursacht. Alle restlichen Varianten, also 18%, stellt in dieser Analyse die Blutgruppe RhD mit Allel-Mischformen („Hybriden“) bestehend aus unterschiedlichen Teilen der beiden paralogen Gene *RHD* und *RHCE*. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit („Homologie“) neigen paraloge Gene zu sogenannten „Genkonversionen“, die z. B. ein Hybridgen aus den ersten 3 *RHD*-Exonen, den *RHCE*-Exonen 4–9 und einem abschließenden *RHD*-Exon 10 verursachen. In diesem Fall haben die beiden paralogen Gene also mehrere Kilo-Basenpaare (kbp) große Gebiete untereinander ausgetauscht, wodurch dann formal ein Hybridgen vom Typ *RHD-CE(4–9)-D* resultiert hat [19]. Hybridbildung und sogar Genduplikation, mit dann bis zu 4 Glykophorin-Genen pro Chromosom, wurde auch bei den paralogen Genen *GYP A*, *GYP B* und *GYP E* des Blutgruppensystems MNSs beobachtet [4]. Die oben dargestellte „genetische Agilität“ ist nur scheinbar; in Wirklichkeit entstanden die verschiedenen Blutgruppenallele über lange Zeiträume hinweg, finden sich deren gemeinsame Vorläufer auch in Primaten und unterliegen keiner andauernden Mutation; sie sind also relativ konserviert [20].

Für alle Einzelschritte der Proteinexpression (Transkription, Spleißen, Translation, posttranslationelle Modifikation) sind Mutationen bekannt, welche die Blutgruppenantigene oder deren Fehlen verursachen. Es ist wichtig, die kausalen Mutationen zu identifizieren und bevorzugt diese – und nicht „nur“ genetisch gekoppelte Polymorphismen – gendiagnostisch zu adressieren.

Detektion von Punktmutationen

Eine molekulare Blutgruppenbestimmung erfordert die Analyse von mehreren verschiedenen Punktmutationen, oft an verschiedenen Genen, gleichzeitig an einer oder vielen Proben (DNS).

Inspiziert durch die molekulare Analyse von HLA-Merkmalen stellt „PCR using sequence specific priming“ (PCR-SSP, alternative Bezeichnung „ARMS“) hierfür seit Mitte der 1990er-Jahre und auch noch heute eine oft angewandte Technik in der molekularen Blutgruppenbestimmung dar [21, 22]. Jede Mutation und gegebenenfalls ihr „Alter Ego“, also das „Wildtyp-Allel“, werden hierbei in 2 separaten PCRs, aber mit identischem PCR-Programm bestimmt. Zusätzlich interessierende Mutationen können parallel geschaltet werden [23]. Trotz ihrer Ursprünglichkeit zeichnet sich PCR-SSP im Vergleich zu vielen anderen Techniken mit reiner SNP-Detektion durch 4 gewichtige Vorteile aus:

1. Sie ist schnell, da sie eine Gendiagnose in weniger als 3 Stunden ab Probeneingang erlaubt.
2. Zusätzlich vermag sie direkt Haplotypen zu bestimmen. Das bedeutet, dass beide Varianten von 2 benachbarten SNPs in allen 4 theoretisch vorkommenden Kombinationen, dementsprechend in 4 getrennten PCRs, mittels „double ARMS“ spezifisch nachgewiesen werden können [24]. Beispielsweise beruht die genetische Diskrimination von RhE vs. Rhe auf dieser „Bispezifität“.
3. PCR-SSP-Systeme sind leichter als andere Verfahren um neu interessierende SNPs modular erweiterbar.

► **Tab. 1** Anzahl und Arten von Polymorphismen und Mutationen, die Antigene und deren Fehlen bei den Blutgruppensystemen Lutheran, Kell und RhD (gesplittet nach den Untergruppen partielles D, weak D, Del und D negativ) verursachen.

kodierend vs. nicht kodierend	Art der Mutation	Effekt	BCAM	KEL					alle RhD	alle	alle (%)
					partielle D	weak D	Del	D negativ			
	Substitution (1 bp)										
kodierend	Silent (gleiche As)										
kodierend	Missense (As-Austausch)	neues AG	18	30	38				38	86	30%
kodierend	Missense (As-Austausch)	„weak“ AG				71			71	71	25%
kodierend	Missense (As-Austausch)	„ad/el“ AG		12			6		6	18	6%
kodierend	Missense (As-Austausch)	kein AG (null)	1	1				1	1	3	1%
kodierend	Nonsense (As > STOP)	kein AG (null)	2	13				8	8	23	8%
nicht kodierend	Splice-site	neues AG		1			4		4	5	2%
nicht kodierend	Splice-site	kein AG (null)		5				4	4	9	3%
nicht kodierend	Promoter	kein AG (null)									
	Insertion/Deletion (1 bp)										
kodierend	Out of Frame Indel	Frame-shift					3	6	9	9	3%
	Insertion/Deletion (2 bp)										
kodierend	In Frame Deletion	neues AG	2		2				2	4	1%
kodierend	Out of Frame Deletion	kein AG (null)		1				1	1	2	1%
kodierend	Out of Frame Insertion	kein AG (null)	1					2	2	3	1%
			24	63	79	73	13	31	196	233	82%

Daten aus ISBT Allel-Tabellen der Versionen 3.0 160630 für Lutheran (Gen *BCAM*), und 2.0 110914 für Kell (Gen *KEL*), und RhD (Gen *RHD*) vom November 2016 [5]. Verwendete Abkürzungen: AG: Antigen, As: Aminosäure, ad/el: Adsorption/Elution, Indel: Insertion/Deletion.

4. Aufgrund zusammengefasster „Module“ (= Kits) kann jede interessierende Blutgruppe für sich, z. B. *RHD* getrennt von *KEL*, analysiert werden. Trotzdem, PCR-SSP-basierte „Sentimentalität“ endet sehr rasch bei tiefen bis mittleren Durchsatzzahlen, z. B. ab einer Probenzahl von 12 Untersuchungen pro Tag.

Neben PCR-SSP-basierten Verfahren, deren Resultate immer noch mithilfe von Agarosegelen ausgewertet werden, richten andere kommerziell erhältliche molekulare Blutgruppenbestimmungen ihr Augenmerk größtenteils auf Probendurchsatz und weniger auf Einzelprobenanalyse [25–28]. Sie deklarieren somit Blutspenders als ihr favorisiertes, weil zahlreiches Probenmaterial. Gleichzeitig nutzen alle diese letztgenannten Verfahren Fluoreszenzdetektion für die Diskrimination der beiden Allele eines SNPs; entweder als klassische „real-time“, „chip-“, oder „bead-basierende“ Methoden [25, 29–31]. Neben den kommerziell erhältlichen Verfahren existieren zur Spendertypisierung auch eine Vielzahl „in-house“ entwickelter Methoden in den Laboratorien. Dabei erreicht beispielsweise die MALDI-TOF MS-basierte molekulare Blut-

gruppenbestimmung Detektionskapazitäten von bis zu 36 SNPs, gleichzeitig an mehreren Tausend Proben pro Tag [32, 33].

Genauigkeit der genetisch basierten Blutgruppenvorhersage

Manchem Leser mag die Schnelligkeit der Entwicklungen im Gebiet der molekularen Blutgruppenbestimmung überstürzt erscheinen. Wie steht es um die zwingend notwendige Genauigkeit in der genetisch basierten Blutgruppenvorhersage?

Eine Zusammenfassung von insgesamt 9 Studien zur Hochdurchsatz-Genotypisierung von serologisch voruntersuchten Blutspendern, publiziert in den Jahren zwischen 2005 und 2016, zeigte durchwegs weniger „genetische“, als „serologische Fehler“ bezüglich der Blutgruppen Kell, Duffy, Kidd, MN, und Ss (zusammengefasst in Table 1 des nachfolgenden Zitats) [34]. Die in den 9 Studien insgesamt untersuchten Probenzahlen lagen zwischen 6290

► **Tab. 2** Aspekte von beachtenswerten Unterschieden der molekularen Blutgruppenbestimmung zwischen Spendern und Empfängern.

Aspekte	Blutspender	Blutempfänger (Patienten)
Zeit zum Resultat	nicht zeitsensitiv Sammlung von Proben über lange Zeiträume möglich	zeitsensitiv ideal 4 bis 8 Stunden
Typisierungsausfall	nicht gravierend Spender-Datensatz kann unberücksichtigt bleiben	gravierend Diagnostik muss sofort wiederholt werden
tolerierter finanzieller Aufwand pro Probe	gering	hoch
Durchsatz	Hochdurchsatz	Einzelprobenanalytik
Spezialfall RhD	Hochauflösung überflüssig (nicht transfusionsrelevant)	Hochauflösung unbedingt notwendig (Diskrimination partieller, schwacher, Del- und RhD-negativer Allele dringend transfusionsrelevant)
unbekannte (nicht berücksichtigte) Null-Allele	unerheblich Resultat ist phänotypisch falsch heterozygot prädiert (nicht transfusionsrelevant)	gefährlich (AK-Bildung möglich)
unbekannte (nicht berücksichtigte) Allelvarianten mit Mutationen an Primer-Bindestellen	gefährlich (AK-Bildung im Empfänger möglich)	unerheblich Resultat ist phänotypisch falsch homozygot prädiert (nicht transfusionsrelevant)

für Kidd und 7676 für Ss (Listung der 9 Studien in den nachfolgenden Zitaten) [25, 34–41].

In einer der oben genannten und groß angelegten Einzelstudie fanden sich weder viele „Null-Allele“, nur einmal unter 4000 Spenderproben (8000 Allele) für Kidd und Duffy und keine für Kell, noch wurden in der beschriebenen „kaukasischen“ Kohorte Genvarianten mit Mutationen nahe diagnostischer PCR-Primer-Bindestellen identifiziert [40]. In einer anderen oben genannten Einzelstudie führten Ss-Detektion an 5743 Proben (11 486 Allele), 2 (identische) stille S-Allele und eine S-Variante mit mutierter Primer-Bindestelle zu 2 falsch S-positiven bzw. einem falsch S-negativen genetisch prädierten Phänotyp [34]. Bezüglich MN (ebenfalls an 5743 Spenderproben erhoben) entpuppten sich alle 7, vorab genetisch falsch N-negativ geglaubten Proben, als Spender mit einer sogenannten St(a)-Variante, also mit bekanntem, aber nur N-ähnlichem Phänotyp. In Bezug auf die beiden letztzitierten Einzelstudien fanden sich also unter insgesamt 46 972 untersuchten Allelen 4 zuvor unbekannte Null-Allele und eine Variante mit einer Mutation an einer diagnostischen Primer-Bindestelle. Es muss davon ausgegangen werden, dass weitere Mutanten-Allele, z. B. mutierte k-Allele in einer k I k-homozygoten und serologisch K-negativen Probe, unerkannt verblieben.

Studien zur molekularen Blutgruppenbestimmung generieren nach wie vor ständig neues Wissen bezüglich neuer Allelvarianten und deren Häufigkeiten. In Abhängigkeit von beobachteten Allelhäufigkeiten sollte und wird dieses Wissen für mögliche Verbesserungen nachfolgender Verfahrensversionen berücksichtigt werden. Für SNP-basierende Hochdurchsatz-Verfahren ist daher, im Sinne besserer Genauigkeit, zukünftig von einer technisch machbaren, steigenden Anzahl untersuchter SNPs auszugehen. Ebenfalls im Sinne verbesserter Genauigkeit und vor allem in Zeiten von Bevölkerungsmigration müssen populationsgenetische Variationen, und zwar beginnend von ethnischer bis hin zu klein-regionaler, berücksichtigt werden.

Unterschiede zwischen Spendern und Empfängern bezüglich molekularer Blutgruppenbestimmung

Eine getrennte Betrachtung der molekularen Blutgruppenbestimmung von Blut Spendern und -empfängern (Patienten) ist zweckmäßig (► **Tab. 2**). Die Unterschiede in den finanziell zu tolerierenden Gesteungskosten für die Diagnose und die Umsetzung der unterschiedlichen technischen Anforderungen sind beträchtlich. Es gilt auch zu berücksichtigen, ob nationale Richtlinien, oder die verwendeten IT-Systeme zur Datenspeicherung, eine „unterschiedliche Blutgruppe“, also z. B. den pragmatischen Zusatz „als Spender positiv, als Empfänger negativ“, für Spender und Empfänger überhaupt erlauben.

Praktizierte molekulare Blutgruppenbestimmung bei Patienten (Empfängern)

Empfängerseitig ist eine allgemeine Antigenprädiktion mittels molekularer Blutgruppenbestimmung indiziert bei (1) vortransfunden Patienten und somit serologisch unbestimmbar Blutgemischen [42] und bei (2) DAT-positiven Patienten mit z. B. autoimmunhämolytischer Anämie. Genetische Analysen werden auch durchgeführt bei (3) der vorgeburtlichen Bestimmung einer fetalen Blutgruppe bevorzugt an zellfreiem Material aus maternalem Plasma, und (4) zur Ermittlung der RhD-Zygotie von (potenziellen) Vätern bei Vorliegen eines Risikos für „hemolytic disease of the fetus and newborn“ (HDFN). Des Weiteren kommt die molekulare Blutgruppenbestimmung auch zum Einsatz, wenn (5) für spezifische Antigene keine kommerziell erwerblichen Antiseren erhältlich sind, z. B. für die serologische Bestimmung von Do^{a/b}, oder auch Co^{a/b} (gilt auch für Spendertypisierung), (6) Antigene

► **Tab. 3** Molekulare Blutgruppenbestimmung. Vergleich von 2 Laboratorien aus Österreich (Innsbruck, IBK) und der Schweiz (Zürich, ZRH). Die 5-Jahres-Daten für Innsbruck stammen aus den Jahren 2004 bis 2008 [45], für Zürich aus dem Zeitraum von 2012 bis 2016. Zu beachten ist die international übliche Schreibweise für Gene, entsprechend mit Großbuchstaben und kursiv.

Grund für und/oder Art der molekularen Blutgruppenbestimmung	n pro 5 a		n pro a		n pro a und Mio. EW		%	
	IBK	ZRH	IBK	ZRH	IBK	ZRH	IBK	ZRH
Überprüfung <i>ABO</i>	77	116	15,4	23,2	18,7	13,9	6,6%	8,2%
Überprüfung <i>KEL</i>	23	40	4,6	8,0	5,6	4,8	2,0%	2,8%
Überprüfung <i>ACKR1</i> , <i>Fy</i>	8	35	1,6	7,0	1,9	4,2	0,7%	2,5%
Überprüfung <i>GYP A</i> , <i>GYP B</i> , <i>MNSs</i>	0	28	0,0	5,6	0,0	3,4	0,0%	2,0%
Überprüfung „ <i>RAREs</i> “, <i>Kp</i> , <i>Yt</i> , ...	20	38	4,0	7,6	4,9	4,6	1,7%	2,7%
Überprüfung <i>RHCE</i>	25	41	5,0	8,2	6,1	4,9	2,2%	2,9%
Überprüfung <i>RHD</i>	81	194	16,2	38,8	19,7	23,2	7,0%	13,6%
Überprüfung <i>RHD</i> weak	233	368	46,6	73,6	56,6	44,1	20,1%	25,9%
Überprüfung <i>RHD</i> Zygotis	9	11	1,8	2,2	2,2	1,3	0,8%	0,8%
Überprüfung <i>HPA</i> Antigens	28	2	5,6	0,4	6,8	0,2	2,4%	0,1%
positiver <i>DAT</i> , serolog. unb.	151	58	30,2	11,6	36,7	7,0	13,0%	4,1%
„vortransfundiert“ serolog. unb.	183	141	36,6	28,2	44,4	16,9	15,7%	9,9%
externe Qualitätskontrolle	64	57	12,8	11,4	15,5	6,8	5,5%	4,0%
Archivierung Referenzprobe	118	260	23,6	52,0	28,6	31,2	10,2%	18,3%
anderer Grund (bekannt)	110	19	22,0	3,8	26,7	2,3	9,5%	1,3%
Grund unbekannt	32	14	6,4	2,8	7,8	1,7	2,8%	1,0%
Total	1162	1422	232,4	284,4	282,0	170,4	100,0%	100,0%

Verwendete Abkürzungen: n: Anzahl, a: Jahr, Mio.: Million, EW: Einwohner, IBK: Innsbruck, ZRH: Zürich.

aller Systeme, die allgemein Probleme für die klassische Serologie darstellen, wenn diese schwach exprimiert, oder nur mittels Adsorption und Elution nachweisbar sind, oder wenn (7) die zahlreichen, serologisch teilweise schlecht diskriminierbaren und unterschiedlich transfusionsrelevanten Phänotypen des RhD-Systems betroffen sind.

Exemplarisch kann die Anzahl der molekular auf Blutgruppen untersuchten Proben pro Jahr und Million Einwohner für die Regionen Innsbruck (Tirol, Österreich) und Zürich (Schweiz) mit 282 bzw. 170 angegeben werden (► **Tab. 3**, Ermittlung der Zahlen siehe Box). Die Anzahl der Typisierungen weicht von der Anzahl untersuchter Proben nach oben ab, da für bestimmte Patienten mehrere Blutgruppensysteme gleichzeitig untersucht werden müssen. Dennoch wurden derartige Untersuchungen in unten dargestellten Beispielen mittels PCR-SSP bewältigt. Die hauptsächlich bestehenden Anforderungen an die beiden genannten Laboratorien liegen, prozentuell ansteigend, bei der Untersuchung von *DAT*-positiven Patienten (4,1–13,0%), Vortransfundierten (9,9–15,7%), grundsätzlichen Abklärungen diverser Antigene (in Summe 11,0–18,1) und bei der Abklärung von *RhD* (29,9–43,2%). Vor allem schwache oder diskrepante serologische Bestimmungen des *RhD* sorgen für Unklarheiten in der Versorgung mit Erythrozytenpräparaten, aber auch bei der Gabe der *Rh*-Prophylaxe im Rahmen der Schwangerschaft [19]. Die molekulare Bestimmung eines möglichen *Weak Ds* ist die am häufigsten nachgefragte Einzeluntersuchung (20,1–25,9%), und ist in

den USA für die *Weak-D*-Typen 1, 2 und 3 empfohlen und in der Schweiz vorgeschrieben [43, 44].

ERMITTLUNG VON EINZUGSBEREICHEN FÜR DIE VERSORGUNG MIT MOLEKULARER BLUTGRUPPENBESTIMMUNG

Exemplarisch für die Regionen Innsbruck und Zürich.

Über die Anzahl lokal hergestellter Erythrozytenkonzentrate (EK), die gesamt-national hergestellten EKs und die Einwohnerzahlen der beiden Länder Österreich (AT) und Schweiz (CH) wurde die Anzahl der versorgten Einwohner für das Zentralinstitut für Bluttransfusion in Innsbruck (AT) und für Blutspende Zürich (CH) geschätzt. Innsbruck versorgt demnach 824 000 Einwohner, entsprechend 9,89% der Bevölkerung von Österreich (2008), und Zürich versorgt 1 669 000 Einwohner, entsprechend 20,05% der Bevölkerung der Schweiz (2015). Der Einzugsbereich und entsprechend die Anzahl mit dem „Service zur molekularen Blutgruppenbestimmung“ versorgten Einwohner wurde mit dem Versorgungsbereich mit EKs gleichgesetzt (► **Tab. 4**).

► **Tab. 4** Ermittlung der Einzugsbereiche für die Versorgung mit molekularer Blutgruppenbestimmung für die Regionen Innsbruck und Zürich. Zahl ohne Aufbringung durch Mandantenzentren der Blutspende ZRH.

Art	Quelle AT (IBK)	2008		2015	
		AT (IBK)	Quelle CH (ZRH)	CH (ZRH)	
Einwohner (EW) national in Mio.	Wikipedia	8 337	Bundesamt CH für Statistik	8 327	
n Verbrauch EK national	AGES, Hämovigilanz-Bericht Österreich 2014 [46]	419 300	Blutspende CH, SRK-Jahresbericht 2015 [47]	248 647	
n Verbrauch EK regional	persönlich, H. Schennach, Institutsleitung, Blutbank IBK	41 463	persönlich, D. Goslings, Abteilungsleitung Produktion, Blutspende ZRH*	49 848	
% regional von national	kalkuliert	9,89%	kalkuliert	20,05%	
n versorgte EW regional in Mio.	kalkuliert	0,824	kalkuliert	1,669	

Verwendete Abkürzungen: AT: Österreich, IBK: Innsbruck, CH: Schweiz, ZRH: Zürich, EW: Einwohner, Mio.: Million, n: Anzahl, EK: Erythrozytenkonzentrate, AGES: (Österreichische) Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, SRK: Schweizerisches Rotes Kreuz.

Praktizierte molekulare Blutgruppenbestimmung bei Spendern

Spenderseitig wird die molekulare Blutgruppenbestimmung verwendet für (8)* die Schaffung eines Spenderpools mit breit genotypisierten Blutgruppeneigenschaften, also einem breiten genetisch präziierten Phänotypprofil, (9) für die Suche nach Spendern mit seltenen Blutgruppeneigenschaften („high-frequency antigen“, HFA), und (10) für die molekulare Bestätigung genetischer *RHD*-Negativität unter serologisch RhD-Negativen.

Die technischen Anforderungen an die Blutgruppen-Genotypisierung von Blutspendern müssen an den jeweils bestehenden Bedarf angepasst werden. Üblicherweise detektierte Blutgruppensysteme sind Kell, Duffy, Kidd, MN, Ss und andere [33]. Eine Faustregel empfiehlt, ca. 10% aller jährlich anfallenden EKs einer zentralen Versorgungseinrichtung und bevorzugt Mehrfachspender der Blutgruppe 0 mit RhD-negativem Phänotyp zu untersuchen. Hierfür werden Hochdurchsatz-Methoden verwendet [25, 34–41]. Der typisierte Spenderpool wird vor allem für die Versorgung von chronisch transfusionsbedürftigen Patienten mit bereits bekannten Allo-Immunsierungen eingesetzt oder um mögliche Allo-Immunsierungen zu vermeiden [48]. Eine besonders sinnvolle Nutzungsvariante eines „breit genotypisierten“ Spenderpools scheint die Online-Nutzung von Spender-Datensätzen durch dezentrale Versorger mit eigenen Blutdepots zu sein [49]. Besondere Beachtung verdient auch der Aufbau ethnisch abgestimmter Spenderpools, insbesondere für die Versorgung von schwarz-afrikanischen Patienten mit Sichelzellanämie [50, 51].

* Die Nummerierung bezüglich der Begründung für molekulare Blutgruppenbestimmung wurde hier fortgesetzt. (1) bis (7) siehe Absatz „Praktizierte molekulare Blutgruppenbestimmung bei Patienten (Empfängern)“.

Patienten mit Allo-Antikörpern gegen hochfrequente Antigene droht ein ständiger Versorgungsengpass. Die genetische Suche nach Spendern mit seltenen Homozygotien, z. B. für Kp^a, Lu^a, oder Vel Negativität wird daher heutzutage parallel zur „breiten Genotypisierung“, also an den gleichen Spenderproben, durchgeführt [33]. Im Idealfall koordiniert eine übergeordnete, z. B. nationale, oder auch internationale Datenbank die Kommunikation zwischen zentralen Versorgungseinrichtungen bei der Suche nach seltenen Spendern [52].

Die in der Schweiz gesetzlich vorgeschriebene molekulare Suche nach genetisch *RHD*-Positiven identifiziert unter 1000 serologisch RhD-Negativen im Schnitt ca. 1,3 Spender mit phänotypischer RhD-Positivität. Meist handelt es sich bei diesen RhDs um Varianten, die nur mittels Adsorption/Elution serologisch bestätigt werden können, aber gleichwohl zu Allo-Immunsierungen bei RhD-negativen Empfängern beitragen [53–55].

Die Arbeit im Terminologie-Komitee der International Society of Blood Transfusion (ISBT)

Für die einheitliche Benennung neuer Blutgruppen, Blutgruppenantigene und -allele auf internationaler Ebene liegt die Zuständigkeit bei der Working Party „Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology“ der ISBT [5]. Sie besteht gegenwärtig aus 21 Mitgliedern unter dem Vorsitz von Frau Prof. Jill Storry (University of Lund). Für jedes Blutgruppensystem gibt es je eine „Responsible Person“. Alle Erkenntnisse und Beschlüsse des Komitees werden publiziert [56]. Blutspende Zürich ist im Terminologie-Komitee der ISBT durch den Autor dieses Beitrags vertreten. Das Komitee berücksichtigt alle Blutgruppen und Antigene, wenn alle Kriterien für deren Anerkennung (siehe letzter Absatz des Kapitels „Chronologie zur Beschreibung der molekularen Blutgruppen“) erfüllt sind. Antigene erhalten dann üblicherweise eine neue Nummer, z. B. MNS:47, oft eine Zusatzbezeichnung, z. B. SARA+, und einen Allelnamen, z. B. GYPA*47. Bei der Schreibweise beachte man die Großschreibung des Gennamens, der mitunter unter-

schiedlich im Vergleich zu den Empfehlungen des Human Gene Nomenclature Committee (HGNC) auftaucht (z.B. *LU**, anstatt *BCAM**), insgesamt in kursiv, gefolgt von „*“ und einer numerischen Kodierung.

Die Darstellung von Blutgruppen mittels Phänotypen und Genotypen ist grundsätzlich verschieden. Antigene werden phänotypisch meist als Antigenpaare dargestellt, wie z.B. im Kell-Blutgruppensystem als K/k, Kp(a+b+), KEL11/17, Js(a-b+). Genetisch jedoch werden alle Antigene eines Blutgruppensystems und eines Menschen mithilfe von nur 2 Allelen und in Form eines Genotyps angegeben. Eine k/k, Kp(a+b+) heterozygote Probe wird demnach genetisch korrekt und ausschließlich mit *KEL*02 I KEL*02.03*, beschrieben. An einem Genotyp *KEL*02 I KEL*02* alleine wäre nicht erkenntlich, ob die entsprechende Probe genetisch auch auf Kp^{a/b} getestet wurde oder ob die Probe tatsächlich nur kk, Kp^a-negativ, war. Daher muss der berichtete Blutgruppen-Genotyp die jeweils untersuchten SNPs zwingend beinhalten. Idealerweise enthält ein Bericht zum Blutgruppen-Genotyp des Weiteren die Prädiktion des Phänotyps. Außer der Vielzahl wissenschaftlicher Berichte zum Thema „Molekularbiologie von Blutgruppen“ existieren für die oben genannte „Prädiktion“ gegenwärtig keine international anerkannten Richtlinien.

Prognose

Es ist abzusehen, dass auch im Bereich der molekularen Blutgruppenbestimmung die Methode des „Next Generation Sequencing“ (NGS) in den nächsten Jahren eine wichtige Rolle spielen wird. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird künftig die komplette Bestimmung eines Blutgruppengenoms, speziell in chronisch transfusionsbedürftigen Patienten mit wenig zeitsensitivem Diagnose-Druck, zur Routineanwendung evolieren [57–59]. NGS verspricht, die gegenwärtig nur ungenügend bewältigte Hürde unerkannter Null-Allele, und damit die fehlerlose Prädiktion eines Blutgruppen-Phänotyps, zu nehmen. Parallel mögen klassische Serologie und/oder schnelle, SNP-basierende Verfahren weiterhin zeitsensitive Versorgungsansprüche für Empfänger ergänzen. Über kurz oder lang kann auch spendeseitig und NGS- oder SNP-basierend ein Ersatz der klassischen Serologie durch Methoden der molekularen Blutgruppenbestimmung vermutet werden. Technisch gänzlich ausgeschlossen wird eine genetisch basierende Bestimmung transfusionsrelevanter Allo-Antikörper.

Es bedarf also auch weiterhin einer koordinierten Zusammenarbeit zwischen Serologie und Genotypisierung. Einer Zusammenarbeit im Sinne und zum Wohle moderner Transfusionsmedizin, dem frühesten Beispiel echter personalisierter Medizin.

Interessenkonflikt

Neben seinem Anstellungsverhältnis bei Blutspende Zürich, Schweiz, fungiert C.G. als Berater auf Honorarbasis der Firma inno-train GmbH, Kronberg i. T., Deutschland. Im November 2016 erfolgte eine Patent-Einreichung zu einem nicht näher ausgeführten Aspekt mit Bezug zur molekularen Blutgruppenbestimmung.

Literatur

- [1] Sarfarazi M, Harper PS, Kingston HM et al. Genetic linkage relationship between the Xg blood group system and two X chromosome DNA polymorphisms in families with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Hum Genet* 1983; 65: 169–171
- [2] Colin Y, Rahuel C, London J et al. Isolation of cDNA clones and complete amino acid sequence of human erythrocyte glycophorin C. *J Biol Chem* 1986; 261: 229–233
- [3] Huang CH, Johe K, Moulds JJ et al. Delta glycophorin (glycophorin B) gene deletion in two individuals homozygous for the S–s–U– blood group phenotype. *Blood* 1987; 70: 1830–1835
- [4] Daniels G. *Human Blood Groups*. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013
- [5] ISBT. Committee on Terminology for RBC Surface Antigens. 2016. Im Internet: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>; Stand: 31.03.2017
- [6] Daniels G, Reid ME. Blood groups: the past 50 years. *Transfusion* 2010; 50: 281–289
- [7] Tilley L, Green C, Poole J et al. A new blood group system, RHAG: three antigens resulting from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Vox Sang* 2010; 98: 151–159
- [8] Saison C, Helias V, Ballif BA et al. Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior. *Nat Genet* 2012; 44: 174–177
- [9] Zelinski T, Coghlan G, Liu XQ et al. ABCG2 null alleles define the Jr(a-) blood group phenotype. *Nat Genet* 2012; 44: 131–132
- [10] Helias V, Saison C, Ballif BA et al. ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies the new blood group system Langereis. *Nat Genet* 2012; 44: 170–173
- [11] Andolfo I, Alper SL, Delaunay J et al. Missense mutations in the ABCB6 transporter cause dominant familial pseudohyperkalemia. *Am J Hematol* 2013; 88: 66–72
- [12] Storry JR, Joud M, Christophersen MK et al. Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype. *Nat Genet* 2013; 45: 537–541
- [13] Ballif BA, Helias V, Peyrard T et al. Disruption of SMIM1 causes the Vel blood type. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 751–761
- [14] Cvejic A, Haer-Wigman L, Stephens JC et al. SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. *Nat Genet* 2013; 45: 542–545
- [15] Yamamoto M, Cid E, Yamamoto F. Molecular genetic basis of the human Forssman glycolipid antigen negativity. *Sci Rep* 2012; 2: 975
- [16] Svensson L, Hult AK, Stamps R et al. Forssman expression on human erythrocytes: biochemical and genetic evidence of a new histo-blood group system. *Blood* 2013; 121: 1459–1468
- [17] Anliker M, von Zabern I, Hochsmann B et al. A new blood group antigen is defined by anti-CD59, detected in a CD59-deficient patient. *Transfusion* 2014; 54: 1817–1822
- [18] Daniels G, Ballif BA, Helias V et al. Lack of the nucleoside transporter ENT1 results in the Augustine-null blood type and ectopic mineralization. *Blood* 2015; 125: 3651–3654
- [19] Wienzek-Lischka S, Flegel WA. Zur klinischen Bedeutung des Antigen D und seiner Varianten. *Transfusionsmedizin* 2016; 6: 57–64
- [20] Matassi G, Cherif-Zahar B, Pesole G et al. The members of the RH gene family (RH50 and RH30) followed different evolutionary pathways. *J Mol Evol* 1999; 48: 151–159
- [21] Newton CR, Graham A, Heptinstall LE et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 2503–2516

- [22] Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225–235
- [23] Gassner C, SchmarDA A, Nussbaumer W et al. ABO glycosyltransferase genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 1996; 88: 1852–1856
- [24] Lo YM, Patel P, Newton CR et al. Direct haplotype determination by double ARMS: specificity, sensitivity and genetic applications. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 3561–3567
- [25] Hashmi G, Shariff T, Seul M et al. A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion* 2005; 45: 680–688
- [26] Avent ND, Martinez A, Flegel WA et al. The Bloodgen Project of the European Union, 2003–2009. *Transfus Med Hemother* 2009; 36: 162–167
- [27] Delaney M, Harris S, Haile A et al. Red blood cell antigen genotype analysis for 9087 Asian, Asian American, and Native American blood donors. *Transfusion* 2015; 55: 2369–2375
- [28] Lopez M, Apraiz I, Rubia M et al. Performance evaluation study of ID CORE XT, a high throughput blood group genotyping platform. *Blood Transfus* 2016; DOI: 10.2450/2016.0146-16
- [29] Drago F, Karpasitou K, Poli F. Microarray beads for identifying blood group single nucleotide polymorphisms. *Transfus Med Hemother* 2009; 36: 157–160
- [30] Goldman M, Nuria N, Castilho LM. An overview of the Progenika ID CORE XT: an automated genotyping platform based on a fluidic microarray system. *Immunohematology* 2015; 31: 62–68
- [31] Hong YJ, Chung Y, Hwang SM et al. Genotyping of 22 blood group antigen polymorphisms and establishing a national recipient registry in the Korean population. *Ann Hematol* 2016; 95: 985–991
- [32] Gassner C, Meyer S, Frey BM et al. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping—the alternative approach. *Transfus Med Rev* 2013; 27: 2–9
- [33] Meyer S, Trost N, Frey BM et al. Parallel donor genotyping for 46 selected blood group and 4 human platelet antigens using high-throughput MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2015; 1310: 51–70
- [34] Meyer S, Vollmert C, Trost N et al. MNSs genotyping by MALDI-TOF MS shows high concordance with serology, allows gene copy number testing and reveals new St(a) alleles. *Br J Haematol* 2016; 174: 624–636
- [35] Montpetit A, Phillips MS, Mongrain I et al. High-throughput molecular profiling of blood donors for minor red blood cell and platelet antigens. *Transfusion* 2006; 46: 841–848
- [36] Polin H, Danzer M, Proll J et al. Introduction of a real-time-based blood-group genotyping approach. *Vox Sang* 2008; 95: 125–130
- [37] Hopp K, Weber K, Bellissimo D et al. High-throughput red blood cell antigen genotyping using a nanofluidic real-time polymerase chain reaction platform. *Transfusion* 2010; 50: 40–46
- [38] Jungbauer C, Hobel CM, Schwartz DW et al. High-throughput multiplex PCR genotyping for 35 red blood cell antigens in blood donors. *Vox Sang* 2012; 102: 234–242
- [39] Haer-Wigman L, Ji Y, Lodén M et al. Comprehensive genotyping for 18 blood group systems using a multiplex ligation-dependent probe amplification assay shows a high degree of accuracy. *Transfusion* 2013; 53 (11 Suppl. 2): 2899–2909
- [40] Meyer S, Vollmert C, Trost N et al. High-throughput Kell, Kidd, and Duffy matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping of 4000 donors shows close to full concordance with serotyping and detects new alleles. *Transfusion* 2014; 54: 3198–3207
- [41] McBean RS, Hyland CA, Flower RL. Approaches to determination of a full profile of blood group genotypes: single nucleotide variant mapping and massively parallel sequencing. *Comput Struct Biotechnol J* 2014; 11: 147–151
- [42] Rozman P, Dovc T, Gassner C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion* 2000; 40: 936–942
- [43] Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM et al. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. *Transfusion* 2015; 55: 680–689
- [44] Swissmedic. Transfusionsmedizinische Laboruntersuchungen an Patientenproben. 2014. Im Internet: <https://www.swissmedic.ch/marktueberwachung/00138/00982/>; Stand: 31.03.2017
- [45] Gassner C. Blutgruppendiagnostik auf molekularer Ebene. *Pipette, Offizielles Publikationsorgan der SULM* 2009; Nr. 4: 9–12
- [46] AGES. Hämovigilanzbericht 2014 (Österreich), Bundesamt für Sicherheit im Gesundheitswesen AGES Medizinmarktaufsicht, Institut Überwachung. 2015. Im Internet: http://www.basg.gv.at/fileadmin/user_upload/H%C3%A4movigilanzbericht_2014.pdf; Stand: 31.03.2017
- [47] Blutspende SRK Schweiz. Blutspende SRK Jahresbericht 2015. 2016. Im Internet: <http://www.blutspende.ch/de/suche?utf8=%E2%9C%93&q=Blutspende+SRK+Jahresbericht+2015&button=>; Stand: 31.03.2017
- [48] Flegel WA. Red cell alloimmunisation: incidence and prevention. *Lancet Haematol* 2016; 3: e260–e261
- [49] Flegel WA, Gottschall JL, Denomme GA. Integration of red cell genotyping into the blood supply chain: a population-based study. *Lancet Haematol* 2015; 2: e282–e289
- [50] Tormey CA, Hendrickson JE. Routine non-ABO blood group antigen genotyping in sickle cell disease: the new frontier in pretransfusion testing? *Transfusion* 2015; 55 (6 Pt 2): 1374–1377
- [51] Fasano RM, Chou ST. Red blood cell antigen genotyping for sickle cell disease, thalassemia, and other transfusion complications. *Transfus Med Rev* 2016; 30: 197–201
- [52] Hustinx H; BlutspendeSchweiz. Rare Donors – Seltene Spender – Rare donneurs. 2017. Im Internet: <http://www.iblutspende.ch/rare-donors/seltene-spender.html>; Stand: 31.03.2017
- [53] Gowland P, Gassner C, Hustinx H et al. Molecular RHD screening of RhD negative donors can replace standard serological testing for RhD negative donors. *Transfus Apher Sci* 2014; 50: 163–168
- [54] Crottet SL, Henny C, Meyer S et al. Implementation of a mandatory donor RHD screening in Switzerland. *Transfus Apher Sci* 2014; 50: 169–174
- [55] BlutspendeCH-SRK, SVTM. Kapitel 11B, Spendenanalytik: Blutgruppen-serologische Untersuchung an Spenderproben. 2017. Im Internet: <https://bsc-bsd.ch/dokuman2/de-de/bsd/vorschriften/kapitel.aspx>; Stand: 31.03.2017
- [56] Story JR, Castilho L, Chen Q et al. International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetics and terminology: report of the Seoul and London meetings. *ISBT Science Series* 2016; 11: 118–122
- [57] Lane WJ, Westhoff CM, Uy JM et al. Comprehensive red blood cell and platelet antigen prediction from whole genome sequencing: proof of principle. *Transfusion* 2016; 56: 743–754
- [58] Fichou Y, Mariez M, Le Marechal C et al. The experience of extended blood group genotyping by next-generation sequencing (NGS): investigation of patients with sickle-cell disease. *Vox Sang* 2016; 111: 418–424
- [59] Belsito A, Magnussen K, Napoli C. Emerging strategies of blood group genotyping for patients with hemoglobinopathies. *Transfus Apher Sci* 2016; DOI: 10.1016/j.transci.2016.11.007