

Diplomarbeit

**Häufigkeit und Analyse serologisch auffälliger ABO-
und Rhesus-Blutgruppenbefunde**

eingereicht von

Florian Otto Schützer

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Univ.-Klinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin

unter der Anleitung von

ao.Univ.-Prof. Mag. iur. Dr.med. univ. Thomas Wagner, MSc

sowie

Mag.^a rer.nat. Dr.ⁱⁿ Eva-Maria Matzhold

Graz, 17.02.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 17.02.2017

Florian Otto Schützer eh

Danksagungen

Ich möchte hier zu Allererst meinen Betreuern Herrn Professor Wagner sowie Frau Doktor Matzhold für ihre tatkräftige Unterstützung an dieser Arbeit danken. Ohne deren Bereitschaft mir die Möglichkeit zu geben, unter ihrer Aufsicht diese Arbeit zu verfassen und der Hilfe wäre diese Arbeit erst gar nicht möglich gewesen. Ihre Erfahrungen – nicht nur in den Bereichen von Blutgruppensystemen und deren Untersuchung – sondern auch im Verfassen wissenschaftlicher Arbeit waren eine enorme Bereicherung und haben die Qualität dieser Arbeit entscheidend beeinflusst.

Außerdem danke ich dem ganzen Team der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin, da ich mich mit Fragen und Anliegen jederzeit an jeden einzelnen wenden konnte und stets auf freundliches Entgegenkommen gestoßen bin. Gesondert danke ich dabei noch Frau Anja Stoisser MSc, Frau Alma Mekic BSc und Frau Eva-Maria Knapp.

Ich danke des Weiteren meiner Familie, deren Unterstützung das Studium der Humanmedizin erst möglich gemacht hat sowie meinen Freunden die mich mit Halt und kritischen Beurteilungen bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Zusammenfassung

Die Blutgruppenserologie ist ein vergleichsweise kleines Feld in der Medizin, aber bedeutsam sowohl in der Frage der Übertragung von Blut als auch in der Schwangerschaft. Daher kann jeder Mensch zumindest einmal im Leben damit in Berührung kommen. Das ABO sowie das Rhesus System sind die wohl bekanntesten, und für die Transfusionsmedizin bedeutendsten Blutgruppensysteme in unserer Gesellschaft. Die Bestimmung der Blutgruppen erfolgt im Labor mit vergleichsweise einfachen Methoden. Gelegentlich ist es aber nach dieser serologischen Blutgruppenbestimmung nicht möglich, einen eindeutigen Befund zu erstellen. Diese sogenannten diskrepanten und auffälligen Ergebnisse werden dann durch genetische Untersuchungen weiter abgeklärt.

In dieser Arbeit werden verschiedene serologische Blutgruppenphänotypen und die Frequenz der zu Grunde liegenden genetischen Varianten vorgestellt und diskutiert.

Es handelt sich um eine retrospektive Analyse von Blutgruppenbestimmungen der letzten 4 Jahre; genau genommen vom 1.1.2012 bis 31.12.2015. Die phänotypischen Auffälligkeiten kamen durch Routineuntersuchungen von SpenderInnen und PatientenInnen ans Tageslicht und wurden mit erweiterten serologischen Methoden und molekularbiologischen Untersuchungen abgeklärt.

Wichtig zu erwähnen sei hierbei, dass sich die Analyse auf das Einzugsgebiet der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin am Landeskrankenhaus Graz bezieht. Es wurden also steirische BlutspenderInnen und PatientenInnen aus verschiedenen Regionen, teilweise natürlich auch Menschen mit Migrationshintergrund, untersucht.

Material und Methoden: Zur Erhebung der Daten wurden verschiedene Labordokumentationen (elektronisch und in Papierform) verwendet. Dort wurden Auffälligkeiten in serologischen Proben von den BMAs standardmäßig markiert. Dadurch konnte man sich in dieser retrospektiven Analyse auf genau diese fokussieren. Die genetische Konstellation wurde über SSP-PCR (einem molekularbiologischen Verfahren), oder mittels direkter Sequenzierung analysiert.

Ergebnisse: An der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin wurden in den Jahren 2012 bis 2015 298.654 Blutproben untersucht. Im ABO System gab es 315 auffällige Befunde. Es konnten auch 14 neue ABO Allele beschrieben werden.

Im Rhesus System waren 517 Fälle hauptsächlich über schwache Reaktionen auffällig, weswegen diese weiter untersucht wurden. In 68% der Fälle wurden hier sogenannter Weak-D-Typen bestimmt, in lediglich 7% der Fälle Partial-D-Typen. Hier kam es in 16 Fällen zur Entdeckung neuer Rhesusallele. In 75 % der Fälle wurde keine D Veränderung diagnostiziert.

Diskussion: Im ABO Blutgruppensystem ergibt die im ersten Schritt durchgeführte SSP-PCR in 73% der Fälle ein schlüssiges Ergebnis. Durch weitere direkte Sequenzierung konnte in 3% der Fälle die SSP-PCR bestätigt werden, in 24% der Fälle lieferte die Sequenzierung jedoch ein genaueres Ergebnis. Die im Rhesus System diagnostizierten Weak-D-Typen stimmen größtenteils mit der, in anderen wissenschaftlichen Arbeiten beschriebenen, Häufigkeitsverteilung in Mitteleuropa überein. Größere Divergenzen gibt es bei der Verteilung von Partial-D-Typen. Die große Zahl unauffälliger D Bestimmungen lässt sich auf Vorgaben für die Rhesusbestimmung von Spendern zurückführen. Nach diesen müssen Spender unter gewissen Voraussetzungen – auch ohne auffällige Rhesus D Bestimmung – weiter molekularbiologisch abgeklärt werden.

Abstract

Analysis of human blood groups is a small field in medicine. However, it is important in blood transfusion as well as in pregnancies. For that reason, at least once in a lifespan every human may come in touch with this field in medicine. The ABO and the Rhesus systems are the best-known blood group systems. Their identification takes place with relatively simple methods. Not every test results in an unambiguous identification of the blood group. These discrepant results have to be clarified by further genetic analysis.

In this work, a variety of serological blood group phenotypes are presented and discussed. This is a retrospective analysis from 1.1.2012 to 31.12.2015. The phenotypical peculiarities were found in routine blood group testing for donors as well as for patients and further investigated by molecular biological methods. Important to know is, that these peculiarities were found in the area of the University Clinic for Blood Group Serology and Transfusion Medicine at Graz' state hospital. Blood samples were from patients and blood donors in Styria (locals and people with migration background)

Material and Methods:

Data were collected from laboratory documentation (electronic and paper form). Peculiarities in serological testing were highlighted by the technicians. Therefore, it was possible to focus on them at this research. The further molecular biological and genetic testing was done by SSP-PCR (a molecular biological analysis) or direct sequencing.

Results

In the years 2012 to 2015, 298.654 blood samples were investigated. 315 peculiarities were found in the ABO system. In the Rhesus system, 517 cases were conspicuous in the serological testing process through weak reactions. In 68% of the further analysis, weak D types were diagnosed. Just in 7% partial D types were found. In 16 cases, novel alleles were identified. In 75 cases no Rhesus D peculiarities could be found.

Discussion: In the ABO System the results were further tested by SSP-PCR. This analysis was found to be sufficient in 73%. By direct sequencing the SSP-PCR analysis could be proven in 3%. In 24% other alleles were found. Furthermore, it was possible to discover 14 new *ABO* alleles. In the Rhesus system weak D types correspond with the results in other papers about the distribution in central Europe. Bigger differences could be found in the partial D types distribution. The nondescript Rhesus D types can be ascribed to the standards of blood group testing. According these standards, blood donors have to be tested by molecular biological methods under certain circumstances.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract.....	vi
Inhaltsverzeichnis	vii
Glossar und Abkürzungen.....	ix
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xi
1 Einleitung	12
2 ABO-System	13
2.1 Genetische Grundlagen	13
2.2 Frequenz von ABO Gruppen.....	19
2.3 Phänotypen und ihre Untergruppen	20
2.4 Nomenklatur	22
3 Das Rhesus-System.....	23
3.1 Hintergrund	23
3.2 Genetische Grundlagen.....	24
3.3 Nomenklatur	27
3.4 Phänotyp und Untergruppen	27
3.4.1 <i>Weak-D-Typ</i>	27
3.4.2 <i>Partial-D-Typ</i>	28
4 Material und Methoden	30
4.1 Serologische Blutgruppen Bestimmung	31
4.1.1 <i>ABO Bestimmung</i>	31
4.1.2 <i>Rhesusbestimmung</i>	35
4.2 Molekulare Analytik	36
4.2.1 <i>Genotypisierung mittels SSP- PCR</i>	36
4.2.2 <i>Sequenzierung nach Sanger (SBT)</i>	39
5 Ergebnisse – Resultate	40
5.1 ABO-System.....	40

5.1.1	<i>Ergebnisse ABO SSP – PCR</i>	41
5.1.2	<i>Ergebnisse ABO-SBT</i>	43
5.2	Ergebnisvergleich SSP-PCR und SBT-Analyse	45
5.3	Rhesus-System	46
6	Diskussion	49
6.1	ABO System	49
6.2	Rhesus	54
6.2.1	<i>Weak-D-Typen</i>	54
6.2.2	<i>Partial-D-Typen</i>	58
6.2.3	<i>Komplexere Veränderungen</i>	61
6.2.4	<i>Keine D Anomalie</i>	61
6.3	Zusammenfassung.....	62
7	Literaturverzeichnis	64

Glossar und Abkürzungen

Allele	Ausprägung eines Gens oder eines genetischen Markers, die auf homologen Chromosomen am gleichen (Gen) Locus lokalisiert sind (nach 1; S. 55)
Antigen	Substanz, die von einem Organismus als fremd oder eigen erkannt wird und eine spezifische Immunantwort (Bildung von Antikörpern oder spezifischer T-Lymphozyten) bzw. eine Immuntoleranz (Selbstantigen) auslöst. (nach 1; S. 113)
Antikörper	nach ihrer Funktion, mit entsprechendem Antigen spezifisch (selektiv) zu reagieren (Antigen-Antikörper-Reaktion), lautende Bezeichnung für Immunglobuline (nach 1; S. 116)
Chromosomen	Träger der genetischen Information, intensiv färbare, faden- oder schleifenförmige Bestandteile des Zellkerns (nach 1; S. 385)
Erythrozyten	rote Blutkörperchen (nach 1; S. 625)
Genotypus	Gesamtheit aller Erbanlagen eines Organismus (dominante und rezessive Gene bzw. Allele), die den Phänotyp bestimmen (nach 1; S.745)
Phänotypus	Summe aller in einem Einzelwesen vorhandenen Merkmale (nach 1; S.1613)

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Genotyp / Phänotyp</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 2 ABO: molekularbiologische Grundlagen.....</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 3 A,B,O- und Bombay-Typ (14).....</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 4 Genetik RhD/RhCE.....</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 5 Polymorphismen für Weak-D-Typen(30).....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 6 RhD Varianten</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 7 Reaktionsstärken in der serologischen Testung</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 8 Beispiel serologische ABO Bestimmung</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 9 uneindeutiges serologisches Ergebnis.....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 10 Zyklus einer PCR</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 11 Ergebnis einer SSP</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 12 Sequenzierung nach Sanger</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 13 Verteilung von ABO Blutgruppen</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 14 Allel Zusammensetzung ABO SSP.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 15 ABO - SBT Ergebnisse</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 16 Vergleich SSP mit SBT Ergebnissen.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 17 Indikationen für weiterführende Rhesusabklärung.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 18 Ergebnisse weiterführender Rh Untersuchung.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 19 Mannigfaltigkeit der Weak-D-Typ Ergebnisse.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 20 Verteilung der Partial-D-Typ Ergebnisse</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 21 Unterteilung komplexer Rhesus-Veränderungen</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 22 Weak-D-Typ Verteilung in Oberösterreich</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 23 Partial-D-Typen in Oberösterreich.....</i>	<i>58</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Serologische ABO Bestimmung</i>	18
<i>Tabelle 2 bevölkerungsspezifische Frequenz von ABO</i>	19
<i>Tabelle 3 Nomenklatur im ABO System</i>	22
<i>Tabelle 4 ethnische Unterschiede von Rhesus Antigenen</i>	25
<i>Tabelle 5 Zusammenhang Phänotyp/Genotyp im Rhesus System</i>	26
<i>Tabelle 6 Ergebnisse serologischer Rhesus Bestimmung</i>	35
<i>Tabelle 7 Anzahl durchgeführter BG-Bestimmungen 2012-2015</i>	40
<i>Tabelle 8 Häufigkeit serologischer ABO Auffälligkeiten</i>	41
<i>Tabelle 9 Ergebnisse der SSP ABO Bestimmungen</i>	41
<i>Tabelle 10 neu gefundene ABO Allele</i>	44
<i>Tabelle 11 Häufigkeit serologischer Rhesus Auffälligkeiten</i>	46
<i>Tabelle 12 Weak-D-Typ Verteilung in Tirol, Nord- und Südwest Deutschland</i>	55
<i>Tabelle 13 Gegenüberstellung Partial-D-Typen Linz/Graz</i>	58
<i>Tabelle 14 Partial-D-Typen Verteilung Tirol / Norddeutschland</i>	59

1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist die retrospektive Analyse serologisch auffälliger Blutgruppenbefunde und die Erfassung der genetischen Varianten im ABO und Rhesussystem, die diesen zu Grunde liegen.

Analysiert wurden Blutgruppenbefunde von SpenderInnen und PatientenInnen aus dem Einzugsgebiet der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin in Graz. Serologisch auffällige Befunde, also solche, die kein eindeutiges Ergebnis in der Typisierung ergeben haben, wurden routinemäßig mittels genetischer Methoden analysiert und dann – in den weitaus meisten Fällen – ein eindeutiger Befund erstellt.

Grundsätzlich werden in der Spenderdiagnostik als auch in der Patientendiagnostik nur – von wenigen Ausnahmen abgesehen – die Blutgruppensysteme ABO und Rhesus untersucht. Daher konzentriert sich die genetische Untersuchung und Auswertung auf diese beiden Blutgruppensysteme.

Zum Verständnis und zur Interpretation der Ergebnisse ist es notwendig, einige Grundlagen zu den genannten Systemen voranzustellen.

2 ABO-System

2.1 Genetische Grundlagen

Determiniert wird die ABO Blutgruppe eines Menschen über Oberflächenantigene. Die vier wichtigsten lauten A1, A2, B und O. Diese werden wiederum über das *ABO*-Gen, dem mehrere Allele zu Grunde liegen, bestimmt. Die Allele sind auf dem Chromosom 9 platziert.

Hierbei gilt, dass A^1 dominant über A^2 ist (A^1 setzt sich in der Ausprägung gegenüber A^2 durch) und A^1 oder A^2 kodominant mit B auftreten (A^1/A^2 existieren in der Ausprägung neben B , es setzen sich beide durch). A^1 , A^2 sowie B sind dominant gegenüber H . Hinzukommen die Gene für das H-Antigen (H), sowie Sekretor (Se , se), welche am Chromosom 19 vertreten sind. (2)

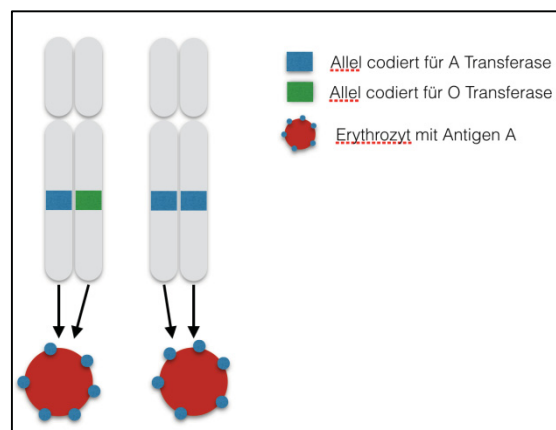


Abbildung 1, Genotyp / Phänotyp

Abbildung 1 zeigt beispielhaft, dass ein Phänotyp aus zwei verschiedenen Genotypen resultieren kann. Links ist der heterozygote Genotyp (A/O) dargestellt, rechts der homozygote (A/A). In beiden Fällen wird die Blutgruppeneigenschaft A ausgeprägt.

H stellt die Grundsubstanz der ABO-Antigene dar und kommt somit in allen menschlichen roten Blutzellen vor. Sie wird bei allen Menschen exprimiert, am stärksten jedoch bei denen mit der Blutgruppe O und bei TrägerInnen der Blutgruppe AB in geringster Anzahl. Geordnet von der stärksten zur schwächsten Reaktivität des H-Antigens mit Anti-H in der serologischen BG Bestimmung gilt: $O > A2 > A2B > B > A1 > A1B$ (3).

Eine Übersicht der verschiedenen Phänotypen zeigt Tabelle 2.

Für die Blutgruppen A, B und AB dient die H-Substanz als Grundstein für weitere Modifikationen. Diese geschehen über so genannten Transferasen. Das sind Enzyme, die chemische Prozesse katalysieren, indem chemische Gruppen übertragen werden. (1)

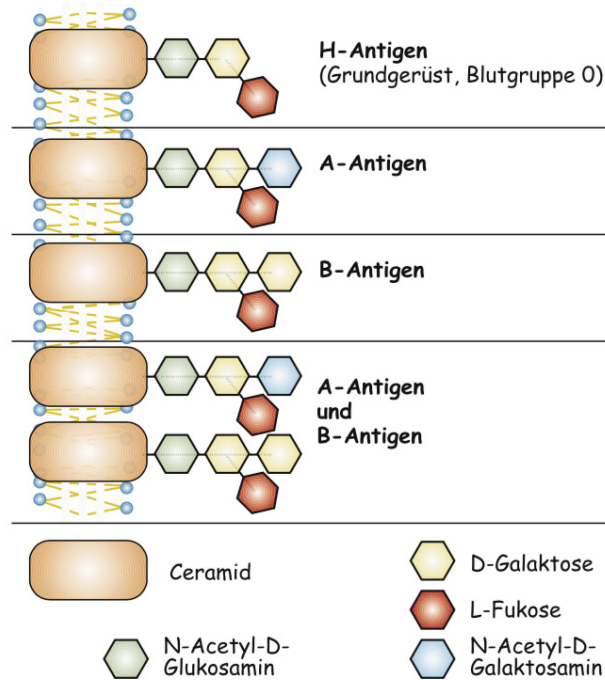


Abbildung 2, ABO: molekularebiologische Grundlagen

Abbildung 2, übernommen aus (4), zeigt den Aufbau unterschiedlicher Antigene im ABO System. Man erkennt, dass H bei allen 4 Gruppen vorkommt und dass dieses dann bei den Antigenen A und B durch die Bindung von Zuckerresten modifiziert wird.

Die für A beziehungsweise B codierenden Allele unterscheiden sich in 7 Nukleotiden, (SNPs: single nucleotid Polymorphismus). Dadurch werden vier Aminosäuren ausgetauscht, welche zu einer Änderung der A/B-Transferase-Spezifität führt. (5)

Das A Allel (*A101*) codiert für die α 1 \rightarrow 3 N-Acetylgalactosaminyltransferase (A-Transferase), das B-Allel (*B101*) hingegen für die α 1 \rightarrow Galactosyltransferase (B-Transferase). (6–9)

Die A-Transferase hängt ein N-Acetylgalactosamin an die H-Substanz, die B-Transferase eine D-Galactose. TrägerInnen von AB haben beide Transferasen gleichermaßen; beide Antigene werden an die H-Substanz angehängt.

Das klassische *O*-Allel weist im Vergleich zum *A*-Allel eine Deletion einer einzelnen Base im Exon 6, an der Nukleotidposition 261 (261delG) auf. Dies führt aufgrund der Verschiebung des Leserasters bei der Proteinsynthese zu einem stark verkürzten, inaktiven Protein. Ist das *O*-Allel auf beiden Chromosomen vorhanden, kann die H-Substanz nicht modifiziert werden, die Erythrozyten tragen weder einen A-Zucker noch einen B-Zucker, man bezeichnet sie daher als Blutgruppe O. (5) Mittlerweile kennt man 59 verschiedene genetische Modifikationen, die zur Inaktivität der A/B Transferase führen. (10)

Der Unterschied zwischen den Blutgruppeneigenschaften A1 und A2 ist hauptsächlich quantitativ aber auch qualitativ (Fehlen des A1 Zuckers). Bezüglich dieses Themas gibt es in der Wissenschaft jedoch nach wie vor Diskussionen. Gesichert ist, dass die A2 Transferase weniger effizient arbeitet als die A1-Transferase, und somit weniger H-Substanz umgewandelt wird. Um den Unterschied serologisch feststellen zu können, benötigt man spezifische Antikörper. (3,11)

Das A1 Antigen lässt sich serologisch durch das *Dolichos-biflorus*-Lektin, einem Pflanzenstoff, nachweisen. Dieses reagiert als Anti-A1. Das A2 lässt sich durch das *Ulex-europaeus*-Lektin von A1 abgrenzen. Dieser Stoff des Stechginsters fungiert als Anti-H. (12)

Zwei Regionen am Chromosom 19 codieren für zwei Enzyme mit ähnlicher Substratspezifität. Der *H*-Lokus und der *Se*-Lokus.

Der *H*-Lokus codiert für die Fucosyltransferase 1 (FUT1). Diese spielt eine elementare Rolle für den Aufbau der H-Substanz. Der *H*-Lokus muss entweder homozygot (als *H/H*) oder heterozygot (als *H/h*) vorhanden sein, damit H-Substanz gebildet werden kann. Gibt es hingegen einen homozygoten Defekt (*h/h*) in der Codierung für die H-Substanz, so wird keine H-Substanz gebildet. Die nachgeschaltete Glykosyltransferase vom Chromosom 9 kann kein weiteres Kohlenhydrat daran binden, es kommt zur Ausprägung des sogenannten Bombay Typs. (13)

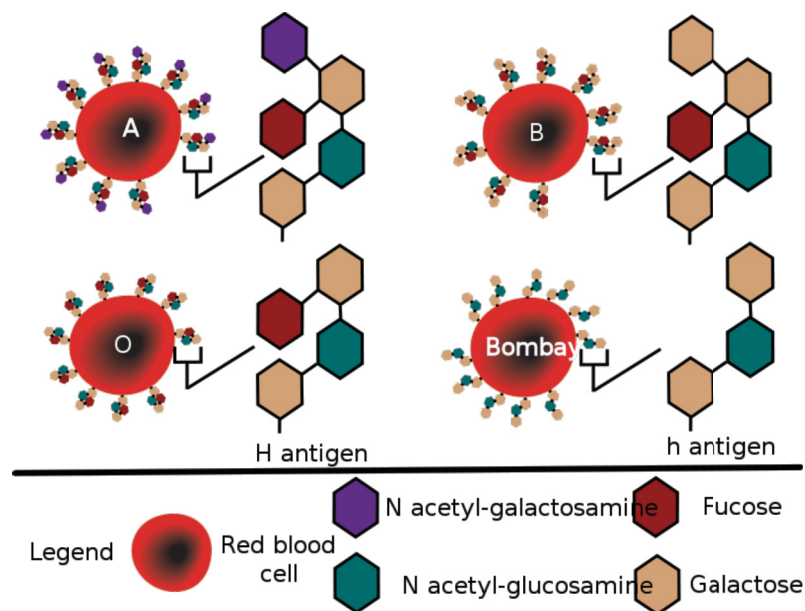


Abbildung 3, A,B,O- und Bombay-Typ (14)

Abbildung 3 übernommen von (14): Die Oligosaccharidstruktur des A, B, O und Bombay Phänotyps wird dargestellt. Fehlt das H-Antigen kommt es zur Ausprägung des Bombay-Phänotyps.

Se codiert für die Fucosyltransferase 2 (FUT2). Diese bildet ein lösliches H Antigen, das in allen Körperflüssigkeiten bis auf Liquor physiologisch ausgeschieden wird. Auch hier wird wieder dominant codiert. So scheiden 80 % der Bevölkerung ABO-Substanz über Körperflüssigkeiten wie Speichel oder Urin aus. Diese sind entweder heterozygot für eine funktionelle Fucosyltransferase (*Se/se*) oder homozygot (*Se/Se*) und werden als „Sekretoren“ bezeichnet. Menschen mit der Kombination *se/se* (Non-Sekretor) scheiden hingegen diese Substanz nicht aus (Vgl. Abb.1:). Rechnerisch sowie empirisch ergibt sich hier eine Bevölkerungsgruppe von 20%. (2,13).

Ist weder ein funktionelles *H*-Allel noch ein *Se*-Allel vorhanden, kommt es zur Ausprägung des sogenannten Bombay-Typ. Man findet auf den Erythrozyten sowie in Körperflüssigkeiten wie Speichel oder Harn, keine H-Substanz, im Serum hingegen hochtitrig Anti-H.

Dieses Phänomen wurde als erstes in Indien beschrieben. Dort tritt der Bombay-Typ gemeinsam mit dem Para-Bombay-Typ mit einer Häufigkeit von 1 in 10.000 auf. Noch häufiger kommt er in Taiwan mit einer Häufigkeit von 1:8.000 vor, in Europa hingegen nur mit einer Häufigkeit von 1:1.000.000.

Beim Para-Bombay-Phänotyp ist die H-Substanz gering an den roten Blutzellen vorhanden, und kann im Speichel fehlen. Es gibt eine schwächere Anti-H-Aktivität. Der Genotyp kann sich als *Se/Se* oder *Se/se* manifestieren.

Relevant ist diese Erkenntnis, da Individuen mit diesem Phänotyp Anti-H, Anti-A und Anti-B im Blut haben. Für die Transfusionsmedizin bedeutet dies, dass Empfänger mit einem Bombay Phänotyp nur mit Bombay-Blut versorgt werden können, da deren im Serum vorhandene Antikörper, sowohl mit A, B als auch O Antigenen der Spender-Erythrozyten reagieren und eine hämolytische Transfusionsreaktion machen können. (13,15)

Bei der ABO Blutgruppenbestimmung müssen neben den oben erwähnten Antigenen auf den Erythrozyten, auch der entsprechende Antikörperstatus im Serum bestimmt werden (Serumgegenprobe). Diese Antikörper, die sogenannten Isoagglutinine, richten sich jeweils gegen die im Blut nicht vorhandenen ABO Antigene. (16).

Diese Erkenntnis dokumentierte erstmals *Karl Landsteiner* 1900 und 1901 in Wien in seinen Publikationen, wofür er 1930 den Nobelpreis für Medizin erhalten hat. Antikörper in Seren welche mit den damaligen Vollblutkonserven transfundiert wurden, führen zu intravasaler Hämolyse mit zum Teil fatalen Folgen. (17)

Diese ABO-Antikörper werden in den ersten sechs Lebensmonaten gebildet, da humansymbiotische Bakterien (Bakterien, die im gesunden Menschen vorkommen und mit diesem in Symbiose leben) Strukturen an ihrer Oberfläche besitzen, die den Antigenen des ABO-Systems ähneln (12). Anti-A und Anti-B sind typischerweise Antikörper der Klasse IgM. (18)

Eine Antigen-Antikörper Bindung mit IgM Antikörpern aktiviert die Komplementkaskade vollständig. Dadurch kommt es zu einer sofortigen Hämolyse der Erythrozyten in den Gefäßen. So ist die Antigen-Antikörper Reaktion mit IgM Antikörpern gefährlicher als mit IgG Antikörpern, was auch die abgeschwächten klinischen Auswirkungen im Rhesus System erklärt. (2,19)

Gibt es bei den serologischen Untersuchungen Diskrepanzen, dass zum Beispiel die Serumgegenprobe nicht zu dem Ergebnis der Erythrozyten-Antigene passt, so muss eine weitere Abklärung erfolgen. (20)

Eine klassische Blutgruppenbestimmung ist in Tabelle 1 mit den zu erwartenden Ergebnissen gezeigt. Für eine komplette ABO-Blutgruppenbestimmung braucht es die Antigen-Testung und die Serumgegenprobe. Im Normalfall stimmen die Ergebnisse der erythrozytären Testung und der Serumgegenprobe überein. Je nach Blutgruppe kommt es zu folgenden Reaktionen.

<i>Blutgruppe</i>	Erythrozytäre Testung (Antikörper bekannt)			Serumgegenprobe (Antigen bekannt)		
	A	B	AB	A1	A2	B
<i>A</i>	+	-	+	-	-	+
<i>B</i>	-	+	+	+	+	-
<i>AB</i>	+	+	+	-	-	-
<i>O</i>	-	-	-	+	+	+

Tabelle 1 Serologische ABO Bestimmung

Tabelle 1 übernommen aus (2) stellt die Ergebnisse serologisch eindeutiger Blutgruppen Bestimmungen gegenüber. Ein Plus bedeutet eine Reaktion der zu untersuchenden Erythrozyten bzw. des zu untersuchenden Serums mit dem, in der Test-Kammer/Karte vorliegendem Antikörper/Antigen. Ein Minus ein Ausbleiben einer solchen Reaktion.

2.2 Frequenz von ABO Gruppen

Die Verteilung der ABO Blutgruppen variiert bevölkerungsabhängig. Dies hat zur Folge, dass bestimmte Blutgruppen in manchen Ethnien häufiger vorkommen als in anderen. Einen Überblick bietet Tabelle 2.

Population (Probandenzahl)	Angaben in %					
	O	A1	A2	B	A1B	A2B
Indigene Völker Südamerikas (539)	100	0	0	0	0	0
Vietnamesisch (220)	45	21,4	0	29,1	4,5	0
Australische Aborigines (126)	44,4	55,6	0	0	0	0
Deutsche (100.000)	42,8	32,5	9,4	11,0	3,1	1,1
Bengalen (241)	22	22,2	1,8	38,2	14,8	0,9
Samen [Lappen] (324)	18,2	36,1	18,5	4,8	6,2	6,2

Tabelle 2 bevölkerungsspezifische Frequenz von ABO

Tabelle 2, übernommen aus (3), zeigt die Diversität der ABO Blutgruppen Verteilung in Prozent in unterschiedlichen Ethnien.

Bemerkenswert ist hier, dass bei indigenen Völkern die Blutgruppe O mit 100% auftritt, obwohl diese nach den Gesetzen der Vererbung seltener auftreten müsste, da es für die Ausprägung der Blutgruppe O auf beiden Chromosomen ein O-Allel benötigt, wohingegen – wie oben erwähnt – A und B dominant gegenüber O sind (4).

Die Blutgruppe O ist in Gegenden, in denen die Pest nie oder nur in der Neuzeit ausgebrochen ist, stark vertreten. Ein Versuch, bei dem Kaninchen abgetötete Pestbakterien (*Pasteurella pestis*) über Tage hinweg injiziert wurden, hat gezeigt, dass diese Antikörper bilden die mit Blutzellen der Gruppe O agglutinieren. Hier hätten Träger der Blutgruppe O einen Selektionsnachteil, da der Körper physiologisch keine Antikörper gegen eigenes Gewebe bildet. Es würden dadurch zumindest weniger Antikörper gegen die Pestbakterien gebildet werden können; der Erreger wird schwächer bekämpft. (21,22)

2.3 Phänotypen und ihre Untergruppen

In Europa ist aufgrund der Häufigkeit der Blutgruppe A die Unterteilung in A₁ (80%) und A₂ (20%) zu finden.

Auf A₁-Erythrozyten finden sich mehr Antigene als auf A₂-Erythrozyten. Zusätzlich weisen A₁-Erythrozyten das Antigen A₁ auf. Es zeigt sich ein Unterschied in der Struktur, weswegen man sie im Labor serologisch mittels *Dolichos-biflorus*-Lektin differenzieren kann.

In Seren von Personen mit A₂-Erythrozyten ist häufig ein sogenanntes irreguläres Anti-A₁-nachweisbar. Dies wird durch die Agglutination mit A₁-Erythrozyten, die für die Blutgruppenbestimmung vorgeschrieben sind, sichtbar.(12,20)

Zusätzlich gibt es noch viele weitere Varianten der A- und B-Allele, die für die Ausprägung von ABO-Subgruppen im Phänotyp verantwortlich sind.

Beispiele für abgeschwächte A Eigenschaften und ihre Reaktionen bei der serologischen BG-Bestimmung:

- A₃ reagiert mit den meisten Anti-A-Seren. Die Reaktion ist jedoch noch schwächer ausgeprägt als bei A₂.
- A_x-Erythrozyten lassen sich nur mit sehr hochtitrigen Anti-AB-Seren zur Reaktion bringen.
- Blutzellen der Gruppe A_m lassen sich gar nicht mehr mit den üblichen Testseren agglutinieren und werden deswegen phänotypisch zur Blutgruppe O gezählt. (2)

Bei der Blutgruppe B lässt sich eine ähnliche Abschwächung wie bei A auf A₂ nicht beobachten. Dennoch gibt es genetische Varianten der B-Transferase, seltene B-Allele, die für eine phänotypisch schwache Ausprägung der Blutgruppe B verantwortlich sind.(12)

Bei der Blutgruppe B ist die Unterscheidung nur bei B₃ serologisch gut möglich. Diese findet man jedoch am ehesten in Ostasien (12,23).

Cis AB

In gewissen Fällen kann es vorkommen, dass sowohl das für A als auch das für B codierende Allel als Komplex vererbt wird. (2). Es ist daher möglich, dass das Kind eines Vaters mit der Blutgruppe AB und einer Mutter mit der Blutgruppe O, die Blutgruppeneigenschaften AB trägt. In diesen seltenen Fällen wurde dem Kind die AB Eigenschaften, die gekoppelt auf einem väterlichen Allel vorliegen, vererbt. Typischerweise ist hier das B-Antigen schwach ausgeprägt, sodass in der Regel der Phänotyp nicht mit einem „normalen“ AB verwechselt werden kann (3).

2.4 Nomenklatur

Die verschiedenen Blutgruppensysteme (derzeit sind 36 bekannt) werden von der *International Society of Blood Transfusion* oder kurz ISBT eingeteilt und nach dem Datum der erstmaligen Beschreibung gelistet. Das ABO-System als das erste beschriebene Blutgruppensystem hat demnach die Nummer 001. Der Name sowie das Symbol sind als ABO festgelegt (22). Anzumerken ist hier, dass, obwohl im Sprachgebrauch „A, B, null“ verwendet wird, es sich bei der Schreibweise um ein großes O handelt.

Die BGMUT (Blood Group Antigen Gene Mutation Database) ist eine Datenbank, in der sämtliche Variationen der Gene, die für die Ausprägung der Blutgruppeneigenschaften eine Rolle spielen, dokumentiert werden.(24)

Die hier häufig verwendete Nomenklatur hat jedoch eine andere Schreibweise. So entspricht *ABO*A1.01* im ISBT-System *A101* im BGMUT System. (22)

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird die BGMUT Nomenklatur verwendet.

Phänotyp	ISBT Nomenklatur	BGMUT Nomenklatur
A ₁	ABO*A1.01	A101
B	ABO*B.01	B101
O	ABO*O.01.01	O01
A _x /A _{weak}	ABO*AW31.02-05	Ax03
O?	ABO*O.05	O52

Tabelle 3 Nomenklatur im ABO System

Tabelle 3: (10,25) zeigt beispielhaft den Unterschied zwischen der ISBT und der BGMUT Nomenklatur. *O?* bedeutet eine Diskrepanz in der serologischen Blutgruppenbestimmung zwischen Antigentestung und Serumgegenprobe

3 Das Rhesus-System

3.1 Hintergrund

Das Rhesus-System ist im Zusammenhang mit der Schwangerschaft und einer daraus resultierenden Blutgruppen Unverträglichkeit zwischen Mutter und ungeborenem Kind von besonderer Bedeutung. Aufgrund der hohen Immunogenität kommt es häufig zur Bildung irregulärer Antikörper. Es ist zudem das wichtigste auf Proteinen basierende Blutgruppensystem. Bemerkenswert ist auch, dass die Antigene, anders als beim ABO-System, ausschließlich auf Erythrozyten und keinem anderen Gewebe zu finden sind. (26)

Das Rhesussystem umfasst die fünf Rhesusmerkmale D (RhD, *Rhesusfaktor positiv*), C, c, E und e, die in unterschiedlichen Kombinationen auftreten und serologisch nachweisbar sind. Wird Rhesus D-positives Blut in einen Rhesus-negativen Menschen transfundiert, so kommt es in bis zu 80 Prozent der Fälle zu einer Immunisierung gegen den Rhesusfaktor D und damit zur Bildung eines sogenannten Anti-D Antikörpers. Dies ist besonders bei Schwangerschaften, in denen eine Rhesusinkompatibilität zwischen Mutter und Kind vorliegt (Mutter Rhesus negativ, Kind Rhesus positiv), von Bedeutung.

Eine eindeutige Rhesus Blutgruppenbestimmung ist die Voraussetzung, um ein Immunisierungsrisiko für den Empfänger von Rhesus D positivem Blut, beziehungsweise das Risiko eines durch Rhesusinkompatibilität ausgelösten Morbus Hämolyticus Neonatorum vorherzusagen, und in weiterer Folge Konsequenzen für die medizinische Behandlung abzuleiten. (12)

Die durch *RHD* Gen und *RHCE* Gen am Chromosom 1 codierten Proteine RhD und RhCE sind zwei Transmembranproteine mit einer Länge von jeweils 416 Aminosäuren. Das entstehende Protein ist zwölf Mal durch die Membran gezogen. (12)

Eine schematische Darstellung –mit möglichen Varianten– zeigt Abb. 5.

3.2 Genetische Grundlagen

Determiniert werden die Rhesus-Antigene durch zwei eng benachbarte Loci am P-Arm des Chromosoms 1.

Am Locus 1 codiert das *RHD* Gen das Rhesus D Protein (Rh D). Fehlt der *RHD* codierende Abschnitt auf beiden Chromosomen im Genotyp (homozygot nicht vorhanden), beschreibt man den daraus resultierenden Rh D negativen Phänotyp als „dd“. Wobei „d“ die Abwesenheit von D darstellt, nicht jedoch ein eigenes Gen oder Antigen. Es gibt auch keinen korrespondierenden Antikörper der ein d-Antigen definieren würde. (12)

Am Locus 2 befindet sich das Gen *RHCE*, das für die übrigen Antigene Rh C, c sowie E, e codiert. (27)

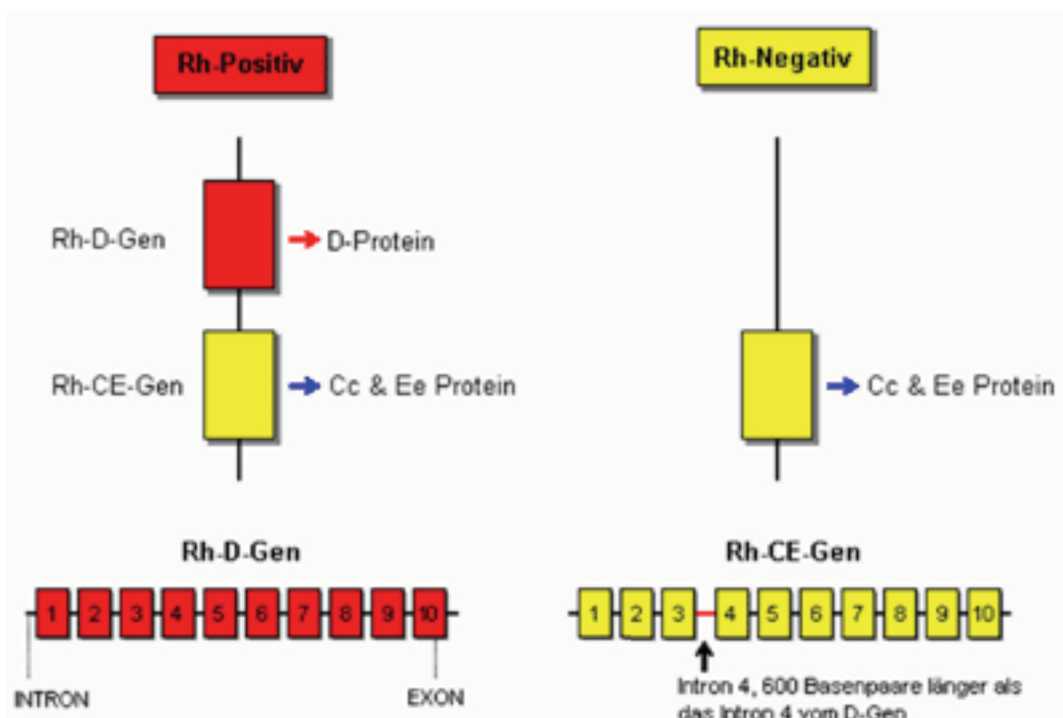


Abbildung 4 Genetik RhD/RhCE

Abbildung 4 aus (28): Genetische Konstellation von Rh D positivem und Rh negativem Phänotyp. Ist das *RHD* Gen vorhanden, kommt es zur Expression eines D Proteins in der Membran der Erythrozyten. Fehlt das *RHD* Gen auf beiden Chromosomen, so kommt es nur zur Expression vom CE-Protein mit C/c beziehungsweise E/e.

Beim Erbgang werden diese Allele in Kombination von 8 möglichen Haplotypen vererbt. Diese sind in der Nomenklatur nach Fisher: *cde*, *cDe*, *cdE*, *cDE*, *Cde*, *CDe*, *CdE* und *CDE*. Diese kommen populationspezifisch mit einer bestimmten Frequenz vor.(3) Dies zeigt Tabelle 4.

Da *RHD* und *RHCE* eng nebeneinander lokalisiert sind und über eine recht hohe Sequenzhomologie verfügen, sind zahlreiche genetische Variationen möglich, die meisten davon aber selten oder nur populationspezifisch vorkommend. (2) Dabei kann es zu Abschwächungen der einzelnen Rhesusantigene, oder auch zum Verlust von z.B. Rh D kommen. (26)

Nomenklatur	Häufigkeit [%]		
	Deutsche	Chinesen	Afrikaner
<i>Fisher/Race CDE</i>			
<i>CDe</i>	43,1	73,0	13,4
<i>cde</i>	39,4	2,3	22,3
<i>cDE</i>	13,6	18,7	2,9
<i>cDe</i>	2,1	3,3	52,9
<i>Cde</i>	1,1	1,9	2,7
<i>cdE</i>	0,6	k.A.	k.A.
<i>CDE</i>	0,1	0,4	5,8
<i>CdE</i>	<0,01	0,4	k.A.

Tabelle 4 ethnische Unterschiede von Rhesus Antigenen

Tabelle 4 aus (12) zeigt die bevölkerungsspezifische Verteilung der Häufigkeit von Rhesusallelen

Die Genotypen können zu folgenden Phänotypen kombiniert werden und kommen in der mitteleuropäischen Bevölkerung wie folgt vor:

Phänotyp	Mögliche Genotypen	Phänotyp	Mögliche Genotypen
CcDee (33,97%)	<i>CDe/cde</i>	ccDEE (2,18%)	<i>cDE/cDE</i>
	<i>CDe/cDe</i>		<i>cDE/cdE</i>
	<i>Cde/cDe</i>	ccDee(2,17%)	<i>cDe/cde</i>
	<i>Cde/cDe</i>		<i>cDe/cDe</i>
CCDee (17,18%)	<i>CDe/CDe</i>	Ccddee (0,74%)	<i>Cde/cde</i>
	<i>CDe/Cde</i>	ccddEe (0,49%)	<i>cdE/cde</i>
Ccddee (15,34%)	<i>cde/cde</i>	CCDEe (0,19%)	<i>CDE/CDe</i>
CcDEe (12,42%)	<i>CDe/cDE</i>		<i>CDE/Cde</i>
	<i>CDe/cdE</i>	CcDEE (0,06%)	<i>CDE/cDE</i>
	<i>Cde/cDE</i>		<i>CDE/cde</i>
	<i>CDE/cDe</i>	CCddee (0,01%)	<i>Cde/Cde</i>
	<i>CdE/cDe</i>	CcddEe (0,01%)	<i>Cde/cdE</i>
ccDEe (11,89%)	<i>cDE/cde</i>		<i>CdE/cde</i>
	<i>cDE/cDe</i>		
	<i>cdE/cDe</i>		

Tabelle 5 Zusammenhang Phänotyp/Genotyp im Rhesus System

Tabelle 5 nach (2) zeigt die Häufigkeit verschiedener Phänotypen mit den möglichen zu Grunde liegenden Genotypen. Außerdem wird die Häufigkeit dieser in der mitteleuropäischen Bevölkerung dargestellt.

3.3 Nomenklatur

Das Rhesussystem kennt mehrere Nomenklaturen. Zum einen nach *Fisher* und *Race*, bei der die genetische Ausstattung für C/c, D/d und E/e der Reihe nach angegeben wird. Außerdem die Nomenklatur nach *Wiener*, wobei für jeden Phänotyp ein eigenes Kürzel verwendet wird (R1, R2, r, u.a.). Zudem kennt man noch eine numerische Form der Nomenklatur welche von *Rosenfield* verwendet wurde und sich ideal für elektronische Datenverarbeitung eignet. (19)

3.4 Phänotyp und Untergruppen

Auch im Rhesus Blutgruppensystem gibt es Varianten. Dies lässt sich durch folgendes wörtliches Zitat der ÖGBT Standards zusammenfassen:

„RhD-Varianten (Dvar, früher: D^{weak}) können quantitative (Weak-D-Typen) oder qualitative (Partial-D-Typen) Veränderungen aufweisen.“ (20)

Diese werden in den folgenden Unterkapiteln erklärt.

3.4.1 Weak-D-Typ

Zu diesem Phänotyp kommt es durch unterschiedliche, ein- oder mehrfache Punktmutationen im *RHD*-Gen. Diese führen zu einem Aminosäureaustausch im codierten Protein. Dieser Austausch ist meist innerhalb der erythrozyären Zellmembran oder intrazellulär lokalisiert. So kommt es zu einem quantitativ verringerten Einbau des Proteins in die Zellmembran; die eingebauten Proteine tragen, aus einer Vielzahl von Epitopen bestehend, extrazellulär das vollständige D Antigen, wenn eben auch in verringerter Anzahl. Bei den Weak-D-Typen I-III, die um die 95% aller Weak-D-Typen bei Kaukasiern ausmachen, konnte man bisher keine Allo-Anti-D-Immunsierung feststellen. PatientenInnen mit diesen Rhesus-Phänotypen können mit Rh D positivem Blut transfundiert werden und Schwangere mit diesem Phänotyp benötigen keine Rhesus-Prophylaxe. (26,29)

Das Vorkommen dieser Aminosäureveränderungen kann man schematisch wie folgt darstellen:

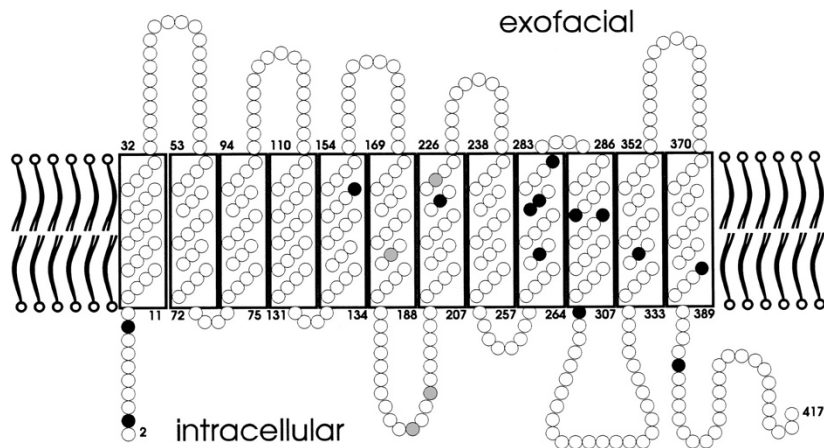


Abbildung 5, Polymorphismen für Weak-D-Typen(30)

Abbildung 5 nach (30) zeigt das Rhesus D Protein mit zwölf transmembranären Segmenten sowie sechs Schlaufen extrazellulär (*exofacial*) eingebaut in die Erythrozytenmembran. Die Punkte stellen Polymorphismen dar, welche bei Weak-D-Typen vorkommen können.

Zu einer Rh D Abschwächung kann es aber auch ohne Mutation der Basenabfolge kommen. Hier schwächt das C-Antigen das D-Antigen in den serologischen Effekten. Die Abschwächung nennt man Positionseffekt (*Ceppellini-Effekt*) und scheint hier durch das C Allel in Trans-Stellung hervorgerufen zu sein. (31)

3.4.2 Partial-D-Typ

Beim Vorliegen des Partial-D-Typen sind, im Gegensatz zu Weak-D-Typen, die Aminosäureaustausche so gelegen, dass die extrazellulären Proteinregionen des Rhesus D Proteins am Erythrozyten betroffen sind. So kommt es, dass Personen mit dieser Variante Antikörper gegen einzelne D-Epitope bilden können, auch wenn sie selbst als Rh D positiv kategorisiert wurden (12).

Dabei werden Antikörper gegen einzelne Epitope des Rh D Antigens gebildet, welche aufgrund des Vorhandenseins von genetischen Varianten im Vergleich zum vollständigen D Antigen fehlen. (3)

Ursächlich für Partial-D-Typen sind häufig Genkonversionen von *RHD* mit dem *RHCE*-Gen. Hierbei werden in das *RHD*-Gen einzelne Abschnitte oder auch ganze Exons aus dem *RHCE*-Gen eingefügt. Dadurch werden Hybridproteine exprimiert. Je nachdem, welche Epitope fehlen bzw. vorhanden sind, unterscheidet man "Kategorien". Die D-Kategorien III bis VI sind auf diesem Weg entstanden. (26)

Am häufigsten in der europäischen Bevölkerung ist die Kategorie VI (ca. 1:6000), deren Träger Antikörper gegen die fehlenden Epitope entwickeln können. Andere Kategorien können zwar grundsätzlich auch Antikörper entwickeln, tun dies aber eher selten. Daher sollte man vor allem Patienten mit einem Partial-D-Typ der Kategorie VI, grundsätzlich mit Rhesus-negativen Erythrozyten Konzentraten transfundieren. (32–34)

Abbildung 6 fasst die Unterschiede zwischen dem normalen D, einem Weak-D-Typ und einem Partial-D-Typ (hier als D-Variante beschrieben) nochmal zusammen.

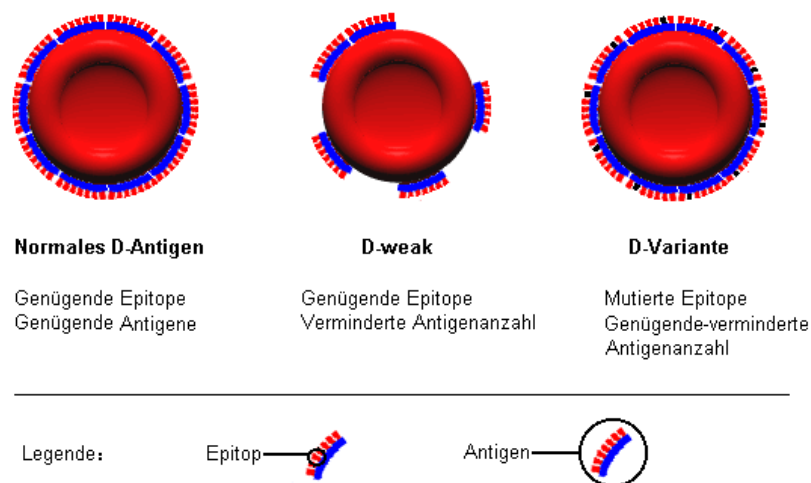


Abbildung 6 RhD Varianten

Abbildung 6 aus (35): Die Abbildung zeigt die Antigendichte von Erythrozyten mit normalem Rh D Phänotyp, einem Weak-D-Typ und einem Partial-D-Typ. Der Partial-D-Typ (im Bild als D-Variante bezeichnet) zeigt eine normale Antigendichte, jedoch sind einzelne Epitope verändert.

4 Material und Methoden

An der Klinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin Graz werden alle Blutproben von BlutspenderInnen und PatientenInnen standardgemäß auf die Blutgruppen ABO und Rhesus getestet. Sofern keine Antikörper gegen andere – hier nicht erwähnte – Blutgruppenantigene vorliegen, bleiben die Untersuchungen auf diese 2 Systeme beschränkt.

Im ersten Teil der Untersuchungen werden die Oberflächenantigene der Erythrozyten serologisch bestimmt. Es gibt mehrere Methoden wie diese Antigen-Antikörper-Reaktionen sichtbar gemacht werden können. Zum Beispiel auf Platten, in Röhrchen oder mit Gelkarten zum Beispiel von der Firma *Diamed (Bio-Rad)*. Der Vorteil von Gelkarten ist, dass die Sensitivität sehr hoch ist und sich der Arbeitsablauf – zumindest teilweise – automatisieren lässt. Zu einer vollständigen Blutgruppenbestimmung gehört im ABO-System – wie oben bereits dargestellt – aber auch die Untersuchung des Serums auf die darin vorkommenden regulären Antikörper (Serumgegenprobe).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Blutgruppen wurden auffällig, da sie in diesen Tests diskrepante Ergebnisse, zum Beispiel bei der ABO-Antigenbestimmung und Isoagglutinin-Bestimmung in der Serumgegenprobe, lieferten. Diese auffälligen Proben wurden weiter mit verschiedenen molekulargenetischen Methoden abgeklärt. Im Rhesus System wurden die serologischen Auffälligkeiten durch schwache Reaktionen der zu testenden Erythrozyten auffällig.

4.1 Serologische Blutgruppen Bestimmung

Die Gelkarten bestehen aus sechs so genannten Mikroröhrchen, die mit Granulat (Gelkügelchen aus Dextran) und je nach Untersuchung, mit spezifischen Antikörpern oder mit sogenanntem Neutralgel befüllt sind. (12) Die Standards, wie serologische Blutgruppenbestimmungen durchzuführen sind, werden von der *ÖGBT*, der österreichischen Gesellschaft für Blutgruppenserologie, Transfusionsmedizin, Regenerative Medizin und Immungenetik, vorgegeben. (20)

4.1.1 ABO Bestimmung

Bei der Antigentestung werden Erythrozyten des zu untersuchenden Blutes in die einzelnen Mikroröhrchen der Testkarten pipettiert. Reagiert der spezifische Antikörper mit den Oberflächenantigenen der Erythrozyten, zeigt sich dies in einer Agglutination (Verklumpung). Um diese sichtbar zu machen, werden die Karten anschließend zentrifugiert. Existiert eine starke Agglutination, so entsteht eine Matrix von Erythrozyten und Antikörpern, die zu groß ist, um sich durch die Beads drängen zu können. Die entstandene Matrix bleibt obenauf liegen. Reagieren Erythrozyten nicht, da sie keine Merkmale tragen, die mit den vorgelegten Antikörpern reagieren, so werden diese bei der Zentrifugation nach unten gedrückt. Es zeigt sich ein Sediment am Boden des Mikroröhrchens. (12)

Bei der ABO Blutgruppenbestimmung wird auch die Serumgegenprobe zur Bestimmung der Isoagglutinine durchgeführt. Dabei wird ebenfalls mit dem Gelkartensystem gearbeitet. Zum Plasma oder Serum der zu bestimmenden Probe werden in sogenannten Neutralgelkarten Testerythrozyten mit den Eigenschaften A1, A2, B und O hinzugefügt. Bei positiven Reaktionen agglutinieren die Antikörper aus dem zu untersuchenden Blut mit den entsprechenden Testerythrozyten. (12,36)

Die Kärtchen haben den Vorteil, dass die Unterscheidung nicht nur binär ist. Das bedeutet, dass man auch Abschwächungen kennt. Schwache Reaktionen erkennt man dadurch, dass die Matrix aus roten Blutzellen und Antikörpern nur teilweise durch das Granulat gedrückt wird. (12).

Die Reaktionsstärken werden durch die Angabe von einem oder mehreren Plus gekennzeichnet, wie Abb. 7 zeigt

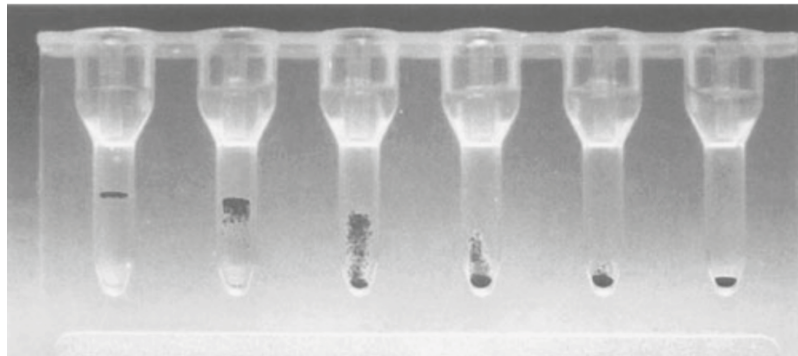


Abbildung 7 Reaktionsstärken in der serologischen Testung

Abbildung 7 übernommen aus (12): Hier lassen sich die hängengebliebenen Agglutinate (Antigen - Antikörper Komplexe) erkennen. Die Reaktionsstärke wird in Plus (+) angegeben. Je nach Stärke werden vier Plus als Maximum sowie ein Minus als Abwesenheit jeglicher Reaktion angegeben. Von links nach rechts in Abbildung 7 zeigt sich: 4+, 3+, 2+, 1+, +/-, -(12)

In der praktischen Ausführung zeigt sich folgendes Bild:

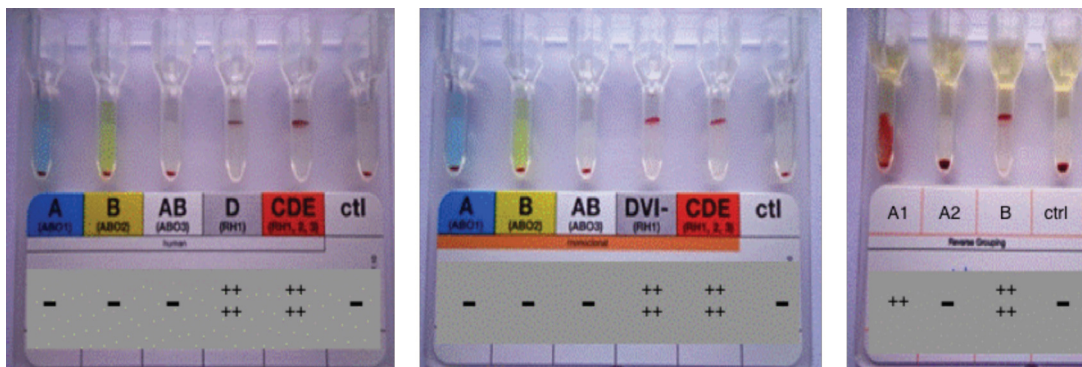


Abbildung 8 Beispiel serologische ABO Bestimmung

In Abbildung 8 (Erstellt an der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin Graz) erkennt man das Fehlen von A und B Antigenen in den ersten beiden Bildern durch die nach unten zentrifugierten Erythrozyten (A, B, und AB negativ). Dies entspricht der Blutgruppe O. Das Ergebnis für CDE fällt positiv aus. In der Serumgegenprobe erkennt man jedoch eine nur schwache Reaktion bei A1 und das Fehlen einer Agglutination bei A2. TrägerInnen der Blutgruppe O hätten jedoch Antikörper gegen A1, A2 und B im Serum. Man erwartet sich hier also ein vier Kreuz positives Ergebnis. Dieser Fall muss also weiter untersucht werden, da Serumgegenprobe und erythrozytäre Testung nicht zusammenpassen.

Auch bei der erythrozytären Testung kann es zu fraglichen Ergebnissen kommen wie Abbildung 9 zeigt:

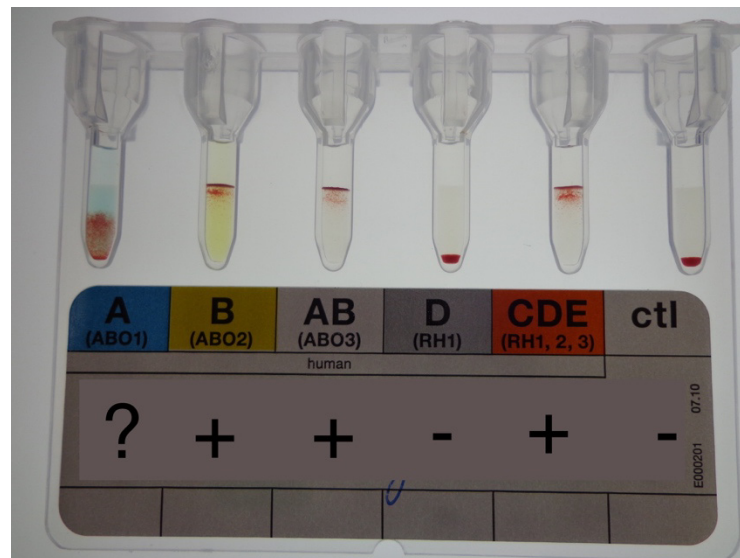


Abbildung 9 uneindeutiges serologisches Ergebnis

Abbildung 9 (Erstellt an der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin Graz) zeigt eine Reaktion bei der die Erythrozyten nur schwach mit Anti A reagieren. Hier ist die Diskrepanz also nicht durch widersprüchliche Ergebnisse bei erythrozytärer Testung und Serumgegenprobe zu finden, sondern vielmehr bei den Erythrozyten selbst.

4.1.2 Rhesusbestimmung

Das Rhesus D Antigen wird serologisch mittels zweier verschiedener Anti-D-Antikörper bestimmt. Von diesen muss zumindest einer monoklonalen Ursprungs sein. Werden zwei monoklonale Antikörper verwendet, ist darauf zu achten, dass diese von unterschiedlichen Klonen abstammen. Ist die Reaktion in beiden Fällen negativ und/oder gibt es in einem mit CDE kombinierten Test ein positives Ergebnis, so ist eine weiterführende Analyse zwingend notwendig. Außerdem muss auch hier eine Auto Kontrolle durchgeführt werden, um eventuell falsch positive Ergebnisse zu erkennen. (20)

Tabelle 6 fasst die möglichen Ergebnisse einer RhD Testung noch einmal zusammen.

Interpretation	Agglutination der PatientenInnen und SpenderInnen Erythrozyten durch:		
	1. Anti D Reagenz	2. Anti D Reagenz	Auto - Kontrolle
RhD positiv	+	+	-
RhD negativ	-	-	-
RhD Variante	schwach +	schwach +	-
RhD Variante	Unterschiedlich stark + Resultate		-
Nicht beurteilbar	-	+	-
Nicht beurteilbar	+ oder -	+ oder -	+

Tabelle 6 Ergebnisse serologischer Rhesus Bestimmung

Tabelle 6 nach (20): Man erkennt die verschiedenen möglichen Ergebnisse bei der serologischen Rhesus Bestimmung. Kommt es zu einem schwachen oder nicht beurteilbaren Ergebnis, so muss man eine weitere (molekularbiologische) Abklärung einleiten.

4.2 Molekulare Analytik

Kommt es zu Auffälligkeiten in den oben beschriebenen serologischen Tests (zum Beispiel, wenn die Ergebnisse der Erythrozyten-Testung und Serumgegenprobe nicht zusammenpassen), erfordert dies eine weitere Abklärung. Die dafür angewendeten Methoden werden in den folgenden Unterpunkten beschrieben.

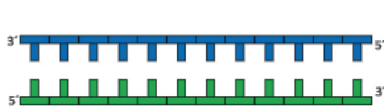
4.2.1 Genotypisierung mittels SSP- PCR

Der erste Schritt ist die Analyse des Genotyps auf häufiger vorkommende Genvarianten. Dazu dient die SSP-PCR, die *Sequenzspezifische Primer-PCR*.

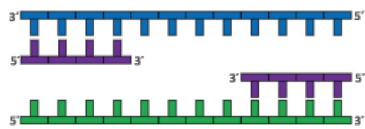
Grundlage hierfür ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), eine molekularbiologische Methode, bei der ein definiertes Target-Gen vervielfältigt wird. Dies geschieht in vielen aufeinander folgenden Zyklen, wobei ein Zyklus aus drei Schritten besteht.

In den käuflichen Testkits liegen Primer vor, die spezifisch an bekannte Varianten des Gens binden. (37,38)

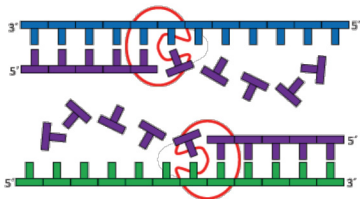
Die SSP PCR ist ein zyklischer Prozess und läuft wie folgt ab:



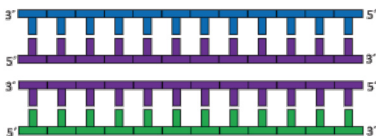
- 1) Denaturieren der DNA Doppelstränge: Durch das Erhitzen auf ca. 90°C werden die Wasserstoffbrücken gelöst, die DNA liegt in Einzelsträngen vor.



- 2) Die Primer binden an das Target-Gen mit einer spezifischen Annealing-Temperatur, bei der sich die Primer optimal an die komplementäre DNA anlegen können.



- 3) Dann kann die Polymerase die im Ansatz zur Verfügung gestellten freien Nucleotide am freien 3' Ende des Primers bzw. bereits angelagerter Nucleotide anknüpfen.



- 4) Am Ende eines Zyklus hat sich die vorliegende DNA verdoppelt.

Abbildung 10 Zyklus einer PCR

Abbildung 10 modifiziert nach (39) zeigt den schematischen Ablauf einer PCR

Für die SSP-PCR wird die Taq-Polymerase verwendet. Diese hat keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, das bedeutet, es gibt keine Korrekturleseaktivität. Passt also der Primer nicht zum vervielfältigenden DNA-Strang, so kommt es durch dieses Mismatch nicht zur Amplifizierung des Produktes. Liegt eine Übereinstimmung vor, kommt es zur Vervielfältigung des gewünschten Abschnittes.(12)

Anschließend werden die PCR-Produkte über Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Zusätzlich wird in jeder PCR ein Kontrollprimerpaar mitgeführt. Dieses Amplifikat wird mit einer spezifischen Kontrollbande am Gel sichtbar. Die entstehenden Muster der PCR Produkte in der Gelelektrophorese können dann mit Hilfe eines Auswerteschemas ausgewertet werden. Eingeschränkt wird die Aussagekraft durch die Anzahl der Primerpaare die im Kit vorliegen, sodass sehr seltene Genvarianten oder neue Allele nicht erkannt werden können. (12)

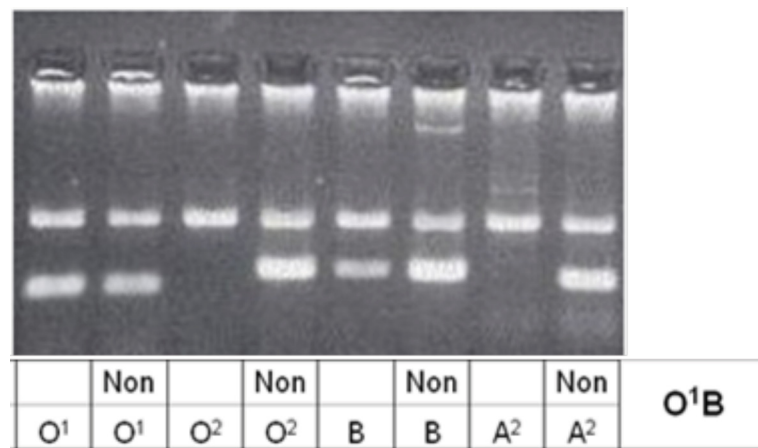


Abbildung 11 Ergebnis einer SSP

Abbildung 11 (Erstellt an der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin Graz) zeigt ein Ergebnis einer ABO SSP. Man erkennt, dass bei O¹ sowie bei B ein PCR-Produkt sichtbar wird. Somit ist das Ergebnis dieser Untersuchung O¹B. Außerdem wird als Gegenkontrolle jeweils ein Non-Allel angeführt. Für das A¹ Allel gibt es keine spezifische Bande, daher wird bei nur einer spezifischen Bande (und dem dazugehörigen positiven Non-Allel) das A¹ Allel als vorhanden angenommen (Ausschlussdiagnose). (12)

An der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin wurde das RBC Ready Gene ABO SSP Kit (*Inno-train*) verwendet. Dieser deckt die Allele O¹, O², B und A² ab.

4.2.2 Sequenzierung nach Sanger (SBT)

Kann die durchgeführte SSP-PCR Untersuchung keine Aufklärung bringen, werden die ABO oder Rhesus D Gene vollständig sequenziert, auch *sequence based typing* (SBT) genannt.

Grundlage hierfür ist die Sequenzierung nach *Sanger*. 1980 erhielten *Walter Gilbert* und *Fred Sanger* für die Entwicklung dieser Methode den Nobelpreis. Hier handelt es sich im Wesentlichen um eine PCR Reaktion, wobei es aber durch Einbau modifizierter, fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) zum Kettenabbruch bei der PCR kommt; man spricht deswegen von einem *Kettenabbruchverfahren*. Nach dem Einbau eines dieser Kettenabbruchnukleotide, die zusätzlich zu Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), sowie Thymin (T) im Ansatz vorhanden sind, kann die Polymerase keine weiteren Nukleotide mehr anhängen. (37)

Das Verhältnis der zugegebenen ddNTPs ist entscheidend, damit statistisch gesehen zumindest einmal an jeder Stelle des zu untersuchenden Genabschnittes ein Abbruch entsteht. Analog zur Gelelektrophorese werden bei der Sequenzierung die entstandenen synthetisierten Kettenabbruchfragmente in einer Kapillare durch Anlegen von Spannung der Größe nach aufgetrennt und von einem Detektor erfasst. Durch Anregung der an der ddNTPs angehängten Farbstoffe mit einem Laser, emittieren diese Licht. Die emittierte Wellenlänge ist für jede Base spezifisch festgelegt. Durch die Abfolge des emittierten Lichts kann man auf die Basenfolge rückschließen. (37)

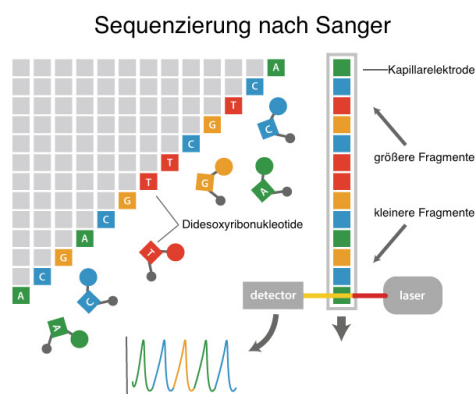


Abbildung 12 Sequenzierung nach Sanger

Abbildung 12, modifiziert nach (40), zeigt das Prinzip der Sequenzierung nach *Sanger*. Die entstandenen Fragmente der Sequenzier PCR wandern hier aufgrund einer angelegten Spannung der Größe nach sortiert durch eine mit Polymer gefüllte Kapillare. Die kleinsten passieren als Erstes. Durch Erfassen des emittierten Lichtes im Bezug zur Zeitachse erhält man eine Abfolge verschiedener Lichtimpulse. Auf deren Grundlage kann man auf die Basenfolge schließen. (40)

5 Ergebnisse – Resultate

An der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin wurden in den letzten 4 Jahren folgende Anzahl an ABO und Rhesus Blutgruppenbestimmungen durchgeführt:

Jahr	Blutgruppenbestimmungen
2012	82.300
2013	77.772
2014	70.279
2015	68.303

Tabelle 7 Anzahl durchgeführter BG-Bestimmungen 2012-2015

Tabelle 7 (41) zeigt die Anzahl absoluter ABO und Rhesus-Blutgruppenbestimmungen in den Jahren 2012 bis 2015. Die deutliche Reduktion der Fallzahlen lag zum einen an der abnehmenden Anzahl an Blutspendern und zum anderen an der Auslagerung von Testungen bei Patienten.

5.1 ABO-System

Im ABO System gab es auf Basis der durchgeführten Untersuchungen folgende Verteilung der Blutgruppen:

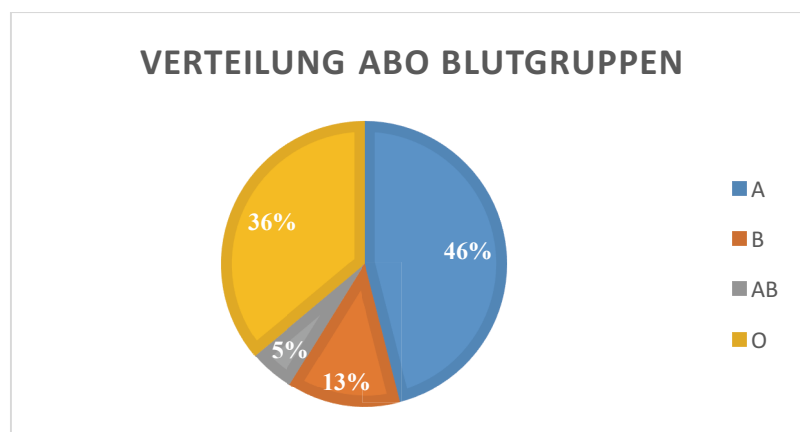


Abbildung 13 Verteilung von ABO Blutgruppen

Abbildung 13 zeigt die prozentuelle Verteilung von ABO Blutgruppenbestimmungsergebnissen.

Die Blutgruppenbestimmung erbrachte bei der weitaus überwiegenden Anzahl der Proben eindeutige Ergebnisse.

Die Anzahl der Proben mit serologischen Auffälligkeiten betrug insgesamt 315 und sind in der folgenden Tabelle 8 nach Häufigkeit des Auftretens pro Jahr dargestellt:

Jahr	Absolute Auffälligkeiten	Relative Auffälligkeiten [%]
2012	76	0,9235
2013	72	0,9258
2014	96	1,3660
2015	71	1,0395

Tabelle 8 Häufigkeit serologischer ABO Auffälligkeiten

Tabelle 8 zeigt die Häufigkeit serologisch auffälliger Blutgruppenbestimmungen, welche weiterführend untersucht wurden. Die relative Häufigkeit bezieht sich auf die Gesamtanzahl der in diesem Jahr durchgeführten Blutgruppenbestimmungen.

5.1.1 Ergebnisse ABO SSP – PCR

Bei fast allen auffälligen Bestimmungen wurde eine SSP Analyse durchgeführt. Bei in Summe 298.654 getesteten Proben ergibt das eine Auffälligkeitsrate von knapp 0,11 %.

In der SSP-PCR wurden die bestimmbareren Allele mit folgender Häufigkeit gefunden:

A^1	117 *
A^2	41
B	112
O^1	244
O^2	111

Tabelle 9 Ergebnisse der SSP ABO Bestimmungen

*: mit Vorbehalt

Tabelle 9 zeigt die aufsummierten Ergebnisse der ABO SSP Blutgruppenbestimmung, unter Berücksichtigung, dass das Ergebnis A^1 auf einer Ausschlussdiagnose beruht.

Die vorhergehend dargestellten Allele wurden bei der SSP Analyse in folgender Zusammensetzung gefunden:

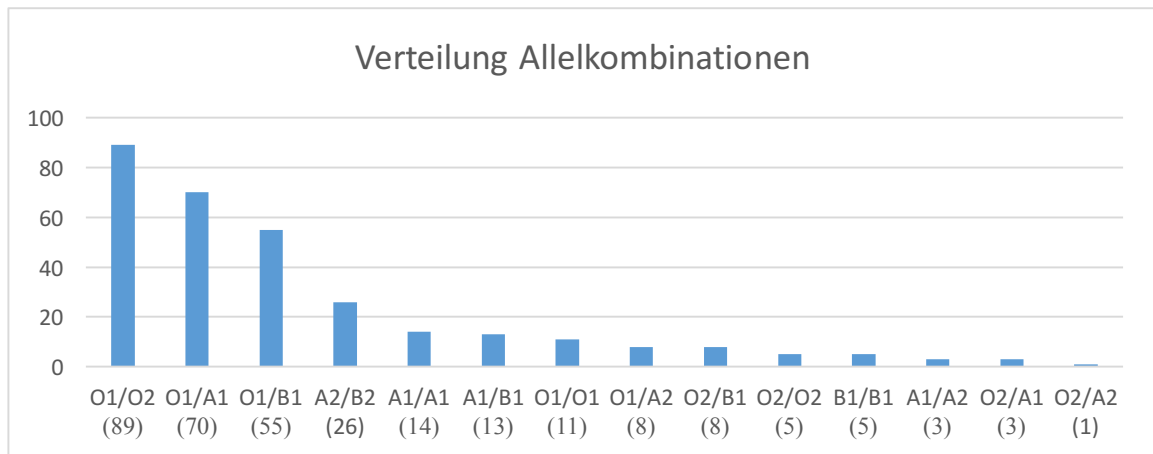


Abbildung 14 Allel Zusammensetzung ABO SSP

Abbildung 14 zeigt die unterschiedliche Zusammensetzung des Genotyps der mit der SSP Analyse untersuchten Personen.

5.1.2 Ergebnisse ABO-SBT

Die Sequenzierung wurde durchgeführt, wenn das SSP-PCR Ergebnis kein abschließendes Ergebnis brachte oder sich eine Diskrepanz zwischen dem serologischen und dem genetischen Ergebnis zeigte. In der weiterführend durchgeführten SBT Analyse wurden Allele mit folgender Häufigkeit identifiziert:

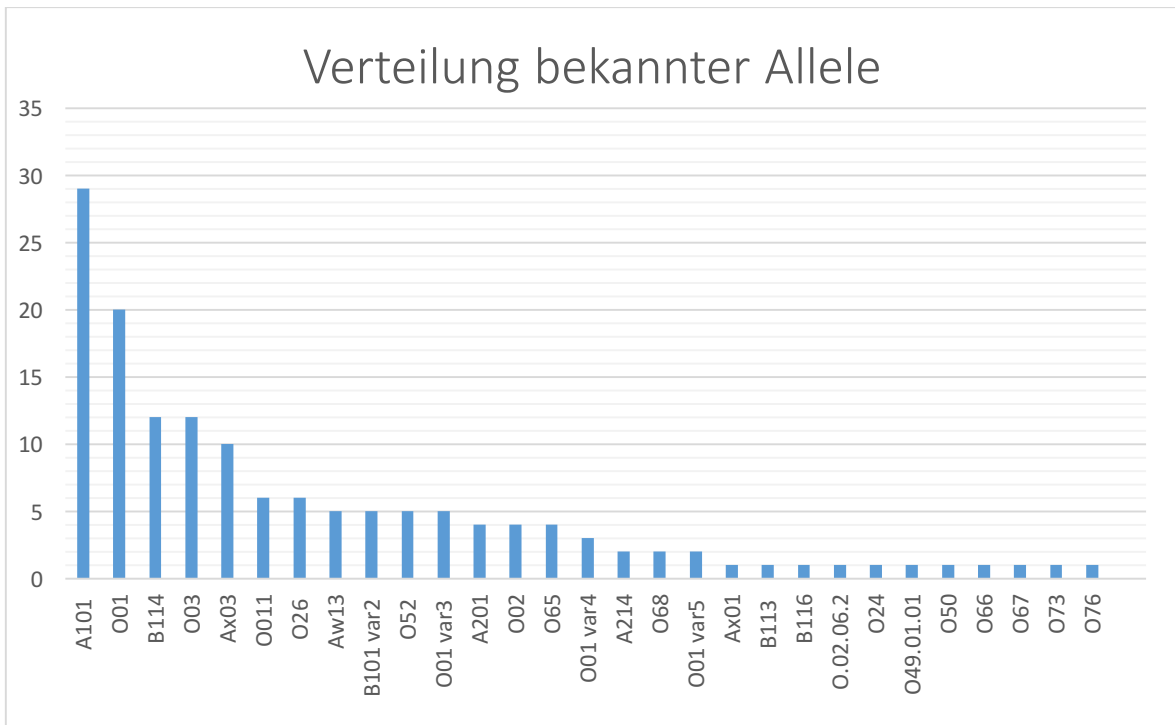


Abbildung 15 ABO - SBT Ergebnisse

Abbildung 15 zeigt sortiert nach Häufigkeit die Ergebnisse der nachgeführten ABO SBT von bereits bekannten Allelen.

In rund 8,2% der SBT Analysen wurden neue Allele gefunden:

Für diese in der nachfolgenden Tabelle 10 beschriebenen Allele wurde bisher noch keine offiziellen Namen vergeben.

vorläufige Bezeichnung	Allelbeschreibung
<i>A101 24bpDEL</i>	Hier handelt es sich um ein <i>A101</i> Allel mit Deletionen (im Exon 5 (del236-239) und im Intron 5 (del1-20))
<i>A101 + Intron 4 1685A>G</i>	Im Vergleich zum <i>A101</i> Allel wird Intron 4 Adenin an Stelle 1685 durch Guanin ersetzt
<i>A101 Exon 2 del:</i>	Im Vergleich zum <i>A101</i> Allel liegt eine Deletion von Exon 2 vor (Intron 1 Base 1287 bis zur 1211. Base im Intron 3)
<i>A201 Var</i>	Das Allel entspricht <i>A201</i> mit einem neuen zusätzlichen SNP im Intron 4
<i>Aw09 Var</i>	entspricht <i>Aw09</i> jedoch ohne SNP im Intron 6(42)
<i>B114+In 2396T>C</i>	<i>B114</i> , jedoch mit zusätzlichem Basenaustausch an Position 2396.: Thymin wird durch Cytosin ersetzt
<i>O01 + Intron 4 1661C>T</i>	<i>O01</i> mit einem SNP an Stelle 1161 (Cytosin wird durch Thymin ersetzt)
<i>O02 Var</i>	Entspricht <i>O02</i> Allel, mit einer neuen Kombination an bekannten SNPs im Intron 4
<i>O03 + Intron 2 209C>T</i>	Im <i>O03</i> Allel wird im Intron 2 Cytosin an Stelle 209 durch Thymin ersetzt
<i>O65 + Intron 3 104 C>G</i>	In <i>O65</i> wird im Intron 3 Cytosin an der Stelle 104 durch Guanin ersetzt
<i>O73 ohne 14 1446C >A</i>	Dieses Allel entspricht <i>O74</i> , jedoch ohne die Mutation im Intron 4, bei der an der Stelle 1446 ein Cytosin in ein Adenin getauscht wird
<i>A Var 268T>C</i>	268T>C Mutation im Exon 6, dies führt zu einem Aminosäureaustausch (Trp90Arg) im Vergleich zum <i>A101</i> Allel
<i>A214 + 653T>A</i>	Entspricht einem <i>A214</i> Allel mit einem SNP 653T>A im Exon 7; dies führt zu einem Aminosäureaustausch (Val212Glu) (43)
<i>A101 + 452T>G</i>	Im Vergleich zum <i>A101</i> gibt es einen SNP (452T>G), dies führt zu einem Aminosäure Austausch (Val51Gly) (43)

Tabelle 10 neu gefundene ABO Allele

Tabelle 10: Überblick über neu gefundene Allele und deren genetische Grundlage. Es handelt sich hier um vorläufige Bezeichnungen, da diese Allele noch nicht in die BGMUT Datenbank aufgenommen wurden.

5.2 Ergebnisvergleich SSP-PCR und SBT-Analyse

Vergleicht man die Ergebnisse der SSP-PCR Untersuchung mit jenen der SBT-Analyse zeigt sich folgendes Bild:

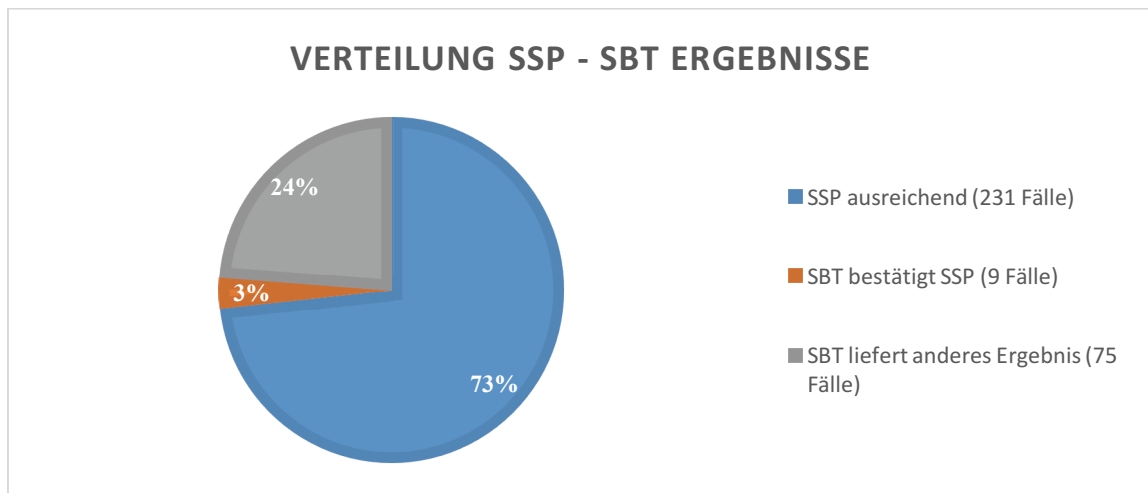


Abbildung 16 Vergleich SSP mit SBT Ergebnissen

In Abbildung 16 werden die Resultate der SSP mit denen der SBT Untersuchung verglichen. In 231 Fällen war die SBT Untersuchung ausreichend. In 9 Fällen wurden die SSP Ergebnisse durch die SBT bestätigt. In 75 Fällen lieferte die SSP jedoch falsche Ergebnisse, was letztendlich durch die direkte Sequenzierung klar wurde.

5.3 Rhesus-System

Bezogen auf das Rhesus System waren in den Jahren 2012 bis 2015 mit folgender Häufigkeit serologische Untersuchungen auffällig:

Jahr	Auffällige Rhesus Untersuchungen
2012	138
2013	120
2014	139
2015	120

Tabelle 11 Häufigkeit serologischer Rhesus Auffälligkeiten

Tabelle 11 zeigt mit welcher absoluten Häufigkeit die serologische Rhesusbestimmung auffällig war.

Dies entspricht 517 serologischen Auffälligkeiten in vier Jahren. Bezogen auf die Summe aller serologischen Untersuchungen in diesem Zeitraum bedeutet das einen Anteil von 0,17%.

Diese Auffälligkeiten können wie folgt unterteilt werden:

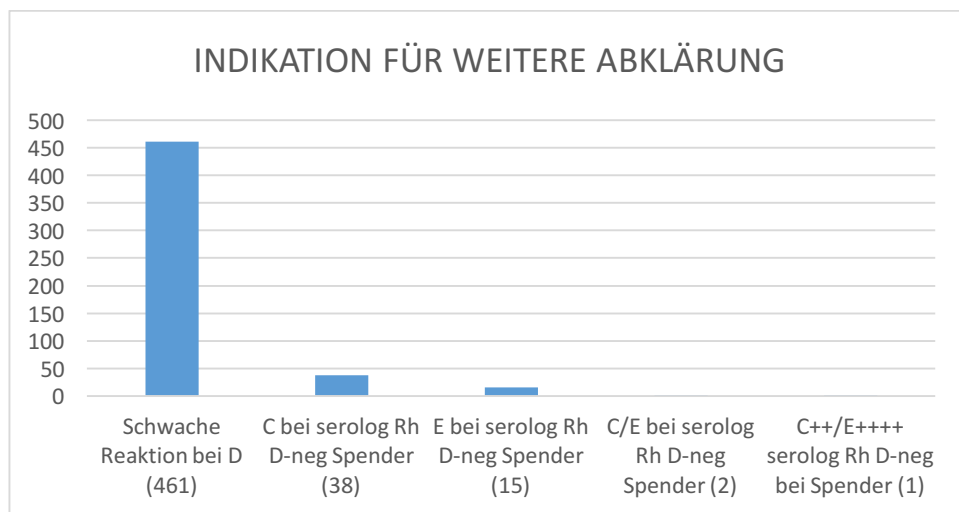


Abbildung 17 Indikationen für weiterführende Rhesusabklärung

Abbildung 17 zeigt die unterschiedlichen Gründe weswegen eine weitere Abklärung notwendig war. Man erkennt, dass schwache Reaktionen bei der D Bestimmung der Hauptgrund waren. Mögliche Positionseffekte bei Spendern machen die Minderheit aus.

Diese serologischen Auffälligkeiten können wie folgt unterteilt werden:

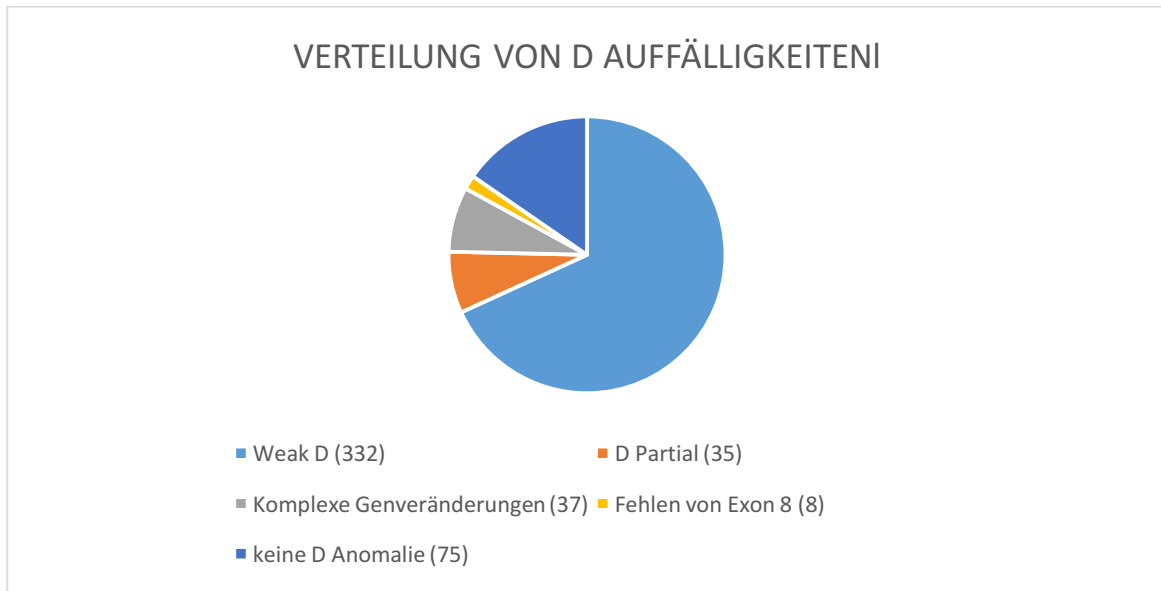


Abbildung 18 Ergebnisse weiterführender Rh Untersuchung

Abbildung 18 zeigt die absolute Anzahl von Ergebnissen weiterführender Rhesus Untersuchungen. Hier zeigt sich, dass zum Großteil Weak-D-Typen der Grund serologischer Abschwächungen waren. Diese Segmente lassen sich wie folgt genauer aufschlüsseln:

Folgendes Diagramm zeigt die Verteilung der Weak-D-Typen

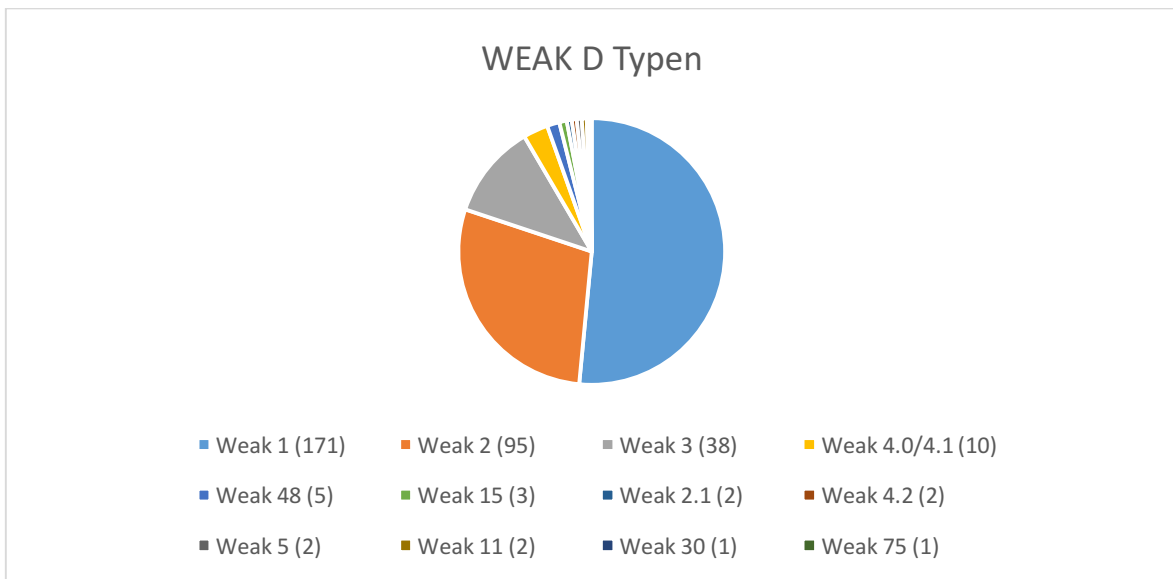


Abbildung 19 Mannigfaltigkeit der Weak-D-Typ Ergebnisse

Abbildung 19 zeigt die verschiedenen diagnostizierten Weak-D-Typen. Es zeigt sich, dass die Typen 1, 2 und 3 den mit Abstand größten Teil ausmachen.

Die zweite wichtige Sparte sind die Partial-D-Typen, welche mit folgender Häufigkeit zu finden waren:

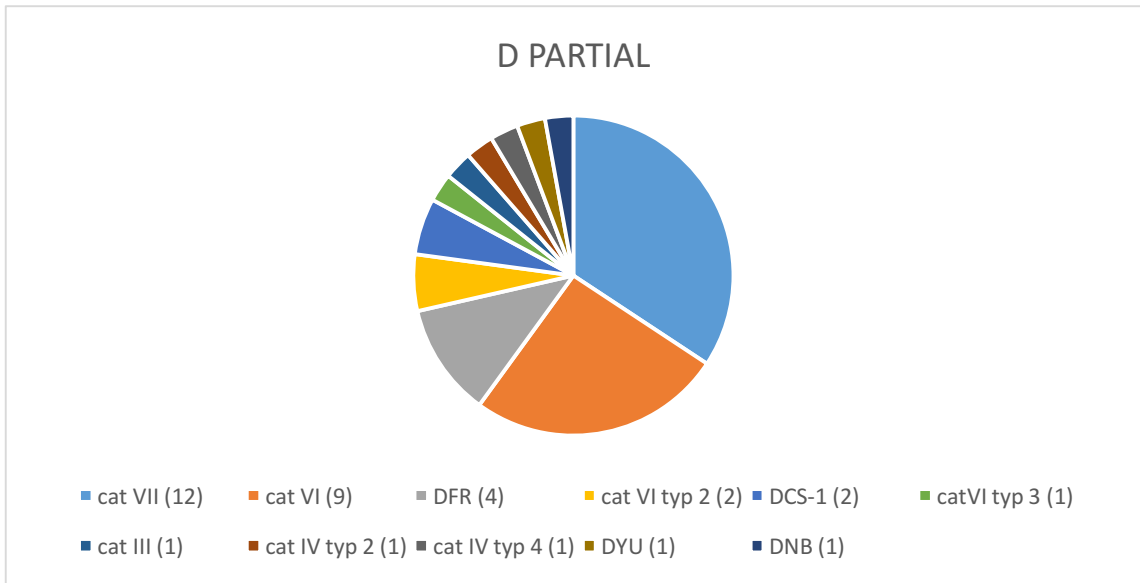


Abbildung 20 Verteilung der Partial-D-Typ Ergebnisse

In Abbildung 20 ist die Verteilung der Partial-D-Typen zu erkennen. In den Klammern erkennt man die absolute Anzahl der diagnostizierten Variante.

Die oben genannten komplexen Veränderungen lassen sich wie folgt aufschlüsseln:

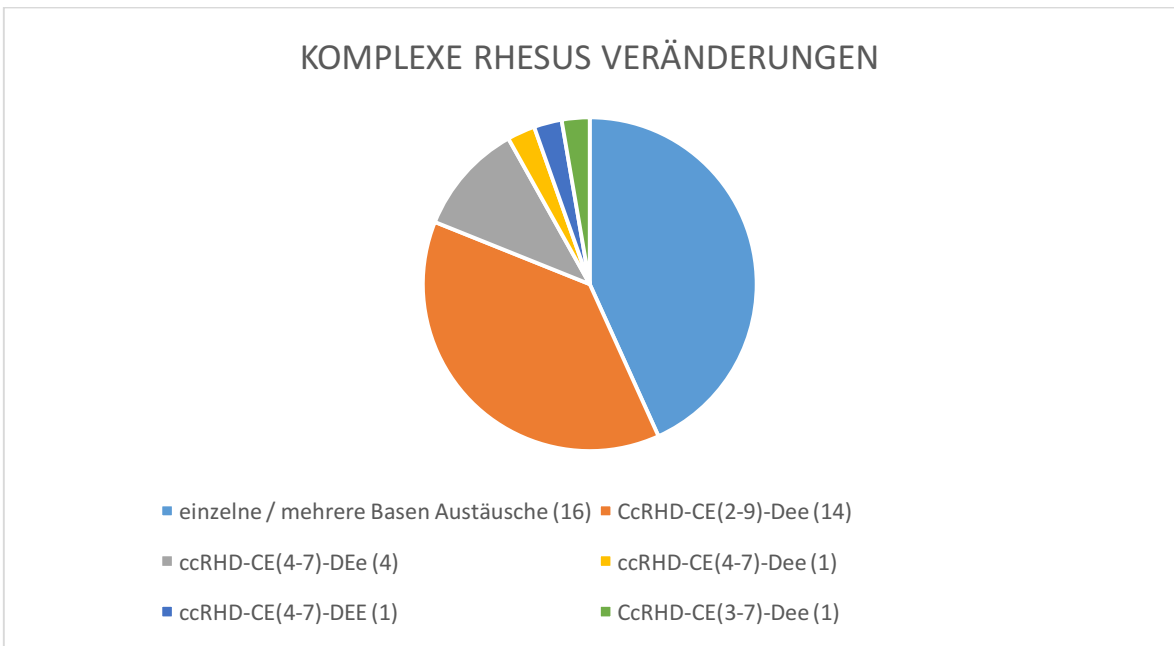


Abbildung 21 Unterteilung komplexer Rhesus-Veränderungen

In Abbildung 21 erkennt man, mit in Klammern angeführter absoluter Häufigkeit, die Verteilung komplexer Rhesus Veränderungen.

6 Diskussion

6.1 ABO System

Die serologische Bestimmung der ABO-Blutgruppe war in den weitaus überwiegenden Fällen eindeutig und bedurften keiner weiteren Abklärung. Die Häufigkeit der Blutgruppen A, B, AB und O decken sich mit den Angaben des österreichischen Roten Kreuzes für die österreichische Bevölkerung. (44)

Die diskrepanten Ergebnisse wurden mit molekularbiologischen Methoden weiter untersucht, davon waren die Ergebnisse der SSP Analysen in 231 Fällen schlüssig, d.h. die Ergebnisse der SSP-Untersuchung stimmten mit dem serologischen Ergebnis überein und bedurften keiner weiteren Abklärung mittels SBT. In 9 Fällen wurde die SSP Analyse durch eine weiterführende SBT Analyse bestätigt. In weiteren 75 Fällen wurden durch die Sequenzierung andere Allele identifiziert.

Dies zeigt, dass eine Genotypisierung mittels SSP oft nicht ausreicht und erst die Sequenzierung des gesamten Gens eine plausible Erklärung für diskrepante serologische Ergebnisse liefern kann, da auf SSP basierende Testkits nur einige der bekannten Allele detektieren können und daher seltenere Varianten oder auch bisher unbekannte Mutationen unentdeckt bleiben und zu falschen Ergebnissen bzw. Interpretationen führen können.

Außerdem fallen mehrere erstmalig in Graz entdeckte Blutgruppenallele in dieser Arbeit auf, die in dem untersuchten Zeitfenster gefunden wurden. Zum Beispiel das Blutgruppenallel *O52*, ein sehr seltenes *O* Allel (2,9% aller SBT Ergebnisse), das bisher nur in der steirischen Bevölkerung gefunden wurde und nicht auf der 261delG Variante beruht. (45) Bei dieser Sequenzvariante wird eine Aminosäure im Exon 6 des ABO Gens durch ein Stopp Codon ausgetauscht. Dadurch kommt es bei der Translation zu einem vorzeitigen Syntheseabbruch und eine verkürzte inaktive Transferase entsteht. *O52* wurde erstmals 2005 von *Hosseini-Maaf* publiziert. Die untersuchte Blutprobe stammt aus Graz.(25)

A101 ist das in der SBT-Analyse am häufigsten identifizierte Allel und dient auch als Referenz-Sequenz des ABO Gens. *A101* codiert eine funktionelle A Transferase, die zur Ausprägung des BG-Phänotyps A führt. Sämtliche anderen Allele werden immer im Vergleich zur entsprechenden Nukleotidposition in der Referenzsequenz dargestellt. (25) Die Diagnose *A_I* nach einer durchgeführten SSP-PCR ist eine Ausschlussdiagnose, wenn andere Allele mit dem vorliegenden Primerset nicht detektiert werden können. Wenn dieses Ergebnis aber nicht plausibel mit dem serologischen Ergebnis übereinstimmt, bedarf es einer weiteren Abklärung. In einem gewissen Anteil bestätigt sich jedoch dieses Ergebnis, weswegen es hier mit großer Häufigkeit vertreten ist.

Das Allel *O01* wurde häufig gefunden. Aufgrund der Deletion eines Nukleotids (Guanosin) an der Stelle 261, kommt es aufgrund einer Leserahmenverschiebung letztendlich zu einem vorzeitigen Stopp Codon, wodurch die Synthese der ABO Transferase abgebrochen wird. (12,25) Kommt *O01* homozygot vor, liegt eindeutig die die ABO Blutgruppen O vor. Meist ist ein zweites, im heterozygoten Genotyp vorhandenes, ABO Subgruppenallel ursächlich für eine Diskrepanz in der serologischen Blutgruppenbestimmung. Subgruppenallele codieren oftmals ABO Transferasen mit sehr geringer Transferaseaktivität. Dabei werden so wenige A-Antigene synthetisiert, dass diese mit den einfachen serologischen Testmethoden nicht nachweisbar sind. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass das Immunsystem trotz serologischem ABO Antigenstatus O, kein Anti-A2 bildet. Häufig ist zusätzlich ein irreguläres Anti-A1 nachweisbar.

B114 wurde im untersuchten Zeitraum an der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin 12-mal entdeckt. Hierbei ist zu erwähnen, dass es sich generell um eine seltene Form des B Allels handelt und als erstes von *Stabentheiner* et. al bei einem Individuum in Österreich beschrieben wurde. Funktionell scheint es aber keinen Unterschied zum *B101* zu Allel geben, B-Antigene sind bei Trägern dieser Variante nachweisbar. (25)

Bei *Ax03* handelt es sich ebenfalls um eine seltene Variante des A Allels. Es kommt zu insgesamt 4 Nukleotid Austausch in den Exons 6 und 7. (25)

Dadurch werden 2 Aminosäuren auf Proteinebene ausgetauscht und die codierte Transferase, weist möglicherweise veränderte biochemische Eigenschaften auf. (38) *Olsson* et. al haben 1998 sechs nicht verwandte Familien mit der Expression des *A_x* Phänotyps untersucht. (46)

Bei *O03* handelt es sich um eine O Variante, jedoch ohne die für das O Allel typische Deletion der 261. Base im Exon 6. Es gibt jedoch 4 nichtsynonyme SNPs (missense) im codierenden Bereich, die die Glykosyltransferase funktionslos machen könnten, da die Zucker bindende Stelle verändert wird.(47) Bemerkenswert ist, dass in einzelnen Fällen eine geringe Expression von A Antigen beobachtet wurde. (25)

Aw13 ist eine seltene Variante und wurde 2006 erstmals von *Seltsam* et. al beschrieben. Das Initiator Methionin-Codon ist fehlerhaft, weswegen es gleich zu Beginn zu einem Abbruch der Proteinsynthese kommt. (25)

B101 Var 2 ist eine Variante mit zusätzlichen SNPs im Intronbereich im Vergleich zum *B101* Allel. Dieses Gen wurde erstmals von *Matzhold* et. al an der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin in Graz beschrieben. (25) Auch dieses Allel scheint zwar selten, aber speziell in der steirische Bevölkerung verbreitet zu sein.

A201 ist das klassische A2 Allel und wurde 2011 von *Yamamoto* definiert. Hier liegt eine missense Mutation der Base an Nukleotidposition 467 (467C>T) und einer Deletion der Base an Stelle 1061(1061delC) im Exon 7 vor. Die Deletion führt zu einem Frameshift, weswegen das eigentliche Stopp Codon falsch interpretiert wird und die codierte Transferase um 21 Aminosäuren verlängert wird. (25,47)

O02 ist eine 1999 erstmals beschriebene Variation eines O Allels, bei der zusätzlich zur typischen Gunaosindeletion im Exon 6 (261delG), neun weitere SNPs im codierenden Bereich vorliegen. (25)

O65 ist mit 2 zusätzlichen Substitutionen im Intron 4 (215A>G und 216A>C) eine Variante des *O02* Allels. Dieses Allel wurde bisher bei nur fünf Personen in Österreich beschrieben. (25)

O68 beschreibt ein Allel, dem im Vergleich zu *O02* der 220C>T Polymorphismus im Exon 5 fehlt. Es wurde erstmals von *Matzhold* und ihrem Team der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin 2015 in Graz identifiziert. (25)

A214 ist eine Variante des *A201* Allels und trägt zusätzlich die Nukleotidsubstitution 336G>A im Intron 5 Diese seltene Variante wurde ebenfalls in Österreich in zwei Familien 2011 beschrieben. (25)

Ax01 ist eine seltene Variation von *Yamamoto* beschrieben.(48) Dieser liegt nur ein einziger Aminosäure Austausch zu Grunde. Hier befindet sich an Position 646 ein Adenosin statt einem Thymin, was aber eine starke Abschwächung der A-Transferase Aktivität zur Folge hat. (25)

B113 ist ein von *Stabentheiner* und ihrem Team dokumentiertes Blutgruppenallel welches bisher nur bei zwei Individuen in Österreich beschrieben wurde. Im Vergleich zum klassischen *B101* Allel gibt es einen zusätzlichen SNP (858C>A) im Intron 3, was aber für die phänotypische Ausprägung des B-Antigens keine Rolle zu spielen scheint. (25)

Ebenso von *Stabentheiner* und nur in einer Familie in Österreich beschrieben ist *B116*, das im Vergleich zu *B101* im Intron 5 die Nukleotidsubstitution G>A trägt. Aufgrund der Lokalisation dieser Mutation könnte es sich um eine Splice site Mutation handeln, die eine Auswirkung auf den Splicingvorgang der prä-mRNA des ABO Transkripts haben kann. Allerdings wurde nicht in allen Fällen eine phänotypische Abschwächung (B_{weak}) bestätigt. (25)

*ABO*O.02.06.2* entspricht *O02* jedoch ohne den SNP 681G>A im Exon 7.(25)

Von *Olsson* und seinem Team wurde 2006 erstmals *O24* beschrieben. Durch zehn SNPs und der typischen 261 Deletion kommt es zum Abbruch der Synthese und dem Austausch von zwei Aminosäuren. (25)

O50 wurde von *Hosseini-Maaf* et al. erstmals dokumentiert. Bei 488C>T im Exon 7 handelt es sich um einen weiteren Aminosäureaustausch (T163M) im Vergleich zum *O03* Allel. (25)

Die Allele *O67* und *O73* unterscheiden sich durch einzelne SNPs in den Introns. (25,49)

Auch *O49* ist als Variante von *O03* einzustufen, der Basenaustausch 689G>A im Exon 7 bewirkt noch zusätzlich einen Austausch von Glycin gegen Asparagin an Position 229 (G229D). Dieses seltene Allel wurde von *Hosseini-Maaf* erstmals in israelischen Spendern beschrieben. (25,49)

O11, *O26*, *O01 Var3*, *O01 Var 4*, *O01 Var 5*, *O66*, *O76* basieren alle auf der inaktivierenden 261delG Variante und unterscheiden sich lediglich in SNPs in nicht codierenden Regionen. *O01 Var 3,4* und *5* wurden von *Matzhold et. al* erstmals beschrieben. (25)

Bei den in Tabelle 10 erwähnten neu gefundenen Allelen kann folgendes angefügt werden:

Eine neue Variante des *A101* Allels (hier als *A101 24bpDel* bezeichnet), mit einer Deletion von 5 bp im Exon 5 und weiteren 20 bp im angrenzenden Intron 5, wurde in 11 von 34 untersuchten Mitgliedern einer steirischen Familie identifiziert. Diese Mutation ist eine Splice Site Mutation, was wie die ersten Untersuchungen des Transkripts zeigten, auch einen Effekt auf das Splicing der prä-mRNA haben. Daraus entstehende Transkripte wurde ein Fehlen von Exon 6, beziehungsweise auch ein Verbleib von Sequenzen des Intron 5, nachgewiesen. Allein das Fehlen des Großteiles der katalytischen Domäne dieser mutierten ABO Transferase würde den O Phänotyp jener Personen, die im Genotyp heterozygot für ein weiteres O Allel sind, erklären.

Eine Deletion von nahezu 10% des *ABO* Gens, wurde in drei untersuchten Familienmitgliedern einer einzelnen Familie entdeckt. Die Deletion betrifft Sequenzen von Intron 1 bis Intron 3, also einschließlich des Verlustes eines vollständigen Exons (Exon 2). Dieses neue Allel (*A101 Exon 2 Del*) wurde aufgrund des nachgewiesenen O Phänotyps der betroffenen Familienmitglieder als neues O Allel beschrieben. (50) Andere erstmals identifizierte Allele unterscheiden sich von bereits beschriebenen Varianten durch neue Kombinationen bereits bekannter SNPs oder zusätzliche Mutationen in nichtcodierenden Sequenzen des ABO Gens. (25)

Bei der Identifizierung dieser neuen Allele in nur wenigen Einzel-Fällen oder in Familien (*Exon 2 del* und *Exon 5 24 bp Del*) kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um sporadisch auftretende oder sogenannte private Mutationen handelt.

6.2 Rhesus

Bei den D Varianten, welche durch schwache serologische Reaktionen auffallen, unterscheidet man zwischen den Weak-D-Typen und den Partial-D-Typen. Der Unterschied liegt hauptsächlich an der Lokalisation der Veränderung im codierten Protein. Generell lässt sich sagen, dass D-Antigenvarianten mit SNPs in extrafacialen Regionen des Erythrozyten als Partial-D-Typen, Rhesus Proteine mit SNPs innerhalb der transmembranösen Regionen oder intrazellulär als Weak-D-Typen bezeichnet werden. Klinische Relevanz zeigt diese Unterteilung, da man eine Alloantikörper Bildung nach Transfusion von Rhesus positivem Blut meist nur bei Personen mit Partial-D-Typen findet. Bei den Weak-D-Typen 1-3 konnte bisher keine Immunisierung festgestellt werden.

6.2.1 Weak-D-Typen

Die Weak-D-Typen 1, 2 und 3 stellen den Großteil der serologisch schwachen Rhesus Reaktionen dar.

Die Verteilung in der hier durchgeführten Analyse differiert - interessanterweise - leicht von der in Oberösterreich:

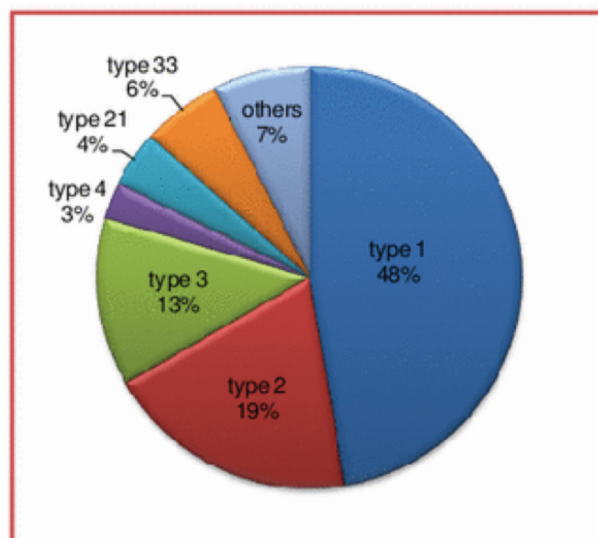


Abbildung 22 Weak-D-Typ Verteilung in Oberösterreich

Abbildung 22 modifiziert nach (51) zeigt die prozentuelle Verteilung von Weak-D-Typen in Oberösterreich

Der Anteil an Weak-D-Typ 1 bei den untersuchten Personen in Graz ist mit 52% höher als in Oberösterreich. Der Anteil an Weak-D-Typ 2 ist mit 29% in Graz ebenso größer. Beim Weak-D-Typ 3 ist der Unterschied schon geringer; in Graz zählen dazu lediglich 11%. Die Weak-D-Typen 1, 2 und 3 stellen 80% aller identifizierten Weak-D-Typen dar.

Eine andere Analyse von Müller et.al. vergleicht auch die Frequenzen der Weak-D-Typen in Tirol, Nord- und Süd Deutschland:

Weak D type	Tyrol	Germany	
		Northern	Southwestern
1, 2, or 3	118	258	145
4	4	1	6
5	4	0	2
6 to 11	0	0	6*
13	1	0	0
14	1	0	0
21	0	1	0
1 & 3	1	0	0
3 & 4	1	0	0
Total	130	260	159

* Each type was found in a single sample.¹

Tabelle 12 Weak-D-Typ Verteilung in Tirol, Nord- und Südwest Deutschland

Tabelle 12 aus (34) zeigt den Unterschied zwischen der Verteilung der Weak-D-Typen in Tirol, Norddeutschland und Südwestdeutschland.

Hier stellen die Weak-D-Typen 1, 2 und 3 knapp 91 % aller Weak-D-Typen in Tirol dar. In Norddeutschland über 99%, in Süddeutschland – ähnlich wie in Tirol - knapp über 91%. Man erkennt ein Diversitätsgefälle von Zentraleuropa in den Norden. Auch andere, seltenere Weak-D-Typen sind hier stärker vertreten.

Weak-D-Typ 1 ist die häufigste beziehungsweise zweithäufigste Variante des *Standard RHD* und unterscheidet sich davon um eine Base (809T>G). Dies führt zu einem Aminosäuretausch. (30)

Weak-D-Typ 2 ist häufig bei Australiern jedoch in Mitteleuropa auch stark vertreten. Bei dieser Blutgruppe kommt es ebenso zu einem einzigen SNP (1154G>C) sowie einem daraus resultierenden Aminosäure Austausch. (30)

Weak-D-Typ 3 ist ebenso auf einen einzigen Nukleotidaustausch (8C>G) mit einem damit verbundenen Aminosäure Austausch zurückzuführen und ist auch stark in Zentraleuropa vertreten. (30) In Tirol ist es mit 50% der Weak-D-Typen vertreten. (34)

Aus klinisch praktischer Sicht ist wesentlich, dass Patientinnen und Patienten, so wie Schwangere mit Weak-D-Typ 1, 2 und 3 mit Rhesus positivem Blut versorgt werden können, da dabei keine Immunisierung nachgewiesen werden konnte. (33) Das erleichtert die Versorgung der Patienten enorm, da 85% aller Blutspender Rhesus positiv sind.

Weak-D-Typ 4.0 sowie 4.1 besitzen beide drei gleiche SNPs. Weak-D-Typ 4.1 hat jedoch eine zusätzliche Mutation. Diese resultieren in 2 beziehungsweise 3 Aminosäuren Austausch. Diese befinden sich entweder in der Zellmembran beziehungsweise an der Zellinnenseite und wären eigentlich mit Rhesus positivem Blut zu versorgen. (32) Allerdings gibt es zu diesem Weak-D-Typ – wie auch zu den anderen heute bekannten Weak-D-Typen – keine klinischen Daten.

Weak-D-Typ 48 liegt ein einziger Basenaustausch mit einem dadurch hervorgerufenen Aminosäureaustausch zu Grunde. Dieser befindet sich in der zweiten Schlaufe innerhalb der Membran und wäre demnach auch mit Rhesus positivem Blut zu versorgen. Dieser Typ kommt hauptsächlich im europäischen Raum vor. (32)

Weak-D-Typ 15 fußt ebenso auf einem einzelnen SNP mit einem daraus folgenden Aminosäure Tausch. Es handelt sich hierbei um die letzte Aminosäure innerhalb der Zellmembran in der neunten Schlaufe des Rhesus Proteins. Dieser Typ kommt aus dem afrikanischen Raum. Dass er hier vertreten ist, lässt sich leicht damit klären, dass man in Graz auf Grund seiner Größe auch auf Menschen mit Migrationshintergrund trifft. (32)

Zwei SNPs liegen dem Weak-D-Typ 2.1 zu Grunde. Hier ist zu erwähnen, dass diese Form 2009 erstmalig in Linz beschrieben wurde. Es werden zwei Aminosäuren ausgetauscht; ein Austausch befindet sich innerhalb der Membran, der zweite jedoch außerhalb. Dieser Typ ist also „fälschlicherweise“ den Weak-D-Typen zugeordnet, denn dieser muss mit Rhesus negativem Blut versorgt werden, um keine Immunisierung hervorzurufen. (32)

Weak-D-Typ 4.2 ist wiederum afrikanischen Ursprungs. Ihm liegen 4 SNPs zu Grunde welche für 3 andere Aminosäuren codieren. Keine der drei befindet sich an der Außenseite, weswegen auch diese Personen mit Rhesus positivem Blut versorgt werden könnten. (32)

Weak-D-Typ 5 kommt in Tirol mit ca. 3% vor. Dieser Typ fußt auf einem einzelnen SNP mit einem daraus hervorgerufenen Aminosäureaustausch. Der Austausch ist innerhalb der

Zellmembran, weswegen auch hier mit Rhesus positivem Blut versorgt werden könnte. In Graz kommt dieser Phänotyp mit 0,6 % wesentlich seltener vor. (32)

Weak-D-Typ 11 ist ein spannendes Phänomen, da es teilweise als Weak-D-Typ oder als Partial-D-Typ beschrieben wird. Dies hängt davon ab mit welchem *RHCE* Komplex dieses vererbt wird. Im *cDe* Haplotyp erscheint es als nur wenig schwaches D, im *CDe* Haplotyp ist die Antigendichte deutlich verringert; man spricht vom sogenannten *Borderline Weak-D-Typ*. Ihm liegt ein einzelner SNP zu Grunde, der dadurch codierte Aminosäuretausch befindet sich innerhalb der Zellmembran. (32)

Weak-D-Typ 30 wurde 2003 erstmals von *Wagner F.F.* beschrieben. Dieser Form liegt ein einzelner SNP mit einem Aminosäureaustausch zu Grunde. Die Mutation befindet sich innerhalb der Zellmembran weswegen auch hier mit Rhesus positivem Blut versorgt werden könnte. (32)

Weak-D-Typ 75 wurde erstmals von *Gassner et. al* in der Schweiz dokumentiert. Auch ihm liegt ein einzelner Nukleotidaustausch mit einem daraus resultierenden Aminosäureaustausch innerhalb der Zelle zu Grunde. Auch hier wäre eine Versorgung mit Rhesus positivem Blut vorstellbar, verweise aber nochmals auf die oben erwähnte Einschränkung. (32)

6.2.2 Partial-D-Typen

Noch größer ist der Unterschied zwischen Oberösterreich und der Steiermark bezüglich der Verbreitung der Partial-D-Typen. Diese sind in Oberösterreich wie folgt verteilt:

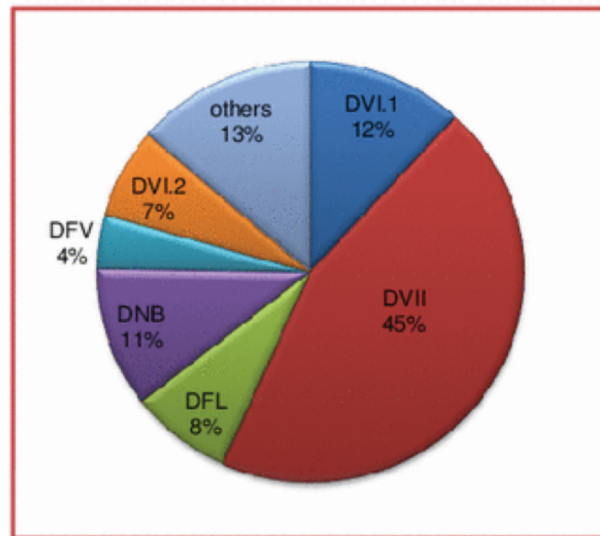


Abbildung 23 Partial-D-Typen in Oberösterreich

Abbildung 23 nach (51) zeigt die Verteilung der Partial-D-Typen in Oberösterreich.

Vergleicht man diese Werte direkt in einer Tabelle bekommt man folgendes Ergebnis:

Partial-D-Typ	Linz [%]	Graz [%]
D VII	45	34
DVI.1	12	26
DNB	11	3
DVI.2	7	6
DFL	8	
DVF	4	
andere	13	

Tabelle 13 Gegenüberstellung Partial-D-Typen Linz/Graz

Tabelle 13 vergleicht die prozentuellen Anteile der Partial-D-Typen von Linz und Graz. Die Werte für Linz entstammen Abb. 23.

Herausragend fällt der Unterschied bei D cat VI auf. Dies ist in Graz ist mit 26% stärker vertreten. Der nächst kleinere Posten ist DNB mit 11% in Linz, hingegen ist nur mehr mit 3 % in Graz vertreten.

Tabelle 14 vergleicht die Partial-D-Typen Verteilung zwischen Tirol und Norddeutschland. Diese wurden von *Müller et. al.* aufgeschlüsselt.

Aberrant RhD	Tyrol	Northern Germany
D ^{VI} type I	15	0
D ^{VI} type II	0	3
D ^{VII}	1	3
D HMi	0	2
D HO	0	1
D ^V type VII	0	1
Weak D, all types	130	260
Total	146	270

Tabelle 14 Partial-D-Typen Verteilung Tirol / Norddeutschland

Tabelle 14 modifiziert nach (34): man erkennt die Unterschiede zwischen den Partial-D-Typen zwischen Tirol und Norddeutschland. Die Zahlen sind in absoluter Häufigkeit im durchgeführten Zeitraum dieser Studie angegeben.

Am Auffälligsten ist, dass der Typ D cat VII in Ostösterreich am häufigsten vorkommt. In Tirol gar nur einmal, in Norddeutschland noch 3-mal. Der in Tirol am häufigsten vorkommende Typ ist D VI Typ 1, dieser kommt in Graz ebenso vor, jedoch nicht mit dieser prozentuellen Häufigkeit.

D cat VII wird mit knapp über 3 % bei 201 schwachen D Reaktionen in Linz beschrieben. Es kommt zu einem SNP mit einem Austausch der letzten Aminosäure der zweiten extrazellulären Protein Schleife. Hier kann es durch Transfusion mit Rhesus positivem Blut zu Immunisierungsreaktionen kommen.(32)

Kategorie VI Typ 1 ist ebenso ein Phänotyp der hauptsächlich in Österreich anzutreffen ist. Ihm liegt eine Hybridisierung mit dem *RHcE* Allel zu Grunde. Hierbei kommt es durch die Ähnlichkeit des *RHD* Allels zum *RHcE* Allels zur Anlagerung dieser und zu einem langstreckigen Austausch mehrerer Nukleotide. (12,32) In Linz ist diese Form mit 3,9% als Ursache schwacher serologischer Rhesus Ergebnisse beschrieben. In der hier durchgeführten retrospektiven Analyse kommt es jedoch nur mit einer Häufigkeit von 1,7% vor. TrägerInnen dieser Blutgruppe können relativ leicht Antikörper bilden und sind deswegen Rhesus negativ zu versorgen. (52)

Dem DFR (1) Phänotyp liegt eine Hybridisierung mit dem *RHCE* Allel zu Grunde. Es wird im Südwesten Deutschlands und China beschrieben. Langstreckige Änderungen des Rhesusproteins führen auch hier zur Empfehlung mit Rhesus negativem Blut zu versorgen. (32)

D cat VI Typ 2 basiert auch auf einer Hybridisierung mit dem *RHCE* Allel. Zusätzlich zu Linz und Südwest Deutschland wird diese Kategorie auch in Frankreich beschrieben. Auch PatientenInnen mit diesem D-Antigen sollten Rhesus negativ versorgt werden. Frauen im gebärfähigem Alter müssen jedenfalls Rhesus negativ versorgt werden. (32)

DCS-1 basiert auf zwei SNPs. Diese führen zur Änderung zweier Aminosäuren, einer innerhalb der Zellmembran und eine außerhalb. Deswegen muss auch hier mit Rhesus negativem Blut versorgt werden. Dieser Partial-D-Typ wird ebenfalls in dieser retrospektiven Analyse beobachtet. (32)

D cat VI Typ 3 fußt auf einer Hybridisierung mit dem *RHCE* Allel und wird neben dem Südwesten Deutschlands auch in China beschrieben. Auch hier muss mit Rhesus negativem Blut versorgt werden. (32)

D cat III wird in verschiedene Untergruppen aufgeteilt. Es gibt verschiedene Änderungen, gemein ist allen der SNP in 455A>C. Bemerkenswert ist, dass jeder Aminosäuretausch entweder innerhalb der Zelle oder der Zellmembran ist. Dies erwartet man sich eher von einem Weak-D-Typ. (32) Die Gruppe der D cat III findet sich in der europäischen Bevölkerung selten. Hier ist dadurch eine Rhesus-negative Versorgung in Frage zu Stellen. (32,53)

D cat IV Typ 2 fußt auf einer Hybridisierung des *RHCE* Allels mit dem *RHD* Allel. Es kommt zum Austausch von vier Aminosäuren, wobei zwei außerhalb der Zelle liegen. Auch hier muss Rhesus negativ versorgt werden. (32)

D cat IV Typ 4 basiert ebenfalls auf einer Hybridisierung mit dem *RHCE* Allel und wird in Deutschland observiert. Es kommt zum Austausch dreier Aminosäuren wobei zwei davon extrazellulär liegen. Auch hier muss Rhesus negativ versorgt werden. (32)

Rhesus DYU basiert auf einem einzelnen SNP mit einem Tausch einer Aminosäure extrazellulär. Dieser Phänotyp wird in Deutschland beschrieben und ist auch Rhesus negativ zu versorgen. (32)

DNB wird in Deutschland und der Schweiz beschrieben und wird ebenfalls durch einen einzelnen SNP mit einem Aminosäure Austausch extrazellulär beschrieben. Auch hier muss man Rhesus negativ versorgen um einer Immunisierung vorzubeugen. (32)

6.2.3 Komplexere Veränderungen

Dieser Punkt lässt sich weiter aufteilen in größere Hybride (langstreckiger Austausch von Basen zwischen dem *RHCE* und dem *RHD* Allel) sowie Austausche einzelner oder mehrere Basen. Die 16 Fällen bei denen es zum Austausch von einer oder mehreren Basen kommt, wurden noch einem schwachen D-Antigenen zugeordnet. Da diese Veränderungen so komplex sind, und bei Hybriden teilweise ganze exofaciale Schlaufen fehlen müssen auch diese PatientenInnen mit Rhesus negativem Blut versorgt werden.

6.2.4 Keine D Anomalie

Die vergleichsweise größere Anzahl von molekularbiologisch als unauffällig identifizierten *RHD*-Allelen lässt sich dadurch erklären, dass SpenderInnen, welche ein groß C- oder E-Antigen besitzen und entweder negativ oder nicht eindeutige Ergebnisse bei der RhD-Antigen Bestimmung liefern, weiter abgeklärt werden müssen. Diese Regelung lässt sich auf den Positionseffekt zurückführen, wonach ein C- oder E-Allel das D-Antigen in seiner Ausprägung abschwächen kann. Um Fehltransfusionen zu vermeiden, ist es also notwendig, hier das eventuell genetisch codierte D-Antigen molekularbiologisch weiter abzuklären.

6.3 Zusammenfassung

Die Blutgruppensysteme ABO und Rhesus sind weitläufig bekannt. Weniger bekannt ist, dass es hier zu Varianten kommt, welche in der Versorgung mit Blutprodukten zu beachten sind.

Blutproben von PatientenInnen sowie SpenderInnen müssen primär einer serologischen Blutgruppenbestimmung zugeführt werden. Dies impliziert im ABO System neben der erythrozytären Testung auch die Serumgegenprobe, bei der die Isoagglutinine im Blutserum bestimmt werden. Im Rhesussystem werden Erythrozyten Antigene mit zumindest zwei verschiedenen Antiseren bestimmt.

Die Untersuchungen müssen eindeutige Ergebnisse liefern, um eine Blutgruppe bestimmen zu können. Kommt es zu einer Diskrepanz, so muss eine weitere Abklärung eingeleitet werden um die Blutgruppe molekularbiologisch, also auf auf genetischer Ebene abzuklären. Die Bestimmung der Blutgruppe ist gewissenhaft durchzuführen. Im ABO System können Fehltransfusionen letalen Ausgang nehmen. Im Rhesus System kommt es nicht unmittelbar zu solch fatalen Folgen. Wird jedoch eine Schwangere nicht richtig versorgt, dies schließt auch das Fehlen einer Rhesusprophylaxe in der Schwangerschaft ein, so muss man bei erneuter Schwangerschaft mit schweren intrauterinen Reaktionen, bis hin zum Morbus haemolyticus neonatorum – dem intrauterinen Fruchttod – rechnen.

In dieser Arbeit wird die Frequenz und Häufigkeit auffälliger Blutgruppenbefunde der Jahre 2012 bis 2015 für das ABO und Rhesus System beschrieben. Auffällige Blutgruppenbestimmungen wurden in der Labordokumentation der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin markiert und weiter untersucht.

Es lässt sich festhalten, dass *Landsteiner* wohl nicht damit gerechnet hat, dass die von ihm entdeckten Blutgruppensysteme so facettenreich in ihrer Ausprägung sind. Durch neuere Methoden lassen sich menschliche Blutgruppen in immer weitere Varianten aufschlüsseln. Unmittelbare Konsequenz muss das für SpenderInnen oder PatientInnen jedoch nicht haben. Im Zweifel müssen sicher kompatible (O für ABO oder Rh negativ im Rhesus System) Konserven transfundiert werden, da eine Suche für die gleiche Konstellation nicht überschaubar wäre. Zu diesem Schluss wäre man jedoch auch schon vor molekularbiologischer Untersuchungen gekommen.

Dennoch ist es wichtig auch darauf ein Augenmerk zu legen. Fehltransfusionen können für Konservenempfänger oder für ungeborene Kinder bei Schwangeren potenziell lebensbedrohend sein.

Hier zeigt sich also die absolute Notwendigkeit, Blutgruppenbestimmungen, trotz selten vorkommenden Varianten, gewissenhaft durchzuführen und bei eventuellen Auffälligkeiten diese weiter molekularbiologisch abzuklären.

7 Literaturverzeichnis

1. Pschyrembel W, Walter de Gruyter & Co, Herausgeber. Pschyrembel klinisches Wörterbuch 2012. 263., neu bearbeitete und erweiterte Aufl. Berlin: Boston : De Gruyter; 2011. 2323 S.
2. Eckstein R, Zimmermann R. Immunhämatologie und klinische Transfusionsmedizin: Theorie und Praxis kompakt. 7. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2016. 207 S.
3. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 9. ed., 2 print. Oxford: Blackwell Scientific Publ; 1994. 1015 S.
4. Horn F, Armbruster M, Dospil A, Herausgeber. Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium. 4., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009. 643 S.
5. Yamamoto F, Clausen H, White T, Marken J, Hakomori S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*. 17. Mai 1990;345(6272):229–33.
6. Watkins WM, Morgan WT. Possible genetical pathways for the biosynthesis of blood group mucopolysaccharides. *Vox Sang*. April 1959;4(2):97–119.
7. Tuppy H, Staudenbauer WL. Microsomal incorporation of N-acetyl-D-galactosamine into blood group substance. *Nature*. 16. April 1966;210(5033):316–7.
8. Ginsburg V. Enzymatic basis for blood groups in man. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1972;36:131–49.
9. Race C, Ziderman D, Watkins WM. An alpha-d-galactosyltransferase associated with the blood-group B character. *Biochem J*. Mai 1968;107(5):733–5.
10. Names for ABO (ISBT 001) Blood Group Alleles [Internet]. ISBT. 2017 [zitiert 19. Jänner 2017]. Verfügbar unter:
http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/001_ABO_Alleles_v1.0.pdf
11. Lopez M, Benali J, Cartron JP, Salmon C. Some notes on the specificity of anti-A1 reagents. *Vox Sang*. November 1980;39(5):271–6.
12. Kiefel. Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Grundlagen - Therapie - Methodik [Internet]. Berlin: SpringerMedizin; 2010 [zitiert 3. August 2016]. Verfügbar unter: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=691023>
13. Dean L. The Hh blood group [Internet]. National Center for Biotechnology Information (US); 2005 [zitiert 12. November 2016]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2268/>
14. hh blood group. In: Wikipedia [Internet]. 2016 [zitiert 13. November 2016].

Verfügbar unter:

https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Hh_blood_group&oldid=748835426#/media/File:Bombay.svg

15. Chacko MP, Mathan A, Daniel D. Para-Bombay: A blind spot in blood grouping? *Asian J Transfus Sci.* Dezember 2011;5(2):182–3.
16. Singbartl G, Herausgeber. *Transfusionspraxis*. 2., überarb. Aufl. Berlin: Springer; 2014. 274 S.
17. Landsteiner K. Über Agglutinationserscheinung normalen menschlichen Blutes. *Wien Klin Wochenschr.* 1901;(14):1132.
18. Filitti-Wurmser S. Natural antibodies and immune antibodies of human ABO blood group system. *Biochimie.* 1976;58(11-12):1345–53.
19. Daniels G. *Human blood groups: Geoff Daniels ; foreword to first edition by Ruth Sanger*. 3rd ed. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons; 2013. 544 S.
20. Günther Körmöcz. *ÖGBT-Standards Immunhämatologische Untersuchungen bei Patienten. Österreichische Gesellschaft für Blutgruppenserologie, Transfusionsmedizin, Regenerative Medizin und Immungenetik (ÖGBT)*; 2015.
21. Vogel F. *Lehrbuch der allgemeinen Humangenetik*. [Internet]. Berlin: Springer; 1961 [zitiert 2. August 2016]. Verfügbar unter:
<http://books.google.com/books?id=firtqAAAAMAAJ>
22. Storry JR, Olsson ML. The ABO blood group system revisited: a review and update. *Immunohematology.* 2009;25(2):48–59.
23. Yu L-C, Twu Y-C, Chou M-L, Chang C-Y, Wu C-Y, Lin M. Molecular genetic analysis for the B(3) allele. *Blood.* 15. August 2002;100(4):1490–2.
24. The Blood Group Antigen Gene Mutation Database [Internet]. The Blood Group Antigen Gene Mutation Database. Verfügbar unter:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/home>
25. BGMUT [Internet]. dbRBC. 2017 [zitiert 19. Jänner 2017]. Verfügbar unter:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/rbc/xslcgi.cgi>
26. Flegel WA. Genetik des Rhesus-Blutgruppensystems. *Dtsch Arztebl International.* 9. März 2007;104(10):A – 651.
27. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood.* 15. Jänner 2000;95(2):375–87.
28. Universitätsklinikum Würzburg Vorlesung Transfusionsmedizin [Internet]. [zitiert 22. Jänner 2017]. Verfügbar unter:

- <http://www.transfusionsmedizin.ukw.de/studenten/hauptvorlesung/blutgruppen-erythrozyten-ii/das-rh-system/biochemie.html>
29. Westhoff C. RhD typing Challenges Advancing Clinical Practice with RHD genotyping [Internet]. [zitiert 21. Jänner 2017]. Verfügbar unter: http://www.haabb.org/images/15-Connie_Westhoff.pdf
 30. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*. 1. Jänner 1999;93(1):385–93.
 31. Eckstein R. Immunhämatologie und klinische Transfusionsmedizin: Theorie und Praxis kompakt. 5. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2005. 228 S.
 32. Rhesusbase [Internet]. Rhesusbase. 2017 [zitiert 19. Jänner 2017]. Verfügbar unter: <http://rhesusbase.info>
 33. Flegel WA, Wagner FF. Molekularbiologie von partial D und weak D Bedeutung für die Arbeit in der Blutzentrale. *MTA Dialog*. 2002;8(3):662–5.
 34. Muller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schonitzer D, u. a. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion*. Jänner 2001;41(1):45–52.
 35. Immunobase. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA;
 36. Gelkarten, Bio-Rad [Internet]. diamed. 2017 [zitiert 19. Jänner 2017]. Verfügbar unter: http://www.diamed.com/products.aspx?mode=prod_group&id=1&navvis=yes
 37. Murken J, Herausgeber. Taschenlehrbuch Humangenetik. 8., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2011. 589 S.
 38. Alberts B, Nover L, Bronold M, Herausgeber. Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. 3. Aufl., 2. Nachdr. Weinheim: Wiley-VCH; 2011. 908 S.
 39. Taq Polymerase [Internet]. Human Genome Project. [zitiert 16. Oktober 2016]. Verfügbar unter: <http://itghumangenomeprojectwallpapers.blogspot.com/2012/12/taq-polymerase.html>
 40. Next Generation Sequencing (NGS) - An Introduction [Internet]. 2016. Verfügbar unter: https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/next_generation_sequencing_introduction.php
 41. Jahresbericht 2015. Auenbruggerplatz 48, 8020 Graz: Univ.-Klinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin;
 42. Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Rodrigues MJ, Chester MA, Olsson ML. ABO exon and intron analysis in individuals with the AweakB phenotype reveals a novel O1v-A2

- hybrid allele that causes four missense mutations in the A transferase. *BMC Genet.* 17. November 2003;4:17.
43. Matzhold EM, Wagner A, Drexler C, Wagner T. Novel ABO gene variants caused by missense mutations in Exon 7 leading to discrepant ABO blood typing results. *Transfusion.* Juni 2015;55(6 Pt 2):1589–90.
44. Rotes Kreuz ABO System [Internet]. 2017 [zitiert 19. Jänner 2017]. Verfügbar unter: <https://www.rotekreuz.at/blutspende/blut-im-detail/wissenswertes-ueber-blut/blutgruppen/>
45. Hosseini-Maaf et al. O52 [Internet]. 2017 [zitiert 10. Jänner 2017]. Verfügbar unter: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/rbc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/allele_details&id=81
46. Olsson ML, Chester MA. Heterogeneity of the blood group Ax allele: genetic recombination of common alleles can result in the Ax phenotype. *Transfus Med.* September 1998;8(3):231–8.
47. Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, Blasczyk R. The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood.* 15. Oktober 2003;102(8):3035–42.
48. Yamamoto F, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T. Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3. A(X) and B(A) alleles. *Vox Sang.* 1993;64(3):171–4.
49. Hosseini-Maaf B, Irshaid NM, Hellberg Å, Wagner T, Levene C, Hustinx H, u. a. New and unusual O alleles at the ABO locus are implicated in unexpected blood group phenotypes. *Transfusion.* 2005;45(1):70–81.
50. Matzhold EM, Drexler C, Wagner T. A novel ABO O allele caused by a large deletion covering two exons of the ABO gene identified in a Caucasian family showing discrepant ABO blood typing results. *Transfusion.* 21. August 2016;
51. Rotes Kreuz RHD Veränderungen [Internet]. 2017 [zitiert 12. Jänner 2017]. Verfügbar unter: <http://www.rotekreuz.at/ooe/die-forschung/forschungsteams/molekulare-immunhaematologie/blutgruppendiagnostik-im-rahmen-der-patiententestung/rhesus-diagnostik/>
52. Universitätsklinikum Würzburg Vorlesung Transfusionsmedizin D(weak), D(partial) [Internet]. [zitiert 22. Jänner 2017]. Verfügbar unter: <http://www.transfusionsmedizin.ukw.de/studenten/hauptvorlesung/blutgruppen-erythrozyten-ii/das-rh-system/dweak-dpartial.html>
53. Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications

for blood bank practice. Clin Lab. 2002;48(1-2):53-9.