

Entwicklung einer SSP-PCR Methode für die Spezifizierung von DAR (Weak D Typ 4) Subtypen

Chiara, Theiler, 18-21 A

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

IRB SRK AG, Immunhämatologie

1. Zusammenfassung

In der Transfusionspraxis werden weak D Typ 1-3 als RH1 positiv angesehen. Es gibt aber noch mehrere DAR-Untergruppen. Gemäss Publikationen wird DAR4 als RH1-positiv angesehen und DAR1 als RH1-negativ. Für DAR3.1 ist die Transfusionsempfehlung wegen unterschiedlichen Expertenmeinungen nicht eindeutig.

Im immunhämatologischen Labor der Interregionalen Blutspende SRK AG (IRB) Bern sind von 2015 bis Ende März 2021 249 Proben eingetroffen, welche ein DAR-Allel trugen. RH1 Varianten werden im Labor molekularbiologisch mittels Sequenzspezifischer Primer Polymeraseketten-reaktion (SSP-PCR) abgeklärt. Mit dem verwendeten PCR-Kit können jedoch nicht alle DAR-Untergruppen ermittelt werden. Das Ziel ist mittels einer SSP-PCR Methode die Häufigkeit der DAR-Subtypen zu bestimmen, um allenfalls die Transfusionsempfehlung anzupassen. Bei der Mehrheit der Proben (über 50%) konnte DAR1 nachgewiesen werden. Von allen Patientenproben sind 44.2% DAR3 und nur 2,4 % DAR4. Bei vier der 249 (1,6 %) Proben wurden andere RHD Allele nachgewiesen. Ausserdem wurde kein DAR5 gefunden.

Eine Fachgruppe der Immunhämatologie hat über mögliche Änderungen für die Transfusionsempfehlung entschieden.

2. Einleitung

Die am häufigsten vorkommenden DAR-Typen sind weak D Typ 1, weak D Typ 2 und weak D Typ 3. Diese werden in der Transfusionspraxis als RH1 positiv angesehen. Im immunhämatologischen Labor der Interregionalen Blutspende SRK AG (IRB) werden die RH1 Varianten molekularbiologisch abgeklärt. Hierzu werden die vorhandenen RHD Allele beispielsweise mittels Sequenzspezifischer Primer Polymerasekettenreaktion (SSP-PCR) bestimmt. Wann immer möglich werden dazu kommerzielle Testkits verwendet.

Das momentan vorhandene PCR-Kit (RBC-FluoGene D weak Kit) im PCR-Labor kann nicht alle Varianten des DAR-Clusters unterscheiden. Bis jetzt wurden viele Proben deshalb oft nur als DAR (Weak D Type 4) klassifiziert und somit als Empfänger von RH1 negativem Blut deklariert. Durch eine Spezifizierung der Untergruppen bekannter DAR-Proben kann die Frequenz jener Untergruppen bestimmt werden. Je nach Frequenz der Untergruppen könnte eine Änderung der Transfusionsempfehlung durchaus sinnvoll sein, um allenfalls RH1 negatives Blut einzusparen. Gemäss Publikationen wurde bei DAR4 (weak D Typ 4.1/ RHD*09.04) keine Alloimmunisierungen beobachtet, daher werden diese als RH1-positiv angesehen. [1] Im Gegensatz zu DAR1 (weak D Typ 4.2/RHD*09.01). Für DAR3.1 (weak D Typ 4.0/ RHD*09.03.01) ist die Transfusionsempfehlung nicht eindeutig. Der Grund dafür sind unterschiedliche Expertenmeinungen, denn es wurden sowohl bei Patienten mit DAR1 als auch mit DAR3.1 ein Anti-RH1 nach Transfusionen festgestellt. [2]

3. Ziele und Fragestellungen

Spezifizierung von bekannten DAR-Proben in der Untergruppe DAR3.1, DAR4 und DAR5.

Kann man die Frequenz von DAR3.1, DAR4 und DAR5 unter bereits vorselektierten DAR-Patientenproben ermitteln, um möglicherweise eine Transfusionsempfehlung zu ändern?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Die Spezifizierung wurde mittels SSP-PCR durchgeführt. Dafür wurden Primer eingesetzt, welche komplementär zur vorhandenen Zielsequenz, also hier die benötigten DNA-Proben, passend binden und somit ein Amplifikat erzeugen. [3] Diese Primer wurden vorgängig designt und ausgetestet. Anschliessend sind 249 Proben von 2015 bis Ende März 2021, welche im IRB nur als DAR klassifiziert wurden, auf diese SNV's getestet: 819G>A, 872C>G und 48G>C.

Wenn für eine Probe 819G>A positiv war, wurde sie weiter auf 872C>G und 48G>C getestet. Wenn diese dann für 872G>C nachgewiesen werden konnte, liegt Variante DAR5 vor. Wenn die Probe für 48C>G positiv war, dann ist es ein DAR4. Wenn für die beiden SNV's 872C>G und 48G>C jeweils der Wildtyp nachgewiesen wurde, war es DAR3.1. Die Resultate wurde mit Kapillarelektrophorese, dem QIAxcel und der dazugehörigen Software ausgewertet. Die Resultate wurden als Elektropherogramm oder als Gelbild angezeigt.

5. Ergebnisse/ Resultate

Von den ausgewählten Proben wurden 129 als DAR1 detektiert. Dies betrifft also über die Hälfte der Patientenproben. Bei 110 Proben wurden ein DAR3.1 ermittelt und DAR 4 betrafen 6 Proben. Es wurden noch 4 weitere Unterguppen detektiert, welche nicht zu DAR1, DAR3 oder DAR4 gehören. Alle Resultate wurden prozentual ausgerechnet.

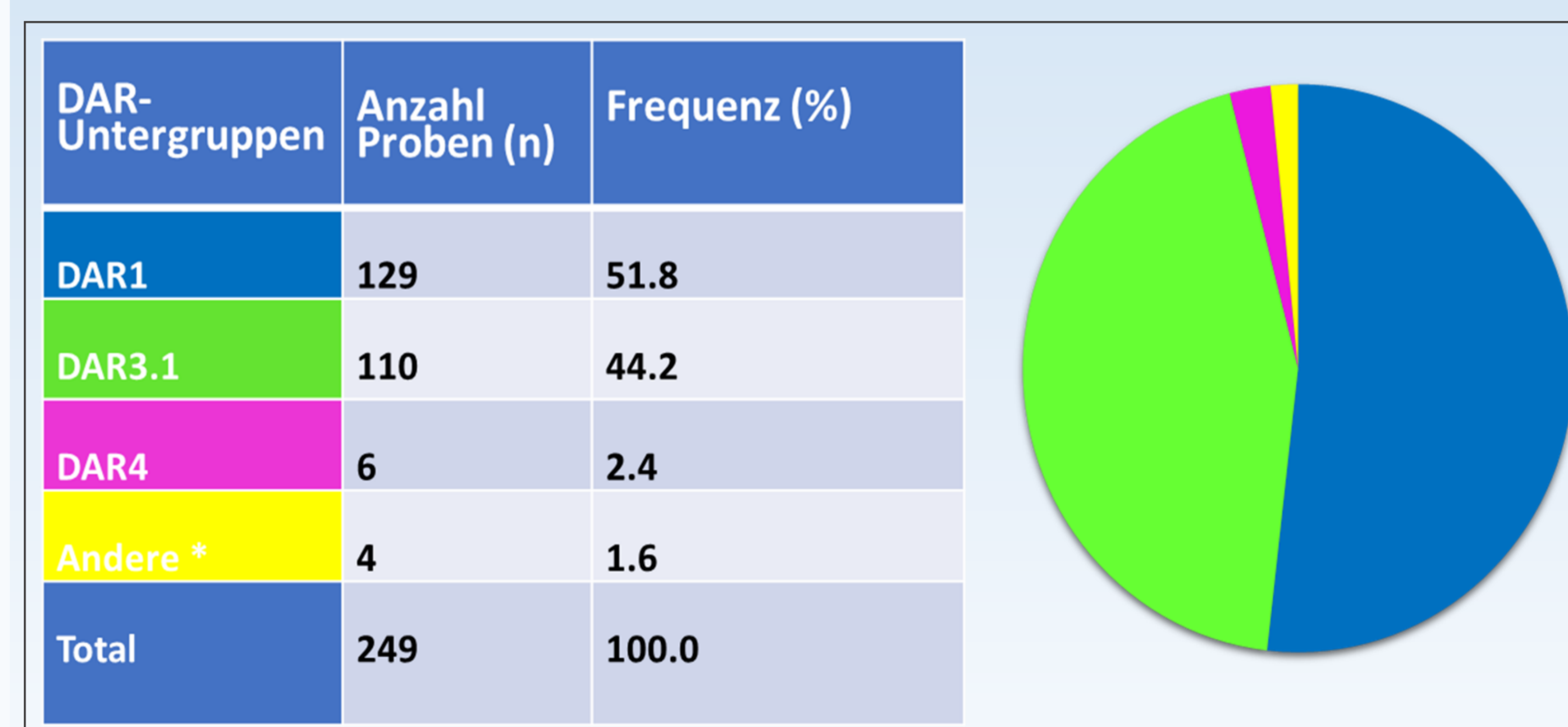


Abb. 1: Resultate (Eigene Abbildung, 2021)

6. Diskussion

Patienten mit DAR1 würden bei allfälligen Transfusionen als RH1 negativ gehandhabt. Die sechs DAR4 positive Patienten könnten hingegen als RH1 positiv betrachtet werden. Bei DAR3.1 positiven Patienten besteht die Frage ob man das Risiko eingehen und RH1 positives Blut transfundieren würde, oder ob man vorsichtig ist und RH1 negatives Blut gibt. Allenfalls könnte man eine Zwischenlösung finden und bei Frauen im gebärfähigem Alter auf Nummer sichergehen. Bei Männern und Frauen >50 Jahre RH1 positives Blut geben um trotzdem RH1 Blut einzusparen ohne ein Risiko einzugehen, dass ein Antikörper gebildet werden kann. In der Praxis wäre dies jedoch eine grosse Umstellung für das medizinische Personal, was eventuell zu einer grösseren Fehlerquelle führen könnte.

In Abwesenheit klarer Evidenz wurde beschlossen weiterhin Patienten mit DAR3.1 als RH1-negativ zu betrachten.

Referenzen

- [1] Flegel, W. A. (2007). Genetik des Rhesus-Blutgruppensystems. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg. 104, Heft 10, A651-A653
- [2] Sandler, S.G, Flegel, W.A., Westhoff, C.M., Denomme, G. A., Delaney, M., Keller, M.A., Johnson, S.T., Katz, L.M., Queenan, J.T., Vassallo, R.R., & Simon, C.D. (2015). It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype, *Commentary*, Volume 55, 682
- [3] Reinard, T. (2018). *Molekularbiologische Methoden 2.0* (2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage). Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.

Abbildung

Abb. 1 Resultate (Eigene Abbildung, 2021)