

Bestimmung varianter Rh-Blutgruppenmerkmale durch kontinuierliche photometrische Durchflußanalyse

K. Graefe, W. Gräßmann, E. Pahl, B. Siebert

DRK-Blutspendedienst Lütjensee (Chefarzt Dr. G. Stienen)

Zusammenfassung:

Durch den Anschluß zusätzlicher Schreibergeräte sowie eines PC-Systems wird das Technicon Autogrouper 16 C-Analysensystem zur Blutgruppenbestimmung so erweitert, daß zusätzlich zum binomischen Analysenkonzept des Standardgeräts die intermediäre Reaktivität von abgeschwächt agglutinierenden Rh-Blutgruppenvarianten registriert wird. Durch Analyse der graphischen Photometerkontrolle oder durch entsprechende Gestaltung des PC-Programms ist es möglich, das Blutgruppenmerkmal D^u und andere Rh-Blutgruppenvarianten zu erfassen. Beobachtungen bei der Analyse von abgeschwächt reaktiven Varianten der 3 Rh-Loci werden berichtet.

Schlüsselwörter:

Photometrische Blutgruppenbestimmung — Rh-Blutgruppenvarianten D^u , C^u , C^{wu} , c^u , E^u

Summary:

Integration of more channel recorders and a PC-system transfers the continuous flow system Autogrouper 16 C to an instrument registering the intermediate reactivity of variant Rh-blood groups in addition to binomic basis blood group analysis. The analysis of graphic photometer protocols as PC-analysis enables the determination of blood group D^u and other variants of the 3 Rh-loci with diminished reactivity. Results of variant analysis of the 3 Rh-loci are reported.

Keywords:

Photometric blood groups analysis — Rh-blood group variants D^u , C^u , C^{wu} , c^u , E^u

Einleitung

Die Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (1) fordern die Bestimmung des Rh-Merkmals D^u . Das hochgestellte u symbolisiert eine abgeschwächte Variante des jeweiligen Blutgruppenmerkmals; abgeschwächt reaktive Rh-Blutgruppenvarianten unterscheiden sich von den voll ausgeprägten Rh-Merkmalen durch eine geringere Antigendeterminantenzahl auf der Erythrozytenoberfläche (2, 3). Es existieren keine spezifischen Antikörper gegen abgeschwächt reaktive Rh-Varianten: die manuell-visuelle D^u -Bestimmung basiert auf der unterschiedlichen Reaktivität des Rh-Faktors D^u mit agglutinierenden/konglutinierenden Anti-D-Reagenzien. Graduell differierende D^u -Antigene können auch dem Erfahrenen bei der Abgrenzung low grade D^u/d , insbesondere aber bei der Differenzierung high grade D^u/D erhebliche Schwierigkeiten bereiten (4, 5). — Die kontinuierliche Durchflußanalyse ermöglicht durch die photometrische Agglutinationsmessung den objektivierbaren Nachweis abgeschwächt reagierender Blutgruppenvarianten (6–8). Wir berichten über eine technische Erweiterung des Technicon-Geräts Autogrouper 16 C, die die kontinuierliche Erfassung des D-Allels D^u und weiterer Rh-Varianten der Loci C und E ermöglicht, sowie über Beobachtungen bei der Analyse von abgeschwächten varianten Rh-Faktoren der 3 Rh-Loci.

Material und Methodik

25000 EDTA-Blutproben von nicht ausgewählten Blutspendern wurden im technisch erweiterten 16kanaligen Durchflußsystem Autogrouper 16 C (Fa. Technicon) unter kontinuierlicher graphischer Registrierung der Transmission des D-Kanals bei 830 nm analysiert. Analog wurde bei 13500 Analysen der Rh-Blutgruppenmerkmale C, C^u , c, E der Extinktionsverlauf bei 830 nm kontinuierlich registriert.

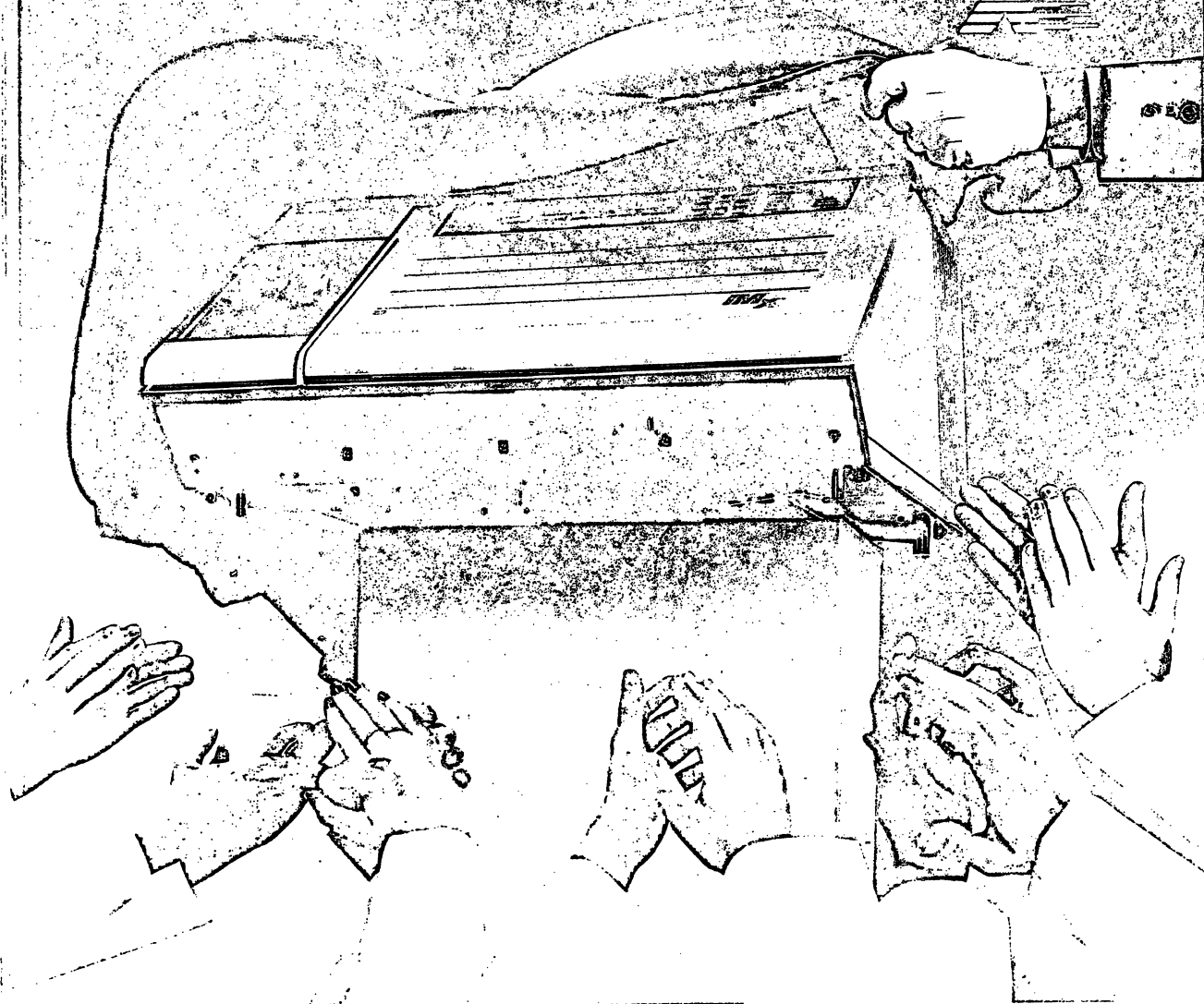
A. Geräte

Das 16kanalige Durchflußanalysensystem Autogrouper 16 C weist in der Herstellerversion 2 Photometerblöcke mit je 8 Photometerzellen auf; die Photometer leiten die Meßsignale an das Technicon-Datenauswertegerät. Die Geräteerweiterung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Fa. SES (spezielle elektronische Systeme) GmbH in D 6501 Nieder-Olm in 2 Stufen:

1. Anschluß eines 8-Kanalverstärkers an die 8 Photometer eines Photometerblocks des Autogrouper 16 C. An den 8-Kanalverstärker angeschlossen sind z. Zt. 2 3-Kanalschreiber zur kontinuierlichen graphischen Extinktionsprotokollierung der Rh-Blutgruppenanalysen sowie zur Analytik weiterer Blutgruppensysteme.

Vorsprung enthüllt – Fachwelt begeistert!

IM SYSTEM



Zugabe!

IM SYSTEM – das System,
das den gestiegenen
Anforderungen an
Ihr Labor gerecht wird.



**ABBOTT Diagnostic
Products GmbH**
Max-Planck-Ring 2, 6200 Wiesbaden-Delkenheim

H. Bürger, Z. Hussain

Tabellen und Methoden zur medizinisch- bakteriologischen Laborpraxis

Isolierung und Identifizierung pathogener Mikroorganismen sind die Voraussetzungen für Diagnose, Therapie, Verhütung von Infektionen und zur Infektionskontrolle.

In dem vorliegenden Buch werden die bisher in jedem qualifizierten mikrobiologischen Labor eingeführten kulturellen und biochemischen Verfahren beschrieben.

Die wichtigsten Daten von ca. 400 als Krankheitserreger geltenden oder aus differentialdiagnostischen Gründen im Bereich der Humanmedizin interessierenden Bakterienspezies sind in einem kompakten Abriß zusammengefaßt.

Der erste Teil des Buches informiert über Gewinnung, Transport und Verarbeitung von Untersuchungsmaterialien, der Hauptteil enthält sehr ausführlich kommentierte Tabellen zur Identifizierung der Mikroorganismen, und im Anschluß daran werden die im Text erwähnten Methoden unter Angabe von Bezugsquellen für notwendige Hilfsmittel erläutert.

Das zum Gebrauch am Arbeitsplatz bestimmte Buch wendet sich an Mikrobiologen, Hygieniker, Pharmazeuten, medizinisch-technische Assistentinnen und alle diejenigen, die routinemäßig bakteriologische Untersuchungen durchführen oder sich im Praktikum auf diese Tätigkeit vorbereiten.

— — ✂ — — — — —

An Verlag Kirchheim, Kaiserstraße 41, 6500 Mainz

Ich bestelle gegen Rechnung Expl. Bürger/Hussain:
Tabellen und Methoden zur med.-bakteriologischen Laborpraxis,
zum Preis von DM 68,—

Name/Praxis: _____

Straße: _____

PLZ: _____ Ort: _____

Datum: _____ Unterschrift: _____

**Format 17 × 24 cm,
256 Seiten,
Abbildungen,
Tabellen,
PVC-Einband,
ISBN 3-87409-006-X,
DM 68,—**

**Bezug über Verlag
oder
Fachbuchhandlung**

**VERLAG
KIRCHHEIM
MAINZ**

2. Ausbaustufe

1. Ausbaustufe

Standardausführung Autogrouper 16

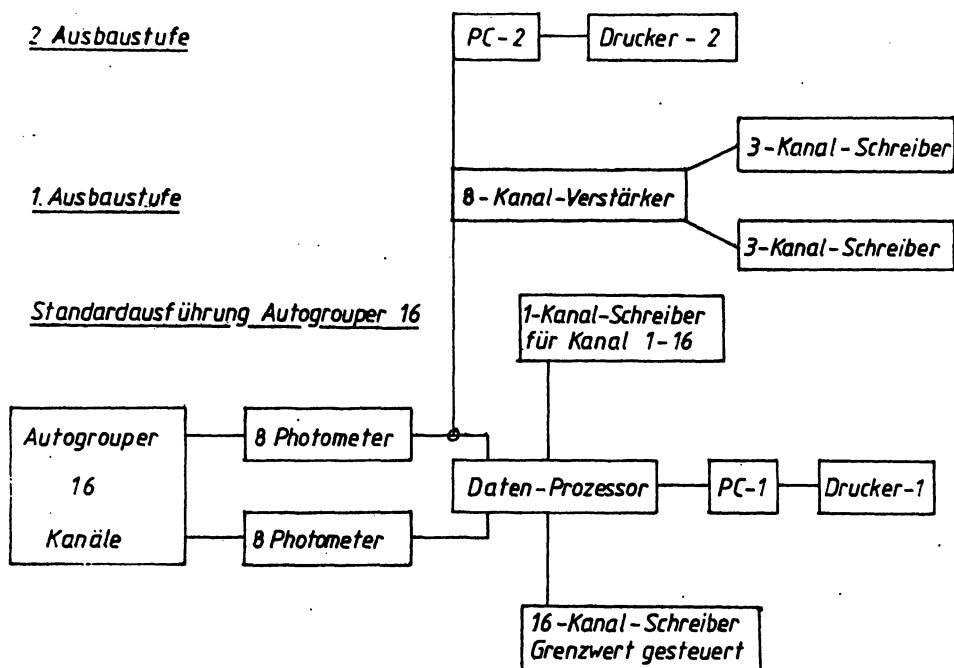


Abb 1:
Schematische Darstellung der technischen Erweiterung des Autogrouper 16 C

Die Extinktionsprofile werden visuell ausgewertet: abgeschwächt reagierende Rh^u-Varianten sind an der charakteristisch von den positiven bzw. negativen Reaktionen abweichenden, intermediären Extinktion zu erkennen (Abb.2,3).

2. Durch Anschluß eines PC's mit Drucker können die kontinuierlich registrierten Extinktionswerte selektiv am peak-Maximum ausgedruckt werden, bzw. die Extinktionswerte können als positive/negative – intermediäre Reaktionen gekennzeichnet werden. Da das Ziel der Geräteerweiterung ergänzend zur Basisanalytik die Erfassung varianter Blutgruppenmerkmale ist, ist es ferner möglich, das PC-Programm so zu gestalten, daß intermediäre Extinktions-peaks als „Rh^u“ gekennzeichnet werden.

Die technische Erweiterung des Autogrouper-Analysensystems ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. 8-Kanalverstärker, Schreiber sowie PC-2 sind im Nebenschluß an die Photometer angeschlossen: die Photometersignale werden parallel an den Technicon-Datenprozessor weitergeleitet: der Analysenablauf des Standardgeräts wird durch die Geräteerweiterung nicht verändert.

B. Reagenzien

1. Testseren zur Blutgruppenbestimmung: „inkomplette“ Seren Anti-C, C^u, c, D, E, verschiedener Hersteller (Fa. BAG, Biotest, Gamma, Merz u. Dade).

Im Vorversuch wird durch Titration die Grenzkonzentration des Reagenzes ermittelt, die bei der Durchflußanalyse noch zu einer vollständigen Agglutination und damit Eliminierung der Erythrozyten führt, die das entsprechende Blutgruppenmerkmal aufweisen.

Anti-D-Gebrauchsverdünnung (1:50): 1 ml Anti-D inkomplett (Fa. Gamma) wird verdünnt mit 45 ml bovinem Albumin 2% (aus Albumin 30% der Fa. Johnson mit 1,3% NaCl-Lösung vorverdünnt). Das verdünnte Reagenz wird

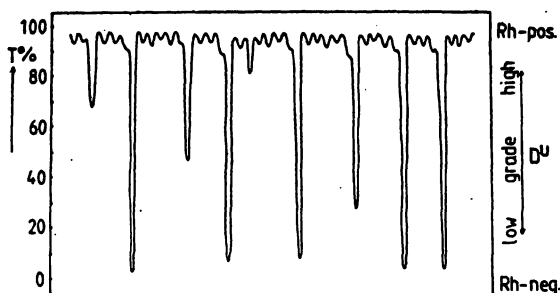


Abb. 2: Photometerprotokoll des D-Kanals bei 830 nm. Abgebildet sind die Transmissionsbefunde bei 4 verschiedengradigen D^u neben 5 Rh-(D)-negativen, sowie einer Vielzahl Rh-(D)-positiven Blutproben

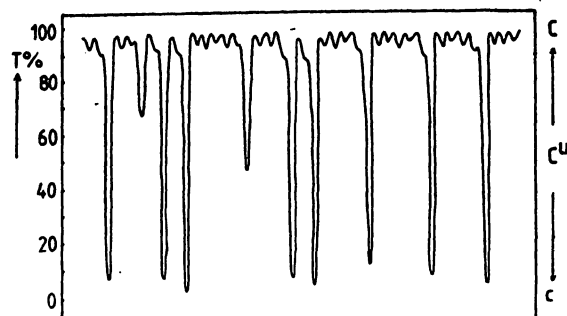


Abb. 3: Photometerprotokoll des C-Kanals bei 830 nm. Abgebildet sind die Transmissionsprotokolle bei 2 verschiedengradigen C^u neben 8 Rh-(C)-negativen, sowie einer Vielzahl Rh-(C)-positiven Blutproben

mit 4 ml Polyvinylpyrrolidon PVP K 90 (Technicon) 5%, sowie mit 0,12 g NaN_3 versetzt.

Analog werden die Testseren Anti-C, C^w , c, E und andere nach Bestimmung der Gebrauchsverdünnung adäquat verdünnt eingesetzt (Gebrauchsverdünnung 1:50 bis 1:200).

2. Bromelin (Fa. Serva): 0,5 g Bromelin werden in 100 ml 1,3% NaCl-Lösung gelöst.

Im kontinuierlichen Durchflußsystem Autogrouper 16 C wird die mit Bromelin versetzte Erythrozytensuspension 1:1 mit der Testserum-Gebrauchsverdünnung gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert.

3. Komplette Testreagenzien der Spezifität Anti-D/Anti-C (Fa. Behring, Biotest, Gamma, Merz u. Dade, Molter, Ortho) wurden nach Arbeitsanweisung der Hersteller im Röhrchentest eingesetzt.

Ergebnis

Die Erweiterung des Technicon-Geräts Autogrouper 16 C ermöglicht die Analyse varianter Blutgruppenmerkmale mit abgeschwächter Agglutinabilität unter Erhaltung der Basisanalytik des Standardgeräts, d.h. der binomischen photometrischen Differenzierung positiver/negativer Agglutinationsreaktionen: Voraussetzung für den Nachweis varianter Blutgruppenmerkmale ist eine adäquate Antikörperkonzentration, die im Vorversuch zu ermitteln ist. Bei Rh-Blutgruppenvarianten mit abgeschwächter Reaktivität werden unter diesen Reaktionsbedingungen die Erythrozyten gemäß Massenwirkungsgesetz nicht quantitativ agglutiniert, so daß Zellen die Photometer passieren und von den positiven/negativen Reaktionen abweichende intermediäre Transmissionswerte resultieren. Die abgeschwächte Reaktivität varianter Rh-Blutgruppen ist aus dem graphischen Schreiberprotokoll visuell ablesbar. Je nach Konzentration bzw. Reaktivität der Blutgruppen-Determinanten auf der Erythrozytenoberfläche sind bei high grade bzw. low grade D^u unterschiedliche Transmissionswerte zu beobachten (7, 8); das Gleiche gilt für andere Varianten des Rh-Blutgruppensystems (Abb. 2, 3). Durch Integration eines PC-Geräts ist die visuelle Auswertung der graphischen Photometerprotokolle durch einen entsprechenden Extinktions-Datenausdruck zu ergänzen oder zu ersetzen. Das PC-Programm kann so gestaltet werden, daß abgeschwächte Agglutinationsreaktionen als D^u , C^u , C^{wu} , c^u , E^u protokolliert werden.

Die Analyse von 25000 EDTA-Blutproben nicht ausgewählter Blutspender ergab bei 136 Probanden (0,544%) das Rh-Merkmal D^u . Die photometrischen Befunde wurden im Röhrchentest mit agglutinierenden/konglutinierenden Anti-D-Seren überprüft und überwiegend als D^u bestätigt; wie bereits früher beschrieben (8), sind im high grade D^u/D -Bereich ca. 5% Differenzen zwischen der photometrischen und der klassischen D^u -Bestimmung zu beobachten; in 4 Fällen waren wiederum manuelle bzw. photometrische D-Befunde aus der Zeit vor der Geräteerweiterung zu D^u zu korrigieren.

Ergänzend zur kontinuierlichen graphischen D/D^u -Analyse analysierten wir bei 13500 nicht ausgewählten Blutspendern die Rh-Merkmale C, C^w , c, E im erweiterten Autogrouper 16 C unter kontinuierlicher graphischer Transmissions-Registrierung bei 830 nm. Bei der Analyse aller Rh-Faktoren wählten wir analog zur Analyse des Rh-Faktors D die Grenzkonzentration der Antikörper, bei der Erythrozyten mit voll ausgeprägtem Blutgruppenanti-

gen bzw. normaler Antigendichte/Erythrozytenoberfläche durch die Agglutination noch quantitativ eliminiert werden.

Analog zum D-Allel D^u sind auch bei der Analyse der Rh-Loci C und E unter diesen Reaktionsbedingungen mit unterschiedlicher Frequenz abgeschwächte Agglutinationsreaktionen zu beobachten. Bei der kontinuierlich graphisch protokollierenden photometrischen Durchflußanalyse registrierten wir bei 13500 Blutspendern 44 (0,33%) C^u – 5 (0,037%) C^{wu} – 4 (0,03%) c^u – 1 (0,007%) E^u .

Die abgeschwächten Reaktionsbefunde wurden in einer zweiten Analysenserie mit denselben Reaktanden bestätigt.

Der Versuch, die photometrischen C^u -Befunde analog der D^u -Analytik durch Reaktion mit agglutinierenden/konglutinierenden Anti-C-Reagenzien zu bestätigen, gelang nur in wenigen Fällen: nur bei 17 (38%) von 44 photometrischen C^u -Befunden ergaben die Reaktionen mit agglutinierenden Anti-C-Reagenzien negative Befunde.

In der vorliegenden Studie war bei Probanden mit abgeschwächt reaktiven Rh^u -Varianten in der Regel nur 1 Rh-Locus betroffen. Gehäuft findet sich C^u jedoch kombiniert mit C^w : bei 13500 nicht ausgewählten Probanden registrierten wir 443 (3,28%) C^w ; 13 C^u (29%) waren mit C^w kombiniert.

Die abgeschwächte Reaktivität von low grade C^u mit Anti-C kann Ursache von Fehlbestimmungen sein: in 6 Fällen waren photometrisch registrierte C^u -Befunde bei früheren manuell-visuellen Analysen bzw. bei der photometrischen Durchflußanalyse vor der Geräteerweiterung nicht als C-Variante erkannt worden: die cc-Vorbefunde mußten zu C^uc korrigiert werden. Analog war in einem Fall ein CC-Befund aufgrund der photometrischen Daten zu Cc^u zu korrigieren. Die photometrischen C^u/c^u -Befunde wurden durch den indirekten Antiglobulintest bestätigt.

Bei den niederfrequenten Rh-Varianten E^u beobachteten wir bisher keine Differenz zu Vorbefunden.

Im Rahmen der vorliegenden Studie ergaben unsere Analysen je einen Probanden der Rh-Blutgruppe ccD^uee bzw. C^ucddee ; letztere war als Rh-negativ ccdde manuell-visuell vorbestimmt worden.

Diskussion

Bei der Blutgruppenbestimmung im kontinuierlichen Durchflußverfahren werden agglutinierte Erythrozyten im Gegensatz zu nicht reaktiven Zellen durch Sedimentation vor der photometrischen Analyse eliminiert: die photometrische Bestimmung der Transmission von zellfreiem Agglutinatüberstand bzw. zellhaltigem Flüssigkeitsstrom ist das Meßprinzip dieses Analysensystems. Bei adäquater Reaktionsführung ist die kontinuierliche photometrische Durchflußanalyse zur Bestimmung abgeschwächt reagierender Rh-varianter Blutgruppenmerkmale, z.B. zur von den Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion geforderten D^u -Bestimmung geeignet. Da das Durchflußanalysensystem Autogrouper 16 C der Firma Technicon nur über einen 1kanaligen Photometerschreiber verfügt, der zur Steuerung und wechselweisen Überwachung der 16 Reaktionskanäle erforderlich ist, ist eine routinemäßige Extinktions-Protokollierung eines

Reaktionskanals mit dem Standardgerät nicht möglich. Durch die beschriebene Geräteeinrichtung wird das Analysensystem Autogrouper 16 C zu einem Instrument, das durch die kontinuierliche Extinktionsregistrierung intermediäre Agglutinationsgrade objektivierbar erfaßt und so simultan zur binomischen Basisanalytik die Bestimmung abgeschwächt reagierender Blutgruppenmerkmale ermöglicht.

Die kontinuierliche Extinktionsregistrierung gewährleistet eine optimale Überwachung der angeschlossenen Reaktionskanäle und damit ein Optimum an Sicherheit der Durchflußanalyse. — Bei der Standardversion des Autogrouper 16 C können abgeschwächt reaktive Blutgruppenvarianten fehlinterpretiert werden: die Hersteller-version des Autogrouper 16 C definiert die Grenze zwischen positiven/negativen Agglutinationsbefunden in einem mittleren Transmissionsbereich zwischen positiven und negativen Kontrollextinktionen. Diese mittlere Grenzextinktion ermöglicht eine zuverlässige binomische Differenzierung positiver/negativer Agglutinationsbefunde; — bei Rh-Varianten mit abgeschwächter Agglutinabilität und entsprechend intermediären Transmissionswerten bis in den Bereich des Grenzwertes, oder auch den Grenzwert überschreitend, sind Fehlinterpretationen möglich. Die kontinuierliche Extinktionsregistrierung sichert die Erfassung und exakte Einordnung abgeschwächt reagierender Rh-Blutgruppenvarianten.

Die D/D^u-Bestimmung erfolgt in einem Analysengang, eine ergänzende Analyse mit konglutinierenden/agglutinierenden Anti-D-Reagenzien ist nach den vorliegenden Erfahrungen nicht erforderlich.

Mit geringer Frequenz sind bei der kontinuierlichen Extinktionsregistrierung abgeschwächt reaktive Varianten der Rh-Loci C/E zu beobachten. Die Rh-Varianten C^u/E^u sind als gemäß den Mendel'schen Gesetzen vererbte Allele der Rh-Loci C/E bekannt (9, 10). Differenzen bei der Überprüfung der photometrischen C^u-Befunde mit agglutinierenden/konglutinierenden Anti-C-Reagenzien sind wahrscheinlich reagenzienbedingt; diese Differenzen bedürfen einer weiteren Klärung. — Bei der photometrischen Durchflußanalyse sind auch bei der Be-

stimmung der Rh-Faktoren c/C^u abgeschwächt reaktive Varianten zu beobachten; die niederfrequenten Varianten c^u/C^{uu} bedürfen einer ergänzenden genetischen Analyse.

Low grade-Varianten der Rh-Loci C/E können bei der manuell-visuellen wie bei der Analyse durch das Autogrouper 16 C-Standardmodell Ursache von Fehlbestimmungen der entsprechenden Rh-Faktoren sein. Die Erfassung und exakte Interpretation von abgeschwächt reaktiven Varianten auch der Rh-Loci C/E durch den modifizierten Autogrouper 16 C ist von prinzipiellem analytischem und allgemeinem Blutgruppen-serologischem Interesse. Die technische Erweiterung des Autogrouper 16 C ist ein Beitrag zur weiteren Rationalisierung und zu mehr Sicherheit bei der Blutgruppenanalyse.

Schrifttum:

1. Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion Bundesärztekammer. Wissenschaftliche Reihe. Deutscher Ärzteverlag Köln 1980.
2. ROCHNA, E., HUGHES JONES, N. C.: The use of purified 125/I — labeled anti- γ -Globulin in the determination of the number of D-antigen sites on red cells of different phenotypes. Vox. Sang. 10, 675—686 (1965).
3. BUSH, M., SABO, B., STROUP, M., MASOUREATIS, S. P.: Red cell antigen sites inherited from a homozygous D^u mother. Transfusion 14, 433—439 (1974).
4. SPIELMANN, W., SEIDL, S.: Einführung in die Immunhämatologie und Transfusionskunde. Verlag Chemie 1980.
5. MOLLISON, P. L.: Blood transfusion in clinical medicine. Blackwell Scientific Publications Oxford 1983.
6. PERRAULT, R., HÖGMAN, C.: Automated red cell antibody analysis. A parallel study. I. Detection and quantitation. Vox. Sang. 20, 340—355 (1971).
7. PEYRETTI, F.: The determination of D^u phenotypes using agglutination quantitation of the Autogrouper 16 C. Technicon International Division, Editors V. Reicher, J. E. Barclay.
8. GRAEFE, K., GRÄSSMANN, W., SIEBERT, B.: Photometrische D^u-Bestimmung durch kontinuierliche Durchflußanalyse. Lab. med. 10, 45—47 (1986).
9. RACE, R. R., SANGER, R., LAWLER, S. D.: Rh-genes allelomorph to C. Nature 161, 316 (1948).
10. MOURANT, A. E., IKIN, E. W., HÄSSIG, A., HÄSSIG, R., HOLLÄNDER, L.: Über das Vorkommen des Rhesusgens E^u in einer Ostschweizer Familie. Schweiz. Med. Wochenschr. 43, 1100—1102 (1952).

Anschrift des Verfassers:

Dr. med. et. rer. nat. W. Gräßmann
DRK-Blutspendedienst
2073 Lütjensee

□