

Molekularbiologie der Rhesus-Blutgruppe

Bedeutung für die klinische Praxis

**Geben Sie die Quelle an, wenn Sie
diese Bilder als Vorlage verwenden.**

Willy A. Flegel

Abt. Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Ulm

DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen

Institut Ulm

<http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/>

2002

Rhesus: Molekularbiologie

- Einleitung
 - Struktur der *RH*-Gene und Rh-Proteine
- Partial D (D Kategorie)
- Schwach ausgeprägtes Antigen D (weak D)
- Rhesus negativ und *RHD* Heterozygotie
- Rh pos. Blutpräparate unter Rh neg. Spendern

Bedeutung von Rhesus

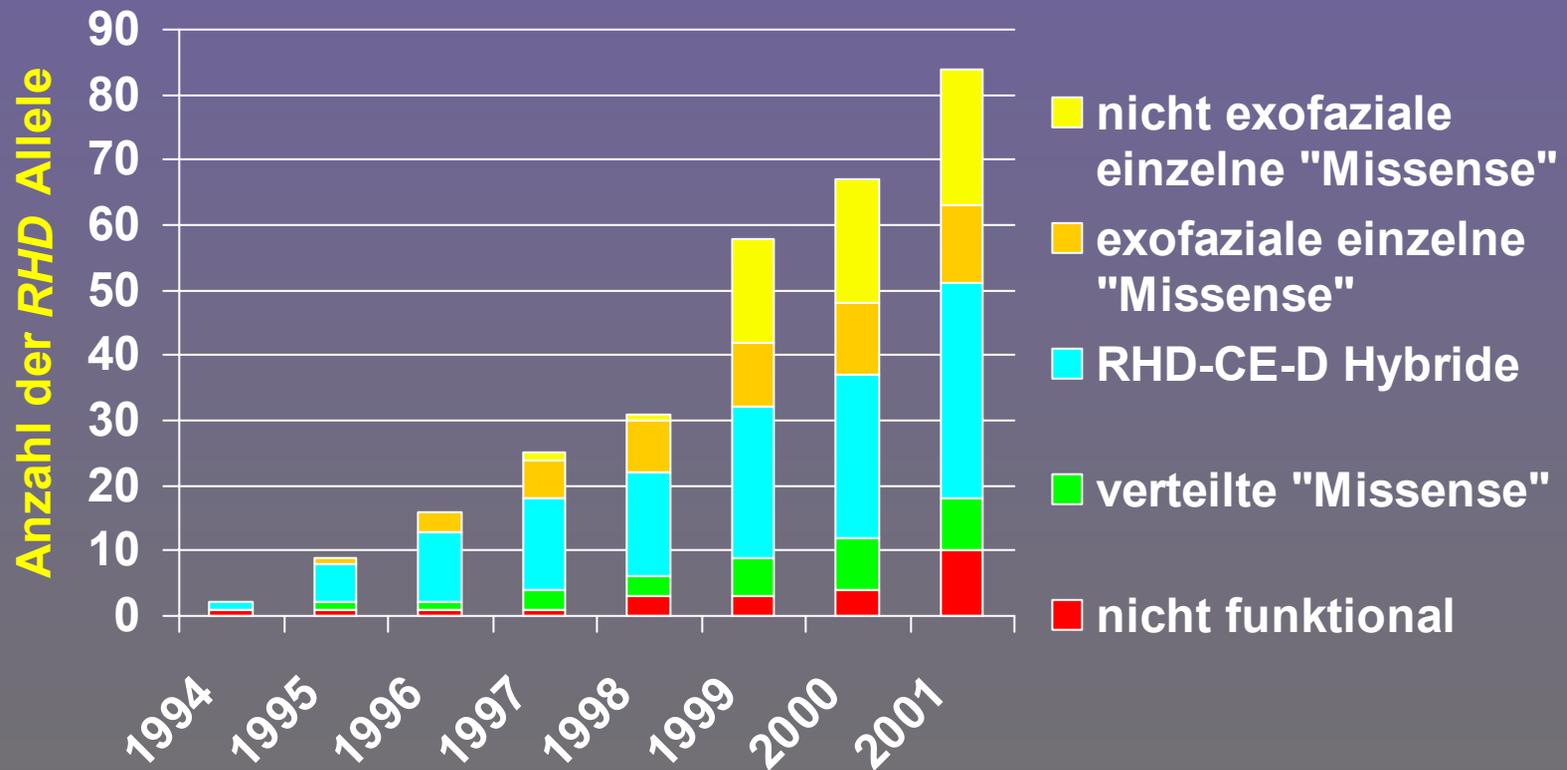
Protein

- Wichtigstes durch Proteine gebildetes Blutgruppensystem
- Wichtigste Ursache des MHN
- Proteine vom Rhesus-Typ sind ein wesentlicher Bestandteil der Erythrozytenmembran

Gen

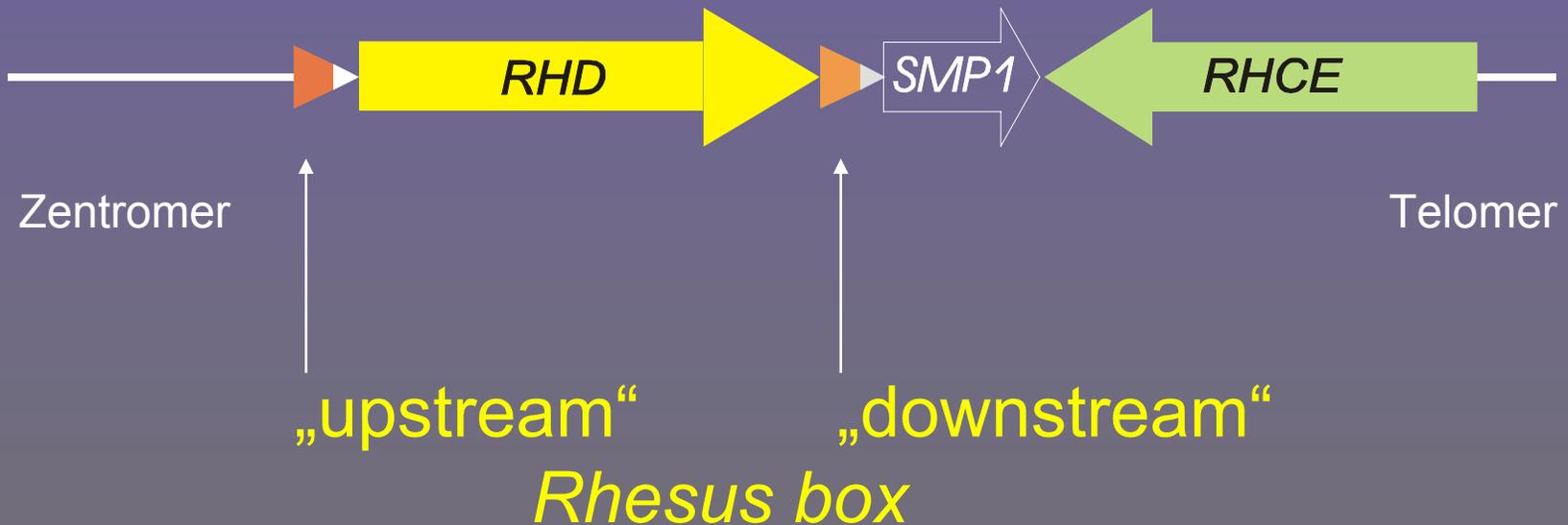
- Am meisten polymorphes Blutgruppensystem
- „Genehaufen“: Verdoppelung und Gendeletion
- Multiple Genkonversionen und Mutationen
- Komplexes Modellsystem für die Genotypisierung

RHD Allele und Typ der molekularen Variante

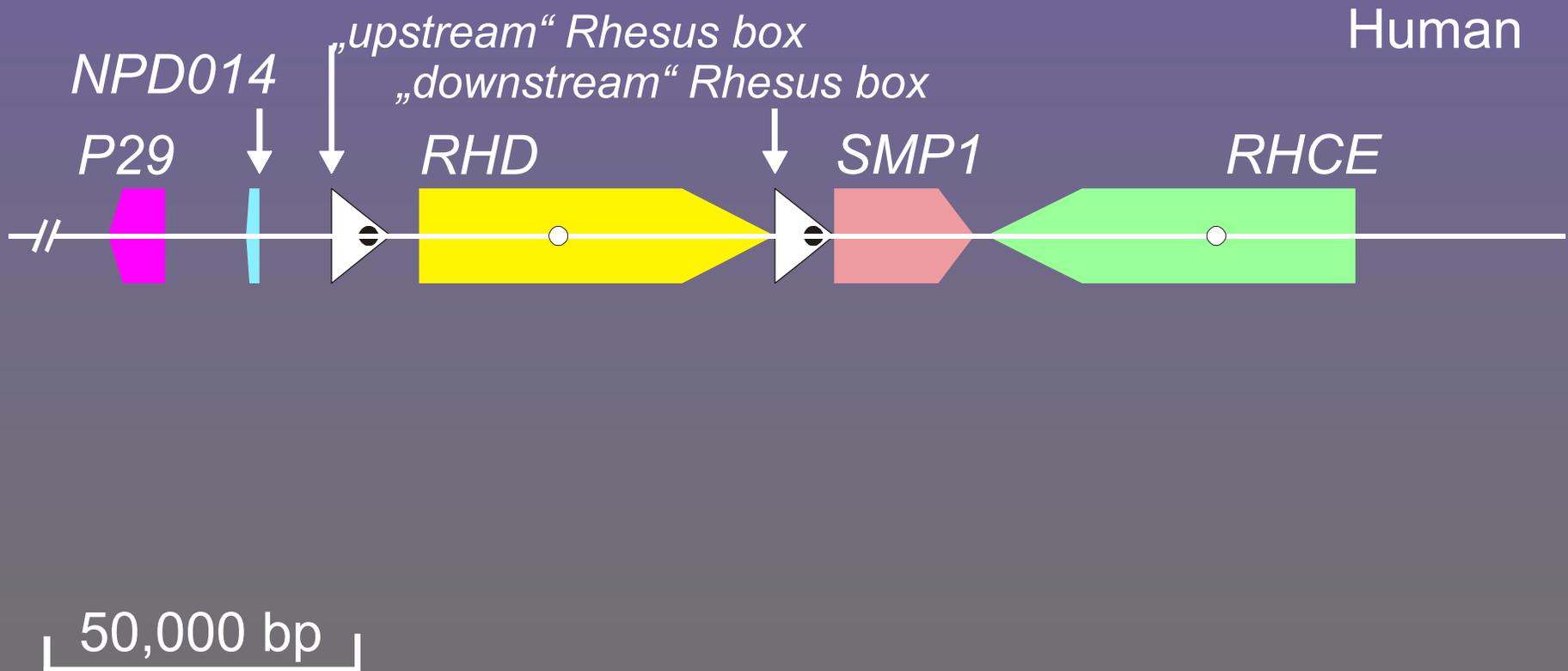


entnommen aus: The RhesusBase
<http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>

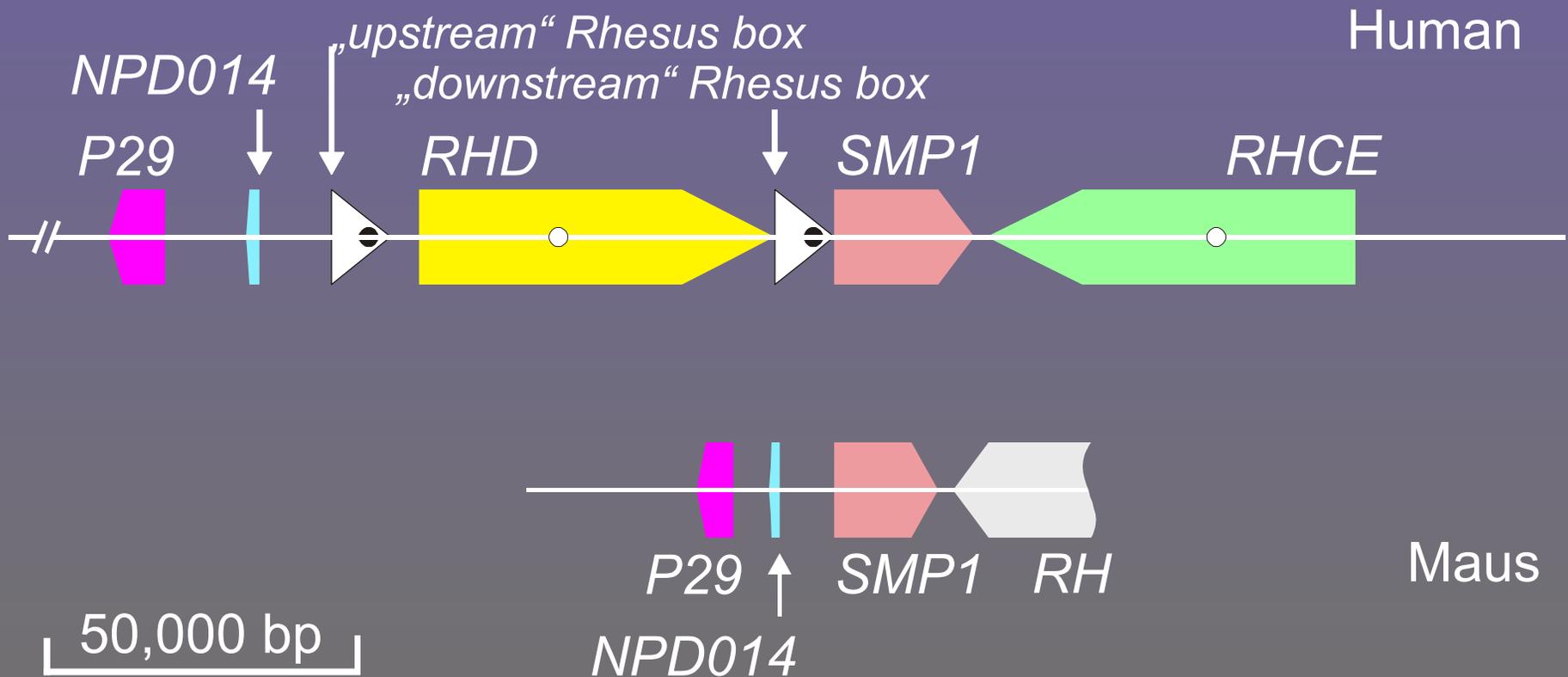
Molekulare Struktur des *RH* Genlocus



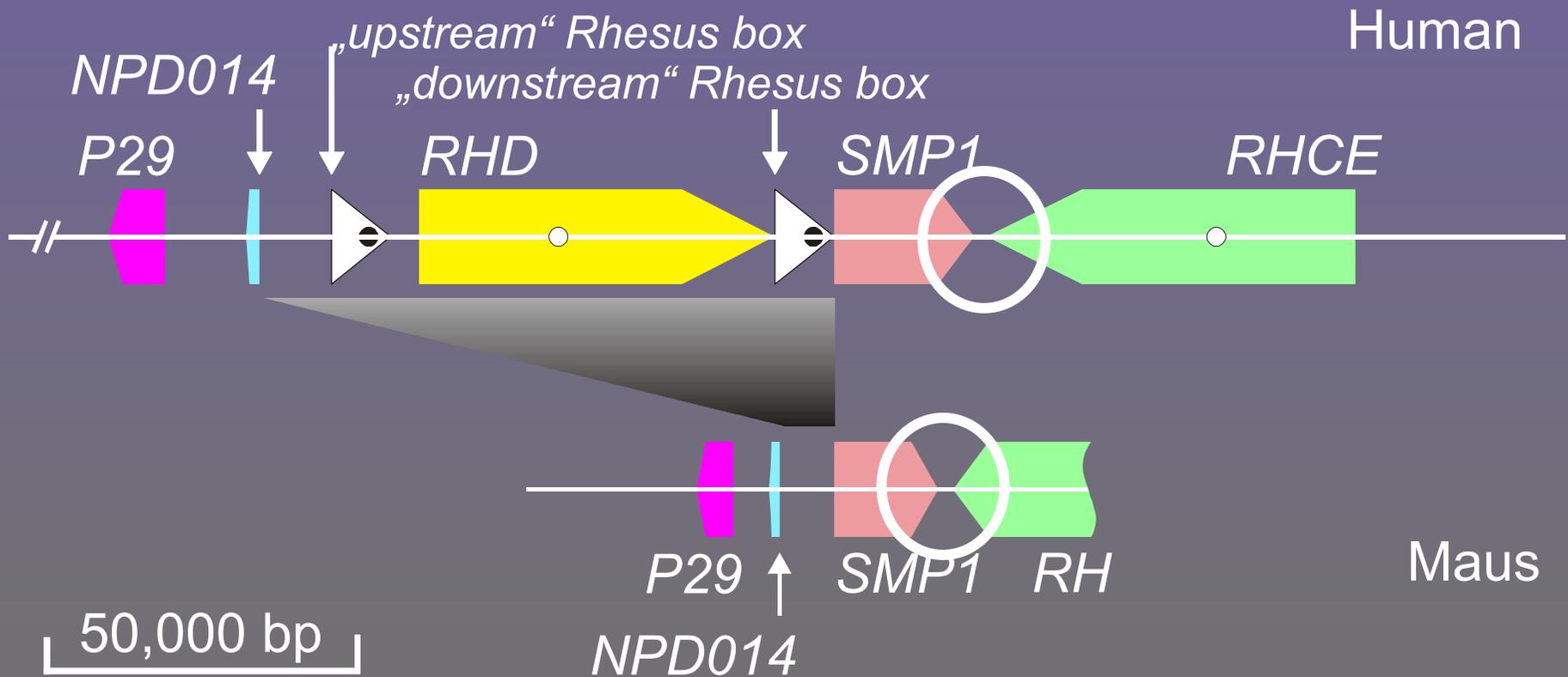
Erweiterte molekulare Struktur des *RH* Genlocus



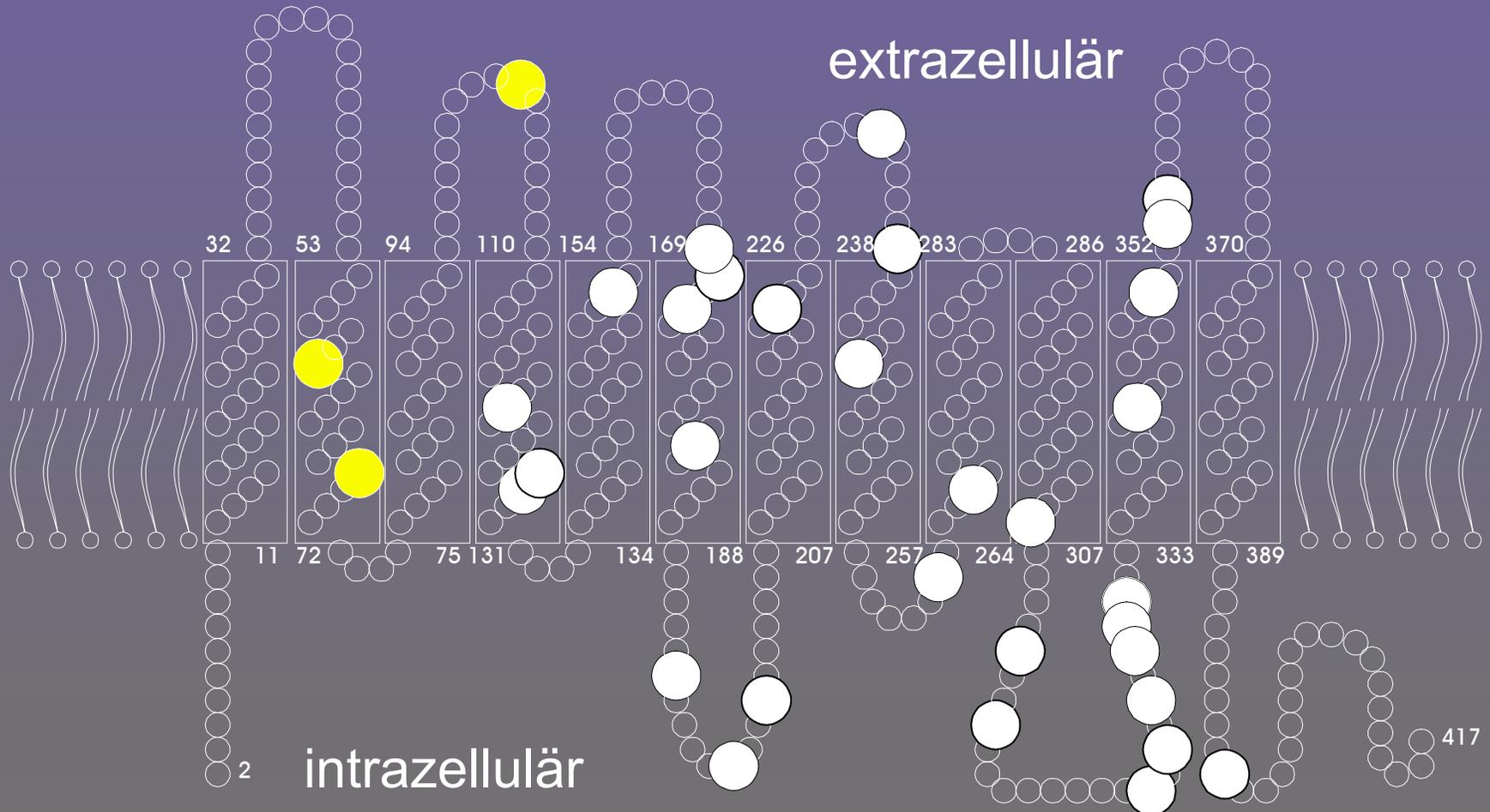
Humaner *RH* Genlokus im Vergleich zu Maus-Genom



RHCE: ursprüngliche Position *RHD* ist das duplizierte Gen



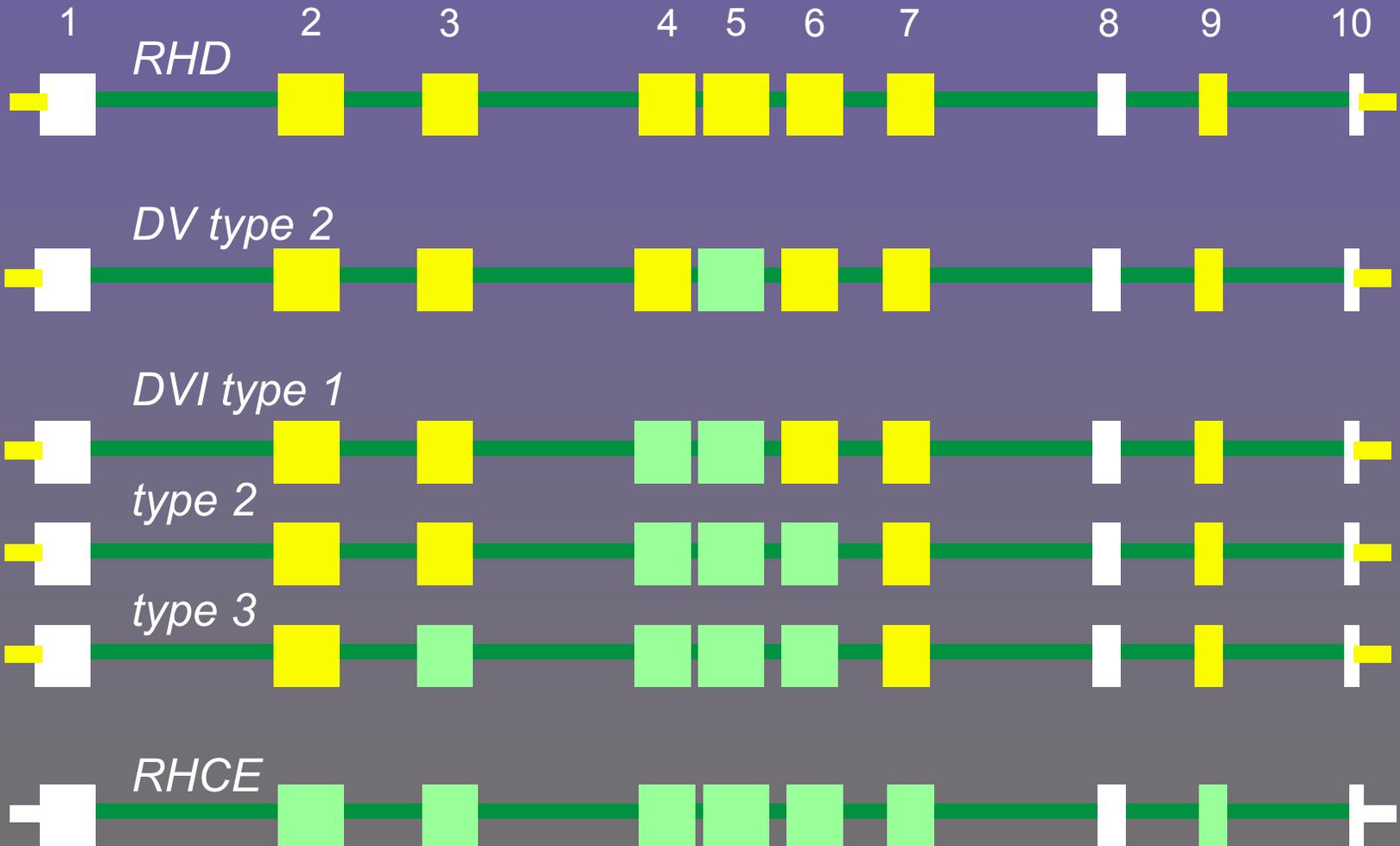
Unterschiede zwischen dem RhD und RhCE Protein



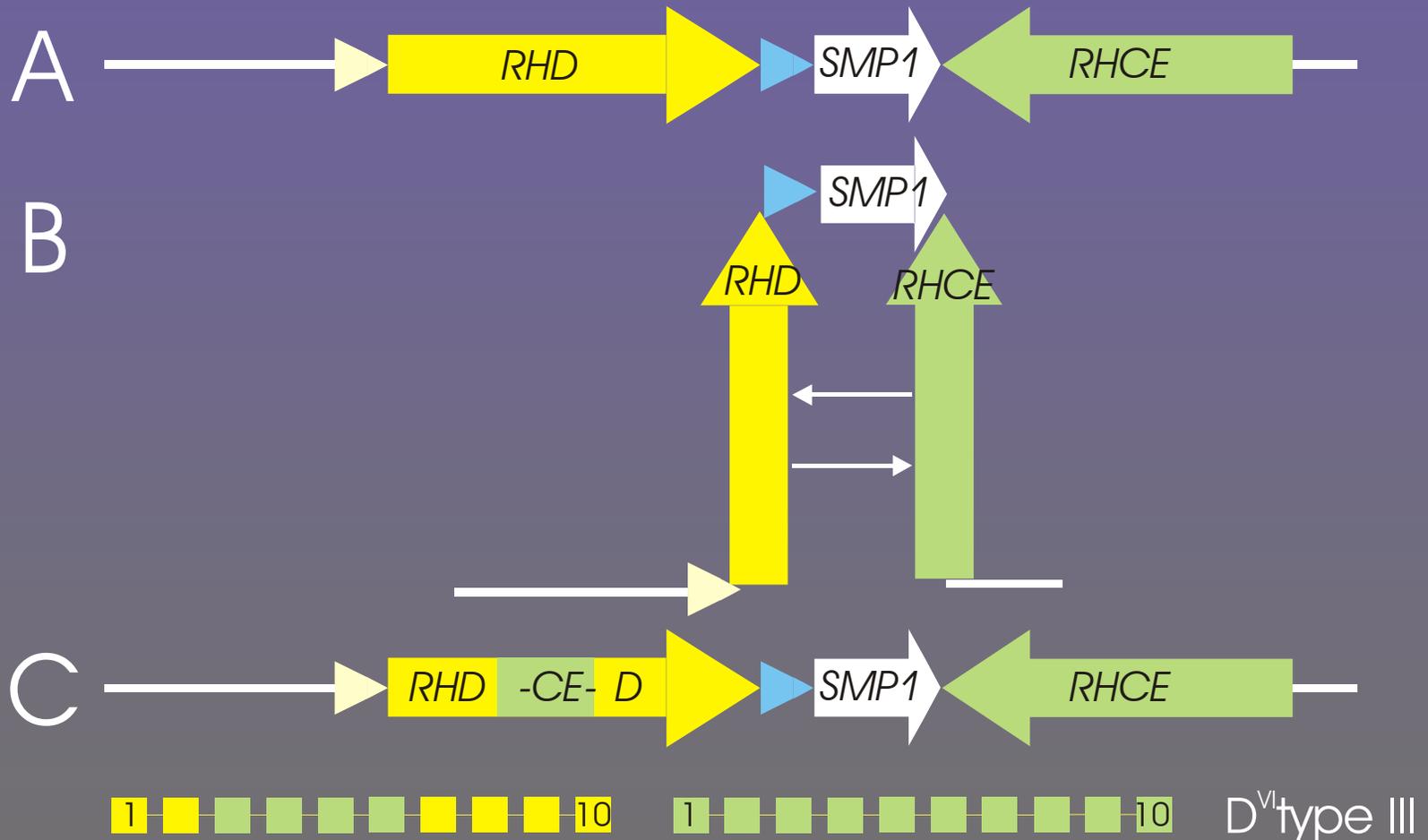
Rhesus: Molekularbiologie

- Einleitung und aktuelle Daten
- Partial D (D Kategorie)
 - *RHD/RHCE* Hybridallele
 - Typische Ursache für „D Kategorien“ als Untergruppe aller partial D
- Schwach ausgeprägtes Antigen D (weak D)
- Rhesus negativ und *RHD* Heterozygotie
- Rh pos. Blutpräparate unter Rh neg. Spendern

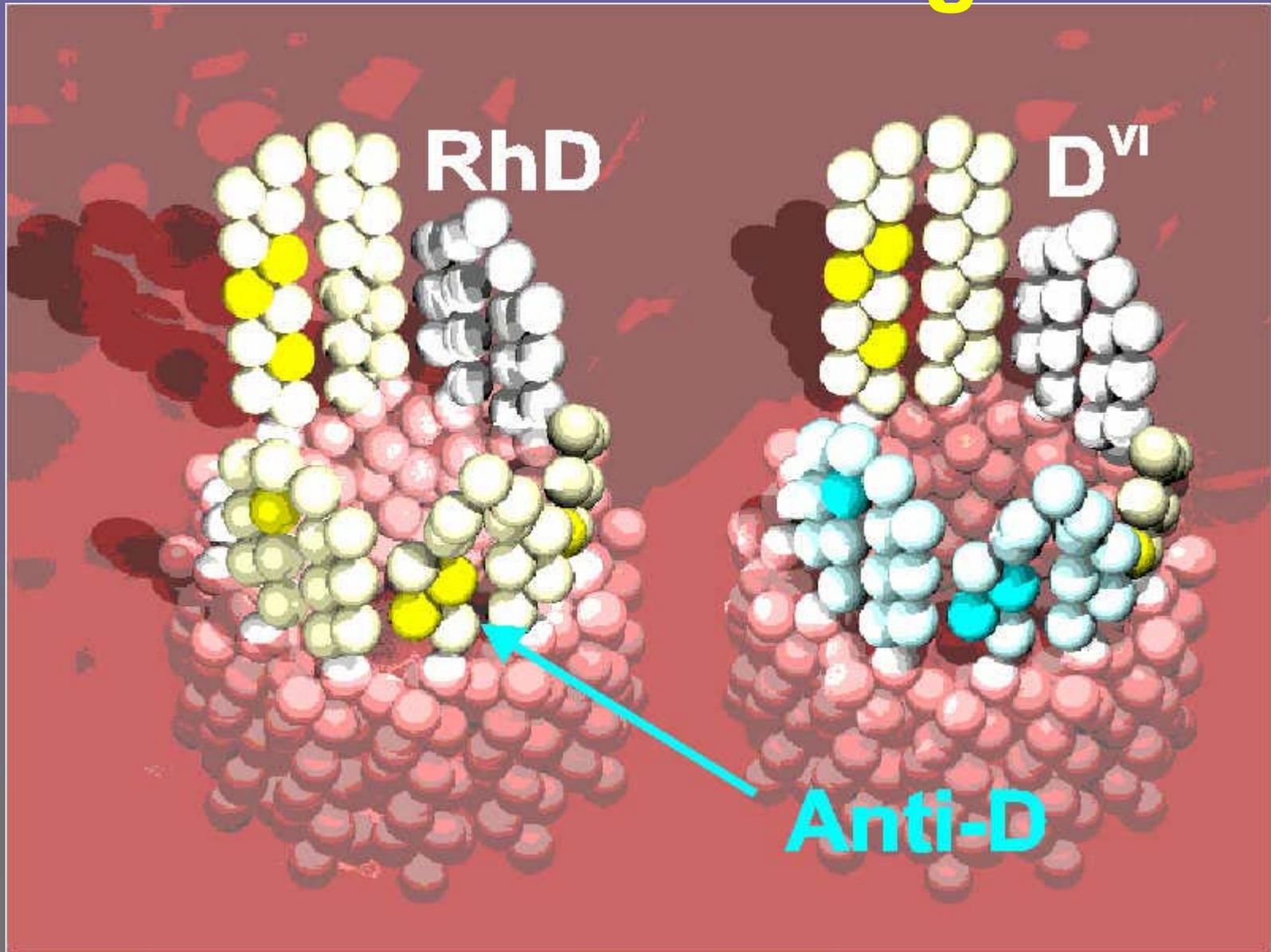
Beispiele für *RHD-CE-D* Hybridallele



Mechanismus der Genkonversion



D Kategorie VI



Frequenz von aberrantem *D*

Aberrantes D	Minimale Frequenz*	anti-D
DVII	1:900	selten
DVI	1:6.800	häufig
DIV	1:10.000	variabel
DV	1:30.000	variabel
DIII-like	1:30.000	selten
DFR	1:60.000	selten
R ₀ ^{Har} (Rh33)	< 1:60.000	selten

* Mittelwerte, Zufallssuche unter > 60.000 Blutspendern

Bedeutung für die klinische Praxis

D Typisierung in Europa unterscheidet zwischen Patienten und Blutspendern

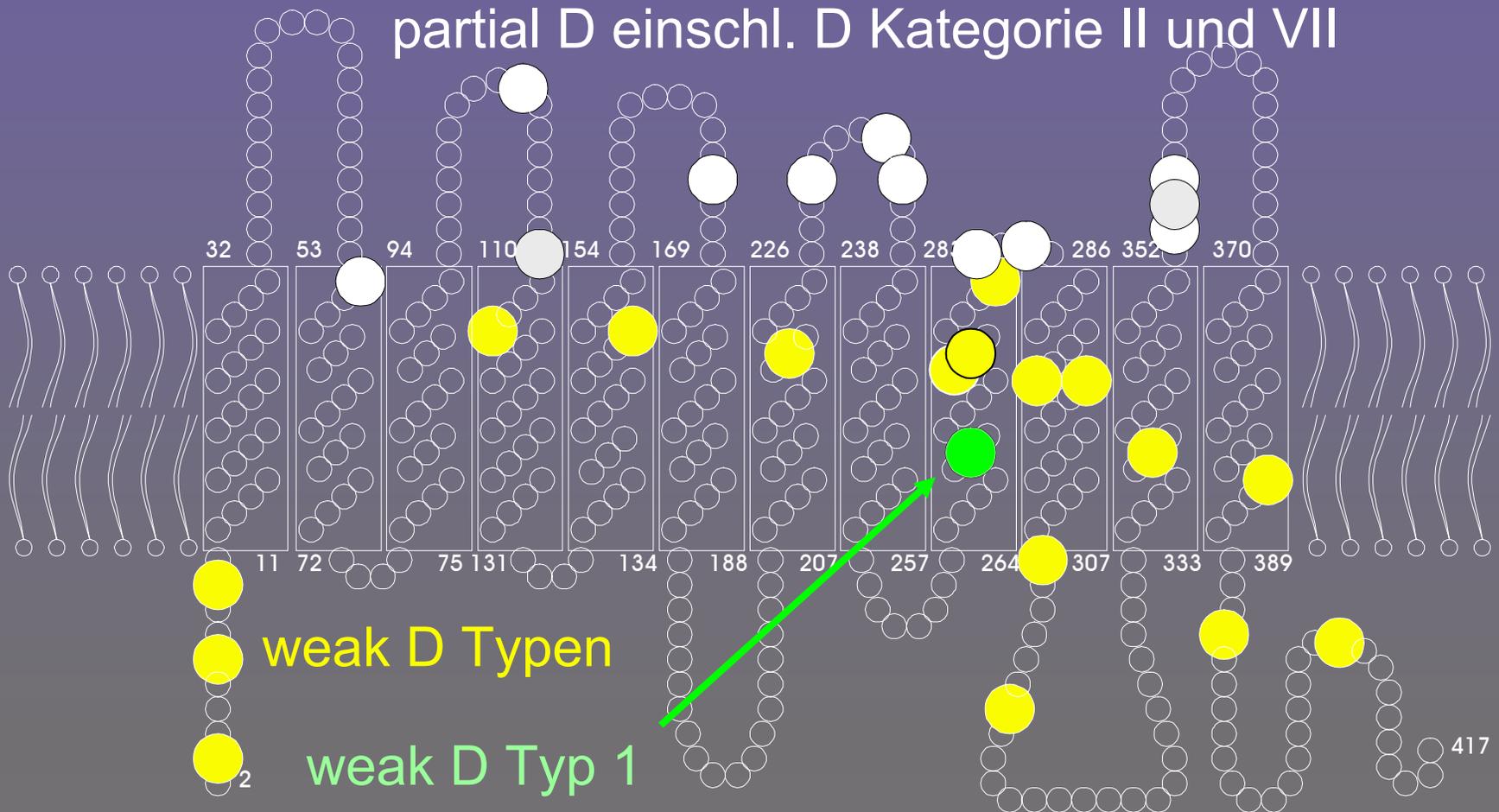
- Patienten, Schwangere und Neugeborene
 - zwei IgM monoklonale anti-D, die D Kategorie VI nicht erfassen
 - kein Antiglobulin-Test
 - DVI wird absichtlich als Rhesus negativ typisiert
- Blutspender
 - geeignete poly- bzw. oligoklonale Reagenzien im indirekten Antiglobulin-Test (z. B. Geltest)
 - DVI, alle partial D und sehr schwach ausgeprägte D-Varianten werden Rhesus positiv typisiert

Infusionsther Transfusionsmed 22(1995)285 & Blood 91(1998)2166
deutsche (seit 1996), englische und holländische Richtlinien

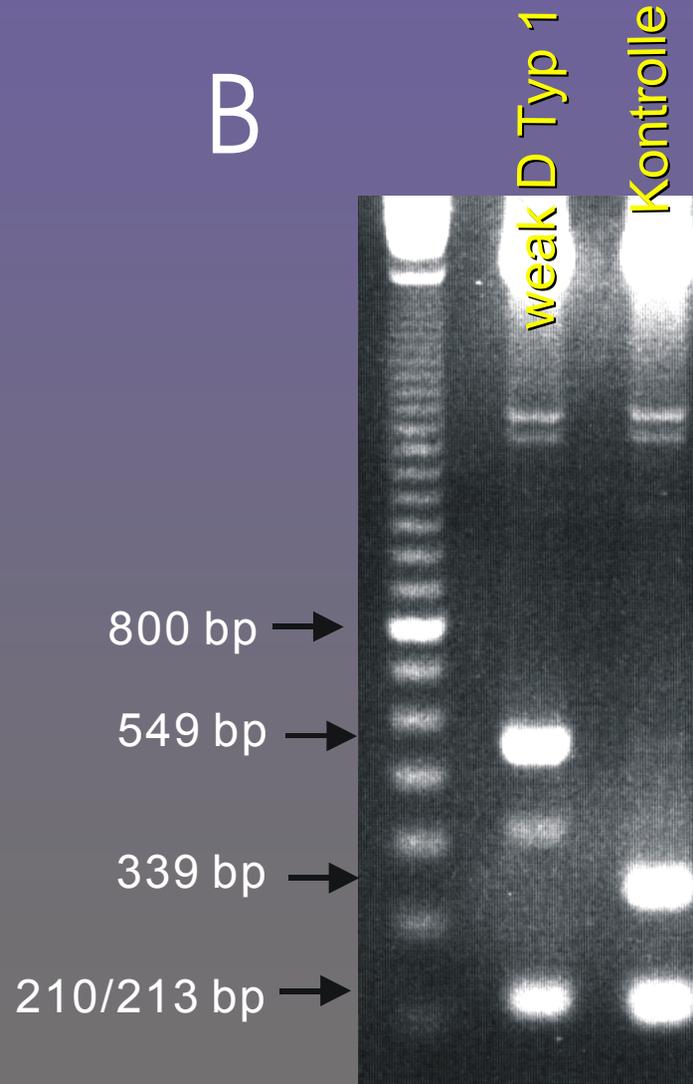
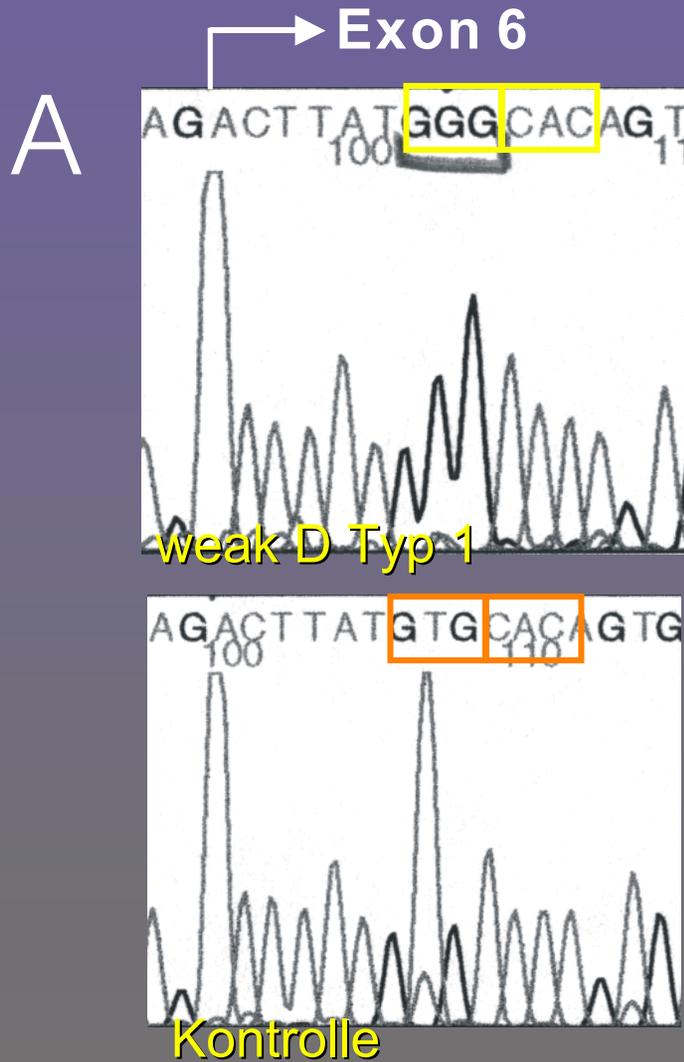
Rhesus: Molekularbiologie

- Einleitung und aktuelle Daten
- Partial D (D Kategorie)
 - „Missense“-Mutationen
 - Falls exofazial, Ursache für partial D (außer D Kategorien)
- Schwach ausgeprägtes Antigen D (weak D)
 - „Missense“-Mutationen
 - Falls nicht exofazial, Ursache der weak D Typen
- Rhesus negativ und *RHD* Heterozygotie
- Rh pos. Blutpräparate unter Rh neg. Spendern

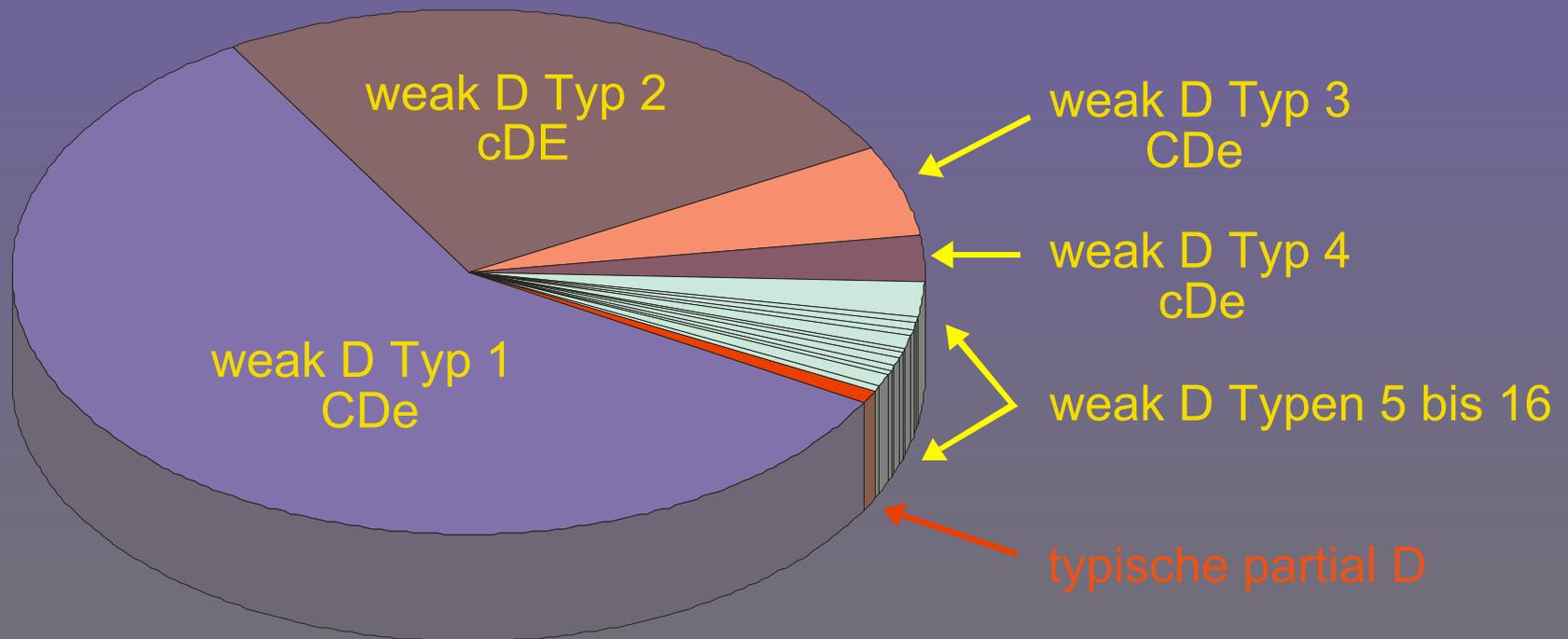
Aberrante *RHD* Allele mit einzelnen Mutationen



weak D Typ 1



Verteilung der weak D Typen



unter 272 weak D Proben ohne DVI
Blood 93(1999)385

Qualitäts- sicherung

Rhesus- Surveillance

- D pos. Patienten mit anti-D
- Register seit 1998
- 60 bestätigte Einsendungen
- davon 13 internationale Einsendungen
- Mehrere neue partial D: DNB, DOL, DAU-3
- 20 Patienten mit „weak D“:
 - Allo-anti-D nur bei weak D Typ 4.2 (DAR) und Typ 15
 - Kein allo-anti-D bei häufigen weak D Typen: solche Proben wiesen alle ein auto-anti-D auf

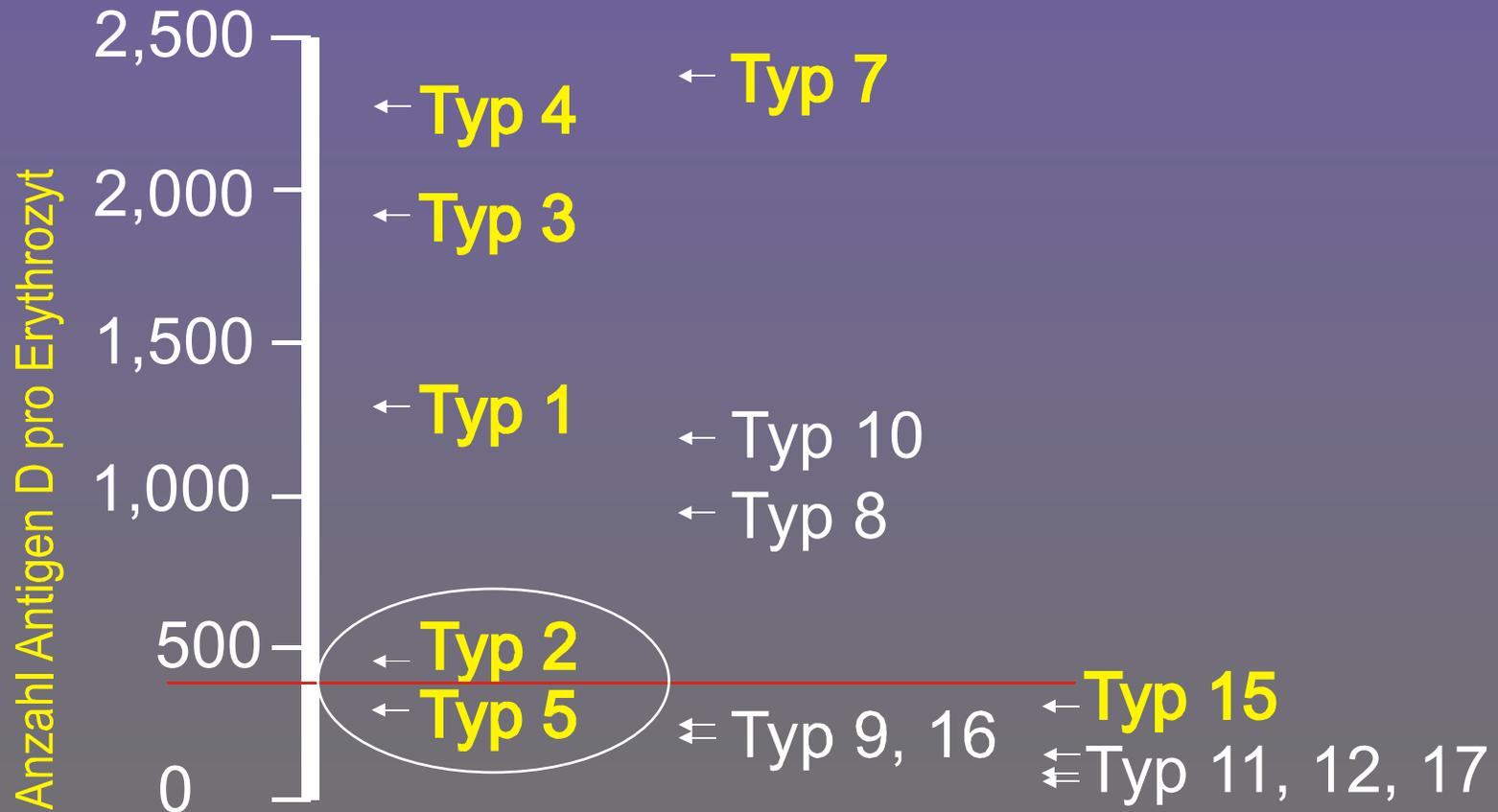
Bedeutung für die klinische Praxis

Stellenwert der Bestimmung von partial D und weak D bei Patienten

- Patienten mit den meisten partial D und einzelnen weak D Typen können anti-D bilden:
 - D Typisierung sollte Rhesus positive Transfusion vermeiden
- Patienten mit den meisten/häufigen weak D Typen können kein (allo-)anti-D bilden:
 - Transfusion mit Rhesus positivem Blut
 - vermeidet die Verschwendung von Rh neg. Blut

Übersichten in Clin. Lab. 48(2002)53-9 und MTA Dialog 8(2002)662-5

Antigendichten von weak D Typen



Bedeutung für die klinische Praxis

Qualitätssicherung durch molekular definierte weak D Typen

- weak D Typ 2
 - Qualitätssicherung (Sensitivität) von anti-D Seren und D-Typisierungsverfahren
- weak D Typen niedrigerer Antigendichte, wie Typ 5 oder Typ 15
 - präzise Definition und Kontrolle des „cut-off“ bei D-Typisierungsverfahren
- geeignet für
 - D-Typisierungsverfahren im klinischen Labor
 - D-Reagenzien und –Kits der Hersteller

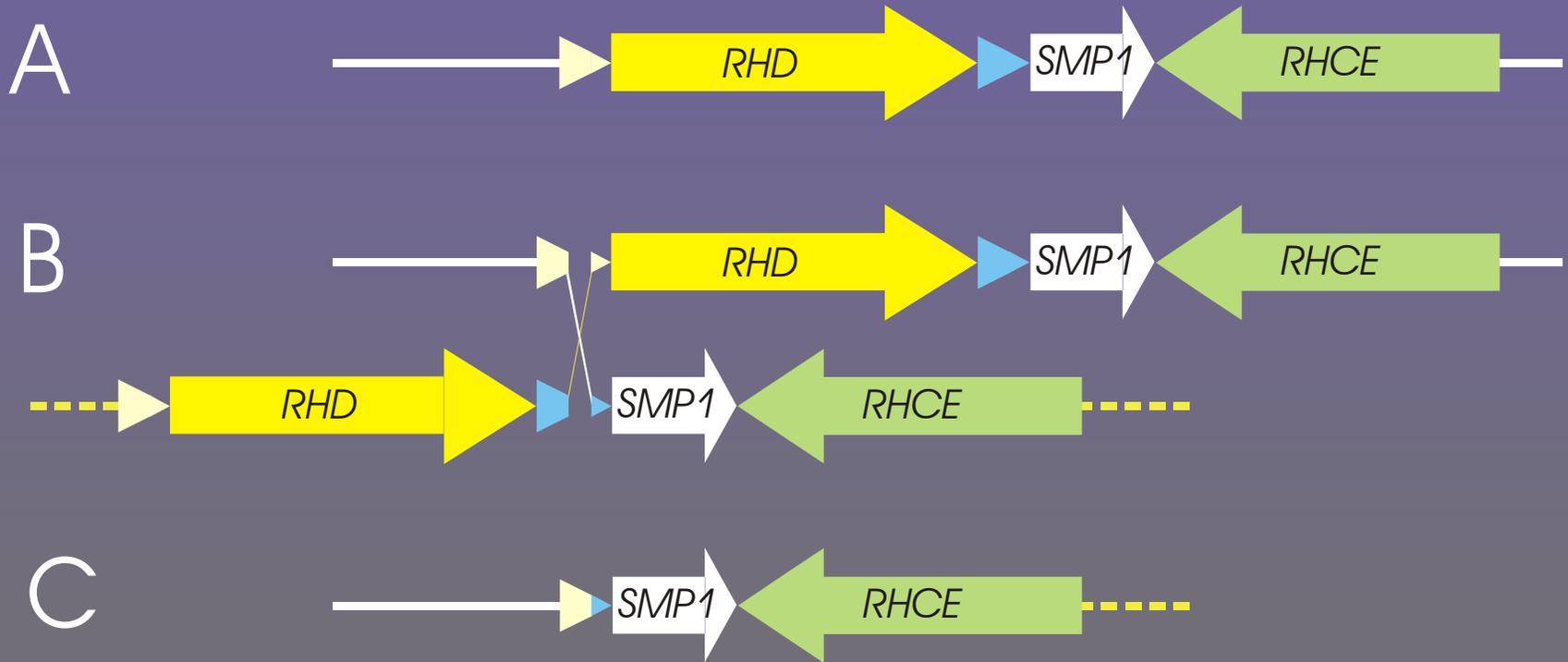
Rhesus: Molekularbiologie

- Einleitung und aktuelle Daten
- Partial D (D Kategorie)
- Schwach ausgeprägtes Antigen D (weak D)
- Rhesus negativ und *RHD* Heterozygotie
- Rh pos. Blutpräparate unter Rh neg. Spendern

D positiv und D negativ

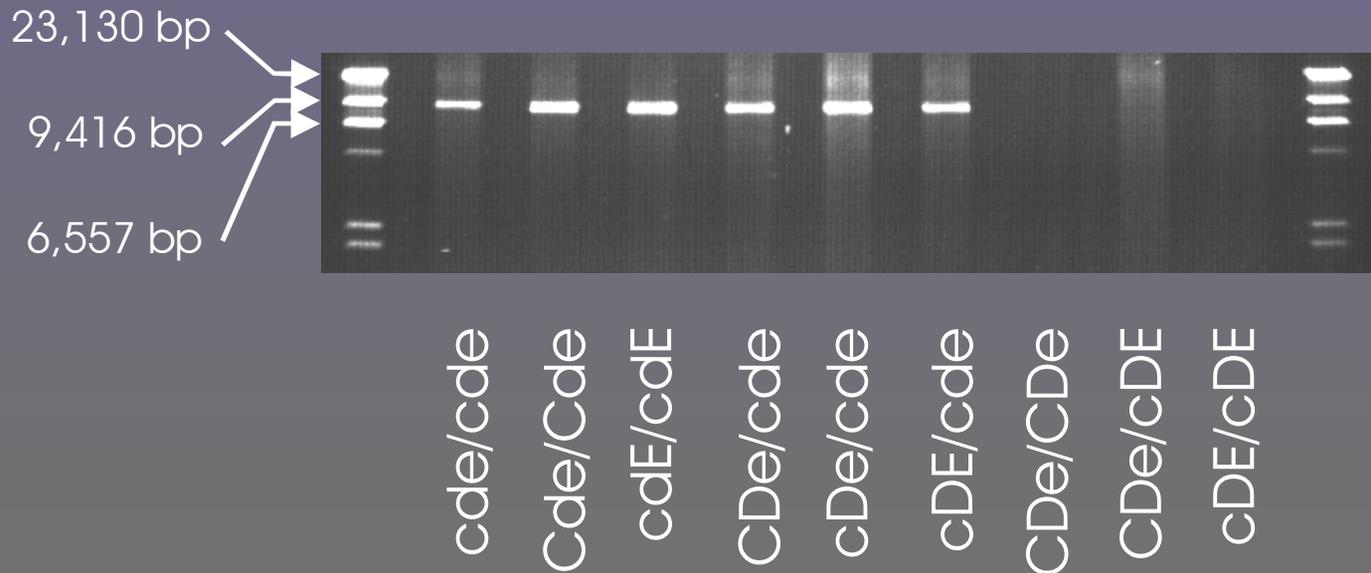
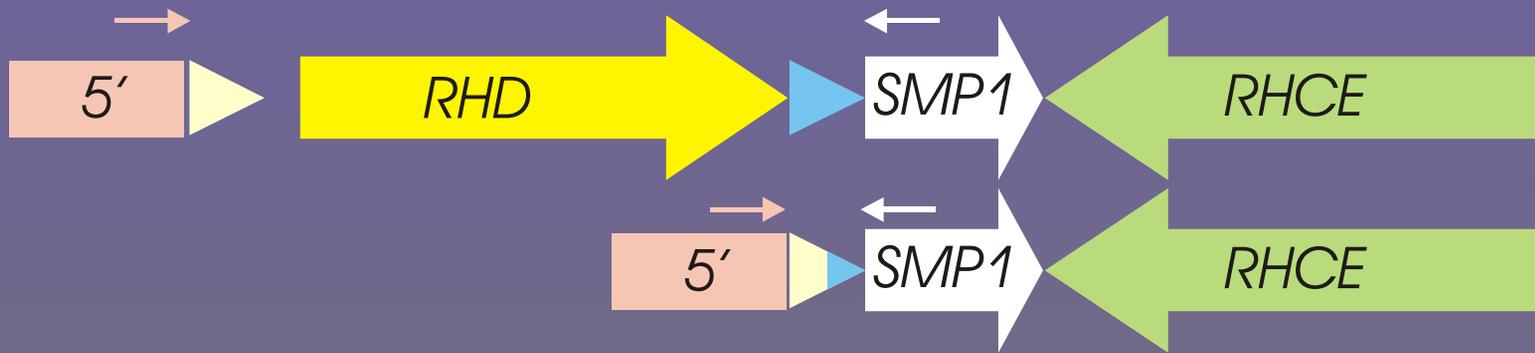


RHD Deletion



Nachweis der *RHD*

Heterozygotie bei Vätern

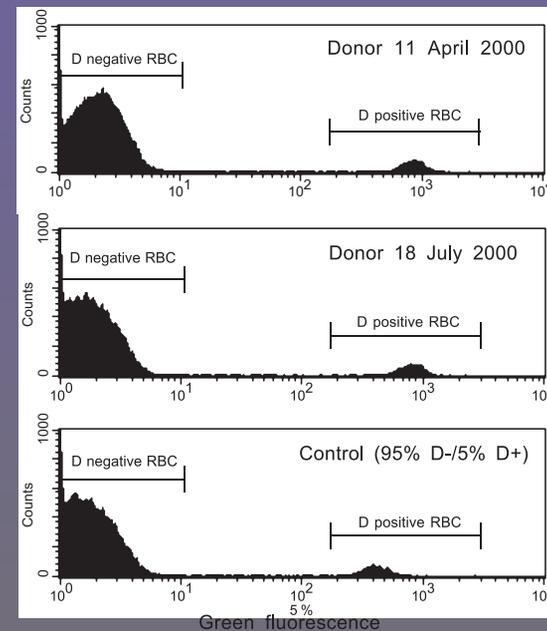


Rhesus: Molekularbiologie

- Einleitung und aktuelle Daten
- Partial D (D Kategorie)
- Schwach ausgeprägtes Antigen D (weak D)
- Rhesus negativ und *RHD* Heterozygotie
- Rh pos. Blutpräparate unter Rh neg. Spendern

Spender mit D+/- Chimerismus verursacht Immunisierungen

- Spender weist zwei Populationen von Erythrozyten auf:
 - 95% Rh neg.
 - 5% Rh pos.
- 13 Blutspenden
 - verursachte anti-D Bildung in den zwei nachuntersuchten Transfusionsempfängern



A

Marker	Events	% Total
All	20000	100.00
D negative RBC	18618	93.09
D positive RBC	1162	5.81

B

Marker	Events	% Total
All	20000	100.00
D negative RBC	18726	93.63
D positive RBC	1190	5.95

C

Marker	Events	% Total
All	20000	100.00
D negative RBC	18857	94.28
D positive RBC	1042	5.21

Bedeutung für die klinische Praxis

Qualitätssicherung durch molekulare Typisierung in Rh negativen Spendern

- unter 8,442 Rh neg. Spendern
 - 1 Spender mit D+/- Chimerismus
 - 4 Spender mit sehr schwach ausgeprägtem Antigen D
- Falls Ergebnisse repräsentativ
 - ca. 1 anti-D Immunisierung pro 50.000 Spenden (4 pro 200.000 Spenden in 1 Jahr)
 - Kosteneffizienz dieser molekularen Typisierung wäre gegeben
- Routineverfahren seit 1.1.2002

Bedeutung für die klinische Praxis

Warum *RHD* Genotypisierung?

- Höhere Sensitivität
 - Nachweis (vieler?) weak D unter “Rhesus negativen“ Spendern der Blutzentralen
- Überlegene Spezifität
 - Die klinische Bedeutung bekannter und neuer *RHD* Allele wird klarer, sobald die Genotypisierung öfter eingesetzt wird.

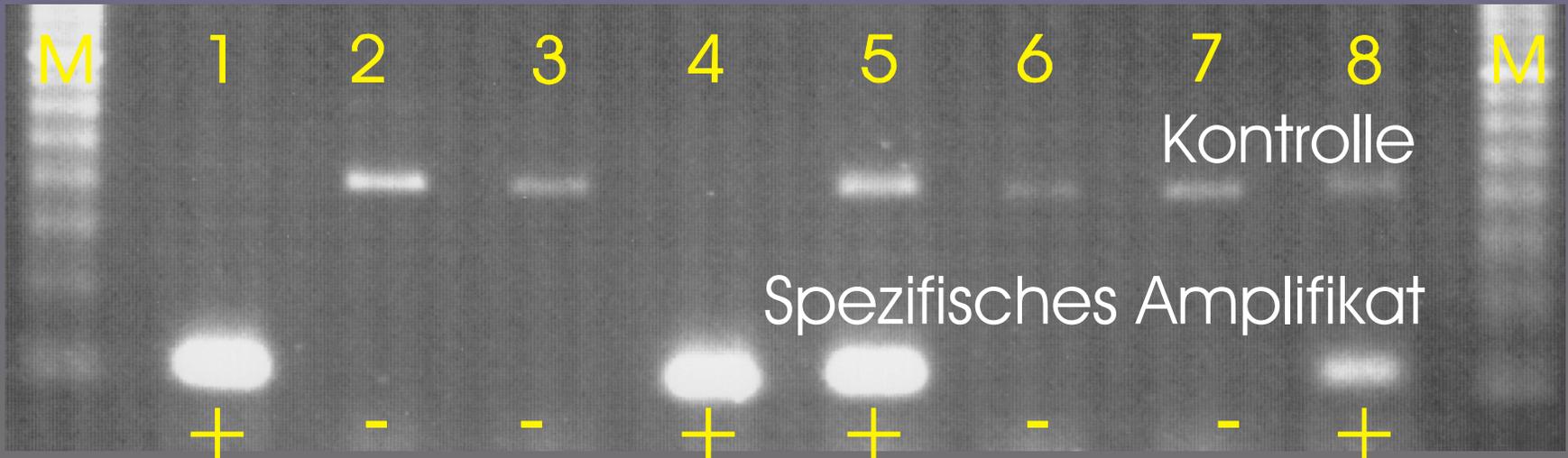
DNB: partial D mit anti-D häufig in Mitteleuropa

Population	Phänotyp-Frequenz
Schweizer (Lugano)	1:292
Schweizer (Bern)	1:538
Deutsche (Ulm)	1:1.644
Dänen (Aarhus)	< 1:798 *

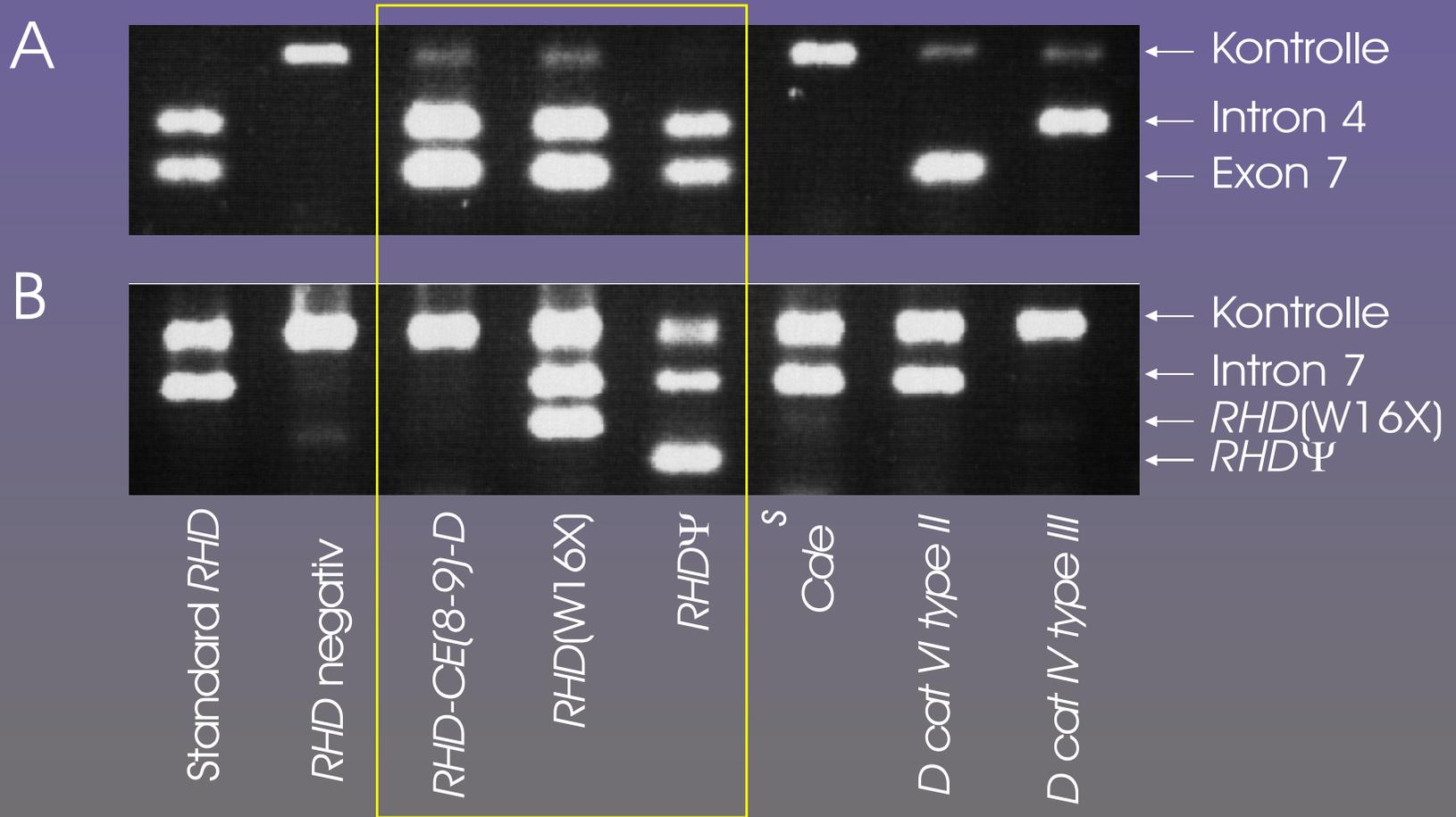
* obere Grenze des 95% Vertrauensintervalls (Poisson Verteilung)
häufigstes bisher bekanntes partial D

Routine Anwendung der PCR

DNA Isolierung	30 min
PCR Ansatz	10 min/45 min
PCR Lauf	90 min
Geltrennung	30 min
Gelfärbung	30 min
Auswertung	<u>10 min</u>
	3,5 – 4 Std.



Aktuell empfohlene *RHD*-PCR



positiv prädiktiver Wert > 0.9999

Spezifität der *RHD*-Genotypisierung: erwartete Rate falsch positiver Ergebnisse mit veröffentlichten Verfahren

PCR Strategie	Rate falsch positiv	Positiv prädiktiver Wert eines positiven Ergebnisses	Getestete Polymorphismen (n)
nur Exon 10	1:1.276	0,999216	1
Intron 4/Exon 7	1:4.081	0,999755	2
Intron 4/Exon 7/ <i>RHD</i> Ψ	1:4.700	0,999787	3
Exone 3, 4, 5, 6, 7, 9	1:6.051	0,999835	6
Exone 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10	1:6.051	0,999835	8
Intron 4/Exon 7/ Intron 7/W16X/ <i>RHD</i> Ψ	1:12.533	0,999920	5

Indikationen zur Genotypisierung von Blutgruppen

- Erste Wahl in der Pränataldiagnostik
 - aus Amniozentese oder von Trophoblasten
 - aus dem peripheren Blut der Mutter
- Polytransfundierte Patienten
 - falls die Serologie nicht ausreichend
- Auto- und Allo-Immuhämolytische Anämien
 - falls die Serologie nicht ausreichend
- *RHD* Genotypisierung bei Vätern
- weak D Typen und andere *RH* Varianten
 - anti-D Prophylaxe? Rh neg. Transfusion?

Bedeutung für die klinische Praxis

- *Patienten*
 - 2 monoklonale anti D, die nicht mit DVI reagieren
 - kein Antiglobulin, aber sensitive Methoden
 - keine Objektträger für Rh neg.!
 - Patienten, einschl. Schwangeren & Neugeborenen
- *Blutspender*
 - geeignete polyklonale oder oligoklonale anti-D
 - plus Antiglobulin *und* sensitive Methoden
- weak D zur Qualitätssicherung
 - molekular definierte weak D Type 2 Blute . . .

Bedeutung für die klinische Praxis

...

- Rh positives Blut für Patienten mit schwach ausgeprägtem Antigen D
 - keine Vergeudung von Rh negativem Blut
- Rh negatives Blut für Patienten DVI
 - und anderer partial D, falls bekannt
- *RH* Genotypisierung für etablierte Indikationen

Aktuelle Fragestellungen bei *Rhesus*

- Molekularbiologie
 - Frequenz und Typen aberranter *RH* Haplotypen in verschiedenen Bevölkerungen
 - 3D Struktur von RhD
 - Zusammensetzung des Rh Komplex
- Klinische Aspekte
 - Immunisierungen durch partial D, weak D und D+/- Chimeren
 - Immunisierung von Empfängern mit partial D oder weak D
- Ziel ist eine praktikable und kosteneffiziente Genotypisierung für das Routinelabor

Universität Ulm

