

Blutgruppenbestimmung auf DNA-Basis – Ende der Serologie?

Das Miteinander beider Techniken – DNA-Analyse und klassische Serologie – wäre optimal.



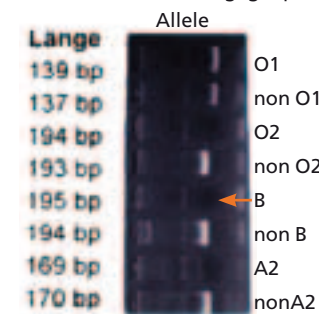
Mit der Möglichkeit, Blutgruppen auf DNA-Basis zu bestimmen, ergibt sich die Frage, ob die klassischen serologischen Techniken der Antigenbestimmung, des Antikörpernachweises und der Verträglichkeitstestung der Vergangenheit angehören und ob die Genotypisierung künftig nicht überhaupt einen höheren Stellenwert im Transfusionswesen sowie in der Schwangerenbetreuung einnehmen wird.

Die klassische Blutgruppenserologie ist eine relativ einfache, robuste und rasch durchführbare Untersuchungstechnik, die im Allgemeinen als kostengünstig angesehen werden kann. Ihre Basis ist die Antigen-Antikörper-Reaktion in Form der Hämagglutination, seltener der Hämolyse. Es lassen sich sowohl Antigene wie auch Antikörper bestimmen, wenn einer der Reaktionspartner bekannt ist. Die Abarbeitung kann manuell, halbautomatisch oder vollautomatisch erfolgen. Wie jede Methode zeigt auch die Serologie gelegentlich Schwächen. Wenn man von den Basis-Reagenzien absieht, die vorgeschriebene Standards erfüllen müssen, haben manche Reagenzien nicht die gewünschte Qualität, was Titer oder Avidität angeht. Manche Antikörperspezifitäten sind nur schwer oder überhaupt nicht erhältlich.

Alternative zur Serologie



Phänotyp = scheinbar AB,
aber Anti-B in Serumgegenprobe



Genotyp = O1A1

Erworbene B-Eigenschaft. Bei der Patientin der Blutgruppe A entstand durch bakterielle Enzyme eine B-ähnliche Membraneigenschaft an den Erythrozyten, wodurch die Blutgruppe AB vorgetäuscht wurde. Das gleichzeitig in der Serumgegenprobe nachweisbare Anti-B deutet auf eine erworbene B-Eigenschaft hin. Die DNA-Analyse zeigt das Fehlen einer für das B-Gen spezifischen Bande. Damit ist das erworbene B bestätigt. Es ist zu beachten, dass die Methode keinen Primer zum Nachweis des A1-Gens besitzt. Daraus erklärt sich die Verwendung der „non“-Primer, aus deren positiver Reaktion der Hinweis auf ein zweites vorhandenes Allel abzuleiten ist. Weil nur eine spezifische Bande (O1) nachweisbar ist, muss der Genotyp O1A1 lauten.

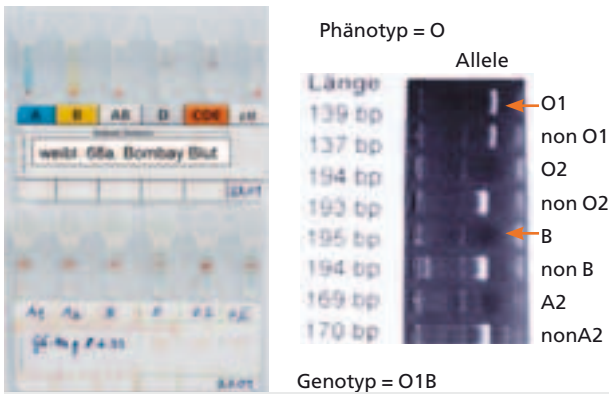
Die seit der Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) möglich gewordene DNA-Analyse von Blutgruppenmerkmalen bietet eine gute Alternative. Die meisten Blutgruppenpolymorphismen beruhen auf Punktmutationen auf Nukleotidebene. Von den 29 bekannten erythrozytären Blutgruppensystemen sind die Nukleotidsequenzen bekannt, wenn man von einigen Unklarheiten im P-System absieht. Mit geeigneten Starter-

molekülen für die PCR, den Primern, lassen sich diese Zielsequenzen im Genom auffinden und amplifizieren, sodass die angereicherte DNA auf ein Gel aufgetragen werden kann. Das Vorhandensein einer spezifischen Bande entspricht dann dem Nachweis einer für das Gen typischen Abfolge von Nukleotiden. Der serologische Nachweis eines Antigens durch Agglutination der Erythrozyten mittels bekannter Antikörper entspricht in der DNA-Analytik einer Bande von der durch den Primer in der PCR amplifizierten blutgruppenspezifischen Nukleotidsequenz.

Kritische Bemerkungen zu den Techniken

Auch DNA-Techniken haben ihre Tücken, die zu Interpretationsfehlern der Befunde Anlass geben können. Daraus lassen sich diskrepante Befunde zwischen Serologie und DNA-Analytik bei ein und derselben Blutprobe erklären. Ein Beispiel ist das erworbene B-Antigen, das bei PatientInnen der Blutgruppe A serologisch nachweisbar wird, wenn diese an bestimmten bakteriellen Infektionen leiden. Die bakteriellen Enzyme verändern an der Oberfläche der Erythrozyten die A-Eigenschaft zu einer B-ähnlichen Eigenschaft, die mit bestimmten Anti-B-Reagenzien reagiert und Blutgruppe B vortäuscht. Es ist logisch, dass auf DNA-Ebene kein B-Gen zu finden ist. Eine serologische Fehlklassifizierung als Blutgruppe B kann bei Transfusionen das Leben des/der PatientIn kosten. Ein/e erfahrene/r SerologIn erkennt das Problem in der Serumgegenprobe, bei der sich ein Anti-B nachweisen lässt. Der serologische Befund liefert in diesen Fällen ein in sich diskrepantes Ergebnis, da Antigen (B) und Antikörper (Anti-B) gleichzeitig vorhanden sind. Diese verwirrende Situation lässt sich auf DNA-Ebene klären. In anders gelagerten Fällen kann ein genetisch gesteuertes Blutgruppenmerkmal serologisch nachgewiesen werden – die DNA-Analyse bleibt den Nachweis der entsprechenden Nukleotidsequenz des Gens schuldig. Dies ist dann der Fall, wenn der/die ProbandIn in der entsprechenden Zielsequenz zum Beispiel eine stumme Punktmutation aufweist. Der Primer kann dann nicht binden und die Amplifikation bleibt aus. Die Kontrollen der PCR zeigen jedoch eine intakte Technik an, sodass das Fehlen des Gens als erwiesen angesehen wird. Wenn es sich um eine stumme Mutation im Gen handelt, ist das Genprodukt (Protein, Glykoprotein) unverändert und daher serologisch erfassbar.

Im Gegensatz zu den angeführten beiden Beispielen kann es vorkommen, dass ein intaktes Gen mittels PCR nachweisbar ist, die Expression des entsprechenden Antigens an der



Die 68-jährige Patientin gehört dem Bombay-Typ an. Serologisch erscheint sie als Blutgruppe 0. Die positiven Reaktionen mit allen Testzellen in der Serumgegenprobe erklären sich aus dem Vorliegen von Anti-A, Anti-B und Anti-H. In der DNA-Analyse werden zwei spezifische Banden (O1, B) nachgewiesen. Das B-Gen kann an die Nachkommenschaft weitervererbt werden, sodass diese Frau in Verbindung mit einem Mann der Blutgruppe 0 Kinder der Gruppe B bekommen könnte.

Erythrozytenmembran aber nicht stattfindet. Als typisches Beispiel ist das so genannte Bombay-Blut zu nennen. Individuen dieses Typs können A- und/oder B-Gene aufweisen, sie erscheinen serologisch als 0 (Null). A- und B-Eigenschaften werden nur exprimiert, wenn deren Vorstufe, die H-Substanz, vorhanden ist. Fehlt das erforderliche H-Gen, wie das beim Bombay-Blut der Fall ist, so bleiben die vorhandenen A- bzw. B-Gene wirkungslos. Transfusionsmedizinisch ist die Blutversorgung dieser PatientInnengruppe ein großes Problem, die Versorgung mit „normalem“ 0-Blut kann tödlich sein. Serologisch ist das Problem in der Serumgegenprobe erkennbar. Das Fehlen der H-Substanz kann mit Anti-H-Lektin nachgewiesen werden. Zur Lösung von Transfusionsproblemen ist die DNA-Analyse nicht erforderlich. Bei Familienuntersuchungen liefert die genetische Untersuchung verlässliche Ergebnisse, und peinliche Fehlbefundungen, die einen echten Kindesvater zu einem fälschlich ausgeschlossenen stempeln, werden vermieden. Die A- und B-Gene der als 0 erscheinenden Bombay-Blut-TrägerInnen werden an die nächste Generation weitergegeben und gelangen dort wieder zur Expression, wenn vom zweiten Elternteil ein H-Gen vererbt wird.

Als weiteres Beispiel für fehlende Expression eines molekulargenetisch erfassbaren Gens sei eine Eigenheit genannt, die sich besonders im Duffy-System zeigt. Gene benötigen zu ihrer Aktivierung eine vorgeschaltete DNA-Sequenz, die als Promotor bezeichnet wird. Auch diese Sequenzen können Mutationen aufweisen. Eine bekannte Punktmutation im Duffy-Promotor (-33 T>C) führt zur Inaktivität des Duffy-Strukturgens. Würde bei solchen ProbandInnen eine Duffy-Eigenschaft auf genetischer Ebene nachgewiesen, wäre die Schlussfolgerung, dass eine Allo-Immunsierung gegen dieses Merkmal auszuschließen sei – dies ist jedoch nicht der Fall. Nur die Anwesenheit des jeweiligen Antigens verhindert Allo-Immunsierungen. Im Duffy-System kommt die Promotor-Mutation nicht allzu selten vor, sodass es sinnvoll ist, bei molekulargenetischem Nachweis der Duffy-Merkmale auch die Promotor-Sequenz zu überprüfen.

Anwendungsmöglichkeiten der DNA-Analysen

Nach diesen kritischen Überlegungen zu beiden Techniken werden die Anwendungsmöglichkeiten der DNA-Analyse bei der Bestimmung von Blutgruppeneigenschaften beschrieben.

- Bei serologischen AB0-Diskrepanzen
- Zur Klassifizierung von RhD^{weak} u.a. Varianten
- Bei positivem DAT
- Bei vortransfunden PatientInnen
- Für fetale Genotypisierung (aus mütterlichem Plasma)
- Zur Bestimmung des Antigen-Profiles bei SpenderInnen (Versorgung von PatientInnen mit Antikörpern, Senkung des Immunisierungsrisikos)
- Zur Auffindung von SpenderInnen, denen hochfrequente Antigene fehlen

Wenn bei der AB0-Bestimmung eine Diskrepanz zwischen Antigennachweis und Serumgegenprobe besteht, schafft die molekulargenetische AB0-Bestimmung Klarheit. Fehlt der entsprechend der Antigenbestimmung erwartete Serumantikörper (z.B. das Anti-B bei Blutgruppe A), so lässt sich meistens das korrespondierende Blutgruppenmerkmal auf genetischer Ebene nachweisen. Das bedeutet, dass das Antigen extrem schwach oder gar nicht an der Erythrozytenmembran exprimiert oder an anderen Körpergeweben nachweisbar ist, wodurch die Iso-Antikörperbildung verhindert wird. Letzteres ist eine Annahme und ein Erklärungsversuch für die Diskrepanz, müsste aber noch bewiesen werden.

Aus wirtschaftlichen Überlegungen sollte bei Schwangeren mit RhD^{weak} eine DNA-Analyse auf D-Kategorien sowie die häufigsten D^{weak}-Typen durchgeführt werden. Liegt keine D-Kategorie und kein D^{weak}-Typ vor, der zur Allo-Anti-D-Bildung befähigt ist, so kann die RhD-Prophylaxe entfallen. Bei Multiparae ergibt sich ein Spareffekt. Molekulargenetische Blutgruppenbestimmungen sind ebenso hilfreich, wenn die zu untersuchenden Personen einen positiven direkten Coombs-Test haben und damit die serologische Bestimmung jener Merkmale unmöglich ist, die zum Nachweis den indirekten Coombs-Test benötigen. Auch bei massiv vortransfunden PatientInnen lässt sich der ererbte Bluttyp genetisch einwandfrei bestimmen, da die heute verwendeten Erythrozytenkonzentrate nur minimale Mengen von kernhaltigen Blutzellen enthalten und die transfundierte Fremd-DNA nicht stören.

Einen entscheidenden Schritt hinsichtlich der Optimierung der Betreuung antikörpergefährdeter Schwangerschaften stellt die Genotypisierung der fetalen Blutgruppen (besonders RhD) aus dem mütterlichen Plasma dar. Alle Schwangeren mit irregulären klinisch wichtigen Antikörpern sollten künftig in den Genuss dieser neuen Technik kommen.

Das Blutspendewesen wird ebenso großen Nutzen aus der Genotypisierung ziehen, wenn die DNA-Analysen schneller und billiger werden und damit große SpenderInnenkollektive auf das gesamte erythrozytäre Antigenspektrum untersucht werden können, damit für PatientInnen mit Antikörpern

rascher verträgliches Blut bereitgestellt werden kann. PatientInnen mit Antikörpern gegen hochfrequente Antigene stellen eine besondere Herausforderung für die Transfusionsdienste dar. Das Screening von BlutspenderInnen auf das Fehlen dieser Antigene (z.B. Vel, Lan) ist dabei ein vorrangiges Ziel. Die bei den SpenderInnen angestrebte Genotypisierung des gesamten Antigenprofils später auch auf die PatientInnen auszudehnen, um bei Transfusionen die Antigenmuster von SpenderInnen und PatientInnen anzugleichen – um die Kreuzprobe wegzulassen –, wird sich praktisch kaum umsetzen lassen. Durch die zahlreichen Polymorphismen werden sich im jeweiligen Blutdepot nie genügend antigenfreie Erythrozytenkonzentrate finden, und die Einberufung von geeigneten SpenderInnen ist organisatorisch nur in Ausnahmefällen zu bewältigen.

Keine Lösung der Antikörperproblematik auf DNA-Ebene

Das wichtigste Aufgabengebiet der Transfusions-Serologie ist der Nachweis von Antikörpern. Das Immunglobulinmolekül weist eine enorme Vielfalt von Konstruktionsmöglichkeiten auf, die mit mehr als 10^8 angegeben werden. Selbst wenn man sich nur auf den antigenbindenden Teil – der für die Spezifität des Antikörpers maßgeblich ist – konzentriert, so ist dort die Variabilität in der Aminosäuresequenz derart hoch, dass sich verschiedene Antikörper gleicher Spezifität voneinander unterscheiden. Deshalb wird es auch für eine Genotypisierung z.B. eines Anti-D keinen allgemeingültigen Primer geben.

Die klassische Serologie wird daher bei Antikörpersuche und -differenzierung sowie Verträglichkeitstestung weiterhin einen festen Platz einnehmen. Die DNA-Analyse von Blutgruppenmerkmalen hilft, serologisch unklare Reaktionen abzuklären und liefert im Transfusionswesen, in der Schwangerschaftsbetreuung und in der Abstammungsbegutachtung wesentliche Verbesserungen. Das Miteinander beider Techniken und ihre gegenseitige Ergänzung wird zur Optimierung auf den genannten Gebieten beitragen. ■

Univ.-Prof. Dr. Diether Schönlitzer

Vorstand a.D. des Zentralinstituts für Bluttransfusion und Immunologische Abteilung, Innsbruck
d.schoenitzer@gmx.at



Für die außerordentlich organisierte Fortbildung „**Stimm- und Sprechtraining**“ mit Frau Mag. Brigitta Prochazka suchen wir noch TeilnehmerInnen! Der Termin wurde auf 4./5. September verschoben. Sehen Sie sich dazu bitte die Referenzen von Frau Mag Prochazka an unter: www.anklang.at
Nähere Informationen zur Fortbildung auf der Homepage: <http://www.meduniwien.ac.at/user/marianne.fliesser-steiner>

Berufsrisiko HIV-Infektion

Infektionsprävention im medizinischen Arbeitsumfeld



Die Möglichkeit einer HIV-Übertragung im Rahmen der Patientenversorgung ist abschätzbar und – wie Untersuchungen zeigen – gering. So liegt z.B. das Risiko nach einer Blutexposition von Schleimhäuten bei 0,03 %.

Hauptgefahrenquellen

Die Indikationsliste für eine HIV-PEP (Postexpositionelle Prophylaxe) weist klar auf die Infektionswahrscheinlichkeit bei verschiedenen Gegebenheiten hin und zeigt deutlich, wo die Hauptgefahr liegt: in der perkutanen Exposition mit Nadeln, Skalpellern oder Lanzetten, die mit Blut von nachweislich HIV-positiven Patientinnen und Patienten kontaminiert sind.

Dabei liegt das Übertragungsrisiko bei etwa 0,3 % (HCV 3 %, HBV 30 %!). Verletzungen mit kontaminierten Hohlnadeln sind gefährlicher als solche mit chirurgischen Nadeln.

Präventionsstrategien

1. Auf der Gesetzesebene

Gemäß dem ArbeitnehmerInnen-Schutzgesetz besteht die Verpflichtung des Arbeitgebers, für die Information der ArbeitnehmerInnen über die Gefahren

für Sicherheit und Gesundheit sowie über die Maßnahmen zur Gefahrenverhütung nachweislich und wiederholt Sorge zu tragen. Des Weiteren sind geeignete Schutzmaßnahmen anzuwenden.

2. Auf der Handlungsebene

Das Bewusstmachen von risikoreichen Aktivitäten und Situationen (z.B. „Recapping“; das Drücken von weiten Nadeln in einen bereits vollen Abfallbehälter; falsche Entsorgung in einen Plastiksack etc.) ist ein erster Schritt zur Sicherheit. Ein Vermeiden derselbigen ist soweit wie möglich durch Training von „sicheren Handlungsabläufen“ unter Anwendung aller gebotenen Schutzmaßnahmen zu erreichen. Obwohl jede Blut- oder Serumprobe als potenziell infektiös anzusehen ist, müssen Proben von HIV-infizierten Personen gekennzeichnet sein. Es ist dafür zu sorgen, dass bei Kenntnis eines HIV-positiven Serostatus einer Patientin/eines Patienten das untersuchende bzw. weiterbehandelnde Personal darüber, soweit erforderlich, unterrichtet wird. Eine klare Richtlinie zur Vorgangsweise nach Zwischenfällen mit menschlichem Blut oder anderen möglicherweise infek-