

Diplomarbeit

**Diskrepanz in der Rhesusdiagnostik -
Ein Methodenvergleich zwischen Neo Iris und Olympus PK7300**

eingereicht von

Hugo Borstner

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinikum für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin

Klinischen Abteilung für Immunhämatologie

unter der Anleitung von

Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.med.univ. MA Thomas Wagner

Mag.rer.nat. Dr.scient.med. Bakk.rer.nat. Eva Maria Matzhold

Graz, 18. November 2025

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.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass, sofern bei der Erstellung dieser Arbeit Künstliche Intelligenz (KI) Werkzeuge zur Generierung und/oder Korrektur bestimmter Textpassagen verwendet wurden, dieser Einsatz unter Einhaltung ethischer Grundsätze, akademischer Integrität und den Vorgaben meiner Universität erfolgte, sowie in Folge dies transparent gemacht und in angemessener Weise gekennzeichnet wurde.

Graz, 18. November 2025

Hugo Borstner eh.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen jenen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Diplomarbeit, sowie im Verlauf meines Studiums Motivation und Unterstützung geschenkt haben.

Allen voran möchte ich mich herzlichst bei meinem Erstbetreuer Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. med. univ. MA Thomas Wagner für die geduldige Betreuung und die Schritt-für-Schritt Unterstützung beim Erstellen dieser Diplomarbeit bedanken! Zusätzlich möchte ich meiner Zweitbetreuerin Mag.rer.nat. Dr.scient.med. Bakk.rer.nat. Eva Maria Matzhold und das gesamte Team des Universitätsklinikums für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin meinen Dank für die Hilfe und großartige Zusammenarbeit aussprechen, die einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben. - Vielen lieben Dank dafür!

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und zwei Brüdern, die mich in den letzten Jahren durch das gesamte Studium und die Erstellung dieser Arbeit grenzenlos motiviert und in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Vielen Dank auch an meine Freundin Anna Lena, die mich mit Liebe, Motivation und Hilfe durch Hoch und Tief begleitet hat. Ohne euch wäre das nicht möglich gewesen - Danke!

In liebevoller Erinnerung widme ich diese Diplomarbeit auch meiner Großmutter, deren Herzengüte und Lebensfreude mich stets begleitet haben.

Für eure bedingungslose Unterstützung bin ich sehr dankbar!

Zusammenfassung

Die genaue Testung der Rhesusblutgruppe spielt eine wichtige Rolle in der Transfusionsmedizin. Sie dient der sicheren und effektiven Vergabe von Blutprodukten für Transfusionen und der Vermeidung von Alloimmunisierungen. Im April 2022 fand an der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin an der Universitätsklinik Graz im Bereich der Blutgruppentestung eine Geräteumstellung statt. Hier stieg man vom bis dahin verwendeten PK7300 von Beckman Coulter auf Neo Iris von Immucor um. Es handelt sich um zwei automatisierte Testgeräte für die Blutgruppenserologie. Kurz nach dem Umstieg zeigten sich im Verlauf der Testungen Diskrepanzen in zuvor getesteten Rhesusblutgruppen von Spender*Innen heraus. Besonders im Vorkommen von D weak Varianten zeigten sich Unterschiede.

Um die Ursache dieser Diskrepanz zu erforschen, werden zunächst die Grundlagen des Rhesussystems, sowie mögliche Testmethoden dargestellt. Die Information beruhen auf einer Literaturrecherche. Folglich zielt diese Studie darauf ab die spezifischen methodischen und technischen Unterschiede zwischen den beiden Geräten zu erforschen. Weiters werden die erhobenen Daten der Diskrepanzen analysiert und interpretiert. Zuletzt fokussiert sich diese Arbeit auf die möglichen Auswirkungen dieser Diskrepanzen auf die Spender*Innen, Empfänger*Innen, sowie auf die Handhabung der Blutprodukte in der Blutbank.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass von 40032 Testungen, die in dem Studienzeitraum durchgeführt wurden, 110 D weak Fälle getestet wurden. Von diesen 110 Betroffenen stellten sich bei 48 eine Diskrepanz in den historischen Testergebnissen eine Diskrepanz auf. Die Studie legt nahe, dass Neo Iris von Immucor durch modernere Hardware, höhere Sensitivität der Capture-Technologie und Verwendung von systemeigenen Reagenzien besser geeignet ist, D weak Varianten zu erkennen.

Die Studie fasst schlussendlich zusammen, dass die Diskrepanzen ausschließlich Fälle betreffen, in denen der Neo Iris Spender*Innen als D weak oder D Partial einstuft, während der Olympus diese als rein positives D klassifiziert. Blutprodukte von betroffenen Spender*Innen werden somit weiterhin als Rhesus positiv gehandhabt. Bei betroffenen Empfänger*Innen ist es von ihrer D Variante abhängig, ob diese Rhesus positiv oder negativ versorgt werden sollten. In Bezug auf das Management der Verteilung von selteneren lagernden Blutprodukten (bspw. Rh negativ) lässt sich anhand der gefundenen Diskrepanzen keine Verbesserung finden.

Abstract

The precise testing of the Rhesus blood group plays an important role in transfusion medicine. It ensures the safe and effective allocation of blood products for transfusions and the prevention of alloimmunization. In April 2022, the Department of Blood Group Serology and Transfusion Medicine at the Medical University of Graz underwent an instrument transition in the field of blood group testing. The previously used PK7300 by Beckman Coulter was replaced with the Neo Iris by Immucor. Both are automated testing systems for blood group serology. Shortly after the transition, discrepancies were observed in previously tested Rhesus blood groups of donors. In particular, differences became apparent in the detection of D weak variants.

To investigate the cause of these discrepancies, the fundamentals of the Rhesus system and possible testing methods are first presented. The information is based on a literature review. Consequently, this study aims to explore the specific methodological and technical differences between the two instruments. Furthermore, the collected data on the discrepancies are analyzed and interpreted. Finally, the thesis focuses on the potential implications of these discrepancies for donors, recipients, and the handling of blood products in the blood bank.

The results of the study show that out of 40,032 tests conducted during the study period, 110 D weak cases were identified. Among these 110 individuals, discrepancies in historical test results were found in 48 cases. The study suggests that the Neo Iris by Immucor, due to its more modern hardware, higher sensitivity of the Capture technology, and the use of proprietary reagents, is better suited to detect D weak variants.

In conclusion, the study shows that the discrepancies exclusively concern cases in which the Neo Iris classifies donors as D weak or D partial, while the Olympus classifies them as strictly D positive. Blood products from affected donors are therefore still handled as Rhesus positive. For affected recipients, the appropriate classification—Rhesus positive or negative—depends on their specific D variant. With regard to the management of rare stored blood products (e.g., Rh negative), no improvement could be identified based on the observed discrepancies.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungen und deren Erklärung	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Das Rhesus-Blutgruppensystem.....	2
2.1 Historik	2
2.2 Nomenklatur	3
2.2.1 Nomenklatur nach Wiener	3
2.2.2 Nomenklatur nach Fisher und Race.....	3
2.2.3 Unterschiede der Theorien.....	4
3 Biochemie und Genetik.....	5
3.1 Genotypen, Phänotypen und Haplotypen	5
3.2 Biochemie.....	7
3.3 Genetische Grundlagen.....	9
4 Antigene und Antikörper.....	11
4.1 D Antigen.....	11
4.1.1 D weak Typ.....	11
4.1.2 D Partial.....	12
4.1.3 D _{DEL} -Variante	13
4.1.4 -D- Phänotyp	13
4.2 C/c und E/e Antigene.....	13
4.3 G Antigen.....	14
4.4 Rhesus Null Phänomen.....	14
4.5 Rhesusantikörper	14
4.5.1 Anti-D.....	15
4.5.2 Anti-C.....	15
4.5.3 Anti-E	16

4.5.4	Anti-c	16
4.5.5	Anti-e	16
5	Grundlagen der Diagnostik	17
5.1	Schwierigkeiten der Bestimmung	17
5.2	Historie	18
5.3	Serologische Rhesus D Bestimmung	18
5.3.1	RhCcEe Phänotyp Bestimmung	19
5.4	Agglutinationsreaktion als Grundlage	20
5.4.1	Röhrchentest	20
5.4.2	Gelkartenmethode	20
5.4.3	Mikrotiterplatten	22
5.5	Einflussfaktoren der Antigen-Antikörper Reaktion	23
5.5.1	Temperatur	23
5.5.2	pH-Wert	23
5.5.3	Ionenstärke	24
5.5.4	Enzymbehandlung	24
5.5.5	Antigen-Antikörper Konzentration	24
5.5.6	Serum/Zell Verhältnis	24
5.5.7	Allgemeine Sensitivität der Testmethode	25
5.6	Molekularbiologische Testverfahren	25
5.6.1	Klinische Anwendung	26
6	Automatisierte Blutgruppentestung	28
6.1	Unterscheidung der Automaten	28
6.2	Ziele der Automatisierung	29
6.3	Vergleich PK7300 und Neo Iris	29
6.3.1	Hardwarekomponenten	30
6.3.2	Analyseprozess	33
6.3.3	Interpretationsvorgang	36
6.3.4	Testmethoden	39
7	Material und Methoden	43
8	Datenauswertung	45
9	Diskussion	48

9.1	Interpretation der Hauptbefunde.....	48
9.2	Mögliche Ursachen.....	49
9.3	Auswirkungen auf Betroffene	50
9.3.1	Auswirkungen auf Empfänger*innen.....	50
9.3.2	Auswirkungen auf Spender*innen	51
9.3.3	Auswirkungen auf den Lagerbestand	51
9.4	Klinische Folgen.....	51
9.4.1	Hämolytische Transfusionsreaktionen.....	52
9.4.2	Nicht Hämolytische Transfusionsreaktionen.....	54
9.4.3	Morbus Hämolyticus Neonatorum	55
9.5	Limitationen der Studie	56
9.6	Zukunftsausblick	56
10	Literaturverzeichnis.....	58
11	Anhang	62
11.1	Ethikvotum	62

Abkürzungen und deren Erklärung

Rh	Rhesus
LW	Landsteiner und Wiener
RhD	Rhesus D
RhCE	Rhesus CE
IgG	Immunglobulin G
RhAG	Rhesus assoziiertes Glykoprotein
kb	kilobasen
IgM	Immunglobulin M
NaCl	NatriumChlorid
IAT	Indirekter Antikörpertest
LISS	Low Ionic Strength Solution
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCR-SSP	Polymerase-Kettenreaktion mit sequenzspezifischen Primer
PCR-SSO	Polymerase-Kettenreaktion mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden
PCR-SSCP	Polymerase-Kettenreaktion mit Single-Strand Conformation Polymorphism
DNA	Desoxyribonukleinsäure
NIPT	Nicht invasiver Pränataltest
CCD	Charged Coupled Device
NTD	No type determined
INV	Invalid
TRALI	Transfusionsassoziierte Lungeninsuffizienz
TACO	Transfusion-associated Circulatory Overload
FNHTR	Febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktion
HLA	Humanes Leukozytenantigen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung eines Rhesusproteins. Jede Aminosäure wird durch einen Kreis dargestellt; schwarze Kreise kennzeichnen Positionen, die sich in allen häufigen Allelen zwischen RhD und RhCE unterscheiden, graue Kreise kennzeichnen Positionen, die sich nur in einigen Allelen zwischen RhD und RhCE unterscheiden (10).....	7
Abbildung 2: RhD- und RhCE-Modell­darstellung der 10 Exons (2)	9
Abbildung 3: Darstellung der Schwanz-an-Schwanz Konfiguration, Rh-Box und THEM50A (6)	10
Abbildung 4: Darstellung der Gelkartenmethode mit unterschiedliche Reaktionsstärken (25). Negative Reaktionen zeigen sich wie bei "0". "+" zeigt eine positive Reaktion. Die Reaktionsstärke wird anhand von "w-4" gekennzeichnet. "mf" deutet auf ein mixed field hin, und "H" zeigt eine Hämolyse.	21
Abbildung 5: Darstellung der Platten mit den Mikrowells, verwendet beim Olympus PK7300 (21)	34
Abbildung 6: Bildaufnahme der Ergebnisse einer Mikroplatte (21).	35
Abbildung 7: Darstellung, der für die Interpretation verwendeten Parameter (21).....	37
Abbildung 8: Interpretationsschema für die Parameter der Analyse (21).	38
Abbildung 9: Flowchart der Aufnahme von Spender*innen in die Studie	43
Abbildung 10: Anteil weak D an den Gesamtspenden	45
Abbildung 11: Diskrepanzen bei weak D Fällen	46
Abbildung 12: Verteilung der 50 diskrepanten weak D Fälle nach Variante und Genotyp .	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die 8 Rhesusgenkomplexe in der jeweiligen Bevölkerung (8)	5
Tabelle 2: Rh Phänotypen mit möglichen Genotypen und der Häufigkeit in der Englischen Bevölkerung (9).....	6
Tabelle 3: Agglutinationsreaktion und resultierende Ergebnisse nach der ÖGBT (15).	19
Tabelle 4: Ergebnisse bei erhöhter SPC Wichtung (26).	38
Tabelle 5: Antikörper-Antigen Verhältnis. Vergleich von Methoden (30).....	42

1 Einleitung

Die Bestimmung der Blutgruppe spielt eine wesentliche Rolle in der Durchführung der Transfusionsmedizin. Um diese Aufgabe zu bewältigen, werden an dem Universitätsklinikum für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin Graz zahlreiche automatisierte Testverfahren verwendet um Spender*innen- sowie Empfänger*innenblut auf ihre Blutgruppe zu untersuchen. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Testung, liegt in der Erhebung der Rhesusgruppe. Bis April 2022 erfolgte dies an der Klinik anhand des Gerätes PK7300 von Beckman Coulter. Ab dann erfolgte eine Umstellung auf ein Gerät namens Neo Iris von Immucor. In dem Zeitraum des Umstiegs stellten sich mehrere Diskrepanzen in den Testergebnissen heraus. Bei einigen Personen, bei denen die Ersttestung anhand des PK7300 Gerätes erfolgt war, zeigte sich in der wiederholten Testung der Rhesusgruppe mittels Neo Iris nicht übereinstimmende Ergebnisse.

Nun stellt sich die Frage, was ursächlich für unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den beiden Testgeräten und ihrer Methode ist. Weiters ist zu klären, welche Folgen diese diskrepanten Testergebnisse auf Spender*innen, Empfänger*innen, sowie auf die Blutbank mit sich bringen.

Diese Arbeit zielt darauf, die Testgeräte miteinander zu vergleichen, sowie die möglichen Folgen der diskrepanten Testergebnisse zu erforschen.

Um dieses Ziel zu erreichen, wird zunächst das Rhesus-Blutgruppensystem genauer beschrieben.

2 Das Rhesus-Blutgruppensystem

2.1 Historik

Im Jahr 1900 entdeckte Karl Landsteiner die Antigene A, B und 0 des bedeutenden ABO-Blutgruppensystems. Diese Entdeckung, die ihm 1930 den Nobelpreis für Medizin einbrachte, legte den Grundstein für die Entwicklung der Transfusionsmedizin, einschließlich der Blutgruppenserologie und der Praxis der Bluttransfusion. Auch die Entdeckung des Rhesus-Systems ist auf Landsteiner zurückzuführen (1).

Innerhalb von zwei Jahren führten drei wissenschaftliche Erkenntnisse zur weiteren Erforschung des Rhesus-Blutgruppensystems. 1939 untersuchten die Wissenschaftler Levine und Stetson einen Fall, bei dem eine Frau nach einer Bluttransfusion mit dem Blut ihres Ehemannes eine hämolytische Transfusionsreaktion entwickelte. Anlass für diese Transfusion war eine Totgeburt. Im Serum der Frau entdeckten Levine und Stetson einen Antikörper, der die Erythrozyten ihres Ehemannes agglutinierte. Diese Agglutinationsreaktion konnte auch bei 80 Prozent der ABO-kompatiblen Blutspender*innen nachgewiesen werden. Daraus schlussfolgerten die Wissenschaftler, dass dieses neu entdeckte, noch unbenannte Antigen unabhängig von den damals bekannten Blutgruppensystemen ABO, MN und P existierte (2).

In den Jahren vor 1940 injizierten Landsteiner und Wiener Erythrozyten von Rhesusaffen in Meerschweinchen und Hasen. Aus deren Blutseren konnten die gebildeten Antikörper isoliert werden. Es stellte sich heraus, dass diese Antikörper sowohl die Erythrozyten der Rhesusaffen, als auch die Erythrozyten von 85 Prozent der weißen Bevölkerung in New York agglutinierten. Landsteiner und Wiener nannten diese Antikörper „Anti-Rh“ (3).

Zur gleichen Zeit forschten Wiener et al. an Transfusionsfällen, bei denen trotz ABO-Kompatibilität Komplikationen auftraten. Die in diesen Blutseren gefundenen Antikörper wiesen dieselbe Spezifität auf wie die von Levine und Stetson beschriebenen sowie die von Landsteiner und Wiener entdeckten „Anti-Rh“-Antikörper. Folglich wurden auch die humanen Antikörper als Anti-Rhesus oder Anti-Rh bezeichnet (1).

20 Jahre später wurde jedoch bewiesen, dass die humanen Antikörper und die xenogenen Antikörper nicht mit demselben Antigen reagierten. Da, das durch die humanen Antikörper identifizierte Antigen, in zahlreichen Publikationen bereits als Rh bezeichnet worden war und eine Umbenennung nicht mehr in Frage kam, entschied man sich, stattdessen das

tierische Antigen umzubenennen. Dieses wurde fortan zu Ehren von Landsteiner und Wiener als LW bezeichnet (4).

2.2 Nomenklatur

Im Laufe der Geschichte haben sich zwei Nomenklaturmethoden etabliert, um das komplexe Rhesus-System zu beschreiben. Es stellte sich heraus, dass neben dem zunächst entdeckten Rh⁺ Antigen noch weitere Antigene existieren. Bis 1943 wurden vier zusätzliche Antigene identifiziert, die der englische Mathematiker und Genetiker Fisher mit den Bezeichnungen D, C, c und E benannte. Das Antigen D entsprach dabei dem ursprünglich bekannten Antigen (1). Fisher erkannte eine besondere Beziehung zwischen C und c: Jede C-negative Person war gleichzeitig c-positiv und umgekehrt. Diese Eigenschaft ist typisch für Allelie, weshalb Fisher die Bezeichnungen C und c wählte. Auf dieser Grundlage nahm er an, dass es auch zu den Antigenen D und E jeweils ein gegensätzliches Allel geben müsse, das er d und e nannte. Später wurde tatsächlich ein Anti-e nachgewiesen. Ein Anti-d konnte hingegen bis heute nicht identifiziert werden, weshalb das „d“ lediglich als stilles D betrachtet wird (1). Die beiden daraus entstandenen Nomenklaturmethoden basieren auf unterschiedlichen genetischen Theorien des Rhesus-Systems, die in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden (5).

2.2.1 Nomenklatur nach Wiener

Nach der Entdeckung des Rh-Antigens durch Landsteiner und Wiener versuchten sie, die Vererbung dieses Antigens zu erklären. Ihre Schlussfolgerung war, dass die Produktion der Rhesus-Antigene durch einen einzigen Genlocus mit multiplen Allelen gesteuert wird (6). Jedes dieser Allele kodiert ein Antigen, das aus mehreren Faktoren besteht. Beispielsweise kodiert R_1 die Faktoren Rh₀, rh' und hr'' (entspricht DCe nach Fisher und Race), während R_2 die Faktoren Rh₀, hr' und rh'' (entspricht DcE nach Fisher und Race) kodiert (5).

2.2.2 Nomenklatur nach Fisher und Race

Im Jahr 1944 schlug Fisher einen alternativen Mechanismus für das Rhesus-System vor. Anstatt von einem einzelnen Gen auszugehen, postulierte er, dass der Haplotyp aus drei eng miteinander verknüpften Genen besteht, von denen jedes zwei Allelvarianten aufweist. Zur Benennung der jeweiligen Antigene und ihrer zugehörigen Allele sollte nun jeweils ein

Buchstabe verwendet werden: C, c, D, d, E und e. Die zuvor angenommene Existenz eines einzigen Antigens ersetzten Fisher und Race durch die Kombination aus drei Antigenen (6).

2.2.3 Unterschiede der Theorien

Wiener war der Ansicht, dass jedes Antigen qualitativ unterschiedlich sei und durch seine Reaktion mit verschiedenen Antiseren definiert werde. Er vertrat die Auffassung, dass jedes Antigen mit einer Reihe von Antikörpern unterschiedlicher Spezifitäten reagieren könne. Fisher hingegen war der Meinung, dass eine Antigen-Antikörper-Reaktion nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip abläuft. Die Spezifität der einzelnen Reaktionen sei demnach das Ergebnis der Kombination aus drei Antigenen (6).

In Wieners Theorie entsprach jedes Antigen einem einzelnen Allel, das eine Variante eines Gens darstellte. Fisher hingegen argumentierte, dass drei unabhängige Genloci mit jeweils zwei möglichen Allelen die Rhesus-Antigene bestimmen. Somit war Fishers Theorie vergleichsweise einfach: Eine Allelvariante kodiert für ein einziges Antigen, das mit einem einzigen Antikörper reagiert (6).

Zusammenfassend lassen sich zwei unterschiedliche Konzepte des Rhesus-Systems beschreiben: Die Fisher-Race-CDE-Terminologie erklärt den Zusammenhang zwischen drei Antigenen mit unterschiedlichen Allelen und Genloci. Wiener hingegen ging von der Existenz zahlreicher qualitativ unterschiedlicher Allele auf demselben Gen aus (6).

Um die Zusammenhänge besser zu verstehen, die genetischen Grundlagen zu erfassen und Rh-Phänotypen sowie Genotypen ableiten zu können, eignet sich die CDE-Nomenklatur von Fisher und Race besser als die von Wiener. Aus diesem Grund hat sich diese Schreibweise in wissenschaftlichen Publikationen weltweit durchgesetzt und wird auch in dieser Diplomarbeit als dominantes Nomenklatorsystem verwendet. Ein Vorteil der Wienerschen Nomenklatur liegt jedoch in der praktischen Anwendung in der mündlichen Kommunikation (1).

3 Biochemie und Genetik

Das Rhesus-System stellt das klinisch wichtigste proteinbasierte Blutgruppensystem dar. Mit einer Vielzahl an beschriebenen Antigenen zählt es zugleich als das umfangreichste unter den bekannten Blutgruppensystemen. Die außergewöhnlich hohe Anzahl an Antigenen lässt sich durch die komplexe genetische Struktur des Systems erklären. Diese Antigene sind auf zwei eng verwandten Transmembranproteinen lokalisiert RhD und RhCE, deren unterschiedliche Aminosäuresequenzen für die Vielfalt an Antigenen verantwortlich sind (7). In den folgenden Kapiteln wird die Biochemische und genetische Grundlage des Rhesussystems näher beschrieben.

3.1 Genotypen, Phänotypen und Haplotypen

Die Gene des Rhesus-Systems befinden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1. An einem Genlocus liegt das Allel D, während am benachbarten zweiten Genlocus entweder die Allele C oder c sowie E oder e vorkommen. Da an diesen festgelegten Genloci jeweils nur eines der drei möglichen Allele vertreten sein kann, ist die Anzahl der möglichen Haplotypen auf acht begrenzt (8). Diese sind in der Tabelle 1, inklusiv der Häufigkeiten aufgelistet.

CDE-Nomenklatur	Wiener'sche Nomenklatur	Häufigkeit in %		
		Engländer *innen	Nigerianer *innen	Chines*innen
CDe	R ₁	42	6	73
cde	r	39	20	2
cDE	R ₂	14	12	19
cDe	R ₀	3	59	3
Cde	r'	1	selten	selten
cdE	r''	1	3	2
CDE	R _z	<1	selten	<1
CdE	r _y	selten	selten	<1

Tabelle 1: Die 8 Rhesusgenkomplexe in der jeweiligen Bevölkerung (8)

Diese acht Haplotypen können zu insgesamt 36 Genotypen kombiniert werden. Serologische Tests mit Anti-D, -C, -c, -E und -e zeigen jedoch nur 18 verschiedene Phänotypen (9). Von diesen 18 Phänotypen repräsentieren lediglich acht einen einzelnen Genotyp, während die übrigen zehn zwei, drei oder sogar zehn verschiedene Genotypen repräsentieren können (siehe Tabelle 2) (5). Dies liegt daran, dass es kein Anti-d gibt, da „d“ lediglich das Fehlen von D bezeichnet. Daher ist es serologisch nicht möglich, eine Homozygotie D/D von einer Heterozygotie D/d zu unterscheiden. Beispielsweise kann DCE/dCe serologisch nicht von

DCe/DCe unterschieden werden. Ebenso ist es unmöglich, bei einer C/c- und einer D/d-Heterozygotie serologisch zu bestimmen, ob sich das D auf demselben Chromosom wie C befindet oder nicht. Daher ist eine Unterscheidung zwischen DCe/dce und dCE/Dce ebenfalls nicht möglich. Dasselbe gilt für die Kombinationen D/d und E/e sowie C/c und E/e. Mit den üblichen serologischen Testmethoden lassen sich DcE/dce und Dce/dcE sowie DCe/DcE und DCE/Dce nicht voneinander differenzieren (9).

Phänotyp	Genotyp	Häufigkeit in %
DCe/DCe	DCe/DCe	17,68
	DCe/dCe	0,82
DcE/DcE	DcE/DcE	1,99
	DcE/dcE	0,34
Dce/dce	Dce/dce	2,00
	Dce/Dce	0,07
DCE/DCE	DCE/DCE	<0,01
	DCE/dCE	<0,01
DCe/dce	DCe/dce	32,68
	DCe/Dce	2,16
	Dce/dCe	0,05
DcE/dce	DcE/dce	10,97
	DcE/Dce	0,73
	Dce/dcE	0,06
DCe/DCE	DCe/DCE	0,20
	DCE/dCe	<0,01
	DCe/dCE	<0,01
DcE/DCE	DcE/DCE	0,07
	DCE/dcE	<0,01
	DcE/dCE	<0,01
DCe/DcE	DCe/DcE	11,87
	DCe/dcE	1,00
	DcE/dCe	0,28
	DCE/dce	0,19
	Dce/DCE	0,01
	Dce/dCE	<0,01
dCe/dCe*	dCe/dCe	0,01
dcE/dcE*	dcE/dcE	0,01
dce/dce*	dce/dce	15,10
dCE/dCE*	dCE/dCE	<0,01
dCe/dce*	dCe/dce	0,76
dcE/dce*	dcE/dce	0,92
dCe/dCE*	dCe/dCE	<0,01
dcE/dCE*	dcE/dCE	<0,01
dcE/dCe	dcE/dCe	0,02
	dCE/dce	<0,01

*Nur ein möglicher Genotyp

Tabelle 2: Rh Phänotypen mit möglichen Genotypen und der Häufigkeit in der Englischen Bevölkerung (9)

In der kaukasischen Bevölkerung ist der Rh-Phänotyp D⁺, C⁺, c⁺, E⁻, e⁺ am häufigsten. Wird dieser als Genotyp notiert, schreibt man ihn als DCe/dce (Kurzform: R1r). Allerdings ist zu beachten, dass es sich hierbei, trotz der Bezeichnung als Genotyp, nicht um den tatsächlichen Genotyp handelt. Derselbe Phänotyp kann auch vom Genotyp DCe/Dce oder Dce/dCe stammen. Der Rückschluss auf den Genotyp DCe/dce erfolgt anhand der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Genotypen in der Bevölkerung. In der kaukasischen Bevölkerung ist DCe/dce 15-mal häufiger als DCe/Dce und 650-mal häufiger als Dce/dCe. Diese Häufigkeitsverteilung variiert zwischen unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen (siehe Tabelle 1). Es ist entscheidend, zwischen dem tatsächlichen und dem wahrscheinlichen Genotyp zu unterscheiden (9).

3.2 Biochemie

Die Gene RHD und RHCE kodieren Polypeptide, die aus 417 Aminosäuren bestehen. Das N-terminale Methionin, das als Translationsinitiationssignal dient, wird jedoch von den reifen Proteinen abgespalten. Abhängig vom RHCE-Allel unterscheiden sich die RhD- und RhCcEe-Polypeptidketten lediglich um 31 bis 35 Aminosäuren. Die Differenz zwischen einer C/c-Kette beträgt 4 Aminosäuren, während zwischen E/e-Ketten nur ein Unterschied von einer Aminosäure vorliegt (9).

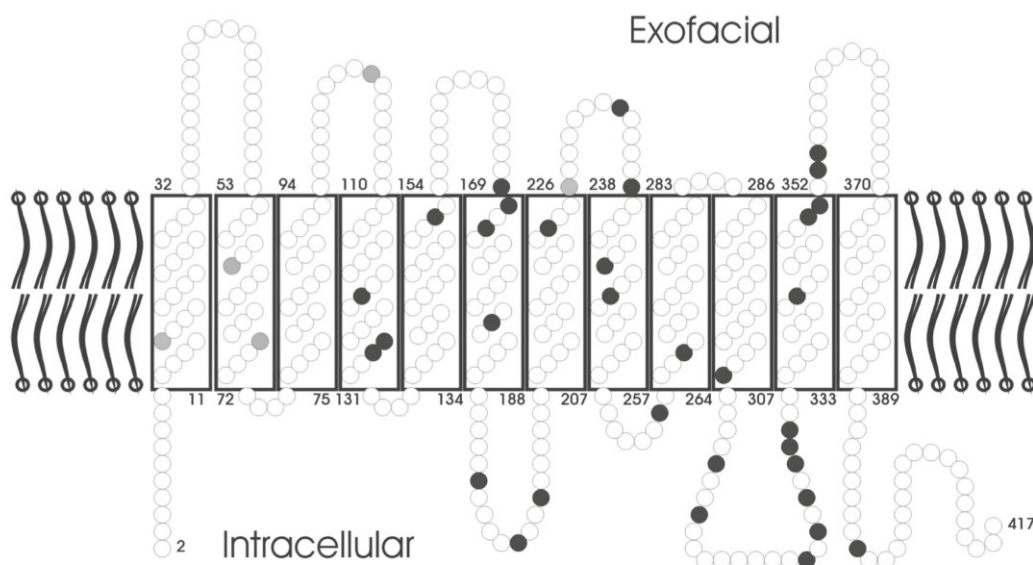


Abbildung 1: Darstellung eines Rhesusproteins. Jede Aminosäure wird durch einen Kreis dargestellt; schwarze Kreise kennzeichnen Positionen, die sich in allen häufigen Allelen zwischen RhD und RhCE unterscheiden, graue Kreise kennzeichnen Positionen, die sich nur in einigen Allelen zwischen RhD und RhCE unterscheiden (10).

Anhand der Analyse der Aminosäuresequenzen lässt sich die Struktur der Rhesusproteine ableiten. Diese durchqueren die Membranlipiddoppelschicht zwölfmal und bilden dabei sechs Schleifen auf der Außenseite der Zellmembran. Diese Schleifen stellen potenziell die Strukturen für die Expression der Rh-Antigene dar. Die N- und C-Termini befinden sich auf der Membrannenseite im Zytoplasma (9). Im Bereich der dritten und vierten extrazellulären Schleife sowie der sechsten, siebten und achten Schleife befindet sich ein kleines Vestibulum, das den Zugang für IgG-Antikörper ermöglicht (5). Siehe Abbildung 1. Die Komplexität des Rhesussystems liegt unter anderem in der Konformation der Rhesusproteine und ihrer polytopischen Struktur. Rhesusantigene sind stark von ihrer Konformation innerhalb der Zellmembran abhängig. Die Rhesusproteine interagieren mit einer oder mehreren extrazellulären Domänen und können dadurch leicht beeinflusst werden. Bereits geringfügige Veränderungen am Protein, wie beispielsweise eine Aminosäuresubstitution in einer membrandurchspannenden Domäne, können ausreichen, um die Struktur und damit die Expression des Antigens zu verändern (5).

Vergleicht man die Rh-Proteine mit anderen Membranproteinen, so fällt auf, dass Rh-Proteine nicht glykolysiert sind. Es zeigt sich jedoch eine intrazelluläre Assoziation zwischen dem Rhesusprotein und einem Glykoprotein mit der Bezeichnung Rh-assoziiertes Glykoprotein (RhAG). Diese beiden Proteine sind zu 33 % ident und weisen eine ähnliche Anordnung in der Membran auf. RhAG ist jedoch mit einem einzigen N-verknüpften Zucker auf der ersten Schleife glykolysiert und wird auf Chromosom 6 kodiert. RhAG trägt keine Rhesusantigene, ist jedoch essenziell für deren Expression (9).

3.3 Genetische Grundlagen

Die Rhesusgene RHD (#111680 in der OMIM Datenbank (11)) und RHCE (#111700 in der OMIM Datenbank (12)) weisen eine nahezu identische genomische Struktur auf, bestehend aus zehn Exons. Die Exons 1–7 kodieren jeweils 50–60 Aminosäuren des Proteins, während die Exons 8–10 für die letzten 58 Aminosäuren verantwortlich sind. Siehe Abbildung (2).

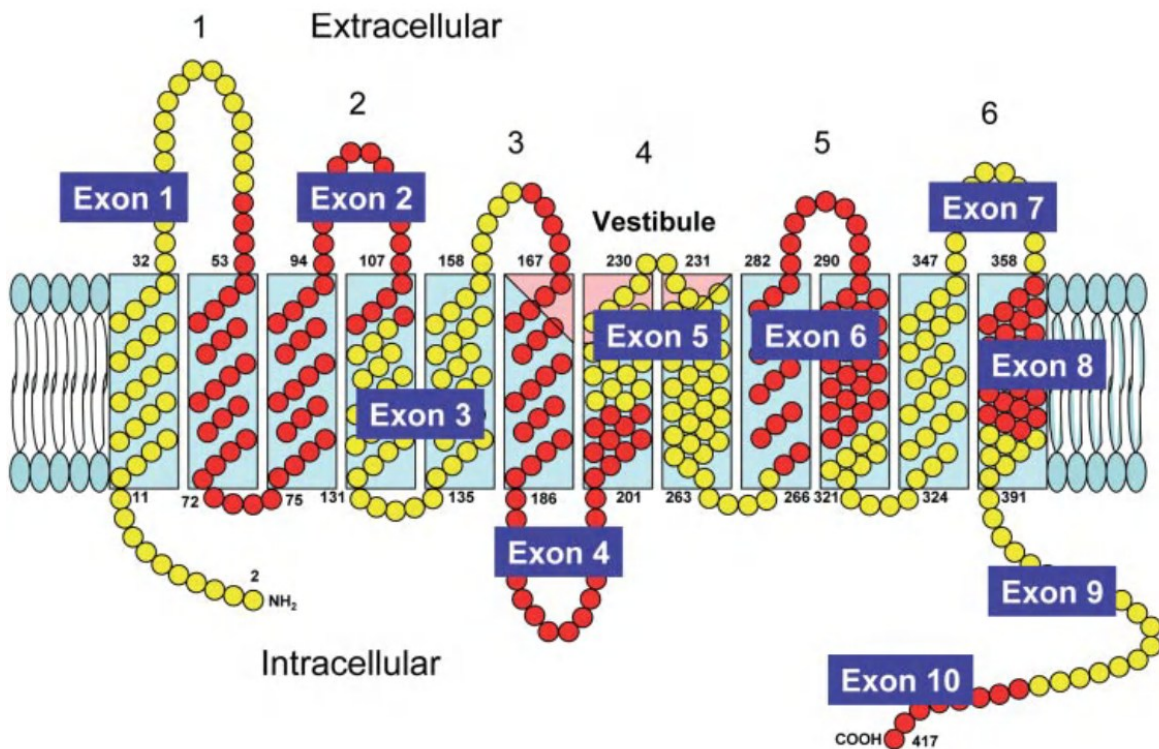
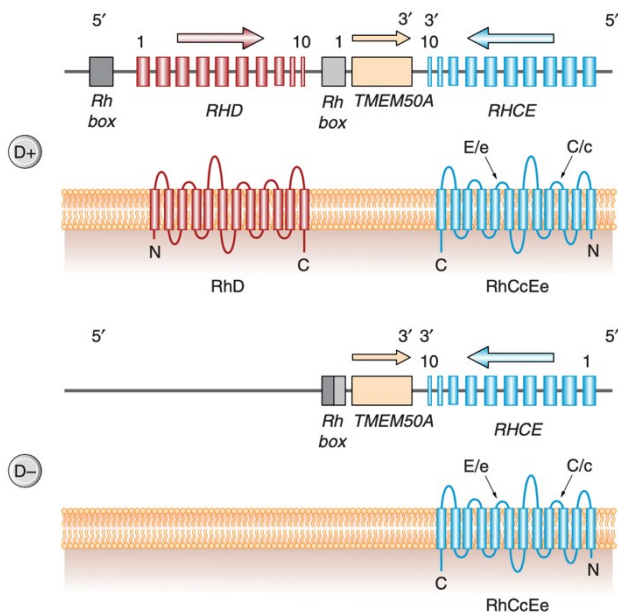


Abbildung 2: RhD- und RhCE-Modelldarstellung der 10 Exons (2)

Alle Introns und kodierenden Exons der Rhesusgene RHD und RHCE stimmen zu 93,8 % überein. Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch in einer Deletion von etwa 600 Basenpaaren im vierten Intron des RHD im Vergleich zu RHCE (5).

Eine Besonderheit der Rhesusgene ist ihre entgegengesetzte Orientierung auf dem Chromosom, in einer Schwanz-an-Schwanz-Konfiguration: 5'RHD3'–3'RHCE5'. Siehe Abbildung 3. Der kodierende Strang von RHD entspricht nicht dem kodierenden Strang von RHCE und umgekehrt. Die beiden Gene RHD und RHCE sind etwa 30 kb voneinander entfernt. In diesem Abschnitt befindet sich das Gen TMEM50A (5).



Das RHD-Gen ist von zwei hoch homologen DNA-Abschnitten umgeben, den sogenannten upstream- und downstream-Rhesusboxen, die jeweils eine Größe von etwa 9000 bp aufweisen. Bei Personen mit einer RHD-Deletion lässt sich eine hybride Rhesusbox nachweisen (13). Siehe Abbildung 3.

Abbildung 3: Darstellung der Schwanz-an-Schwanz Konfiguration, Rh-Box und THEM50A (6)

4 Antigene und Antikörper

4.1 D Antigen

Das D-Antigen ist eines der wichtigsten Antigene in der Transfusionsmedizin. Lediglich die Antigene des ABO-Blutgruppensystems haben eine höhere Bedeutung. Die D⁺ und D⁻ Phänotypen werden auch als Rh⁺ und Rh⁻ bezeichnet. Ein Antikörper gegen das D-Antigen kann schwere Transfusionsreaktionen hervorrufen, beispielsweise einen Morbus haemolyticus neonatorum. Mindestens 30 % der D-negativen Empfänger*innen von D-positiv transfundiertem Blut bilden Anti-D (9).

Ein D-negativer Phänotyp entsteht durch das Fehlen des RhD-Proteins, weshalb kein Anti-d gefunden werden kann. Das „d“ repräsentiert also lediglich das Fehlen von D. In der kaukasischen Bevölkerung resultiert der D-negative Phänotyp aus dem homozygoten Fehlen des RHD-Gens. In der afrikanischen Bevölkerung ist jedoch in 66 % der D-negativen Fälle ein RHD-Gen vorhanden, das allerdings inaktiv ist und somit kein D-Protein und kein D-Antigen produziert (9).

Die genetische Untersuchung des D-Antigens zeigt zahlreiche definierte Varianten. Häufig liegt die Ursache in einem einzelnen Aminosäureaustausch, der entweder die quantitative Expression des Antigens oder die Struktur der Epitope beeinflusst. In manchen Fällen führt eine Mutation des RHD-Gens zu einem Austausch von genetischem Material zwischen RHD und RHCE. Dabei werden einzelne Exons des RHD-Gens durch Exons aus dem RHCE-Gen ersetzt, wodurch Hybridproteine entstehen (9).

4.1.1 D weak Typ

Ein D weak Typ zeichnet sich durch eine reduzierte Anzahl an D-Antigenen auf der Oberfläche der Erythrozyten aus (weniger als 5000 D-Antigene pro Erythrozyt). Ursache für diese quantitative Verringerung ist eine Aminosäuresubstitution in den transmembranösen oder intrazellulären Bereichen des Antigens. Es wird vermutet, dass diese Aminosäureveränderung zu einer Fehlfaltung während des Einbaus in die Zellmembran führt und dadurch die Verankerung in der Erythrozytenmembran beeinträchtigt wird (14).

Als Beispiel wird in einer Publikation von Matzhold et al. ein RHD-Allel mit einer in-frame Deletion von TCT beschrieben, wodurch es zu einer Deletion von Phenylalanin an dieser Stelle kommt. Dies führt zu einer Veränderung an der ersten extrazellulären Schleife des D-Antigens und folglich zu einer geringeren D Antigen Expression (15).

Bislang wurden insgesamt 165 D weak Antigene beschrieben, wobei einige dieser Antigene noch Untergruppen besitzen. Entnommen wurde diese Anzahl aus der "004 RHD Alleles" Liste von der International Society of Blood Transfusion vom 31. Juli 2023 (16).

Es kommt zu einer quantitativen Verringerung der D-Antigene auf der Zelloberfläche, jedoch nicht zu einer qualitativen Veränderung. 95 % der kaukasischen D weak Träger*innen gehören zu den D weak Typen 1, 2, 3 oder 4.0/4.1. Bislang konnte nicht nachgewiesen werden, dass nach einer RhD-positiven Transfusion ein Allo-Anti-D gebildet wurde. Andere D weak Typen (bis D weak Typ 165) weisen jedoch die Möglichkeit auf, bei Kontakt mit D-positivem Blut ein Allo-Anti-D zu entwickeln (14).

Es existiert allerdings ein Genotyp, der einen D weak Typ vortäuschen kann. Race und Sanger beobachteten ein gehäuftes Auftreten des D weak Typs bei CDe/Cde-Genotypen. Ceppellini stellte fest, dass die Kombination von CDe mit Cde zu einer Abschwächung des D-Antigens führt (1). Das D-Antigen wird in seinen serologischen Eigenschaften durch das C-Antigen abgeschwächt. Dabei wirkt sich das C in trans-Stellung (auf dem Cde) stärker auf die Abschwächung aus, als das C in cis-Stellung (auf dem CDe). Dieser Effekt wird als Positionseffekt bezeichnet (8).

Hier ist kurz anzumerken: Die International Society of Blood Transfusion, kurz ISBT, ist eine weltweit tätige Organisation, die sich der Weiterentwicklung der Transfusionsmedizin widmet. Sie ist eine wissenschaftliche Gesellschaft, die 1935 gegründet wurde und heute als globales Wissensnetzwerk für Transfusionsfachleute dient.

4.1.2 D Partial

Ähnlich wie beim D weak Typ können beim D-Partial Aminosäuresubstitutionen die Ursache sein. Diese betrifft mindestens eines der vielen extrazellulären Epitope des RhD-Antigens. Durch diese Substitution kann es zu einer Veränderung oder einem Fehlen bestimmter Epitope kommen. Serologisch imponiert ein D-Partial oft als normales D+ Antigen. Im Rahmen von Routineuntersuchungen bleibt ein D-Partial unentdeckt, es sei denn, die betroffene Person wurde in der Vergangenheit mit Rhesus-D-positivem Blut konfrontiert (z. B. durch eine Transfusion), woraufhin sich ein Allo-Anti-D bildet. Gelegentlich weisen D-Partial-Träger*innen eine reduzierte Expression der D-Antigene auf der Erythrozytenoberfläche auf, wodurch sie serologisch einem D weak Typ ähneln (17). Bislang wurden 136 D-Partial-Typen beschrieben, basierend auf der "004 RHD Alleles"-Liste der International Society of Blood Transfusion.

Die D-Partial-Typen werden in D-Kategorien unterteilt. In der kaukasischen Bevölkerung ist der Typ DVI am häufigsten. Zudem hat DVI die höchste Wahrscheinlichkeit für die Bildung eines Allo-Anti-D-Antikörpers. Die Prävalenz von DVI in Deutschland liegt bei 0,02 % (17).

4.1.3 D_{EL}-Variante

Bei der D_{EL} Variante handelt es sich um eine extreme Abschwächung der Rhesus D Expression. Diese D Variante erscheint in der serologischen Routine-Testung als Rhesus negativ da sie sogar für die Einstufung als D weak Typ keine ausreichende Reaktionsstärke zeigt. Nur mit der hochsensitiven Methode der Elution/Adsorption lässt sich eine D_{EL} Variante nachweisen. In den europäischen Regionen kommt diese Variante nur selten vor. Im asiatischen Raum hingegen weisen bis zu 30% der D-Negativen Personen eine D_{EL} Variante auf (17).

4.1.4 -D- Phänotyp

Der -D- Phänotyp ist ein selten vorkommendes Phänomen mit einer Prävalenz von 0,0005 in Schweden und 0,005 in Lateinamerika. Die Molekulare Basis beruht meist auf einer Homozygotie für RHCE-D-CE Hybride. Personen mit diesem Phänotyp besitzen keine Expression von CcEe-Antigenen auf ihren Erythrozyten. Betroffene zeigen jedoch meistens eine erhöhte Expression des Antigen D (18).

Aufgrund der Rarität dieses Phänotyps, kann es im Bedarfsfall, etwa bei einer notwendigen Bluttransfusion von Betroffenen, zu erheblichen Versorgungsschwierigkeiten kommen. Im beschriebenen Fall von Matzhold et al (2021) kam es bei einer durch anti-Rh17 ausgelösten Fetalen Anämie bei der Schwangerschaft einer Multipara mit -D- zu dieser Problematik. Nur eine einzige weitere Person in Österreich kam für eine Spende in Frage, welches weiterführend zu ethische Fragestellungen führte (18).

4.2 C/c und E/e Antigene

Die weiteren klinisch wichtigen Antigene C, c, E und e unterscheiden sich nur an fünf Aminosäurepositionen. Die Antigene C und c sowie E und e sind zueinander antithetisch. Das bedeutet, dass ein Protein nur eines der antithetischen Antigene exprimieren kann. Ursache hierfür sind Proteinpolymorphismen. Unterschiedliche Varianten eines Proteins werden an derselben Genlokation transkribiert, sodass jeweils nur eine Variante des Proteins

gleichzeitig existieren kann. Häufig liegt lediglich eine einzige Aminosäureveränderung vor, wie beispielsweise bei E und e: Befindet sich an Position 226 des RhCE-Allels ein Prolin, wird das Antigen E exprimiert. Ist an dieser Stelle stattdessen ein Alanin vorhanden, so wird das Antigen e gebildet. Ähnliches gilt für die antithetischen Antigene C/c. Die Antigenpaare E/e und C/c sind jedoch nicht zueinander antithetisch, da sie unterschiedliche Aminosäurepositionen betreffen (7).

Hier ist noch das Vorkommen von einem C_w Antigen zu erwähnen. Das C_w Antigen bildet sich meist durch eine Punktmutation im RHCE-Gen. Hierbei kommt es zu einer Konformationsänderung und folglich zu einem abgeschwächten C (9).

4.3 G Antigen

Das G-Antigen wurde erstmals von Allen und Tippett beschrieben. Es tritt auf Erythrozyten auf, die entweder das C- oder das D-Antigen (oder beide) tragen. Fehlen beide Antigene, wird in den meisten Fällen auch kein G exprimiert. Die höchste Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen von G besteht, wenn sowohl D als auch C vorliegen – in der kaukasischen Bevölkerung bei 84 % der Menschen. Das Rhesus-G-Antigen wird durch die RHD- und RHCE-Gene kodiert. Fehlt an Position 103 eines dieser Gene Serin und liegt stattdessen Prolin vor, wird kein G exprimiert (19).

4.4 Rhesus Null Phänomen

Weist das Blut keinerlei Rhesusantigene auf, spricht man vom Rhnull-Syndrom. In den meisten Fällen besteht gleichzeitig eine hämolytische Anämie mit unterschiedlich starker Ausprägung (8).

Je nach Art der Mutation wird zwischen einem amorphen Typ und einem Regulortyp des Rhnull-Syndroms unterschieden. Beim amorphen Typ fehlt die Expression sämtlicher Rhesusantigene vollständig. Ursache hierfür ist eine Mutation im RhCE-Gen bei RhD-negativem Blut. Der häufigere Regulortyp beruht auf einer Mutation im Gen des RhAG-Proteins. Da dieses Protein fehlt, können die Rhesusantigene nicht in die Zellmembran der Erythrozyten eingebaut werden (8).

4.5 Rhesusantikörper

Die Antikörper im Rhesus-System sind grundsätzlich nicht präformiert. Sie entstehen erst durch eine Immunisierung, beispielsweise bei parenteralem Kontakt mit fremdem Blut (z.

B. durch Bluttransfusionen oder Blutinjektionen) oder während der Schwangerschaft durch Mosaikdifferenzen zwischen Mutter und Kind. Rhesus-Antikörper gehören überwiegend zur IgG-Klasse, seltener treten sie als IgM-Antikörper auf (8). In einer NaCl-Lösung führen IgG-Rhesusantikörper nicht zur Agglutination der Erythrozyten. Erst durch die Zugabe von Albumin, Antiglobulinserum oder Enzymen kommt es zur Agglutination. Daher gelten sie als inkomplette Antikörper. Im Gegensatz dazu sind die seltenen IgM-Antikörper komplette Antikörper, die bereits in einer NaCl-Lösung eine Agglutination hervorrufen. Sie werden auch als Agglutinine bezeichnet (1).

Allerdings ist die Trennung zwischen inkompletten und kompletten Antikörpern nicht immer eindeutig. Meistens enthalten Seren eine Mischung aus beiden Antikörperformen. Besonders hervorzuheben ist, dass alle Antikörpertypen beim Enzymtest positiv reagieren, was diesen zum empfindlichsten Test für das Auffinden von Rhesus-Antikörpern macht (1).

4.5.1 Anti-D

Abgesehen von Anti-A und Anti-B ist Anti-D der wichtigste und früher häufigste Antikörper im Transfusionswesen. Dies ist auf die starke Antigenität des D-Antigens zurückzuführen. Anti-D kann potenziell schwerwiegende hämolytische Transfusionsreaktionen auslösen. Mindestens 30 % der D-negativen Empfänger*innen von D-positivem Blut entwickeln Anti-D (8).

Besondere klinische Relevanz hat Anti-D zudem in der Schwangerschaft, da es einen Morbus haemolyticus neonatorum verursachen kann (9).

4.5.2 Anti-C

Das Anti-C im Rhesus-System wird grundsätzlich als Anti-CCw-Mischantikörper beschrieben und tritt häufig in Kombination mit Anti-D auf. Die Seltenheit dieses Antikörpers beruht auf zwei Faktoren: Zunächst ist das C-Antigen äußerst schwach ausgeprägt (8). Weiters besitzen sowohl D-positive als auch C-positive Personen das Rhesusantigen G. Da beide G-positiv sind, wird das C-Antigen nicht als besonders fremd wahrgenommen (1). C-negative Personen bilden bei einer Immunisierung gegen C stets ein Anti-CCw, während eine Immunisierung gegen Cw zu einem reinen Anti-Cw führt (8).

4.5.3 Anti-E

Beim Anti-E handelt es sich um den zweithäufigsten Antikörper des Rhesussystems. Ebenso wie das Anti-C, ist auch das Anti-E häufig von einem Anti-D begleitet. Die Menschen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für ein Anti-E sind R1r-Individuen (CcDdee), da diese alle anderen Antigene aufweisen, außer E und somit keine Antikörper gegen die anderen Antigene bilden können (1).

Weiters wurde Anti-E bereits bei Personen, die jeglichen Kontakt zu fremdem Blut verneinten, gefunden und kommt somit auch gelegentlich als natürlicher Antikörper vor (1).

4.5.4 Anti-c

Obwohl das c-Antigen eine Häufigkeit von 82% in der Bevölkerung ausmacht, stellt sich das c-Antigen als ein schwaches Antigen dar. Gebildet wird das Anti-c fast ausschließlich von D-positiven Individuen mit einem CCDee Phänotyp. Weiters ist das Anti-c häufig mit einem Anti-E verbunden (1).

4.5.5 Anti-e

Ein Anti-e ist in der Bevölkerung sehr selten, da nur 2–3 % der Menschen e-negativ sind und somit potenziell Anti-e bilden können (8).

5 Grundlagen der Diagnostik

Die Blutgruppenbestimmung ist ein zentrales Element der Transfusionsmedizin. Sie gewährleistet die sichere Versorgung von Patient*innen mit passenden Blutprodukten und verhindert schwerwiegende immunologische Reaktionen. Besonders das Rhesus-System, insbesondere das D-Antigen, stellt aufgrund seiner genetischen Komplexität und der klinischen Relevanz eine besondere diagnostische Herausforderung dar. Dieses Kapitel widmet sich den grundlegenden Aspekten und Schwierigkeiten der serologischen Diagnostik im Rhesus-System, beleuchtet historische Entwicklungen sowie moderne Testverfahren und zeigt auf, welche Einflussfaktoren bei der Antigen-Antikörper-Reaktion berücksichtigt werden müssen. Ziel ist es, ein vertieftes Verständnis der diagnostischen Prozesse zu schaffen und die Relevanz einer präzisen RhD-Bestimmung im klinischen Alltag zu unterstreichen.

5.1 Schwierigkeiten der Bestimmung

Aufgrund der Unterschiede zwischen dem Rhesus-Blutgruppensystem und dem ABO-System ergeben sich in der Diagnostik besondere Herausforderungen, die zu beachten sind. Zunächst liegen im Rhesus-System grundsätzlich keine natürlich vorkommenden Antikörper vor – anders als im ABO-System, in dem die bekannten Isoagglutinine Anti-A und Anti-B existieren. Aufgrund dessen stehen bei der ABO-Diagnostik zwei Säulen zur Verfügung: der Test auf die Antigene auf den Erythrozyten sowie die Gegenprobe zur Überprüfung der vorhandenen Isoagglutinine im Plasma. Anti-D hingegen bildet sich erst nach Kontakt mit einem D-Antigen, weshalb die Serumseite der Diagnostik hier nicht angewendet werden kann (20).

Das D-Antigen präsentiert sich anhand der verschiedenen Epitope eines Membranproteins. Da eine Vielzahl von Allel-Varianten existiert, die zu unterschiedlichen Epitope führen, ergibt sich das Problem, dass monoklonale Anti-D-Seren in der Erkennung dieser Varianten stark variieren. Zudem können auch Rhesus-positive Personen Anti-D bilden. Hier spricht man vom Partial-D-Phänomen (20).

Eine weitere Problematik, die gleichzeitig die Bedeutung der genauen Rhesus-Bestimmung unterstreicht, ist die begrenzte Verfügbarkeit von Rhesus-negativen Blutpräparaten. Es wäre daher zielführend, alle Empfänger*innen, die kein erhöhtes Risiko durch den Erhalt von D-positivem Blut haben, entsprechend zu versorgen. Würde man alle Personen mit D-Varianten

ausschließlich mit Rhesus-negativem Blut transfundieren, wäre der Bedarf kaum zu decken (20).

5.2 Historie

Die Herausforderung bestand darin, eine einfache Methode zu entwickeln, mit der sich alle Personen eindeutig in rhesuspositive und rhesusnegative Empfängerinnen einteilen lassen. Bevor monoklonale Antikörper zur Verfügung standen, setzte man auf eine antigendichte-basierte Strategie. Mittels dieses Verfahrens konnte sichergestellt werden, dass beispielsweise die Variante DVI mit rhesusnegativem Blut versorgt wurde. Personen mit D-Varianten, die nicht zur D-Immunsierung führen (was weitaus häufiger vorkommt als DVI-Subtypen), beispielsweise D weak Typ-1-Trägerinnen, wurden durch diese Methode jedoch ebenfalls unnötigerweise mit rhesusnegativem Blut transfundiert (20).

Seit 1996 ist eine epitop- und antigendichteorientierte D-Bestimmung dank verfügbarer monoklonaler Anti-D-Antikörper möglich (20).

5.3 Serologische Rhesus D Bestimmung

Folgende RhD-Bestimmungsmethode wurde von der österreichischen Gesellschaft für Blutgruppenserologie, Transfusionsmedizin, Regenerative Medizin und Immunogenetik übernommen.

Zur Bestimmung des D-Antigens sind zwei unterschiedliche Anti-D-Reagenzien erforderlich. Eine dieser beiden Reagenzien muss ein monoklonales Anti-D sein und darf die D-Partial-Variante DVI nicht erkennen. Sind beide Reagenzien monoklonalen Ursprungs, müssen sie von unterschiedlichen Klonen stammen – wobei eines das DVI erkennen soll und das andere nicht. Zur Berücksichtigung möglicher Autoagglutinationen und zur Vermeidung von Fehlinterpretationen muss eine Rh-Kontrolle mitgeführt werden. Die Tabelle 3 zeigt die Interpretation der möglichen Testergebnisse (21).

Reagieren beide Reagenzien positiv, liegt ein RhD-positives Blut vor. Bei beidseitig negativen Ergebnissen ist von einem RhD-negativen Blut auszugehen. Besteht eine schwache oder unterschiedlich starke Reaktion beider Reagenzien, kann eine RhD-Variante vorliegen (21).

Agglutination			Interpretation
1. Anti-D-Reagenz	2. Anti-D-Reagenz	Rh-Kontrolle	
+	+	-	RhD positiv
-	-	-	RhD negativ
schwach +	schwach +	-	RhD-Variante
Unterschiedlich stark +	+	-	RhD-Variante
-	+	-	Weitere Abklärung mittels IAT bzw. molekularbiologisch
+/-	+/-	+	nicht beurteilbar, Abklärung notwendig

Tabelle 3: Agglutinationsreaktion und resultierende Ergebnisse nach der ÖGBT (21).

Folgende Fälle erfordern eine weiterführende Abklärung mittels Indirektem Antihumanglobulintest (IAT, D weak-Test):

Wenn eine Diskrepanz zwischen den beiden Anti-D-Reagenzien vorliegt, also nur eines positiv ist. Ist die D-Typisierung im IAT positiv, muss das Ergebnis noch mit dem Direkten Antihumanglobulintest (DAT) validiert werden. Alternativ kann eine molekularbiologische Untersuchung erfolgen (21).

Wenn eine Person RhD-negativ ist, aber mit einem Anti-CDE- oder Anti-CE-Reagenz eine Reaktion zeigt oder ein C- bzw. E-Antigen im Phänotyp aufweist, ist eine genauere Untersuchung mittels IAT erforderlich (21).

Personen mit wiederholtem Transfusionsbedarf, sowie Frauen im gebärfähigen Alter benötigen eine detailliertere Abklärung der D-Variante. Liegt eine D weak Variante Typ 1, 2 oder 3 vor, können diese problemlos mit RhD-positivem Blut transfundiert werden (21).

5.3.1 RhCcEe Phänotyp Bestimmung

Sollte eine Person voraussichtlich eine Vielzahl an Transfusionen benötigen, ist eine erweiterte Phänotypisierung sinnvoll. Ziel ist es, durch die gezielte Auswahl passender Erythrozytenkonzentrate eine Sensibilisierung gegen die weiteren Rhesusantigene C, c, E und e zu verhindern. Die Bestimmung dieser Antigene erfolgt analog zur RhD-Bestimmung mittels zweier Testreagenzien und einer Kontrolle zur Berücksichtigung der Autoagglutination (21).

5.4 Agglutinationsreaktion als Grundlage

Eine der wichtigsten Nachweismethoden in der Transfusionsmedizin ist die Agglutinationsreaktion. Trotz moderner molekularbiologischer Testverfahren bleibt sie aufgrund geringerer Kosten und kürzerer Wartezeiten unverzichtbar (22).

Trifft ein IgM-Antikörper auf ein korrespondierendes Antigen auf dem Erythrozyten, kommt es zur Agglutination – die Zellen „verklumpen“. Abhängig von Antikörperavidität und Stärke erfolgt die Reaktion entweder sofort oder erst nach einer gewissen Inkubationszeit und kann dann ausgewertet werden (23).

Agglutinationsreaktionen können mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden, darunter Reaktionen in Röhrchen, Mikrotiterplatten oder Gelkarten. Das grundlegende Prinzip bleibt jedoch unverändert (22).

5.4.1 Röhrentest

Die Testung mittels Röhrchen erfordert nur eine geringe Menge an Reagenzien und eignet sich gut für Notfall- und Erstblutgruppentests. Zunächst werden Erythrozyten mit den Antikörpern vermischt und für eine definierte Zeit zentrifugiert. Abhängig von der Avidität erfolgt eine Reaktion sofort, oder nach einer gewissen Inkubationszeit. Anschließend wird der Inhalt visuell inspiziert und interpretiert. Hat sich ein Sediment gebildet, das nach dem Zentrifugieren und sanftem Schütteln des Reagenzglases unverändert bleibt, liegt eine vollständige Agglutination vor. Verteilen sich die Erythrozyten hingegen gleichmäßig, ist von einer negativen Reaktion auszugehen. Ist das Ergebnis nicht eindeutig, kann die Suspension auf einem Objektträger unter dem Mikroskop genauer untersucht werden (24).

Allerdings weist diese Methode einige Nachteile auf. Eine objektive und standardisierte Interpretation ist nahezu unmöglich. Zudem kann die Methode nicht bei Leukämiepatient*innen mit schwachen Antigenen oder Personen mit niedrigem Antikörpertiter angewendet werden. Um die Genauigkeit dieser Tests zu gewährleisten, ist äußerste Sorgfalt erforderlich: Die Umgebungsbedingungen müssen stimmen, und sowohl Zentrifugationszeit als auch -geschwindigkeit müssen exakt eingehalten werden. Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode ist zudem ihre schlechte Automatisierbarkeit (24).

5.4.2 Gelkartenmethode

Die Gelkartenmethode hat sich in vielen transfusionsmedizinischen Laboren durchgesetzt und wird regelmäßig angewandt. Dieser empfindliche Test eignet sich sowohl für die

Antigenbestimmung und Antikörperdifferenzierung als auch für den direkten und indirekten Antihumanglobulintest. Die aus Kunststoff hergestellten Karten enthalten sechs Säulen, die mit Mikropartikeln aus Gel gefüllt sind. Diese Mikropartikel sind in einer LISS-Lösung mit Antikörpern, hier Anti-D, eingebettet (23). Eine LISS-Lösung (LISS = Low Ionic Strength Solution) ist eine Lösung mit geringer Ionenstärke, die es ermöglicht, durch Festigung der Bindung sowie Beförderung der Erythrozytenagglutination, spezifische Bindungen zwischen Antigenen und Antikörper sichtbar zu machen (8). Während der Zentrifugation erfolgt eine Sortierung der Erythrozyten nach Größe anhand der Dichtegradienten und der Mikropartikel. Erythrozyten, die keine Reaktion mit den Antikörpern eingehen, sedimentieren auf den Boden des Röhrchens. Erythrozyten, die durch die Antikörperbindung agglutinieren und somit größere Partikel bilden, können den Dichtegradienten nicht überwinden und verbleiben entweder an der Oberfläche oder im Verlauf der Säule. Die Position der Partikel nach der Zentrifugation gibt Aufschluss über die Reaktionsstärke, die visuell abgelesen werden kann (23).



Abbildung 4: Darstellung der Gelkartenmethode mit unterschiedliche Reaktionsstärken (25). Negative Reaktionen zeigen sich wie bei "0". "+" zeigt eine positive Reaktion. Die Reaktionsstärke wird anhand von "w-4" gekennzeichnet. "mf" deutet auf ein mixed field hin, und "H" zeigt eine Hämolyse.

Vorteile dieser Methode sind eine hohe Sensibilität, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (24).

Menschliche Fehler bei der Diagnostik werden durch den Wegfall der Waschvorgänge sowie durch die objektivierbaren und über einen längeren Zeitraum ablesbaren Ergebnisse reduziert (23).

Zudem können mit dieser Methode schwache, inkomplette und Antikörper mit geringerer Affinität erfasst werden (23).

Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die vermehrte Erfassung unspezifischer Reaktionen und klinisch irrelevanter Kälteantikörper (23).

5.4.3 Mikrotiterplatten

Das Testverfahren mit Mikrotiterplatten basiert auf dem automatisierten Nachweis und der Interpretation von Serumantikörpern und Erythrozytenantigenen. Die Vorteile dieser Methode sind die hohe Geschwindigkeit der Testung, der geringe Verbrauch an Reagenzien und die Möglichkeit der Hochdurchsatzanalyse (24).

Diese Methode umfasst das Hinzufügen der Reagenzien in die Wells, die Zentrifugation und Inkubation sowie das konstante Schütteln. Abschließend wird das Ergebnis automatisiert beobachtet und interpretiert. Treten in den Wells Agglutinate auf, zeigt dies eine Agglutination an. Auf einer Platte können gleichzeitig mehrere Proben untersucht werden, was Zeit und Aufwand im Labor deutlich verringert. Der Prozess muss jedoch streng standardisiert sein, um die Genauigkeit der Tests zu gewährleisten. Studien ergaben eine Genauigkeit von 99,6 % bei der Blutgruppentypisierung mit Mikrotiterplatten (24).

Eine Mikrotiterplatte besteht meist aus 96 Wells. Diese Wells können unterschiedliche Formen aufweisen (z. B. U-förmig, V-förmig usw.). Die Wände der Wells sind häufig stufenweise aufgebaut. Die Breite jeder Stufe entspricht grundsätzlich dem Durchmesser eines Erythrozyten, während die Höhe meist etwas größer als der Durchmesser der roten Blutkörperchen ist. Nach einer erfolgreichen Antigen-Antikörper-Reaktion haften sich diese Produkte an den Wänden der Wells an. Treten keine Reaktionen zwischen Antigenen und Antikörpern auf, sinken die Antigene während der Zentrifugation auf den Boden der Wells und erscheinen als Punkt (24).

Die Reagenzien werden mittels automatisierter Instrumente hinzugefügt, und das Ergebnis wird mithilfe von Bildgebungstechnologien erfasst. Aufgrund dieser Automatisierung und der Möglichkeit, zahlreiche Proben gleichzeitig zu analysieren, werden sowohl die Analysezeit als auch der Arbeitsaufwand deutlich reduziert (24).

5.5 Einflussfaktoren der Antigen-Antikörper Reaktion

Vorerst ist anzumerken, dass jede chemische Reaktion in eine Richtung verläuft, bis die treibende Kraft der Reaktion in die entgegengesetzte Richtung gleich groß ist. Ist dieser Punkt erreicht, befindet sich das System im Gleichgewicht.

Bestimmte Faktoren können diese Reaktionen beeinflussen. Einerseits kann die Gleichgewichtskonstante verändert werden, andererseits kann die Geschwindigkeit, mit der das Gleichgewicht erreicht wird, beeinflusst werden. Die relevanten Einflussfaktoren werden im Folgenden beschrieben.

5.5.1 Temperatur

Der Einfluss der Temperatur auf eine Antigen-Antikörper-Reaktion führte ursprünglich zur Einteilung der Antikörper in „warme“ und „kalte“ Antikörper. Die Temperature Auswirkungen stehen vermutlich in Zusammenhang mit der Art der chemischen Bindung. Bei hydrophilen Bindungen wird angenommen, dass sie bei niedrigen Temperaturen stabiler sind, während hydrophobe Bindungen unter höheren Temperaturen stabiler erscheinen.

Die Auswirkungen auf die Gleichgewichtskonstante sind jedoch minimal bzw. vernachlässigbar. Beispielsweise zeigt die Gleichgewichtskonstante von Anti-D bei 2 °C und 40 °C keinen Unterschied. Allerdings dauert es bei 4 °C etwa 20-mal länger, das Gleichgewicht zu erreichen, als bei 37 °C (26).

5.5.2 pH-Wert

Im Gegensatz zur Temperatur verändert der pH-Wert die Gleichgewichtskonstante der Reaktion, beispielsweise bei Anti-D. Diese Abhängigkeit lässt sich durch eine symmetrische Kurve darstellen, deren Maximum im Bereich von pH 6,5 bis 8,4 liegt. Jenseits dieses Bereichs wird die Antigen-Antikörper-Reaktion stark gehemmt. Die Gleichgewichtskonstante bei pH 5,0 oder 9,5 ist etwa 100-mal niedriger als im Intervall zwischen pH 6,5 und 7,0 (26).

Studien nutzen diese Eigenschaft, um Antikörper aus Erythrozyten zu eluieren (27). Es wird angenommen, dass unter stark sauren oder basischen Bedingungen eine deutliche Konformationsänderung des Antikörpers auftritt. Dadurch verändern sich die komplementären Bindungsstellen, was eine Interaktion mit dem jeweiligen Antigen verhindert (27).

5.5.3 Ionenstärke

Unter der Ionenstärke versteht man die Summe der Konzentrationen aller Ionen in einer Lösung. Sie hat einen starken Einfluss auf die Assoziationsrate von Antikörpern mit Antigenen. Eine Studie zeigt, dass eine geringere Ionenstärke insbesondere bei Anti-D zu einer deutlich erhöhten Assoziationsrate führt und damit zu einem schnelleren Erreichen der Gleichgewichtskonstante. Ionengruppen können an geladene Bereiche der Antigen-Epitope binden und dadurch die Interaktion mit Antikörpern verhindern. Der Einfluss der Ionenstärke ist bei den meisten Antigenen nachweisbar – mit Ausnahme von Anti-A, Anti-B und den Antikörpern des Kell-Systems (26).

5.5.4 Enzymbehandlung

Es ist bekannt, dass eine Vorbehandlung von Erythrozyten mit Enzymen die Antigen-Antikörper-Reaktion verstärken kann. Besonders wirksam sind hierbei Papain, Bromelin und Ficin. Es wird vermutet, dass Enzyme die Epitope der D-Antigene verstärkt freilegen. Studien haben gezeigt, dass Ficin die Assoziationsrate der Reaktion erhöht, jedoch keinen Einfluss auf die Dissoziation von Antigenen und Antikörpern hat (26). Dieser Effekt lässt sich jedoch nur bei intakten humanen Erythrozyten nachweisen. Eine Enzymbehandlung von Erythrozytenmembranen nach der Hämolyse führt hingegen zu einer vollständigen Aufhebung der Antigen-Antikörper-Reaktion (28).

5.5.5 Antigen-Antikörper Konzentration

Die Konzentration der Reaktanten spielt eine wesentliche Rolle in der Antigen-Antikörper-Reaktion. Bleibt die Anzahl der Antikörper in einem Gemisch konstant, führt die Zugabe eines Verdünnungsmittels zu einer signifikanten Verringerung der Antigen-Antikörper-Reaktionen. Dies beruht auf dem Verdünnungseffekt, bei dem ein Teil der Antigen-Antikörper-Komplexe dissoziiert, um die Konzentration freier Antigene und Antikörper im Reaktionssystem zu erhöhen (26).

5.5.6 Serum/Zell Verhältnis

Ein weiterer Einflussfaktor ist das Verhältnis von Serum zu Zellen. Dieses kann verändert werden, um die Sensitivität eines Tests zu verbessern. Durch eine Erhöhung des Serumgehalts oder eine Verringerung der Zellzahl lässt sich die Anzahl der Antikörper pro Zelle gezielt beeinflussen. Ein höherer Serumgehalt bedeutet, dass weniger Antikörper pro

Zelle vorliegen, wodurch hochaffine Antikörper effizienter binden können. Eine geringere Zellzahl hingegen führt dazu, dass mehr Antikörper pro Zelle verfügbar sind, was die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen beiden Komponenten erhöht (26).

5.5.7 Allgemeine Sensitivität der Testmethode

Zuletzt ist zu erwähnen, dass weitere Faktoren der Testmethode und deren einzelne Schritte die Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflussen können. Beispielsweise kann es während der Waschschrte zur Dissoziation der gebildeten Komplexe kommen. Auch das Auswertungssystem der Testung, das die Anzahl der Antigen-Antikörper-Reaktionen erfasst, kann einen indirekten Einfluss auf das Ergebnis haben (26).

5.6 Molekularbiologische Testverfahren

Die Ermittlung erythrozytärer Antigene mittels Genotypisierung erfolgt typischerweise als Ergänzung bei unklaren serologischen Ergebnissen oder wenn eine serologische Diagnostik nicht möglich ist (23). Dies trifft auf folgende Situationen zu:

- Untersuchung von maternalem Blut oder Amnionflüssigkeit zur Bestimmung der erythrozytären Antigene eines ungeborenen Kindes.
- Genetische Diagnostik im Rahmen von Risikoschwangerschaften, beispielsweise bei Frauen im gebärfähigen Alter, die irreguläre Alloantikörper aufweisen.
- Fälle, in denen kein / oder nicht ausreichend Material für serologische Testungen verfügbar ist, z. B. wenn lediglich DNA vorliegt.
- Forensische Untersuchungen in der Gerichtsmedizin (23)

Mittlerweile ist die genetische Grundlage zahlreicher Blutgruppensysteme bekannt, darunter auch die Gene des Rhesus-Systems. Dadurch können Antigene auf Allelebene untersucht werden (23). Die Blutgruppengenotypisierung lässt sich in Low-Throughput-, Medium-Throughput- und High-Throughput-Methoden unterteilen. Die Polymerase-Kettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP) ist die am häufigsten angewandte Methode. Sie gehört zu den Low-Throughput-Methoden und ermöglicht auch den Nachweis der häufigsten Allele die zur Ausprägung von schwachen Antigenen führen (24). Die PCR-SSP erfolgt mit einem Reaktionsgemisch, das freie Nukleotide, ein geeignetes Pufferlösung, die Taq-Polymerase sowie die zu testende DNA enthält. In einem automatisierten System durchlaufen diese Gemische 3–4 Temperaturzyklen, die bis zu 30-mal wiederholt werden. In jedem Zyklus lagern sich die Primer – sofern vorhanden – an die entsprechenden DNA-

Abschnitte an. Die Taq-Polymerase fügt daraufhin die passenden freien Nukleotide hinzu. Nach Abschluss dieses Prozesses werden die Ergebnisse elektrophoretisch nach ihrer Länge aufgetrennt und fotografisch dokumentiert. Die aufgetrennten Fragmente ergeben ein spezifisches Bandenmuster, wobei jede Bande einen Basenpolymorphismus anzeigt. Das Gesamtbild gibt schließlich das bestimmte Allel wieder (23).

Neben der PCR-SSP kommen auch andere Varianten der PCR in der molekularbiologischen Diagnostik zum Einsatz. Dazu zählen beispielsweise die PCR-SSO (Sequence-Specific Oligonucleotides), sowie die PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) (15). Eine weitere Methode ist die DNA-Sequenzierung, die eine genaue Bestimmung der Basenabfolge ermöglicht. Welche Methode letztendlich angewendet wird, ist laborabhängig (23).

Eine weitere PCR-Methode stellt die Real-Time-PCR dar, bei der die Amplifikation in Echtzeit überwacht und gemessen werden kann. Dies erfolgt durch die Fluoreszenzmarkierung der zu amplifizierenden Produkte. Eine sogenannte TaqMan-Sonde, die mit einem Reporter-Fluorophor (fluoreszierendes Material) und einem Quencher (zur Unterdrückung des Signals) ausgestattet ist, bindet an das zu amplifizierende Produkt. Während der Amplifikation wird die TaqMan-Sonde gespalten, wodurch sich der Quencher vom Reporter löst und ein Lichtsignal abgegeben wird. Anhand der Signalintensität kann somit in Echtzeit auf die Menge des amplifizierten Materials pro Zyklus geschlossen werden (29).

Der gelelektrophoretische Nachweis von PCR-Produkten wurde mittlerweile durch die Real-Time-PCR abgelöst, da diese zahlreiche Vorteile bietet. Der größte Vorteil der Real-Time-PCR liegt in der Möglichkeit, die Produkte zu quantifizieren. Dadurch kann eine Beziehung zwischen den Endprodukten und den Ausgangsmolekülen hergestellt werden. Im Gegensatz zur Gelelektrophorese, bei der nur das Endprodukt ausgewertet wird, ermöglicht die Real-Time-PCR eine kontinuierliche Überwachung der Reaktion. Zudem entfällt durch die Messung während der PCR der Arbeitsschritt der Produktanalyse nach Ende der Amplifikation, wie er bei der konventionellen PCR notwendig ist. Dies erhöht einerseits die Effizienz und minimiert andererseits das Risiko einer Kreuzkontamination (30).

5.6.1 Klinische Anwendung

Die molekularbiologische Rhesusdiagnostik spielt eine entscheidende Rolle in der pränatalen Rh-Bestimmung. Eine frühzeitige Bestimmung des DCE-Status des ungeborenen

Kindes ermöglicht eine gezielte Prophylaxe gegen die Alloimmunisierung der Mutter durch fetales Blut. Dadurch kann das Risiko für Morbus hämolyticus neonatorum wirksam reduziert werden (31).

Der Vorteil der molekularbiologischen fetalen Rhesusbestimmung gegenüber der serologischen Methode besteht darin, dass keine Blutentnahme aus der Nabelschnur erforderlich ist. Stattdessen genügt eine Amniozentese oder eine Chorionzottenbiopsie – zwei Verfahren mit deutlich geringerem Risiko für eine maternale Immunisierung (31).

Eine Methode, die weder eine Probenentnahme aus der Nabelschnur, noch eine Amniozentese oder Chorionzottenbiopsie erfordert, stellt die Durchführung einer NIPT (Non Invasive Pränatale Testung) dar. Hierbei wird lediglich aus dem mütterlichen Blut zellfreie fetale DNA gewonnen. Diese ermöglicht eine minimal invasive Rhesusgruppenbestimmung des Kindes (32).

Trotz der komplexen Molekulargenetik der zahlreichen D-Varianten und der daraus resultierenden Notwendigkeit, mehrere Abschnitte des RHD-Gens mittels PCR zu untersuchen, hat sich die molekularbiologische Diagnostik als äußerst zuverlässig erwiesen (31).

6 Automatisierte Blutgruppentestung

Im Laufe der letzten Jahre haben sich zunehmend mehr Möglichkeiten ergeben, manuelle labormedizinische Testverfahren zu automatisieren. Die Geräte zur routinemäßigen Diagnostik haben sich so weit weiterentwickelt, dass immer mehr Laboratorien auf die automatisierte Probenbestimmung umgestiegen sind (23). Einen besonderen Stellenwert hat die automatisierte Testung im Bereich der Immunhämatologie, da eine korrekte Bestimmung der Blutgruppen für das Wohl der Betroffenen von entscheidender Bedeutung ist. Diese Geräte ermöglichen die Automatisierung der Rhesusblutgruppentestung. Grundlage der Testung ist die bereits erwähnte Agglutinationsreaktion, die entweder in Mikrotiterplatten oder auf andere Weise durchgeführt wird (33). Siehe Kapitel 5.4.

6.1 Unterscheidung der Automaten

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten von Automaten: Vollautomaten und Teilautomaten. Vollautomaten übernehmen alle Schritte, von der Annahme der Proben bis zur Übermittlung der Testergebnisse – vollständig selbst, ohne, dass manuelle Unterstützung erforderlich ist. Teilautomaten hingegen erfordern manuelle Eingriffe in bestimmten Phasen, wie beispielsweise bei der Zentrifugation oder der Inkubation. Die Auswertung erfolgt in beiden Fällen automatisiert (33). Zusätzlich lassen sich die Automaten nach dem Grad der Flexibilität der verwendeten Testmaterialien unterscheiden. Einige Geräte erlauben ausschließlich die Verwendung von Reagenzien desselben Herstellers. Darüber hinaus können die Automaten nach der Anzahl der Proben kategorisiert werden, die gleichzeitig ausgewertet werden können (23).

Vollautomaten ermöglichen die Durchführung aller Analyseschritte in einem einzigen Gerät. Sie bieten zudem den Vorteil, dass jeder einzelne Schritt der Analyse vollständig rückverfolgt werden kann. Durch die eigenständige Durchführung der Analyseschritte ist ein sogenanntes „Walk-Away“-Prinzip für Laborant*innen möglich. Allerdings weisen frühere Generationen von Vollautomaten oft geringere Durchsatzraten als Teilautomaten auf. Zudem sind Vollautomaten preislich deutlich teurer als Teilautomaten (33).

Teilautomaten bestehen im Vergleich zu Vollautomaten aus mehreren Modulen und sind daher ein offenes System. Die verschiedenen Module übernehmen einzelne Analyseschritte, während Zwischenschritte manuell durchgeführt werden müssen. Dadurch erfordern Teilautomaten die ständige Anwesenheit und Aufmerksamkeit der Laborant*innen. Ihre

höhere Durchsatzrate und die vergleichsweise geringeren Kosten sprechen jedoch für den Einsatz von Teilautomaten (33).

6.2 Ziele der Automatisierung

Durch die Umstellung manueller Testverfahren auf voll- oder teilautomatisierte Analyseverfahren werden mehrere Ziele verfolgt. Besonders in der Immunhämatologie und Transfusionsmedizin spielt die Sicherheit der Testergebnisse eine zentrale Rolle, da sie ein entscheidendes Qualitätsmerkmal der Testmethoden darstellt.

Automatisierte Testmethoden bieten eine erhöhte Sicherheit, indem sie menschlich bedingte Fehler reduzieren. Bei manuellen Testverfahren gibt es zahlreiche potenzielle Fehlerquellen, die durch Unachtsamkeit zu Fehlanalysen führen können. Dazu zählen unter anderem die falsche Auswahl der Reagenzien, die Untersuchung einer falschen Probe, fehlerhaftes Vorgehen während der Analyse, und Fehler bei der Interpretation der Ergebnisse sowie bei der Übertragung der Daten in das elektronische System (33).

Ein weiteres Ziel der automatisierten Methoden ist die präzise Dokumentation der Chargen und Untersuchungsbedingungen der einzelnen Proben (23). Dies gewährleistet eine lückenlose Rückverfolgbarkeit aller Schritte, die in die Analyse einer Probe einfließen. Dadurch werden sowohl die Qualitätskontrolle als auch die Dokumentation erheblich erleichtert und verbessert (33).

Schließlich zielt die Automatisierung darauf ab, die Überwachung der Umgebungsparameter sowie der Reagenzien (z. B. Verfallsdatum, ausreichende Menge) dem Analysegerät zu überlassen. Dadurch wird sichergestellt, dass diese kritischen Informationen nicht übersehen werden (23).

6.3 Vergleich PK7300 und Neo Iris

Nach der Umstellung vom Beckman Coulter PK7300, auch Olympus genannt, auf Neo Iris von Immucor an der Klinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Graz traten Diskrepanzen in den Ergebnissen der Rhesusdiagnostik auf. Dieses Kapitel dient dem Vergleich dieser beiden Laborgeräte.

Olympus PK7300 von Beckman Coulter ist ein vollautomatisiertes Mikroplattensystem. Es wird für die prätransfusionelle Blutgruppentypisierung sowie das Blutgruppenscreening eingesetzt. Das System benötigt externe Testreagenzien (nicht von der Eigenmarke), um im Rahmen der Testungen eine Hämagglutinationsreaktion zu analysieren. Die, für die

Reaktionen verwendeten Mikroplatten stammen hingegen von Beckman Coulter selbst. Darüber hinaus ist dieses Gerät ausschließlich für die in-vitro-Untersuchung von Spender*innen bestimmt (34).

Ebenso handelt es sich beim Testgerät Neo Iris, hergestellt von der Firma Immucor, um ein vollautomatisiertes System, das gezielt blutgruppenserologische und immunhämatologische Tests durchführt. Im Vergleich zum Olympus PK7300 stellt der Neo Iris ein geschlossenes System dar. Das bedeutet, dass – abgesehen von den Proben – alle für die Untersuchung benötigten Komponenten, einschließlich der Reagenzien, ausschließlich von der Eigenmarke Immucor stammen (35).

Hinsichtlich ihrer Wirkung und Funktion erfüllen beide Geräte denselben Zweck in dem Labor einer Blutbank. Allerdings zeigen sich Unterschiede in ihrem Aufbau, im Analyseprozess, sowie in Teilen der verwendeten Testmethode. Diese Unterschiede könnten die Ursache für die beobachteten Diskrepanzen in der Rhesusdiagnostik sein. In den folgenden Kapiteln werden die beiden Testgeräte im Detail gegenübergestellt.

6.3.1 Hardwarekomponenten

Der generelle Aufbau der Geräte Olympus und Neo Iris weist erhebliche Unterschiede auf. Welche Hardwarekomponenten in den jeweiligen Systemen enthalten sind und wie sie sich voneinander unterscheiden, wird in diesem Kapitel beschrieben.

Der Neo Iris verfügt über einen Ladeturm, der sich auf der linken Seite des Geräts befindet. In diesem können Trägerplatten, in denen die Mikroplatten eingespannt werden, be- und entladen werden. Der Ladeturm hat eine Kapazität von 15 Platten, die auch während des Testvorgangs hinzugefügt oder entnommen werden können. Zur Bewegung der Mikroplatten zwischen den verschiedenen Komponenten des Systems verfügt der Neo Iris über ein eigenes Transportsystem. Der sogenannte Plattenträger kann die Mikroplatten in drei Achsen bewegen. Er ist zentral im System positioniert, um optimal auf alle Bereiche des Geräts zugreifen zu können (35).

Diese Kombination aus Transportsystem und Ladeturm, wie sie im Neo Iris vorhanden ist, findet sich im System Olympus nicht. Stattdessen verfügt der Olympus über einen Rack Feeder und eine Plate Transfer Unit. Die Mikroplatten werden dem System manuell zugeführt und anschließend intern automatisch und mechanisch durch das Gerät geleitet. Im Gegensatz zum Neo Iris ist ein kontinuierliches Be- und Entladen während des Testvorgangs hier nicht möglich (34).

Besonders im Pipettiersystem zeigen sich große Unterschiede zwischen diesen beiden Systemen. Es dient dem Ansaugen und Dispensieren von Flüssigkeiten von einem Ort zu einem anderen.

Das Pipettiersystem des Neo Iris besteht aus zwei Pipettierarmen sowie vier Waschstationen. Ein Pipettierarm besitzt vier Nadeln, der zweite hingegen nur eine Nadel. Alle Pipetten können sowohl für Reagenzien als auch für Proben verwendet werden. Der Arm mit vier Nadeln hat Zugriff auf die Ladebuchten mit 14 Reihen, jedoch nicht auf die Ladebucht mit fünf Reihen. Im Gegensatz dazu hat der Arm mit einer einzelnen Nadel Zugriff auf alle Ladebuchtreihen. Insgesamt verfügen die Nadeln über ein Aspirationsvolumen von 500 bis 1000 μl , das in einer oder mehreren Portionen abgegeben werden kann (35).

Das Pipettiersystem verfügt außerdem über ein Entlüftungsmodul, das zur Beseitigung von im System gefangener Luft dient. Dies geschieht in einem Kunststoffzylinder, der die Systemflüssigkeit ansaugt. In der oberen Kammer sammelt sich die Luft, die anschließend abtransportiert wird (35).

Um eine Material- bzw. Reagenzienverschleppung zu vermeiden, besitzt der Neo Iris spezielle Waschstationen (zwei, jeweils eine pro Arm). Nach jedem Dispensierschritt werden die Nadeln an diesen Stationen sowohl außen als auch innen mit der Systemflüssigkeit gereinigt (35).

Im Vergleich zum Pipettiersystem des Neo Iris besitzt der Olympus PK7300 keine universellen Pipetten für verschiedene Aufgaben, sondern drei separate Einheiten mit jeweils fest zugewiesenen Funktionen. Es gibt eine Einheit für die Abgabe der Proben, eine eigene Einheit für die Abgabe der Reagenzien und eine weitere Einheit für die Abgabe des Verdünnungsmittels (Diluent). Die Sample Dispense Unit besteht aus zwei Pipetten, die die Probe in die Verdünnungsgefäße (Dilution Cups) abgeben – eine Pipette für Plasma und eine für Blutzellen. Zwei separate Einheiten der Diluent Dispense Unit verdünnen die Probe in den Dilution Cups und überführen sie anschließend in die Microwells. Die Reagent Dispense Unit gibt die Reagenzien in die Microwells ab (34).

Auch der Olympus verfügt über Waschstationen, an denen die Pipetten vor jedem Dispensierschritt sowohl innen als auch außen mit deionisiertem Wasser gereinigt werden. Diese Waschstationen sind für alle drei Einheiten des Pipettiersystems vorhanden (34).

Beide Systeme benötigen Lagerstellen für Reagenzien und Proben. Das System muss auf diese Lagerstellen zugreifen, um die entsprechenden Flüssigkeiten in die Microwells dispensieren zu können.

Der Neo Iris besitzt fixe Ladebuchten mit insgesamt 19 Reihen, die in eine Kammer mit 14 Reihen und eine mit 5 Reihen unterteilt sind. Diese Ladebuchten dienen der Aufnahme von Reagenzien und Proben, die für die jeweiligen Testungen erforderlich sind. Während des gesamten Testvorgangs sind diese Ladebuchten zugänglich und können kontinuierlich be- und entladen werden. Die Kammer mit den 14 Reihen dient der Aufnahme von Probenmaterial und Reagenzien, während die 5 Reihen in der angrenzenden Kammer ausschließlich für Reagenzien vorgesehen sind. Jede Reihe in diesen Buchten wird durch eine Schiene voneinander getrennt, in die die Produkte eingeschoben und fixiert werden. Welche Pipetten auf welche Ladebuchtzeilen zugreifen können, wurde bereits im Abschnitt zum Pipettiersystem erläutert (35).

Auch der Olympus besitzt festgelegte Stellen im System, die Reagenzien und Verdünnungsmittel enthalten. Diese sind in eine Diluent Setup Unit und eine Reagent Setup Unit unterteilt. Im Gegensatz zum Neo Iris können diese jedoch nicht während des Testvorgangs kontinuierlich be- oder entladen werden. Die Reagenzien und die Verdünnungsflüssigkeit werden nicht aktiv, wie beim Neo Iris, pipettiert, sondern über Aspirationsschläuche angesaugt und über die jeweiligen Proben abgegeben (34).

Ein weiterer Unterschied der Hardwarekomponenten findet sich im Inkubatorsystem. Der Inkubator des Neo Iris ist in den automatisierten Testprozess integriert und sorgt für optimale Umgebungstemperaturen während der Inkubationsschritte. Innerhalb des Inkubators lassen sich zwei Temperaturzonen einstellen: eine Raumtemperaturzone und eine Zone mit 37°C. Diese sind durch eine Isolationszone voneinander getrennt. Insgesamt gibt es 15 Positionen für die Testplatten. Für jede Position lässt sich eine eigene Klappe öffnen, um das Ein- und Ausführen der Proben kontinuierlich bei den richtigen Temperaturen zu ermöglichen (35).

Auch der Olympus besitzt einen integrierten Inkubator, in dem die Temperatur für die Inkubationsschritte eingestellt werden kann. Allerdings lässt sich hier nur eine einheitliche Temperaturzone festlegen. Zusätzlich kann die Luftfeuchtigkeit im Inkubator durch ein Wasserreservoir reguliert werden, um eine optimale Umgebung für die Reaktionsschritte zu schaffen (34).

Weiterhin verfügt der Neo Iris über eine eigene, ebenfalls in das automatisierte System integrierte Zentrifuge. Der Transport in die Zentrifuge erfolgt über ein spezielles Transportsystem. Mittels einer Funktion mit Gegengewicht kann das Gerät selbstständig unterschiedlich schwere und ungleichmäßig verteilte Platten ausbalancieren, um Vibrationen zu minimieren. Zudem dient die Zentrifuge auch zum Schütteln, um die Inhalte in den Wells zu vermischen und eventuell abgesetzte Erythrozyten zu resuspendieren (35).

Der Olympus PK7300 besitzt keine Zentrifuge. Dieser Schritt der Testung muss extern durchgeführt werden und ist daher nicht in den automatisierten Prozess des Geräts integriert. Sind alle Schritte der Testung abgeschlossen, können beide Geräte die Ergebnisse selbstständig auswerten. Dies erfolgt in beiden Fällen mittels einer optischen Interpretation der Reaktionen in den Testwells. Beide Systeme verfügen über eine CCD-Kamera (Charged Coupled Device; ladungsgekoppeltes Bauelement). Diese nimmt Bilder der Mikroplatten und der darin enthaltenen Testwells auf und stellt sie der Software zur Verfügung. In beiden Fällen berechnet das Gerät anhand vordefinierter Parameter ein Ergebnis für jedes Testwell, das schließlich interpretiert wird.

6.3.2 Analyseprozess

Die folgenden Arbeitsschritte werden vom PK7300 durchgeführt, um die Analyse im Gerät durchzuführen:

Um den Analyseprozess zu starten, werden die Testproben mithilfe des Rack Feeders in das System gebracht und in Position gestellt. Die Pipetten der Sample Probe Unit aspirieren anschließend eine definierte Menge Probenmaterial in einen Dilution Cup, wobei die Menge anhand prädefinierter Systemparameter bestimmt wird.

Vor jeder Übertragung von Probenmaterial werden diese Pipetten sowohl innen als auch außen mit deionisiertem Wasser gereinigt.

Um die korrekte Konzentration der Testproben für die Hämagglutination zu gewährleisten, pipettiert die Diluent Dispense Unit das Verdünnungsmaterial in die entsprechenden Dilution Cups. Auch nach diesem Schritt werden die Pipetten gründlich gereinigt (34).

Das verdünnte Probenmaterial wird schließlich in einer prädefinierten Menge in die Wells der Mikroplatte pipettiert. Die Mikroplatten werden von der Firma Beckman Coulter bereitgestellt und weisen ein einzigartiges Sägezahnmuster am Boden der Wells auf. Diese spezielle Form dient der Stabilisierung der Agglutinationsprodukte und ermöglicht somit eine präzise automatische Auswertung (34).

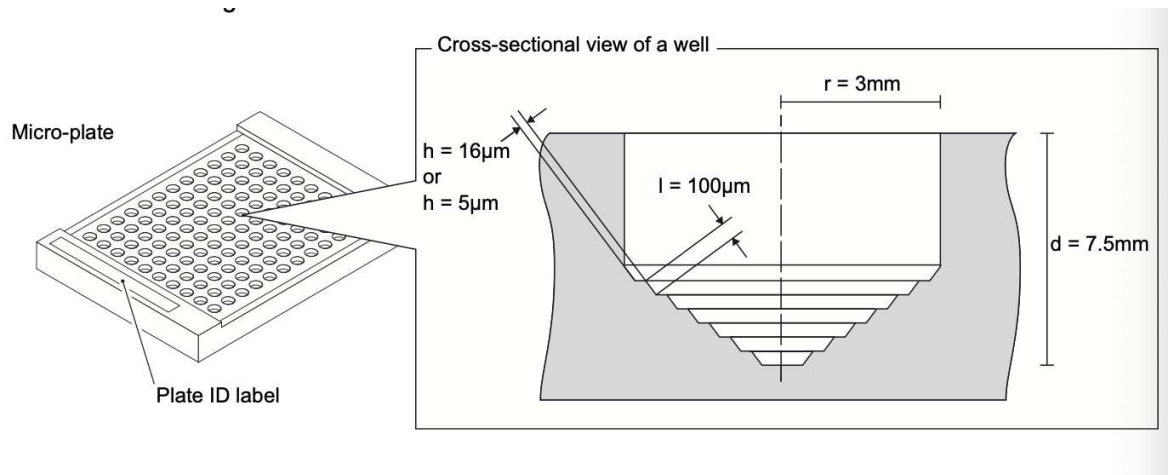


Abbildung 5: Darstellung der Platten mit den Mikrowells, verwendet beim Olympus PK7300 (21)

Mithilfe der Pipetten der Reagents Dispense Unit werden die Reagenzien in jedes Mikrowell pipettiert. Die Informationen über die Menge und Art der Reagenzien sind im Vorhinein definiert. Es können bis zu 12 primäre und 4 sekundäre Reagenzien hinzugegeben werden. Es ist hierbei zu erwähnen, dass diese Reagenzien nicht von der Firma Beckman Coulter vorgeschrieben sind. Stattdessen werden entweder Drittanbieter-Produkte verwendet oder – wie im Falle der Blutbank am Universitätsklinikum Graz – Reagenzien direkt im Labor selbst hergestellt. Dadurch kann die Wahl der verwendeten Reagenzien je nach Labor variieren. Auch die Pipetten für die Reagenzien werden regelmäßig gereinigt. Im Gegensatz zu den Pipetten für die Proben erfolgt die Reinigung hier jedoch nach jeder fünften Probe, sowohl innen als auch außen (34).

Nach den Pipettierschritten werden die Reaktionsgemische im Systeminkubator inkubiert. Die Temperatur und Dauer der Inkubation sind im System voreingestellt und gewährleisten optimale Bedingungen für die Hämagglutinationsreaktionen. Nach Abschluss des Inkubationsprozesses transportiert das System die Mikroplatten auf den Photodiffuser. Licht aus einer Quelle passiert zunächst den Photodiffuser, dann die Mikroplatte und trifft schließlich auf die CCD-Kamera. Das System erfasst ein Bild, das anschließend zur automatischen Systemauswertung weitergeleitet wird (34).

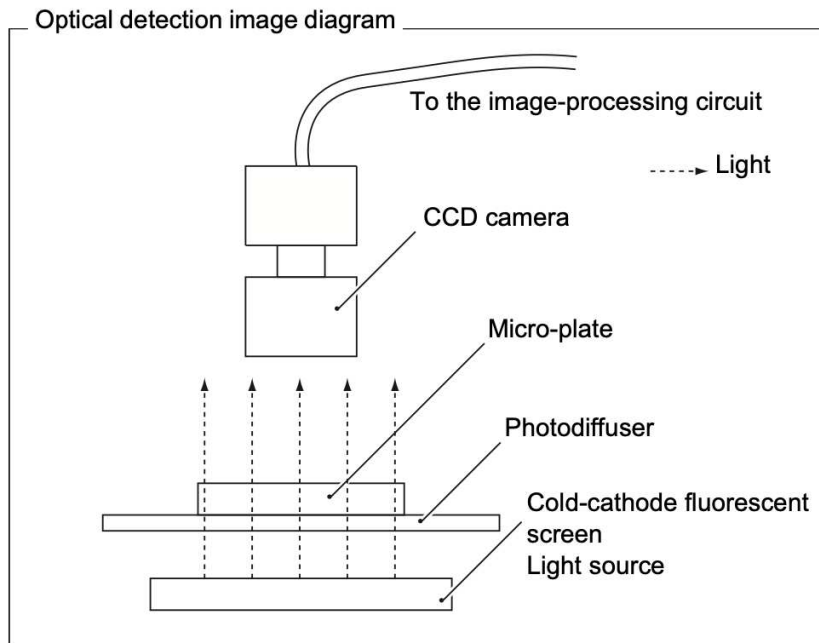


Abbildung 6: Bildaufnahme der Ergebnisse einer Mikroplatte (21).

Der Analyseprozess beim Neo Iris verläuft grundsätzlich ähnlich wie beim PK7300, weist jedoch einige Unterschiede auf, die im Folgenden beschrieben werden.

Zunächst werden die Proben und die für die Testung benötigten Reagenzien in die Ladebuchten eingeschoben. Die Positionen der jeweiligen Produkte werden anschließend mithilfe eines Barcodes und eines Scanners erfasst und identifiziert.

Ein wesentlicher Unterschied zum PK7300 besteht darin, dass die Reagenzien für die Testungen ausschließlich von der Herstellerfirma Immucor bereitgestellt werden. Es können weder Drittanbieter-Reagenzien noch selbst hergestellte Reagenzien verwendet werden. Dadurch entfällt die externe Reagenzien-Komponente aus Drittquellen. Die Reagenzien sind gemäß den Herstellerangaben zu verarbeiten und anzuwenden, um optimale Testergebnisse zu erzielen (35).

Die Mikroplatten, die ebenfalls von der Firma Immucor hergestellt werden, werden in einen Transportrahmen eingespannt. Diese in den Transportrahmen eingesetzten Mikroplatten werden anschließend in den Ladeturm eingebracht und stehen dem Gerät somit für die Analyse zur Verfügung. Das Be- und Entladen der Ladebuchten sowie des Ladeturms mit den jeweiligen Komponenten kann kontinuierlich erfolgen, ohne dass der Analysevorgang des Geräts unterbrochen werden muss. Dies ermöglicht einen hohen Durchsatz an Testungen und sorgt für einen effizienten Arbeitsablauf (35).

Sobald die Mikroplatten, die benötigten Reagenzien sowie die Testproben im System eingegeben sind, kann das System den Testvorgang starten. Mithilfe des Pipettiersystems

überträgt das System definierte Mengen an Reagenzien und Proben in die einzelnen Wells der Mikroplatten. Beim Neo Iris werden überwiegend dieselben Pipetten sowohl für Reagenzien als auch für Probenmaterial verwendet. Nach jedem Pipettiervorgang werden die Pipetten gründlich innen und außen an den jeweiligen Waschstationen gereinigt und durchgespült, um eine Kontamination oder Reagenzienverschleppung zu vermeiden (35). Die zu untersuchende Reaktion findet in den Mikrowells der Mikroplatten statt. Nachdem alle Substrate hinzugegeben wurden, wird die Platte in den Inkubator befördert und unter präzisen Bedingungen inkubiert, um eine auswertbare Reaktion zu ermöglichen. Nach der Inkubation werden die Platten zentrifugiert. Dies dient dazu, die auf den Boden abgesunkenen Erythrozyten zu resuspendieren und somit eine Verfälschung der Testergebnisse zu verhindern. Sobald alle Testschritte abgeschlossen sind, werden die Mikroplatten mithilfe des Transportsystems in den Kamera-Reader überführt. Auch der Neo Iris verwendet eine CCD-Kamera sowie eine Lichtquelle, um die Reaktionen bildlich zu erfassen. Die Auswertung dieser Bilder erfolgt anschließend durch die Neo Iris-Software (35).

6.3.3 Interpretationsvorgang

Nach der Durchführung aller Schritte des Analyseprozesses, wie zuvor beschrieben, und der Aufnahme des Reaktionsprodukts mithilfe der CCD-Kamera erfolgt in beiden Systemen eine Auswertung der Ergebnisse für die einzelnen Wells.

Beim PK7300 geschieht die Auswertung und Interpretation der Bilder der einzelnen Mikroplatten-Wells mithilfe einer Decision-Logic, die das System anhand prädefinierter Parameter automatisch durchführt. Im Wesentlichen besteht die Analyse darin, zu bestimmen, ob eine Agglutination in den Wells stattgefunden hat oder nicht (34).

Im Rahmen der Interpretation beim Olympus werden drei Parameter erhoben, anhand derer die Auswertung durchgeführt wird. Dabei handelt es sich um D, P/C und LIA.

Der P/C-Wert gibt die quantitative Menge an Licht an, die durch die peripheren Anteile (P) beziehungsweise durch die zentralen (C) Anteile des Wells gelangt. Dadurch werden die Lichtdurchlässigkeitsverhältnisse zwischen dem Rand und dem Zentrum des Wells analysiert. Der P/C-Wert berechnet sich aus dem zehnfachen P/C-Quotienten.

Der LIA-Wert gibt den Bereich an, in dem sich die Zellen im Well sammeln (34).

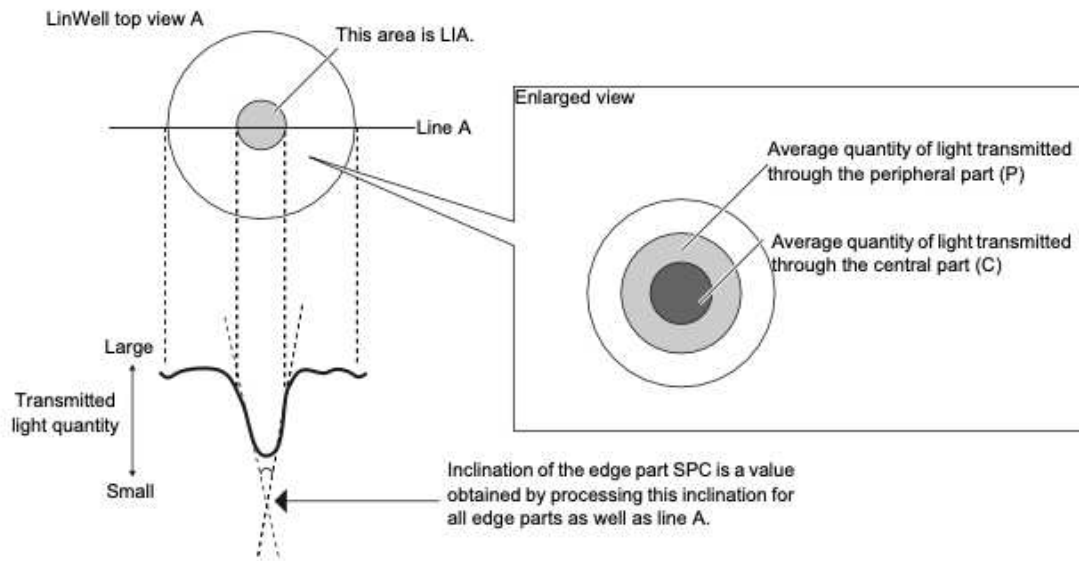


Abbildung 7: Darstellung, der für die Interpretation verwendeten Parameter (21).

Die Grenzwerte für die Interpretation der Parameter müssen von Nutzer*innen des Geräts im Vorhinein definiert werden. Der SPC Wert beschreibt die Schärfer der Ränder von Blutzellen im Zentrum des Wells an. SPC und P/C können einen Wert zwischen 0 und 99 annehmen, während LIA einen Wert zwischen 0 und 999 benötigt.

Anhand dieser vorgegebenen Intervalle gibt das System nach der Auswertung der Testwells und der Erhebung der Werte ein „+“ für einen positiven Wert, ein „-“ für einen negativen Wert und ein „?“ für einen Wert aus, der weder „+“ noch „-“ ist.

Basierend auf den Ergebnissen aller drei Parameter gibt das System für jeden Well ein endgültiges Reaktionsergebnis in Form eines „+“, „-“ oder „?“ aus. Diese Ergebnisse werden für alle drei Parameter erhoben (34).

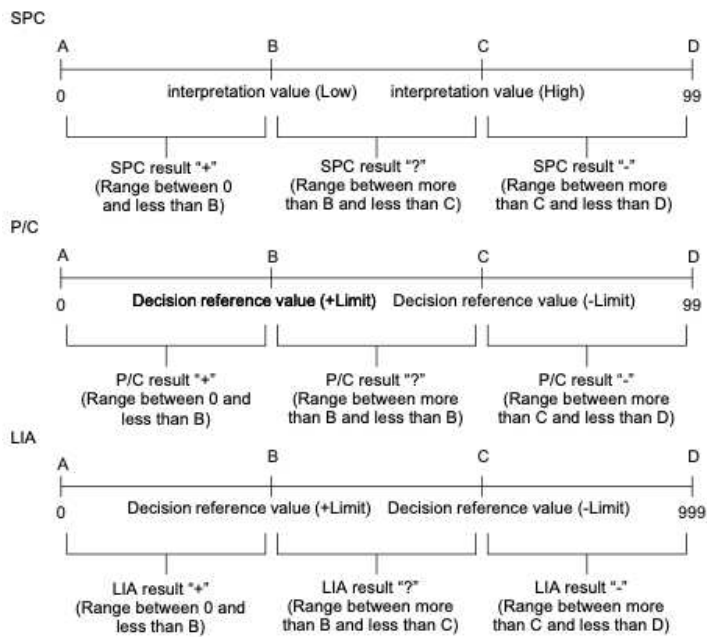


Abbildung 8: Interpretationsschema für die Parameter der Analyse (21).

Nun bestehen zwei Möglichkeiten für die Art der Wichtung der einzelnen Parameter. Sind alle drei Parameter von gleicher Bedeutung so wird nach dem folgenden Schema interpretiert:

Resultate der Reagenzien basieren auf einer Zusammenfassung aller Parameter (SPC, P/C und LIA):

Ergebnis + : Alle Parameter erweisen sich als +

Ergebnis - : Alle Parameter erweisen sich als -

Ergebnis ? : Abweichung von den zwei oberen Möglichkeiten

Es besteht allerdings die Möglichkeit dem SPC-Parameter eine höhere Wichtung zuzuteilen, wodurch das Schema für die Auswertung nun verändert wird:

Reagent interpretation	SPC	P/C	LIA
"+" diagnosis	"+" diagnosis	"+" or "X" diagnosis	"+" or "x" diagnosis
"-" diagnosis	"-" diagnosis	"-" or "X" diagnosis	"-" or "x" diagnosis
"?" diagnosis	Combination of other interpretation results than above		
"." diagnosis	No interpretation due to level detection error, dispensing error or photometry error		
<space>	Incorrect dispensing due to rack jam or mechanical error		

Tabelle 4: Ergebnisse bei erhöhter SPC Wichtung (34).

Folgend wird der Interpretationsvorgang des Neo Iris beschrieben:

Nach der Durchführung aller Testschritte und der abschließenden Aufnahme des Bildes mittels der CCD-Kamera wird vom System Neo Iris jedem Testwell ein Wert zugewiesen und mithilfe der Software ausgewertet. Dieser Wert repräsentiert das Reaktionsergebnis für das jeweilige Testwell. Jedem im Neo Iris durchführbaren Test werden testspezifische Grenzwerte zugeschrieben. Diese Grenzwerte sind vom Hersteller bzw. vom System vorgegeben und müssen nicht von Nutzerinnen des Systems im Voraus definiert werden. Das System wertet die Testergebnisse anhand dieser vordefinierten Grenzwerte aus und übermittelt das Ergebnis an die Nutzer*innen (35).

Beim Neo Iris können die Ergebnisse auf unterschiedliche Weise begutachtet werden. So kann entweder mittels „+“ für positive Reaktionen, „-“ für negative Reaktionen und „?“ für ein unstimmgiges Ergebnis jedes einzelne Well angezeigt werden. Weiterhin können die einzelnen Ergebnisse auch anhand ihrer Reaktionsgrade dargestellt werden. Zudem ist eine Anzeige der Reaktionsstärke möglich. Die Ansichten mit Reaktionsgrad und Reaktionsstärke werden in numerischer Form für jedes Well angegeben. Schließlich lässt sich auch das aufgenommene Bild der Mikroplatten begutachten, einschließlich einer hochauflösenden und vergrößerten Darstellung der einzelnen Wells. Ein „X“ bzw. ein leeres Symbol deutet auf einen Fehler im Prozess der Testung und Auswertung des Wells hin (35). Anhand der möglichen Well-Ergebnisse kann das System eine Testauswertung vornehmen. Diese kann im Falle der Rhesus-Diagnostik wie folgt lauten: Positiv, Negativ, NTD, ?, INV. Bei der Rhesus-D-Testung werden im Neo Iris zwei verschiedene Anti-D-Reagenzien verwendet. Zeigt sich bei einem Reagenz ein positives Ergebnis und beim zweiten Reagenz ein widersprüchlich negatives Ergebnis, so führt dies im System zu einem “NTD”-Ergebnis. NTD steht für “no type determined” (kein Typ festgelegt). Eine mögliche Ursache hierfür könnte das Vorliegen einer D-Variante sein, was eine weitere Abklärung der Probe erfordert (35).

6.3.4 Testmethoden

Die Grundlage der Rhesusblutgruppentestungen sowie vieler weiterer Tests der Geräte bildet die Agglutinationsreaktion. Sowohl das Neo Iris- als auch das PK7300-System führen die serologischen Schritte des Agglutinationstests durch. Diese erfolgen in den bereits erwähnten Mikrotiterplatten. Obwohl diese Methode – wie beschrieben – auch in Gelkarten oder Röhrchen durchgeführt werden kann, basiert die automatische Testung auf Reaktionen in Mikrotiterplatten, da diese Methode einen hohen Durchsatz ermöglicht. In beiden

Systemen werden zunächst die zu testenden Erythrozyten in unbearbeitete Mikrowells pipettiert und anschließend verdünnt. Durch die Zugabe eines Antikörpers wird eine mögliche Reaktion in Gang gesetzt. Nach weiteren Schritten (z. B. Inkubation), wie im vorherigen Kapitel beschrieben, kommt es zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion und folglich zur Hämagglutination der Erythrozyten. Diese setzen sich am Boden der Wells ab. Die Agglutination wird schließlich vom System optisch ausgewertet.

Das Olympus PK7300-System basiert bei der Testung des Rhesus-D-Antigens ausschließlich auf diese serologische Testmethode (34).

Auch Neo Iris setzt bei der Rhesus-Diagnostik zunächst ausschließlich auf die Agglutinationsreaktion. Hierzu werden unbehandelte Mikroplatten verwendet, in deren Wells die Reaktionstestung durchgeführt wird. Ergibt die Testung den ermittelten Wert "NTD", so ist eine weitere Abklärung erforderlich. Dieses sogenannte "Weak D"-Testprotokoll erfolgt nach der folgenden Methode:

Neo Iris wirbt mit einer weiteren Methode der serologischen Testung, die eine automatisierte Auswertung sowie eine kontrollierte Überprüfung auf weak D bei fraglichen Rhesus-D-Testungen ermöglicht. Dabei handelt es sich um die Capture-Technologie der Firma Immucor, die im Folgenden genauer beschrieben wird.

(36).

Hierbei werden spezielle Wells verwendet, welche mit fixierten Erythrozytenmembranen und deren dazugehörigen spezifischen Antigenen beschichtet sind. In diesen Wells werden zum einen Capture LISS und zusätzlich das zu untersuchende Plasma bzw. Serum hinzugefügt. Als Indikator für die erfolgreiche Zugabe der Probe dient ein Farbumschlag von Rot auf Himmelblau oder Violett. Anschließend wird die Probe bei 37 °C inkubiert. Dies führt dazu, dass sich etwaige Antikörper im Plasma an die jeweils spezifischen Antigene auf den Erythrozytenmembranen, die die Wellwand auskleiden, binden. Ungebundene Immunglobuline sowie unspezifische Proteine verbleiben ungebunden und unfixiert im Trägermedium. Um die ungebundenen Antikörper sowie Plasmaproteine zu entfernen, erfolgt ein Waschschrift. Dadurch verbleiben ausschließlich die antigengebundenen Antikörper in den Wells. Dieser Waschschrift bietet den Vorteil, dass sowohl optimale Proben als auch problematische Proben, die möglicherweise hämolysiert sind oder einen erhöhten Bilirubin- oder Lipidgehalt aufweisen, getestet werden können. Der zweite und letzte Pipettierschrift ist die Zugabe von Indikatorzellen, die mit Anti-IgG beschichtet sind. Diese binden sich an die fixierten Antikörper (36).

Vor der Auswertung werden die Testplatten in die Zentrifuge überführt, wo das Gemisch zentrifugiert wird. Das Ergebnis der Testung wird anschließend optisch ermittelt. Im Falle einer positiven Reaktion kommt es zur Bindung zwischen den Indikatorzellen und den Antikörpern. Dies führt zu einer gleichmäßigen Beschichtung des Bodens der Testwells. Je mehr Antikörper vorhanden sind, desto mehr Testzellen können eine Bindung eingehen (36). Sind jedoch keine Antikörper im Serum bzw. Plasma der Patient*innen vorhanden, kommt es während der Zentrifugation zu keiner Bindung der Testzellen. Stattdessen sammeln sich diese am Boden im Zentrum des Wells (36).

Grundsätzlich dient diese Methode der Testung freier Antikörper im Plasma oder Serum der Probe. Im Rahmen der Rhesus-Diagnostik hingegen ist die Testung der an den Erythrozytenmembranen gebundenen Oberflächenantigene von besonderer Bedeutung. Neo Iris bietet jedoch eine ähnliche Möglichkeit, die einen zusätzlichen Schritt in der Testung erfordert. Hierfür verwendet Neo Iris die sogenannten "Capture-R Select"-Platten für die Weak D Testung, im Gegensatz zu den "Capture-R Ready-Screen"-Platten, die für die Antikörpertestung eingesetzt werden. Die "Capture-R Select"-Platten ermöglichen es, humane Erythrozyten an die Wand der Wells zu binden und zu immobilisieren. Sobald die Wells mit den zu testenden Erythrozyten beschichtet sind, wird ein Anti-D-Reagenz hinzugegeben – im Falle der Neo Iris-Testung das NOVACLONE Anti-D. Die Bindung dieses Reagenzes an die Erythrozyten kann – ähnlich der zuvor beschriebenen Capture-Methode – im weiteren Verlauf optisch dargestellt werden (37).

Nun stellt sich die Frage nach der Sensitivität der Capture-Methode im Vergleich zu anderen serologischen Methoden, die ausschließlich die Agglutinationsreaktion als Parameter heranziehen. Wie bereits erwähnt, haben viele Faktoren einen Einfluss auf die Stärke der Antikörper-Antigen-Reaktion. Bei der Capture-Methode spielen zwei Parameter eine Rolle: die „Sensitization“ und die „Adherence“. Die Sensitization beschreibt das Anhaften der Antikörper an die Erythrozytenmembranen, die an der Wand der Wells fixiert sind. Dabei spielt das Verhältnis von Antikörper zu Antigen eine entscheidende Rolle. Geht man davon aus, dass die Antikörperkonzentration bei den unterschiedlichen Methoden konstant ist, so kann diese in Relation zur Erythrozytenoberfläche gesetzt werden. Im Falle der Capture-Methode, die eine deutlich kleinere Fläche aufweist, ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass ein Antigen an einen Antikörper gebunden wird, als bei den anderen Methoden (38).

Method	Sample Volume (μL)	Red Cell Surface Area (mm ²)	Sample to Cell Ratio (μL/ mm ²)
Capture	25*	66.4	.38
Column Agglutination Technology	25	598	.04
Tube	100	2244	.04

Tabelle 5: Antikörper-Antigen Verhältnis. Vergleich von Methoden (38)

Weiters spricht man von der „Adherence“, welche die Bindung eines Antikörpers an das Antigen beschreibt. Durch die Zentrifugation kommt es zum Aneinandergleiten der Indikatorzellen mit den Anti-IgG-Komplexen entlang der Wellwand, an welche die Antikörper binden. Dadurch erhöht sich die Anzahl potenziell übereinstimmender Kontaktpunkte, und der Nachweis einer Reaktion kann hochsensitiv dargestellt werden (38).

7 Material und Methoden

Bei dieser Studie handelt es sich um eine retrospektive Untersuchung. Vorhandene Daten werden anhand einer deskriptiven Statistik analysiert, und die Ergebnisse abschließend interpretiert. Die Interpretation der Auswertungsergebnisse wird durch eine Literaturrecherche gestützt.

Der Untersuchungszeitraum erstreckt sich vom 06.04.2022 bis zum 10.01.2024. Seit dem Umstieg von dem Gerät PK7300 der Marke Beckman Coulter auf das System Neo Iris der Marke Immucor traten in der Routinetestung der Rhesusblutgruppen in der Klinik für Transfusionsmedizin und Blutgruppenserologie mehrere Diskrepanzen in den Ergebnissen auf. Diese abweichenden Testergebnisse sowie die laut Neo Iris fraglichen D-weak-Typen wurden dokumentiert und systematisch zusammengefasst.

Zunächst wurden 122 Testergebnisse als fragliche D-weak-Typen eingestuft, basierend auf den Analysen des Neo Iris. Da das Ziel dieser Studie darin besteht, die diskrepanten Testergebnisse zwischen den beiden Testautomaten zu untersuchen, werden von diesen 122 Datensätzen ausschließlich die Ergebnisse von Mehrfachspender*innen berücksichtigt.

Daher werden alle 44 Datensätze von Erstspender*innen aus der Studie ausgeschlossen, da für diese keine vergleichbaren Testergebnisse mit dem PK7300 vorliegen. Zudem werden nur jene Testergebnisse einbezogen, die innerhalb des festgelegten Studienzeitraums erhoben wurden.

Zur Einholung der Zustimmung der Spender*innen für die Aufnahme der benötigten Daten wurden deren Spenderbögen überprüft. Diese Bögen enthalten gegebenenfalls die Einwilligung zur Nutzung der Daten für Forschungszwecke. Eine Person hat dieser Nutzung nicht zugestimmt und wird daher aus der Studie ausgeschlossen.

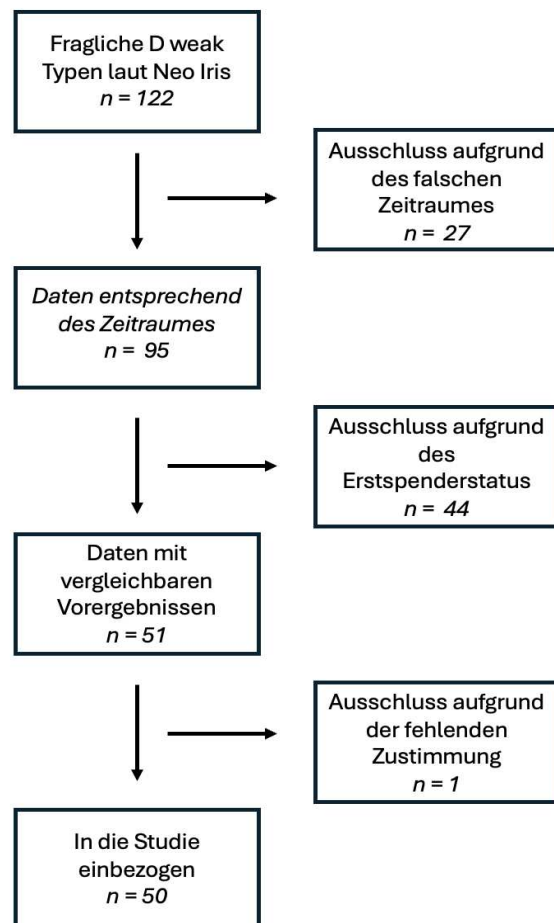


Abbildung 9: Flowchart der Aufnahme von Spender*innen in die Studie

Somit werden von den ursprünglich 122 Datensätzen insgesamt 72 ausgeschlossen: 44 aufgrund fehlender Vergleichswerte, 27 wegen eines nicht passenden Untersuchungszeitraums und eine Person aufgrund der fehlenden Einwilligung. Es verbleiben 50 Spender*innen, deren Daten in dieser Studie analysiert und interpretiert werden.

Bei der Auswahl der Spender*innen mussten bestimmte Kriterien erfüllt sein. Das Hauptkriterium für die Aufnahme in diese Studie war das Vorliegen einer Diskrepanz in der Rhesusdiagnostik im Zeitraum vom 06.04.2022 bis 10.01.2024.

Das bedeutet, dass diese Spender*innen bereits ein positives oder negatives Ergebnis bei der Rhesusblutgruppendiagnostik mittels PK7300 erhalten hatten, sich jedoch im Rahmen der Neo-Iris-Testung ein abweichendes Ergebnis zeigte. Diese Diskrepanz wurde anschließend durch eine PCR-Untersuchung weiter abgeklärt. Bestätigte sich die Diskrepanz, wurden die entsprechenden Daten in die Studie aufgenommen.

Das Spender*innenkollektiv beschränkt sich zudem auf Personen im Alter von 18 bis 70 Jahren. Die Altersgrenze von 70 Jahren entspricht dem höchstmöglichen Alter für eine Zulassung zur Blutspende. Zudem werden sowohl männliche als auch weibliche Spender*innen in diese Studie aufgenommen. Aufgrund der hohen Relevanz in der Bluttransfusionspraxis werden auch gebärfähige Frauen explizit einbezogen.

Um die Teilnehmer*innenzahl zu begrenzen, wurden bestimmte Ausschlusskriterien festgelegt. Dazu zählen Notfallpatient*innen, Minderjährige sowie Spender*innen ohne Einwilligung.

Die für diese Studie benötigten Daten und Spender*inneninformationen werden aus dem der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin zur Verfügung stehenden Programm „eProgres“ erhoben. Zum Schutz der Vertraulichkeit wurden die erhobenen Daten pseudonymisiert bereitgestellt. Die Pseudonymisierung und Verschlüsselung der Datensätze erfolgte durch die Zuweisung und Kennzeichnung der Daten mittels Spender*innennummern.

8 Datenauswertung

Im folgenden Kapitel werden die erhobenen Daten ausgewertet.

Die Datenerhebung ergab, dass im Zeitraum vom 06.04.2022 bis zum 10.01.2024 insgesamt 40.032 Spender*innen auf ihre Rhesusblutgruppe getestet wurden – entweder mittels PK7300 oder Neo Iris.

Bei 110 dieser Proben wurde im Rahmen der Rhesusdiagnostik ein weak D Typ festgestellt. Bei den restlichen 39.932 untersuchten Spender*innen zeigte sich ein eindeutiges rhesuspositives oder rhesusnegatives Ergebnis. Die Gesamtzahl der weak D Fälle entspricht damit einer Häufigkeit von 0,27 % in Bezug auf die gesamte Spender*innenzahl dieses Zeitraums. Dieser Prozentsatz deckt sich mit der bisher bekannten Häufigkeit von weak D Träger*innen in der europäischen Bevölkerung, die – wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben – zwischen 0,2 % und 0,5 % liegt.

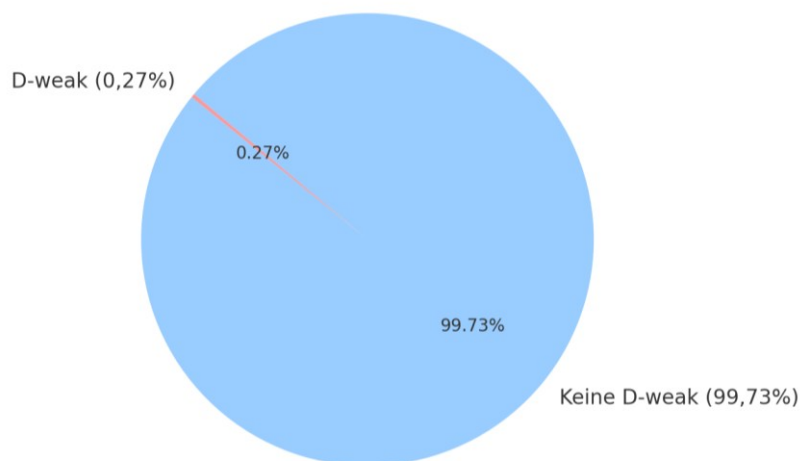


Abbildung 10: Anteil weak D an den Gesamtspenden

Es stellt sich nun heraus, dass von den 110 getesteten weak D Fällen bei 48 eine Diskrepanz in den historischen Rhesusergebnissen der Spender*innen vorliegt. Die übrigen 62 Fälle betreffen daher entweder einen bereits bekannten weak D Typ oder eine*n Erstspender*in. Das heißt, dass in 48 Fällen eine Person als Rhesus negativ oder Rhesus positiv eingestuft wurde und ihr Blut entsprechend behandelt wurde. Statt diese als weak D Produkt zu behandeln. Die Berechnung auf Grundlage dieser Werte ergibt, dass 43,6% aller weak D Typen eine Diskrepanz in der Rhesustestung nach wiederholten Neo-Iris-Tests aufweisen. In diesem Zeitraum wurden 56,4 % der weak D Spender*innen übereinstimmend zwischen Olympus und Neo Iris korrekt typisiert.

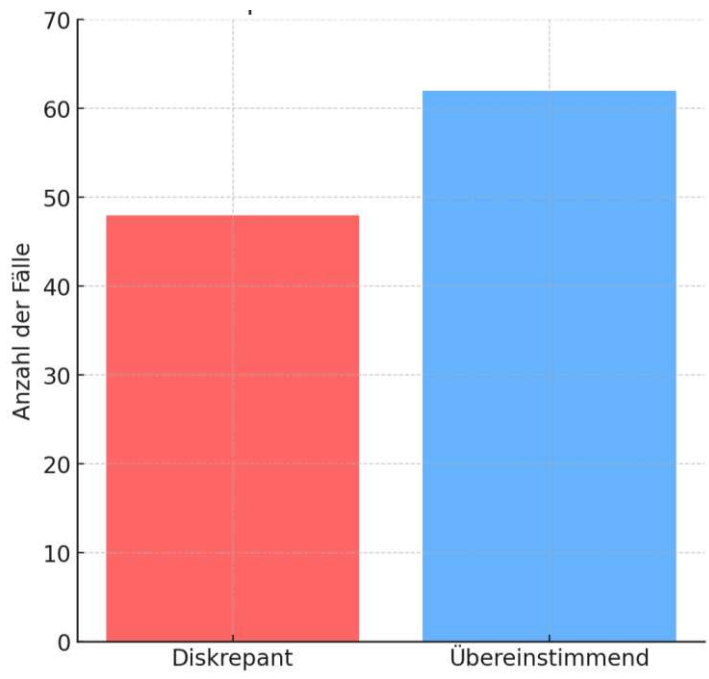


Abbildung 11: Diskrepanzen bei weak D Fällen

Zudem wird die Abweichung der Ergebnisse genauer betrachtet. Zuerst können die 50 Spender*innen basierend auf ihrer D-Variante in Gruppen eingeteilt werden. Von den 50 diskrepanten Daten zeigen sich bei 23 Spender*innen weak D Typ 1. Der weak D Typ 2 trat bei einer Gesamtzahl von 20 auf. Drei Spender*innen haben den weak D Typ 3. Letzten Endes zeigt sich bei einer Person mit dem weak D Typ 48 eine Diskrepanz. Bei der Auswertung der Daten wurden zudem zwei Unstimmigkeiten bei Spender*innen mit D Partial als Rhesustyp festgestellt. In beiden Fällen geht es um das D Partial RHD*06.

Der Rhesusgenotyp wurde für alle Fälle erfasst, um eine genauere Übersicht über die betroffenen Rhesusgruppen zu erhalten.

Erkennbar ist, dass alle Diskrepanzen des weak D Typ 1 den identischen Genotyp CcD.ee besitzen. In den Proben mit Typ 2 zeigt sich bei 18 Personen der Genotyp ccD.Ee, während nur zwei CcD.ee aufweisen. Beim weak D Typ 3 wurden 3 Spender*innen mit dem Genotyp CcD.ee und eine mit dem Genotyp CCD.ee identifiziert. Der Genotyp ccD.Ee wurde bei allen Proben des Typs 48 bzw. mit einem D-Partial festgestellt.

Bei der Überprüfung der Vorbefunde der betroffenen Fälle ergab die Auswertung der Ergebnisse des PK7300, dass jeder Spender und jede Spenderin von diesem Gerät als Rhesuspositiv eingestuft wurde. In den 50 untersuchten Fällen existiert keine Diskrepanz, bei der eine Spenderin/ein Spender zunächst laut dem PK7300 als Rhesus negativ galt und in der weiteren Untersuchung durch Neo Iris als weak D oder Rhesus positiv identifiziert wurde. Zudem ist bei den Abweichungen lediglich eine D-Variante zu entdecken, die nicht

wahrgenommen wurde. In diesem Zeitraum trat weder eine positive noch eine negative Diskrepanz auf.

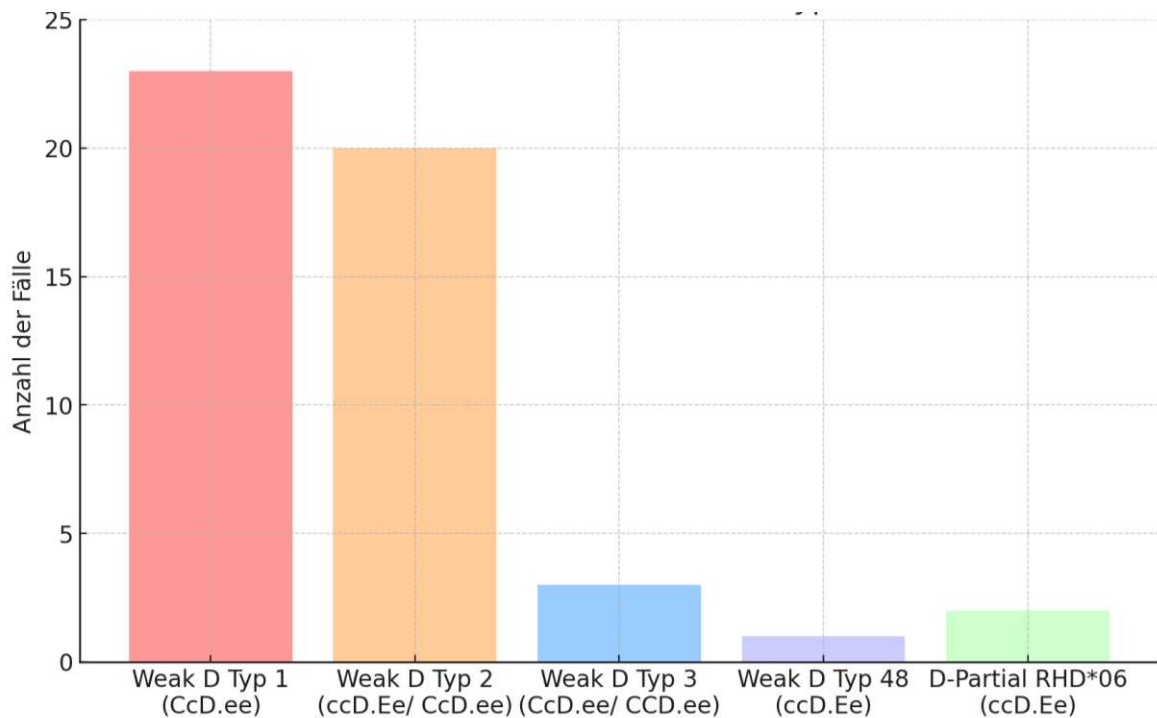


Abbildung 12: Verteilung der 50 diskrepanten weak D Fälle nach Variante und Genotyp

Bei den zwei D-Teil-Diskrepanzen ist zu beobachten, dass im Rahmen der Vorbefundung durch den PK7300 in einem Fall bereits ein abgeschwächtes D festgestellt wurde. Im Fall des identen D-Partialtyps im zweiten Fall wurde hingegen die D-Variante nicht erkannt. Diese wurde erst bei einem weiteren Test durch den Neo Iris als eine Form des weak D erkannt.

Nun gilt es zu klären, wie diese Unterschiede zwischen den zwei Verfahren zustande kommen und welche Faktoren Einfluss auf die Testergebnisse haben.

9 Diskussion

Diese Studie hat zum Hauptziel, die Methoden der Systeme Neo Iris und PK7300 hinsichtlich der Rhesustestung zu vergleichen. Die zu beantwortende Frage lautete: Was verursacht die Diskrepanz zwischen den Testergebnissen von Mehrfachspender*innen? Wegen der gravierenden Folgen, die eine falsche Rhesustypisierung für Spender*innen und Empfänger*innen hat, ist es erforderlich, die möglichen Konsequenzen zu erläutern.

Die Resultate dieser Untersuchung sind für die betroffenen Spender*innen sowie für die Blutbank und deren Umgang mit Blutprodukten von Bedeutung.

9.1 Interpretation der Hauptbefunde

Im Zeitraum, in dem die Daten für diese Untersuchung erhoben wurden, traten – wie im vorherigen Kapitel beschrieben – bei 0,27 % der 40.032 Spender*innen weak D auf. Diese Zahl korreliert mit den in der Literatur geschätzten Häufigkeiten. Metaxas-Bühler gibt an, dass die weak D -Häufigkeit in der kaukasischen Bevölkerung unter 1 % liegt (1), während Geoff Daniels eine Häufigkeit von 0,3-1,7 % beschreibt (2). Der Wechsel von PK7300 auf Neo Iris schließt somit die Gefahr aus, dass es zu vermehrten falsch positiven Testungen kommt.

Von den 110 im Untersuchungszeitraum getesteten weak D Proben wiesen 48 weak D Fälle eine Unstimmigkeit auf. Das macht 43,6 % der gesamten weak D -Testungen aus. Nur etwas über 50 % der 110 weak D Ergebnisse wurden von Olympus und PK7300 übereinstimmend getestet. Es kann demnach geschlossen werden, dass zahlreiche Blutprodukte als Rhesus positiv anstatt als weak D behandelt wurden. Die möglichen Folgen werden in den nachfolgenden Kapiteln genauer erläutert.

Die Klassifizierung der diskrepanten weak D -Fälle in ihre Typen ermöglicht Rückschlüsse auf die Häufigkeitsverteilung der weak D -Typen in der kaukasischen Bevölkerung. Wie zu erwarten war, handelt es sich bei 47 der insgesamt 48 Diskrepanten weak D Ergebnissen um ein weak D vom Typ 1, 2 oder 3. Wie in den vorhergehenden Kapiteln ausgeführt, entspricht dies der Häufigkeitsverteilung von weak D-Typen in Europa. Mit mehr als 90% aller weak D -Fälle wird diese beschrieben (14).

Besonders auffällig ist, dass in den untersuchten Fällen keine Rhesus-positiven auf Rhesus-negativen oder umgekehrten Diskrepanzen festgestellt wurden. Beide Geräte können eindeutig feststellen, ob das D-Antigen oder eine Variante davon vorhanden ist oder nicht.

Der einzige Unterschied liegt in der Einstufung des Reaktionsergebnisses als Rhesus positiv oder als fragliche D-Reaktion, was eine zusätzliche Testung auf weak D nach sich zieht. Es ist nun zu fragen, welche Unterschiede zwischen diesen beiden Testmethoden möglicherweise für die Diskrepanzen verantwortlich sind.

9.2 Mögliche Ursachen

Die Unterschiede zwischen den beiden Testgeräten Neo Iris und Olympus PK7300, die die Diskrepanzen verursachen, ist hauptsächlich in den verschiedenen Testmethoden, Hardwareunterschieden und Testabläufen begründet.

Die Hardwareunterschiede sollten dahingehend berücksichtigt werden, dass das Testgerät Neo Iris von Immucor im Vergleich zum Olympus PK7300 ein moderneres Gerät ist. Somit bezieht sich dies auch auf die in den beiden Testgeräten verbauten Hardwarekomponenten. Die CCD-Kamera, die für die optische Erfassung der Reaktionen in den Wells der Mikroplatten verantwortlich ist, stellt eine entscheidende Komponente dar. Man kann annehmen, dass die Reaktionsergebnisse mit der moderneren Kamera im Neo Iris höher aufgelöst werden können. Damit wird eine genauere Einstufung der Ergebnisse durch die Software in positive, negative oder fragliche Reaktionen ermöglicht.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied betrifft die Testmethoden, die von den Geräten verwendet werden. Wie in den vorhergehenden Kapiteln bereits angesprochen, nutzt Neo Iris die Capture-Methode, um nicht eindeutige Rhesustests weiter zu prüfen. Dank der höheren Sensitivität dieser Testmethode im Vergleich zur herkömmlichen Agglutinationsreaktion können die D-Varianten genauer erfasst werden. Dies führt zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen den beiden Testgeräten.

Auch die eingesetzten Reagenzien sind zu berücksichtigen. Es ist nochmals zu betonen, dass Neo Iris ein geschlossenes System ist, das Reagenzien verwendet, die vom Hersteller bereitgestellt werden. Im Gegensatz dazu nutzt der Olympus PK7300 Reagenzien von Drittanbietern. Variation der Reagenzien kann Abweichungen in den Testergebnissen hervorrufen und zu Diskrepanzen führen (39).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die identifizierten Diskrepanzen vor allem in der Erkennung von D-Varianten auftreten. Aufgrund der genannten potenziellen Ursachen reagiert Neo Iris empfindlicher auf weak D-Fälle, die vom Olympus PK7300 als Rhesuspositiv klassifiziert wurden.

9.3 Auswirkungen auf Betroffene

Die in dieser Studie behandelten diskrepanten Ergebnisse beziehen sich lediglich auf die Spender*innen Klassifikation durch Neo Iris als weak D Typ, während bei Olympus eine reine D Positivität festgestellt wurde. Wie bereits erwähnt, gibt es keinen Fall von Rhesus D positiv zu Rhesus D negativ oder umgekehrt. Potenzielle Gefahren und Begleiterscheinungen, die aus einer solchen Diskrepanz resultieren könnten, sind damit ausgeschlossen. Trotzdem beeinflusst die Kategorisierung als weak D bzw. Partial D den Umgang mit Spender*in und Empfänger*in.

9.3.1 Auswirkungen auf Empfänger*innen

Es zeigt sich nun bei den von der Diskrepanz Betroffenen, dass sie weak D positiv sind und nicht über eine normale D-Positivität verfügen. Welche Folgen hat dies nun für diese Personen, wenn sie als Empfänger*innen gelten?

Die Vorgaben für den Umgang mit Bluttransfusionen bei D-Patienten weichen voneinander ab. Zusätzlich variieren sie je nach Art der D-Variante des Empfängers oder der Empfängerin. Empfänger*innen mit weak D haben grundsätzlich alle Epitope des weak D auf der Zelloberfläche, jedoch in geringerer quantitativer Menge. Allerdings sind sie vorhanden, weshalb bei der Transfusion von Rhesuspositivem Blut keine Anti-D Bildung erwartet wird.

Es gibt jedoch Berichte über Immunisierungsfälle bei einigen weak D-Typen (40). Laut der englischen Leitlinie werden daher alle Empfänger*innen mit weak D Typ 1, 2 oder 3 als Rhesus-positive Empfänger und alle anderen als Rhesus-negative Empfänger*innen behandelt (9). Die Mehrheit der inkonsistenten Testergebnisse weist auf den weak D Typ 1, 2 oder 3 hin. Betroffene können also weiterhin Rhesus-positives Blut erhalten. Bei einem/einer Patient*in zeigt sich ein weak D Typ 48, weshalb dieser D negativ versorgt werden sollte.

In einem Fall mit abweichenden Resultaten trat ein Partial D in der erneuten Untersuchung mit Neo Iris auf, nachdem zuvor eine Rhesus-Positiv-Bewertung erfolgt war. Empfänger*innen mit einer D-Partialvariante zeigen nur Teile des vollständigen Rhesusgens auf ihrer Oberfläche. Dadurch ist die Bildung von Allo-Antikörpern gegen Epitope möglich, die nicht vorhanden sind. Um das Risiko einer hämolytischen Transfusionsreaktion zu vermeiden, muss diese Person mit Rhesus-negativem Blut versorgt werden (40).

9.3.2 Auswirkungen auf Spender*innen

Bei Patient*innen, die zuvor als Rhesus positiv eingestuft wurden und bei denen nun ein weak D vorliegt, stellt sich die Frage, wie sie als Spender behandelt werden. Wegen der hohen Immunogenität des Rhesus-D-Antigens kann bei einer Rhesus-D-negativen Person bereits eine Transfusion von wenigen Antigenen zu einer Bildung von Anti-D führen (41). 30% der Rhesus D-negativen Personen, die mit Rhesus D-positiven Blutprodukten transfundiert wurden, zeigen eine Bildung von Alloantikörpern (9). Da die Patienten*innen in der Vortestung von Olympus jedoch bereits als Rhesus positiv eingestuft wurden, bleibt ihre Handhabung als Spender*in unverändert. Ihr Blut wird weiterhin für Rhesus-positive Blutprodukte verwendet.

9.3.3 Auswirkungen auf den Lagerbestand

Da eine Rhesus-Negativität nur bei 15 % unserer Bevölkerung auftritt, steht nur eine geringe Menge an Rhesus-negativen Blutprodukten zur Verfügung. Aufgrund dessen ist die Gabe von Rhesus-positiven Blutprodukten an Rhesus-negative Patient*innen häufig nicht zu vermeiden. Dies sollte jedoch nur im äußersten Notfall erfolgen und bei Frauen im gebärfähigen Alter sowie bei Patient*innen mit häufiger Transfusionsnotwendigkeit dringend vermieden werden (21)

Nun stellt sich die Frage, ob die festgestellten Diskrepanzen zu einer verbesserten Handhabung der Blutprodukte in einer Blutbank führen können. Da alle betroffenen Personen zuvor als Rhesus-positiv eingestuft wurden, bleibt auch nach der Identifizierung der D-Varianten die Indikation bestehen, das gespendete Blut als Rhesus-positiv zu handhaben. Zudem erhalten diese Personen ausschließlich Rhesus-positives Blut. Es ergibt sich somit kein zusätzlicher Nutzen für die Blutbanken.

Falls jedoch eine Person fälschlicherweise als Rhesus-negativ getestet wurde, obwohl eine weak D-Variante (Typ 1, 2 oder 3) vorliegt, kann und sollte diese Person mit Rhesus-positivem Blut versorgt werden (42). Dadurch könnten Rhesus-negative Blutprodukte eingespart werden.

9.4 Klinische Folgen

Wird eine Blutkonserve aufgrund eines Fehlers als falsch positiv oder falsch negativ für Rhesusantigene gekennzeichnet, besteht die Gefahr einer Fehltransfusion. Wenn eine Person mit Rhesusnegativität eine Blutkonserve erhält, die einer anderen Rhesusgruppe oder einer

Rhesusvariante angehört, kann dies ernsthafte klinische Konsequenzen nach sich ziehen, die im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

Es ist jedoch zu beachten, dass es zwei verschiedene Arten von Reaktionen gibt, die auf eine Bluttransfusion folgen können. Diese können grob in hämolytische und nicht hämolytische Transfusionsreaktionen unterteilt werden.

9.4.1 Hämolytische Transfusionsreaktionen

Hämolytische Transfusionsreaktionen können grob in zwei Kategorien eingeteilt werden, basierend auf dem Zeitpunkt ihres Auftretens. Es ist zu unterscheiden zwischen der akuten hämolytischen Transfusionsreaktion, die sofort oder binnen 24 Stunden nach der Gabe auftritt, und der verzögerten hämolytischen Transfusionsreaktion, die nach einem Tag erfolgt (43). Hämolytische Transfusionsreaktionen kennzeichnen sich durch einen beschleunigten Zerfall der Erythrozyten, entweder bei der/dem Patient*in, bei der/dem Spender*in oder in besonderen Fällen von beiden. Eine Reaktion zwischen den Antikörpern der/des Patient*in und den Oberflächenantigenen der Erythrozyten der/des Spender*in kann die Ursache für die Hämolyse sein. Es handelt sich um eine Major-Inkompatibilität. Es ist auch umgekehrt möglich, dass eine Reaktion zwischen den Antikörpern im Spenderplasma und den Oberflächenantigenen der Erythrozyten der/des Empfänger*in stattfindet. Die als Minor-Inkompatibilität bekannte Problematik. Es gibt seltene Fälle, in denen eine Inter-Donor-Inkompatibilität auftreten kann. Dies führt zu einer Reaktion zwischen den im Spenderplasma enthaltenen Antikörpern und den Oberflächenantigenen der Erythrozyten im Blut der/des Empfänger*in, die aus einer früheren Transfusion stammen (43).

Bei einer Fehltransfusion inkompatibler Erythrozyten an eine Person mit regulären Antikörpern, wie etwa anti-A oder anti-B (die im menschlichen Organismus natürlich vorkommen), kann es zu einer akuten hämolytischen Transfusionsreaktion kommen. Auch eine Transfusion von Spendererythrozyten, bei denen Antikörper gegen andere Antigene gebildet wurden (zum Beispiel aufgrund früherer Transfusionen oder während vorhergehender Schwangerschaften), kann eine solche Komplikation verursachen (43).

Außerdem können akute hämolytische Transfusionsreaktionen in immunbedingte und nicht-immunbedingte Reaktionen kategorisiert werden. Die zuvor genannten potenziellen Gründe für akut hämolytische Transfusionsreaktionen gehören zur Kategorie der immunen akut hämolytischen Transfusionsreaktionen. Die häufigsten Ursachen sind eine fehlerhafte Identifizierung der Patient*innen oder die falsche Durchführung des Bed-Side-Tests (44).

Akute hämolytische Transfusionsreaktionen, die nicht immunbedingt sind, entstehen, wenn die Hämolyse auf andere Ursachen als Antikörper-Antigen-Reaktionen zurückzuführen ist. Dazu gehören beispielsweise die Gabe des Konzentrates zusammen mit einer inkompatiblen Kristalloid Lösung, Schwierigkeiten bei der Lagerung von Blutkonserven oder technische Probleme während der Transfusion aufgrund fehlerhaften Transfusionsmaterials (44).

Verzögerte hämolytische Transfusionsreaktionen werden grundsätzlich durch eine sekundäre Immunantwort (nach einer vorher stattgefundenen primären Immunantwort) auf Antigene auf den Erythrozyten der Spender*innen verursacht, die wie folgt verläuft: Eine Person, die Blut empfängt, bekommt inkompatibles Blut (außer ABO). Beim Erstkontakt immunisiert sich der/die Empfänger*in, und es bilden sich Antikörper gegen die ihm/ihr unbekanntes Antigene. Dies ist die primäre Immunantwort. Wird eine Transfusion gegen die nun gebildeten Antikörper durchgeführt, die im Empfänger*innenblut nur in minimaler Konzentration vorliegen, so kommt es innerhalb von 3 bis 7 Tagen, im Rahmen der sekundären Immunantwort, zu einer Verstärkung der Produktion dieser Antikörper (ein „Booster-Effekt“) und zu einer verzögerten hämolytischen Transfusionsreaktion. Die häufigsten Antigene, die hierbei eine Rolle spielen, stammen aus den Blutgruppensystemen Rhesus, Kidd, Duffy, Kell und MNS (44). Personen mit Antikörpern gegen Erythrozytenantigene (nach vorangegangenen Transfusionen oder Schwangerschaften), deren Titer unter dem messbaren Bereich liegt, sind besonders gefährdet für verzögerte hämolytische Transfusionsreaktionen (44).

Zu Beginn sind die Symptome der Akuten Hämolytischen Transfusionsreaktionen nicht spezifisch. Bei Patient*innen, die bei Bewusstsein sind, verspüren häufig eine Kälte oder ein starkes Brennen im Bereich der Transfusion auf. Zudem schildern sie häufig Schmerzen im Brust-, Bauch- und Rückenbereich. Darüber hinaus können Übelkeit, Kopfschmerzen, Dyspnoe und Tachypnoe auftreten. Hautveränderungen, Fieber und Hypotensive Entgleisungen sind häufige objektive Symptome. Bei bewusstlosen Patient*innen weisen Schocksymptomatik, Hämoglobinurie und Anzeichen systemischer Blutungen auf eine akute hämolytische Transfusionsreaktion hin.

Die verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion tritt ähnlich wie die akute Variante auf, jedoch ist ihre klinische Manifestation weniger ausgeprägt. Fieberschübe und klinische Anzeichen einer Anämie treten häufig in milderer Form auf. Als Hinweis auf eine verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion zeigt sich oft Tage später ein Rückgang des Hämoglobinspiegels bei den Betroffenen. In Fallstudien wurden sogar Fälle dokumentiert, in denen eine solche Reaktion ohne Symptome auftrat. Obwohl eine verzögerte

Transfusionsreaktion für die meisten Menschen selten tödlich ist, kann sie bei Personen in kritischem Gesundheitszustand fatale Folgen haben. (43).

9.4.2 Nicht Hämolytische Transfusionsreaktionen

Außer den hämolytischen Transfusionsreaktionen gibt es auch nicht hämolytische. Da diese Reaktionen grundsätzlich nicht mit den Blutgruppensystemen, insbesondere der Rhesusblutgruppe, verbunden sind, werden die wichtigsten in diesem Kapitel nur kurz angesprochen.

Zunächst ist die transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz, kurz „TRALI“, zu nennen. Es liegt ein nicht kardiogenes Lungenödem sowie Hypoxie vor. In den USA zählt TRALI zu den häufigsten transfusionsbedingten Todesursachen und tritt mit einer Inzidenz von 1:5000 Erythrozytentransfusionen auf. Symptome wie Fieber, Hypotonie und Tachykardie mit bilateralen Lungeninfiltraten ohne Volumenüberladung treten innerhalb der ersten 6 Stunden nach der Transfusion auf. Von einer TACO (transfusion associated circulatory overload) ist die TRALI differenzialdiagnostisch abzugrenzen (45).

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik, die oft auf die Grunderkrankung der Patient*innen zurückgeführt wird, wird die TACO häufig übersehen. TACO kann unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung der Patient*innen auftreten. Die Symptome umfassen: akute respiratorische Insuffizienz, Tachykardie, Hypertonie, akutes oder sich verschlechterndes Lungenödem sowie eine positive Flüssigkeitsbilanz. Die Symptome zeigen sich in der Regel auch hier innerhalb der ersten 6 Stunden (46).

Die meisten Fälle von Transfusionen sind mit der FNHTR verbunden – einer febrilen non-hämolytischen Transfusionsreaktion. Die Ursache kann darin liegen, dass transfundierte Patient*innen Antikörper gegen HLA gebildet hat, oder es besteht ein Zusammenhang mit Zytokinen, die sich bei der Lagerung von Blutprodukten angesammelt haben. Im Vordergrund steht hier, dass es innerhalb der ersten 4 Stunden nach der Transfusion zu Fieber kommt. Zusätzliche Symptome sind Schüttelfrost, Zittern, Kopfschmerzen und Übelkeit. Die Therapie erfolgt nur symptomatisch (47).

Zudem kann es im Zusammenhang mit einer Transfusion zu einer allergischen Reaktion kommen. Im milden Verlauf äußert sie sich durch Urtikaria, Hautrötung und leichte Atemnot. Allerdings kann die Reaktion auch zu schwerer Atemnot, Angioödem, Larynxödem, Bronchospasmus, Hypertonie und Tachykardie sowie zum anaphylaktischen Schock führen. Die Ursache kann in der Regel nicht ermittelt werden (48).

Bakterielle oder virale Infektionen können eine weitere Folge von Transfusionen sein. Sie entstehen, wenn eine Bluttransfusion mit kontaminierten Komponenten erfolgt. Innerhalb der ersten 4 Stunden manifestiert sich eine Infektionssymptomatik mit Fieber, Schüttelfrost, Tachykardie und bis hin zum Schock. Diese Reaktion ist nachweisbar durch identische Keimspezies in der Patient*innenblutkultur und den beteiligten Blutkomponenten (48). Bei der Transfusion von Blutkomponenten sind zusätzliche Reaktionen möglich. Erwähnenswert sind zudem die Eisenüberladung sowie die Hyperkaliämie nach der häufigen Verabreichung von Erythrozytenkonzentraten, ebenso wie Reaktionen bei der Anwendung hämolytischer Blutprodukte. Eine nähere Erläuterung im Rahmen dieser Arbeit erfolgt jedoch nicht.

9.4.3 Morbus Hämolyticus Neonatorum

Eine bedeutende Gefahr bei einer Fehltransfusion mit Rhesusinkompatibilität ist der Morbus hämolyticus neonatorum. Die häufigsten Ursachen für diese Erkrankung sind Blutgruppeninkompatibilitäten zwischen Mutter und Kind, die Rhesusunverträglichkeit sowie die ABO-Erythroblastose. Während der Schwangerschaft gelangen kindliche Erythrozyten in den Blutkreislauf der Mutter. Ist die Mutter Rhesus negativ und das Kind Rhesus positiv, reagiert ihr Immunsystem auf die D-Antigene des Kindes und produziert spezifische plazentagängige IgG-Antikörper dagegen. Grundsätzlich geschieht dieser Vorgang während der Geburt: Bei der Plazentalösung tritt eine größere Menge Blut aus dem kindlichen Kreislauf in den der Mutter über. Das erste Kind ist somit nahezu unbetroffen. Bei einer weiteren Schwangerschaft mit der gleichen Rhesusinkompatibilität gelangen die IgG-Antikörper in den kindlichen Kreislauf. In dieser Region kommt es schon früh und in größerem Ausmaß zum Abbau von Erythrozyten des Fetus. Hierauf erfolgt seinerseits eine verstärkte Bildung von Erythrozyten, die unreif freigegeben werden. Das von der Mutter verstoffwechselte und ausgeschiedene Bilirubin führt beim Kind grundsätzlich zu keinen erhöhten Bilirubinwerten (49).

Klinisch zeigt sich eine mehr oder weniger ausgeprägte Anämie des Kindes, ein Ikterus gravis sowie eine Hepatosplenomegalie, die die verstärkte extramedulläre Blutbildung widerspiegelt (49).

Zur Vorbeugung von Morbus hämolyticus neonatorum kann ein Anti-D-Immunglobulin innerhalb von 72 Stunden nach der Geburt verabreicht werden. So lässt sich verhindern, dass die Rhesus-Antigene des Kindes bei der Mutter eine Sensibilisierung hervorrufen (49).

9.5 Limitationen der Studie

Die vorliegende Studie hat einige Einschränkungen. Mit 50 Diskrepanzen Ergebnissen ist zunächst die geringe Anzahl der Teilnehmer und Teilnehmerinnen zu erwähnen. Die Generalisierbarkeit der Ergebnisse dieser Studie kann durch diese kleine Menge beeinflusst werden. Die begrenzte Anzahl ist darauf zurückzuführen, dass Olympus PK7300 mit Neo Iris nur für kurze Zeit gemeinsam zu Validierungszwecken an der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin Graz ersetzt wurde. Änderungen der Testabläufe und der Handhabung der Geräte, die außerhalb des festgelegten Zeitraums vom 06.04.2022 bis 10.01.2024 liegen, werden in dieser Studie nicht beachtet.

Zudem beziehen sich die Ergebnisse dieser Untersuchung ausschließlich auf die Unterschiede zwischen den beiden spezifischen Testgeräten Olympus PK7300 und Neo Iris. Diese Studie ermöglicht keine Übertragung der Ergebnisse auf Testgeräte anderer Hersteller*innen oder andere Testmethoden.

Eine weitere Einschränkung ergibt sich aus dem Design der Studie. Diese Studie ist retrospektiv. Diese Methode gründet sich auf Daten, die erfasst wurden, ehe deren Verwendung in einer Studie bestimmt wurde. Es kann eine Selektionsbasis entstehen und es können relevante Informationen fehlen (50). Dennoch sind die Ergebnisse dieser Studie für die Zukunft der automatisierten Blutgruppentestung von Bedeutung.

9.6 Zukunftsausblick

Die Ergebnisse dieser Studie sind für die zukünftige Entwicklung und Forschungsrichtung der Rhesusdiagnostik von Bedeutung, was im folgenden Kapitel näher erläutert wird. Die ermittelten Unterschiede zwischen den beiden Testmethoden und die daraus resultierenden Abweichungen in den Testergebnissen verdeutlichen, wie wichtig es ist, bestehende Testmethoden mit anderen, insbesondere moderneren Methoden zu überprüfen. Diese Arbeit demonstriert zudem, dass standardisierte Testmethoden einen erheblichen Vorteil bieten. Sie erlauben es, verschiedene Testmethoden und -geräte besser zu vergleichen, um die Ursache von Diskrepanzen genauer untersuchen zu können.

Weiters bestehen hier Unterschiede zwischen den Testergebnissen von spezifisch Olympus PK7300 und Neo Iris. Zukünftige Untersuchungen sollten auf Abweichungen von anderen vergleichbaren Testinstrumenten und -methoden achten. Die Spezifität und Sensitivität automatisierter Diagnosetechniken zur Bestimmung der Rhesusgruppen können letztlich verbessert werden, wenn die Unterschiede zwischen verschiedenen Gerätearten

berücksichtigt werden. Dadurch soll eine möglichst sichere Durchführung transfusionsmedizinischer Maßnahmen gewährleistet und das Risiko sowie die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen, die aus fehlerhaften Blutprodukttests resultieren, verringert werden. Zudem soll die Handhabung und Aufrechterhaltung des Lagerbestands in den Blutbanken verbessert werden.

10 Literaturverzeichnis

1. Metaxas-Bühler M. Blutgruppen und Transfusion: Theorie und Praxis. 2., durchges. Aufl., 1. Nachdr. Bern: Huber; 1995. 440 S. (Laborreihe).
2. Levine P, Stetson RE. Landmark article July 8, 1939. An unusual case of intra-group agglutination. By Philip Levine and Rufus E Stetson. JAMA. 9. März 1984;251(10):1316–7.
3. Landsteiner K, Wiener AS. Studies on an agglutinogen (Rh) in human blood reacting with anti-rhesus sera and with human isoantibodies. J Exp Med. 1941 Sep 30;74(4):309–20.
4. Levine P, Celano MJ, Wallace J, Sanger R. A human “D-like” antibody. Nature. 1963 May 11;198:596–7.
5. Daniels G. Human blood groups. 3rd ed. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons; 2013. 544 p.
6. Bangham J. J. Writing, printing, speaking: Rhesus blood-group genetics and nomenclatures in the mid-twentieth century. Br J Hist Sci. 2014 Jun;47(173 Pt 2):335–61.
7. Flegel WA. Genetik des Rhesus-Blutgruppensystems. Dtsch Ärztebl. Februar 2007;104(10):651-.
8. Eckstein R, Zimmermann R. Immunhämatologie und klinische Transfusionsmedizin: Theorie und Praxis kompakt. 7. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2016. 207 S.
9. Daniels G, Bromilow I. Essential guide to blood groups. Third edition. Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell; 2014.
10. Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. Immunohematology. 2004;20(1):23–36.
11. OMIM® — Online Mendelian Inheritance in Man, Entry No. 111680, RH-D (RHD) [Zugriff am 19. September 2025]. Verfügbar unter: <https://www.omim.org/entry/111680>.
12. OMIM® — Online Mendelian Inheritance in Man, Entry No. 111700, RHCE, updated [Zugriff am 19. September 2025]. Verfügbar unter: <https://www.omim.org/entry/111700>.
13. Wagner FF, Moulds JM, Flegel WA. Genetic mechanisms of Rhesus box variation. Transfusion. 2005 Mar;45(3):338–44.
14. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. Transfus Apher Sci. 2011 Feb;44(1):81–91.
15. Matzhold EM, Polin H, Körmöczi GF, Macher S, Schönbacher M, Wagner T. RHD del28Phe (DMW) encoded by a novel in-frame deletion resulting in reduced D antigen expression. Transfusion (Paris). September 2019;59(9):3033–4.

16. ISBT — International Society of Blood Transfusion. 004 RHD Alleles [Internet]. Amsterdam: ISBT; 31. Juli 2023 [Zugriff am 19. September 2025]. Verfügbar unter: <https://www.isbtweb.org/resource/004rhd.html>.
17. Sandler SG, Chen L, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *Br J Haematol*. 2017 Oct;179(1):10–9.
18. Torreiter PP, Macher S, Matzhold EM, Resch B, Klaritsch P, Körmöczí GF, u. a. Ethical Issues and Management of Fetal Hemolytic Anemia Caused by Anti-Rh17 in a Multipara with Rare –D– Phenotype. *Transfus Med Hemotherapy*. 2021;48(3):183–7.
19. Schulze TJ, Goebel M, Scharberg EA, Bugert P, Janetzko K. Development of anti-G, anti-C and anti-Jk(b) in a 22-year-old mother during her fourth pregnancy. *Transfus Med Hemother*. 2013 Jun;40(3):207–9.
20. Wagner F. Erythrozytentransfusion: prätransfusionelle Diagnostik – Teil 1. *Transfusionsmedizin - Immunhämatol Hämotherapie Immungenetik Zelltherapie*. 26. Mai 2015;5(02):80–101.
21. Österreichische Gesellschaft für Blutgruppenserologie, Transfusionsmedizin, Regenerative Medizin und Immungenetik (ÖGBT). ÖGBT-Standards Klinische Hämotherapie: Der klinische Transfusionsprozess [Internet]. Wien: ÖGBT; 2019 [zitiert am 10. Apr. 2025]. Verfügbar unter: <https://oegbt.clubdesk.com/clubdesk/fileservlet?id=1000133&s=djEtXXUzJ3TgiOcjA-uA39QyqJlmt4FeqyVAWnnIIE9AQ=>.
22. Kaiser U. *Transfusionsmedizin für Technische Assistenten: für Ausbildung, Prüfung und Praxis*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. 224 S.
23. Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Herausgeber. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 4., überarb. und erw. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer; 2010. 624 S.
24. Li HY, Guo K. Blood group testing. *Front Med*. 2022 Feb 11;9:827619.
25. Diagnostic Grifols SA. *Blood Grouping Reagent DG Gel 8 A/B/D – Instructions for Use*. Parets del Vallès (Barcelona): Diagnostic Grifols SA; 2013. 8 p.
26. Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus* [Internet]. 2007 [cited 2024 Dec 12]. Available from: <https://doi.org/10.2450/2007.0047-07>
27. Devanaboyina SC, Lynch SM, Ober RJ, Ram S, Kim D, Puig-Canto A, u. a. The effect of pH dependence of antibody-antigen interactions on subcellular trafficking dynamics. *mAbs*. 2013;5(6):851–9.
28. Yokoi T, Iwasa M, Sagisaka K. Rh0(D) activity of red blood cells and stroma treated with proteolytic enzymes. *Tohoku J Exp Med*. Mai 1984;143(1):99–105.

29. BAG Diagnostics GmbH. Real-Time PCR in der Diagnostik [Internet]. Lich (Germany): BAG Diagnostics GmbH; c2025 [zitiert 2025 Sep 24]. Verfügbar unter: https://www.bag-diagnostics.com/de/technologie_pcr.html.
30. Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*. 2022 Dec 16;13(12):2387. doi:10.3390/genes13122387.
31. Müller TH, Hallensleben M, Schunter F, Blasczyk R. Molekulargenetische Blutgruppendiagnostik: Grundlagen und klinische Anwendungen. *Dtsch Arztebl Int*. 2001;98(6):A-317-.
32. Hyland CA, O'Brien H, Flower RL, Gardener GJ. Non-invasive prenatal testing for management of haemolytic disease of the fetus and newborn induced by maternal alloimmunisation. *Transfus Apher Sci*. 2020 Oct;59(5):102947.
33. Delamaire M. Automatisation au laboratoire d'immunohématologie érythrocytaire. *Transfus Clin Biol*. 2005 Jun;12(2):163–8.
34. Beckman Coulter Inc. PK7300 Pre-Transfusion Blood Testing System. User's Guide. Brea (CA): Beckman Coulter Inc; 2013.
35. Immucor, Inc. NEO Iris - Bedienungsanleitung. Version EU, Juni 2017.
36. Immucor, Inc. Capture Broschüre Deutsch [Internet]. 2020 [cited 2025 Apr 2]. Verfügbar unter: <https://view.highspot.com/viewer/61b0b1368b7e3f8a453988da>.
37. Immucor, Inc. Capture Brochure [Internet]. 2014 [cited 2025 Apr 2]. Verfügbar unter: https://immdocs.immucor.com/en-us/Products/Documents/Immucor_Capture-Brochure_US_Web.pdf.
38. Immucor, Inc. Monograph: Education Guide – Antibody Detection Test [Internet]. 2021 [cited 2025 Apr 2]. Verfügbar unter: <https://view.highspot.com/viewer/62d06ebb5991e76471a6184b>.
39. European Union. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU. *Off J Eur Union*. 2017 May 5;L117:176–332.
40. Pittiglio DH. *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*. 1st ed. Philadelphia: F. A. Davis Company; 2018.
41. Brar RK, Shaiji PS, Sehgal S. Testing for weak D Antigen: Spectrum and its applied role in rhesus-negative transfusions in Andaman and Nicobar Islands. *Tzu Chi Med J*. 2020;32(2):167–70.
42. Bundesärztekammer. Richtlinie Hämotherapie: Gesamtnovelle 2017, umschriebene Fortschreibung 2021 [Internet]. Berlin: Bundesärztekammer; 2021 [zitiert am 10. Apr. 2025]. Verfügbar unter: https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/_old-files/downloads/pdf-Ordner/RL/RiliH_Lese.pdf.

43. Strobel E. Hemolytic Transfusion Reactions. *Transfus Med Hemotherapy*. 2008;35(5):346–53.
44. Delaney M, Wendel S, Bercovitz RS, Cid J, Cohn C, Dunbar NM, et al. Transfusion reactions: prevention, diagnosis, and treatment. *Lancet*. 2016 Dec;388(10061):2825–36.
45. Cho MS, Modi P, Sharma S. Transfusion-Related Acute Lung Injury. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Mar 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507846/>
46. Agnihotri N, Agnihotri A. Transfusion associated circulatory overload. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med*. Juni 2014;18(6):396–8.
47. Wang H, Ren D, Sun H, Liu J. Research progress on febrile non-hemolytic transfusion reaction: a narrative review. *Ann Transl Med*. Dezember 2022;10(24):1401.
48. Singbartl G, Walther-Wenke G, Herausgeber. *Transfusionspraxis*. 2., überarbeitete Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2014. 274 S.
49. Hoffmann GF, Lentze MJ, Spranger JW, Zepp F, Berner R. *Pädiatrie: Grundlagen und Praxis*. 5th ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2020.
50. Talari K, Goyal M. Retrospective studies - utility and caveats. *J R Coll Physicians Edinb*. Dezember 2020;50(4):398–402.

Zur sprachlichen Optimierung des Textes wurde folgendes Tool verwendet:

- ChatGPT (Version ChatGPT-4o)
- OpenAI, L.L.C.
- April 2025
- <https://chatgpt.com>

Zur sprachlichen Optimierung des Textes wurde folgendes Tool verwendet:

- Quillbot (Version aktuelle Webversion 04/2025)
- Quillbot, Inc.
- April 2025
- <https://quillbot.com>

11 Anhang

11.1 Ethikvotum



Ethikkommission
der Medizinischen
Universität Graz

Neue Stiftingtalstraße 6 West, Eingang Q
A-8010 Graz
ethikkommission@medunigraz.at
<https://ecs2.medunigraz.at>

Votum

EK Nr: 1003/2024

Projekttitle: Diskrepanz in der Rhesusdiagnostik - Ein Methodenvergleich zwischen Neo Iris und Olympus PK7300

Antragsteller/in: Herr Hugo Borstner

Institution: Medizinische Universität Graz

Sponsor: Medizinische Universität Graz

Art des Projektes:

- **Retrospektive Datenauswertung**
- **Diplomarbeit**

Teilnehmende Prüfzentren:

Ethik-Kommission	Prüfzentrum	Prüfärztin/arzt
Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz	Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin	Herr Ao.Univ.-Prof. Mag. Thomas Wagner Dr.med.univ. MA

Die Stellungnahme der Ethik-Kommission erfolgt aufgrund folgender eingereicherter Unterlagen:

Conflict of Interest

Name	Version	Datum
Interessenskonflikt	--	28.03.2024

Sonstige

Name	Version	Datum
Anschreiben für die Einreichung des Projektes	--	26.03.2024



Studienprotokoll (Prüfplan)

Name	Version	Datum
Studienprotokoll	1.0	22.03.2024

Unterschriftenseite

Name	Version	Datum
Ethikantrag inkl. Unterschrift	--	18.04.2024

Die Kommission fasst folgenden Beschluss (mit X markiert):

<input checked="" type="checkbox"/>	Es besteht kein Einwand gegen die Durchführung der Studie.
-------------------------------------	------------------------------------------------------------

Die aktuelle Mitgliederliste der Ethik-Kommission ist unter folgender Adresse abrufbar:

<https://ecs2.medunigraz.at>

Mitglieder der Ethik-Kommission, die für diesen Tagesordnungspunkt als befangen anzusehen waren und daher laut Geschäftsordnung an der Entscheidungsfindung/Abstimmung nicht teilgenommen haben: Herr ao. Univ.-Prof. Mag. Dr.med. Thomas Wagner

Dieses Dokument ist für berechnigte Benutzer/innen in digitaler Form unter folgender Adresse abrufbar:

<https://ecs2.medunigraz.at/vote/6/download/>

