

# Wissenschaft und Fortbildung

## Durch Reaktionsverstärkung bedingte Probleme der D<sup>u</sup>-Erkennung

Immo Hoppe

Blutbank der Freien Universität Berlin im Klinikum Charlottenburg

### Zusammenfassung:

*Der weit verbreitete Einsatz von Reaktionsverstärkern in konglutinierenden Anti-D-Testseren hat zur Folge, daß ein guter Teil (ca. 25%) der D<sup>u</sup>-Fälle die für D<sup>u</sup> typische Reaktionsabschwächung vermissen läßt und als D verkannt wird. Andererseits bieten derartige Seren keine Gewähr, daß die seltene Konstellation ccD<sup>u</sup>.ee nicht als D-negativ verlorengeht.*

*Zur sicheren Erfassung aller D<sup>u</sup>-Fälle ist daher zu fordern, daß bei der Rh-Bestimmung neben dem obligaten konglutinierenden Anti-D regelmäßig ein agglutinierendes Zweitserum mitgeführt wird und daß nicht nur zweifelhafte, sondern auch D-negative Blute regelmäßig im Coombstest auf D<sup>u</sup> getestet werden. Als zuverlässig und arbeitstechnisch günstig erwies sich in dieser Hinsicht der Einsatz chemisch modifizierter Anti-D-Seren vom Typ Anti-D (RST)\*.*

### Schlüsselwörter:

D<sup>u</sup>-Merkmal – Anti-D (RST) – konglutinierendes Anti-D

### Summary:

*Due to the wide use of accelerators in congrutinating anti-D sera, a good deal (appr. 25%) of D<sup>u</sup> cases lacks its typical serological behaviour and is misinterpreted as D. On the other hand fortified sera don't guarantee that the rare constellation ccD<sup>u</sup>.ee will not be lost among the D-negatives. For safe diagnosis of all cases of D<sup>u</sup>, in Rh typing 1. aside of the congrutinating anti-D a second agglutinating serum should be used, 2. not only doubtful, but even D-negative specimens should be tested for D<sup>u</sup> regularly.*

*For these purposes chemically modified anti-D sera as Anti-D (RST)\* have been proved to be reliable and especially suitable\*.*

### Keywords:

D<sup>u</sup>-typing – Anti-D (RST) – congrutinating anti-D

\* Anti-D (RST), Hersteller: Gamma Biologicals, Houston, Texas (USA)

## Einleitung

Bei  $D^u$  handelt es sich um eine schwache Variante des Rh-Merkmals D, die i.a. durch Genwechselwirkung zustande kommt und nur selten erblicher Natur ist. Sofern  $D^u$  nicht durch D verdeckt ist, kann es durch Besonderheiten seiner Reaktion mit Anti-D-Testseren erkannt werden (Tab. 1). Mit konglutinierendem (inkomplettem) Anti-D reagiert es abgeschwächt, fraglich oder sogar negativ. Bei stärker reagierendem  $D^u$  gibt das Verhalten im agglutinierenden (kompletten) Anti-D den Ausschlag, ob D oder  $D^u$  vorliegt.  $D^u$  sollte nämlich, anders als D, mit ihm nicht reagieren. Sehr schwache  $D^u$ -Formen können erst nach Sensibilisierung mit inkomplettem Anti-D im Coombstest gesichert werden. Da  $D^u$  ganz überwiegend durch C oder E in trans-Position vermittelt wird, gilt die Vorschrift, daß D-negative Erythrozyten, welche mit Anti-CDE reagieren, im Coombsverfahren auf  $D^u$  zu testen sind.

Auf Grund seiner Erfahrungen als Fachberater für die IN-STAND-Ringversuche Immunhämatologie weist Drescher (1) darauf hin, daß die D-Variante  $D^u$  den Labors „Riesenprobleme“ bereite. Gewiß tragen hierzu bei der etwas komplizierte Weg der  $D^u$ -Bestimmung sowie Schwierigkeiten bei der Interpretation der serologischen Ergebnisse. Zunehmende Erschwernis entsteht aber auch aus Änderungen der Qualität der konglutinierenden Testseren. Die Forderung des Labors, auch das Rh-Merkmal D möglichst ohne zeitraubende Inkubation nachweisen zu können, fand nämlich in zunehmendem Maße bei den Serumproduzenten Entgegenkommen, indem diese die Reaktivität des konventionellen konglutinierenden Anti-D durch verschiedenartige Manipulationen „verstärkten“.

## Untersuchungsmethoden

Daß „verstärkt“ konglutinierende Seren für die  $D^u$ -Erkennung nachteilig sind, bemerkten wir selbst etwa seit Mitte der siebziger Jahre. Zunächst, so auch 1978 und 1979 (Phase I der Tabellen), suchten wir uns durch gezielte Testung Herstel-

lerfirmen, deren konglutinierendes Anti-D die bis dahin übliche Qualität aufwies. Für die Bestimmung des Rh-Merkmals D wurden routinemäßig zwei solcher Seren nebeneinander verwendet. Eine  $D^u$ -Testung (Prüfung mit agglutinierendem Anti-D sowie nach Sensibilisierung im Coombstest) erfolgte, wenn eines von ihnen oder gar beide schwächer als mit Score 3 anzeigten, sowie, über die Richtlinien (2) hinausgehend, bei allen D-negativen Blutproben.

In den folgenden  $1\frac{1}{2}$  Jahren bis Mitte 1981 (Phase II) wurde routinemäßig mit je einem konglutinierenden Anti-D und Anti-CDE sowie zwei agglutinierenden Anti-D gearbeitet. Anlaß für diese Ergänzung war eine Zunahme der durch konglutinierendes Anti-D stark angezeigten  $D^u$ -Fälle sowie Schwierigkeiten in der Beschaffung von Testseren der üblichen Qualität. Der Einsatz zweier agglutinierender Anti-D erfolgte mit Rücksicht auf deren oft erwähnte Qualitätsschwankungen. Komplettes Anti-D sollte klarstellen, in welchem Umfang inzwischen  $D^u$ -Fälle der Reaktionsverstärkung zum Opfer fielen, d.h. als D-positiv (Rh positiv) gedeutet wurden.

Während des letzten Jahres, ab Mitte 1981 (Phase III), wurde eines der agglutinierenden Anti-D durch Anti-D (RST) (Gamma Biologicals, Houston, Texas/USA) ersetzt. Anti-D (RST) soll im Röhrchen das komplette Anti-D ersetzen mit dem Vorteil, daß auf eine  $37^\circ$ -Inkubation verzichtet werden kann und daß es die Erythrozyten gegebenenfalls so sensibilisiert, daß unmittelbar in die Coombsphase der  $D^u$ -Testung übergegangen werden kann (3).

## Ergebnisse und Diskussion

Bei 33602 Blutgruppenbestimmungen fanden sich 177 Fälle von  $D^u$  (0,53%). Die  $D^u$ -Rate schwankte bei Aufgliederung der Kasuistik nach Jahrgängen zwischen 0,36 und 0,71% (Tab. 2), bei Aufgliederung nach Phasen unterschiedlicher Diagnostik zwischen 0,42 und 0,66% (Tab. 3). Die Prüfung auf Gleichheit im  $\chi^2$ -Kontingenztest zeigte, daß diese Unterschiede nicht signifikant waren ( $p = 0,05$ ). Bei drei Viertel

Tab. 1: Serologisches Verhalten von D,  $D^u$  und d (\* Untersuchung entfällt)

Anti-D	D	$D^u$	$D^u$	$D^u$	d
agglutinierend	+++	Ø	Ø	Ø	Ø
konglutinierend	+++	++	+ / ±	Ø	Ø
konglutinierend + Coombstest	*	*	+++	++	Ø

Tab. 2:  $D^u$ -Frequenz 1978–1982 (1. Halbjahr)

	Blutgruppenbestimmungen	$D^u$ -Fälle
1978	7236	35 (0,48%)
1979	7322	35 (0,48%)
1980	7424	53 (0,71%)
1981	7491	39 (0,52%)
1982	4129	15 (0,36%)
total	33602	177 (0,53%)

Tab. 3:  $D^u$ -Frequenz unter unterschiedlichen diagnostischen Bedingungen

	Blutgruppenbestimmungen	$D^u$ -Fälle
Phase I	14558	70 (0,48%)
Phase II	11016	73 (0,66%)
Phase III	8028	34 (0,42%)

Tab. 4: Rh-Formel bei 177 Fällen von  $D^u$

Rh-Formel	absolut	%
Cc $D^u$ .ee	136	77
cc $D^u$ .Ee	15	9
CC $D^u$ .ee	8	5
Cc $D^u$ .Ee	5	3
cc $D^u$ .ee	13	7

aller Fälle von D<sup>u</sup> fand sich das Rhesusmerkmal C, E, C homozygot, C und E bestritten ebenso wie jene Fälle von D<sup>u</sup> ohne C und E jeweils etwa 5% (Tab. 4).

Daß Reaktionsverstärkung der konglutinierenden Anti-D Testseren tatsächlich den korrekten D<sup>u</sup>-Nachweis erschwert, zeigt die prozentuale Verteilung der Reaktionsausfälle bei D<sup>u</sup> in den verschiedenen Jahren bzw. Phasen der Diagnostik (Tab. 5).

In Phase I wurden nur 9% von D<sup>u</sup> durch konglutinierendes Anti-D mit Score 3 angezeigt. Aufgeschlüsselt nach Jahren waren es 1978 4%, 1979 13% der Fälle. Sie wurden dadurch D<sup>u</sup>-verdächtig, daß wenigstens das Zweitserum schwächer wirkte. In drei Viertel der Fälle ergab sich ein Hinweis auf D<sup>u</sup> daraus, daß maximal Score 2 oder 1 abzulesen war. 14% von D<sup>u</sup> verdankten ihren Nachweis der Tatsache, daß sie als fraglich Rh-negativ mit Anti-CDE getestet wurden oder bei der Konstellation ccD<sup>u</sup>.ee im Coombstest auffielen. Die Unterschiede der Reaktionsintensität des einzelnen D<sup>u</sup> mit den beiden parallel eingesetzten Testseren beliefen sich durchschnittlich nur auf etwa einen halben Scorewert (Tab. 6). In der Hälfte der Fälle zeigten beide Seren identisch an. Nur in 10% differierten ihre Scorewerte um mehr als eine Stufe. In Phase II und III wurden jeweils fast 40% von D<sup>u</sup> mit Score 3 angezeigt (Tab. 5). 1982 waren es bisher sogar 60%. Läßt man die Daten aus Phase I als Norm gelten, so ergibt sich, daß durch Reaktionsverstärker inzwischen mehr als ein Viertel aller D<sup>u</sup> als Rh-positiv mißdeutet wurden. Ihre Erkennung war allein dem negativen Reaktionsausfall mit agglutinierendem Anti-D sowie Anti-D (RST) zu verdanken. Daß es sich bei den durch diese Seren aufgedeckten D<sup>u</sup> nicht etwa um Fälle handelte, die auch früher unerkannt geblieben wären, geht aus der Tatsache hervor, daß nach Umstellen der Diagnostik ein anhaltender, statistisch gesicherter Anstieg der D<sup>u</sup>-Frequenz ausblieb (Tab. 2 und 3). Eine D<sup>u</sup>-Rate von 0,5% ist allgemein anerkannt und wurde auch in dieser Zeitschrift erst kürzlich von Schricker (3) mitgeteilt.

Bei rund 20000 Blutgruppenbestimmungen mit routinemäßigem Einsatz von zwei bzw. einem agglutinierenden Anti-D erwies sich diese Art von Testserum entgegen anfänglichen Befürchtungen bei vorschriftsmäßigem Einsatz als zuverlässig. Anti-D (RST) kann eingesetzt werden 1. anstelle eines konglutinierenden Anti-D auf dem Objektträger, 2. anstelle eines agglutinierenden Anti-D im Röhrchen sowie 3. ausge-

hend vom Röhrchenansatz für den D<sup>u</sup>-Nachweis im Coombs-test. Es ist nicht bekannt, ob Anti-D (RST) auf dem Objektträger hinsichtlich D<sup>u</sup> ähnlich verdeckende Wirkungen entfaltet wie moderne konglutinierende Testseren. Auch unsere Untersuchungen geben hierüber keinen Aufschluß. In ihrem Rahmen wurde Anti-D (RST) in etwa 8000 Fällen anstelle eines agglutinierenden Anti-D sowie an etwa 1200 D-negativen oder D<sup>u</sup>-Fällen für die D<sup>u</sup>-Testung im Coombstest verwendet. Für beide Zwecke erwies sich Anti-D (RST) als uneingeschränkt geeignet. Als Kontrolle diente in allen Fällen agglutinierendes Anti-D sowie bei etwa 300 D-negativen oder D<sup>u</sup>-Fällen die D<sup>u</sup>-Testung im Coombstest über konglutinierendes Anti-D.

Bei der Rh-Bestimmung legen die geltenden Richtlinien besonderen Wert auf die Erkennung von D<sup>u</sup>. Ob dies ebenso wie die besondere Behandlung der D-negativen Fälle mit C und/oder E in jeder Hinsicht gerechtfertigt ist, mag umstritten sein. Das blutgruppenserologische Labor hat einen sicheren D<sup>u</sup>-Nachweis anzustreben. Dieser ist nach unseren Ergebnissen in zweierlei Hinsicht nicht gewährleistet. Mehr als ein Viertel aller D<sup>u</sup> wird neuerdings mit konglutinierendem Anti-D als Rh-positiv verkannt.

Durch routinemäßigen Einsatz eines agglutinierenden Anti-D-Zweitserums kann dieser Fehler ausgeglichen werden. 7% von D<sup>u</sup> mit der Rhesusformel ccD<sup>u</sup>.ee reagieren nach unseren Daten auch mit verstärktem konglutinierendem Anti-D meist nur fraglich oder gar negativ. Diese Fälle blieben auch früher oft unerkannt und können nur durch routinemäßige D<sup>u</sup>-Testung im Coombstest sicher erfaßt werden. Beide Arbeitsabläufe können durch Anti-D (RST) auf einen Nenner gebracht werden. Anti-D (RST) vermag die durch konglutinierendes Anti-D übermäßig stark angezeigten D<sup>u</sup>-Formen im Röhrchentest sicher abzugrenzen. Ausgehend vom Röhrchenansatz erlaubt es einen sicheren Nachweis von D<sup>u</sup> (einschließlich der ccD<sup>u</sup>.ee-Variante) im Coombstest.

Die Methode der Rh-Bestimmung würde sich hiernach insofern ändern, als

1. neben dem obligaten konglutinierenden Anti-D regelmäßig Anti-D (RST) als agglutinierendes Zweitserum mitzuführen ist und
2. ausgehend vom Anti-D (RST)-Ansatz sämtliche D-negativen Proben im Coombstest auf D<sup>u</sup> zu testen sind.
3. Die abschließende Untersuchung der D-negativen Proben mit Anti-CDE, die ursprünglich Träger von C oder E und auf diesem Umweg auch D<sup>u</sup>-Fälle aufdecken sollte, würde nur noch der Ermittlung der Merkmale C bzw. E dienen.

Durch eine derartige Umstellung der Rh-Diagnostik könnten vorbestehende oder in neuerer Zeit entstandene Lücken bei der Erkennung von D<sup>u</sup> sicher geschlossen werden.

#### Schrifttum:

1. DRESCHER, H., JOSEF, D.: Die Beurteilung qualitativer Merkmale in Ringversuchen. Lab.med. 5, 135–140 (1981).
2. Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 1980.
3. SCHRICKER, K. Th.: Erfahrungen mit den neuen RST-Seren® im Vergleich zur herkömmlichen Bestimmung der Rh-Merkmale. Lab.med. 6, 143–146 (1982).

#### Anschrift des Verfassers:

Professor Dr. med. Immo Hoppe  
Leiter der Blutbank im Klinikum Charlottenburg  
der Freien Universität Berlin  
Spandauer Damm 130  
D-1000 Berlin 19

Tab. 5: Reaktionsstärkenverteilung (%) konglutinierender Anti-D-Testseren bei Fällen von D<sup>u</sup>

Score	3	2	1	±/Ø
Phase I	9	44	33	14
Phase II	38	18	22	22
Phase III	38	15	24	24

Tab. 6: Differenz der Scorewerte zweier konglutinierender Anti-D-Testseren bei Fällen von D<sup>u</sup> (Verteilung in %)

Scorewert-Differenz				
0	0,5	1,0	1,5	2,0
49	17	24	7	3