

Aus dem Institut für Homöostaseologie und  
Transfusionsmedizin der Philipps-Universität Marburg  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. V. Kretschmer

# **Festphasentechnik versus Gelzentrifugation**

**Zum Nachweis erythrozytärer Antikörper –  
Eine prospektive Studie zum Vergleich zweier  
Antikörpersuchtests**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Medizin dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Sebastian Thiele**

aus Darmstadt

**Marburg 2003**

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-  
Universität Marburg am 06.03.2003

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan Prof. Dr. B. Maisch  
Referent Prof. Dr. V. Kretschmer  
Correferent PD Dr. Schwella

## Gliederung

1	Einleitung	4
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.2	Methoden	15
2.2.1	ID-Microtyping-System®	15
2.2.2	Capture-R-Test®	19
2.3	Studiendesign	24
2.4	Auswertung	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Antikörpernachweis	28
3.2	Testsensitivität und -spezifität	30
3.3	Antikörpertiter	33
3.4	Reaktionen im Eigenansatz	34
4	Diskussion	36
5	Zusammenfassung	44
6	Tabellenanhang	46
7	Literaturliste	52

## 1 Einleitung

Als Blutgruppen werden diejenigen antigenen Determinanten von Erythrozyten, aber auch von Leukozyten und Thrombozyten bezeichnet, die nach Übertragung auf ein allogenetisches Individuum eine Immunantwort induzieren können, da sie in verschiedenen Allelen vorliegen. Die Funktionen, die Genetik und die Biochemie der Blutgruppenantigene konnte in den letzten Jahren zunehmend aufgeklärt werden [1,2,3].

Die Geschichte der Entdeckung der Blutgruppen ist eng mit dem Namen Landsteiner (1868-1943) verknüpft. Gemeinsam mit seinen Mitarbeitern entdeckte er 1901/1902 das ABO-System [3,5], eine Leistung für die er 1930 mit dem Nobel-Preis ausgezeichnet wurde. 1927 berichtete Landsteiner über zwei weitere Blutgruppensysteme, MN und P. Erst 12 Jahre später folgte die Entdeckung des nach dem ABO-System wichtigsten Blutgruppensystems, des Rhesus-Systems, durch Levine und Stetson. Nach der Einführung der Antiglobulintechnik durch Coombs, Mourant und Race im Jahre 1945 wurden in rascher Folge über 600 weitere Blutgruppenmerkmale auf Erythrozyten gefunden [3].

Das nach wie vor wichtigste Blutgruppensystem ist das ABO-System. Je nach Vorhandensein der Merkmale A und B auf den Erythrozytenmembranen unterscheidet man die Gruppen A, B, AB und O, wobei O das Fehlen beider Merkmale anzeigt. Das ABO-System ist dadurch ausgezeichnet, dass im Serum eines Menschen stets Antikörper gegen diejenigen Merkmale vorkommen, die das Individuum selbst nicht besitzt. Diese regulär vorkommenden Antikörper des ABO-Systems werden Isoagglutinine oder auch "natürliche" Antikörper genannt. Sie gehören vorwiegend zur Klasse der IgM Immunglobuline.

Antikörper gegen die Merkmale der meisten anderen Blutgruppensysteme treten überwiegend erst nach einem entsprechenden Antigenkontakt im Rahmen von Schwangerschaft oder Transfusion auf. Sie werden deswegen im klinischen Sprachgebrauch als "irreguläre" Antikörper bezeichnet [1,2,3]. Diese Antikörper können zur Klasse der IgM und IgG Immunglobuline gehören.

Präformierte erythrozytäre Antikörper können bei Blutgruppen-inkompatiblen Transfusionen eine Hämolyse der infundierten Erythrozyten hervorrufen. Diese kann als intravasale oder extravasale Hämolyse stattfinden.

Die intravasale Hämolyse erfolgt über die Aktivierung des Komplementsystems, die bis zur Generierung von C5a und des C5b-9 Komplexen führt. Die extravasale Hämolyse erfolgt unter Beteiligung zellulärer Komponenten (z.B. Makrophagen, K-Zellen) und findet intralial und/oder intrahepatisch statt [4].

Die hämolytische Transfusionsreaktion wird durch die Reaktion eines Alloantikörpers mit dem entsprechenden Erythrozytenantigen initiiert. Infolge der Bildung von Immunkomplexen kommt es dann zur Aktivierung verschiedener Plasmaenzymssysteme (Kinin-, Komplement-, Hämostasesystem). Diese wiederum sind verantwortlich für die Ausbildung des systemischen Krankheitsbildes der hämolytischen Transfusionsreaktion, das Schock, Nierenversagen und Verbrauchskoagulopathie einschließen kann [4].

Eine ABO-Unverträglichkeitsreaktion verläuft meist als fulminante Sofortreaktion. Rhesus- und andere Antigen-unverträglichkeiten führen zu unterschiedlich stark ausgeprägten Hämolysen bzw. Transfusionsreaktionen.

Um solche potentiell lebensbedrohlichen Transfusionsreaktionen durch Blutgruppenunverträglichkeit zu vermei-

den, ist es stets notwendig, neben der ABO-Austestung auch einen Suchtest auf irreguläre erythrozytäre Antikörper beim Empfänger durchzuführen. So können gegebenenfalls Antikörper nachgewiesen und anschließend nach ihrer Zugehörigkeit in ein Blutgruppensystem differenziert werden. Mit diesen Informationen ist dann die Bereitstellung kompatibler Blutkonserven möglich.

Ein optimaler Antikörpersuchtest sollte einfach und schnell durchführbar sein und alle klinisch relevanten Antikörper sicher nachweisen, jedoch geringe Empfindlichkeit gegenüber irrelevanten Antikörpern oder unspezifischen Faktoren zeigen. Außerdem sollten die Testergebnisse unabhängig vom Untersucher gut reproduzierbar und stabil sein, so dass eine Zweitablesung zu einem späteren Zeitpunkt noch möglich ist. Zudem sollte der Testablauf automatisierbar sein.

Die Arbeitstechniken in der Erythrozytenserologie greifen im wesentlichen auf den Antiglobulintest nach Coombs und die Hämagglutination zurück [3,6].

Der Antihumanglobulintest nach Coombs ist ein Test, in dem mittels eines Antikörpers gegen humanes Immunglobulin eine Beladung von Erythrozyten mit Immunglobulinen (z.B. irreguläre erythrozytäre Antikörper) und/oder Komplementfaktoren nachgewiesen werden kann. Erfolgt die Beladung der Erythrozyten in vivo, so weist man dies im "direkten" Antiglobulintest nach. Als "indirekter" Antiglobulintest wird die Reaktion bezeichnet, in der die Beladung der Erythrozyten mit Antikörpern in vitro stattfindet. Diese Methode wird in Antikörpersuchtests verwendet. Dazu werden Erythrozyten, die bestimmte Antigene auf ihrer Oberfläche tragen, mit Antikörpern gegen diese Antigene beladen ("sensibilisiert"). Durch einen Waschvorgang werden danach alle nicht spezifisch gebundenen Antikörper aus dem Reaktionsansatz entfernt, ohne spezi-

fisch gebundene Antikörper von den Erythrozyten wieder abzusprengen (zu eluieren). Im nächsten Schritt wird zu den gewaschenen, antikörpertragenden Zellen ein Antihumanglobulin (z.B. Anti-IgG, -IgM, -C3d) hinzugefügt, welches durch Brückenbildung eine sichtbare Agglutination der sensibilisierten Erythrozyten herbeiführt.

Die Hämagglutination ist eine sichtbare Verklumpung von Erythrozyten durch spezifische Antikörper. Nach ihrer Fähigkeit, mit oder ohne Hilfe eines Supplements (z.B. Albumin) eine erkennbare Agglutination zu bewirken, werden "inkomplette" und "komplette" agglutinierende Antikörper unterschieden. Sie können ihr Reaktionsoptimum in der "Wärme" (37 °C) oder "Kälte" (4 - 20 °C) haben. "Komplette" Antikörper sind solche, die in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Erythrozyten agglutinieren. Sie gehören überwiegend der Klasse der IgM-Globuline an. Inkomplette Antikörper benötigen für die Agglutination von Erythrozyten den Zusatz von Supplement (Albumin, Dextran, Serum) oder von proteolytischen Enzymen (Papain, Bromelin, Trypsin) [7,8,9].

Eine Möglichkeit, die Sensitivität der Nachweismethode weiter zu erhöhen, ist die Aufschwemmung der Erythrozyten in einer Kochsalzlösung mit erniedrigter Ionenstärke (Low-Ionic Strength Salt Solution = LISS) [10].

Alle bislang vorhandenen Tests basieren auf dem Nachweis der irregulären Antikörper und/oder der damit verbundenen Komplementbeladung über eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion. Als Antigene werden in der Praxis zwei oder mehr unterschiedliche Erythrozytenpopulationen kombiniert, die hinsichtlich ihres bekannten Antigenmusters so ausgewählt werden, dass sie in Kombination die Merkmale aller klinisch relevanten Blutgruppensysteme aufweisen. Bei der Herstellung dieser Test-

zellsuspensionen ist nicht nur die Auswahl der Blutgruppenmerkmale wichtig, sondern auch die Konzentration der auf den Erythrozyten exprimierten Antigene. Höhere Konzentrationen von Antigenen können durch die Verwendung homozygoter Zellen erreicht werden. Die Größe der entstehenden Agglutinate und damit deren Nachweisbarkeit hängt von dem Konzentrationsverhältnis von Antigen und Antikörper ab, das optimal im Äquivalenzbereich der Heidelberger Kurve liegen sollte [11]. Der Nachweis dieser Antigen-Antikörperkomplexe erfolgt unterschiedlich in den einzelnen Testverfahren.

Der indirekte Coombstest war als Röhrchentest viele Jahre die Standardmethode zum Nachweis von irregulären erythrozytären Antikörpern. Dabei werden Testzellen mit Probandenserum in einem Glasröhrchen gemeinsam inkubiert und anschließend gewaschen. Nach Zusatz von Antihumanglobulin wird die Suspension noch mal inkubiert. Liegen im Probandenserum Antikörper gegen die auf den Testerythrozyten angebotenen Antigene vor, so kommt es nach einer weiteren Zentrifugation zur sichtbaren Agglutination.

In den achtziger Jahren wurde der sogenannte Säulenagglutinationstest entwickelt. Bei diesem Verfahren werden Suchzellen und Probandenserum in eine Kammer über einer kapillaren Säule pipettiert und dort ggf. mit weiteren Zusätzen (z.B. Enzymzusatz) inkubiert. Die Säule besteht je nach Hersteller aus einem Gel, das im Falle des Coombstestes mit Antihumanglobulinserum getränkt ist. Der in dieser Studie eingesetzte Säulenagglutinationstest (ID-Microtyping-System®, Firma DiaMed AG, Schweiz) verwendet ein Sephadex-Gel (Abb. 1).



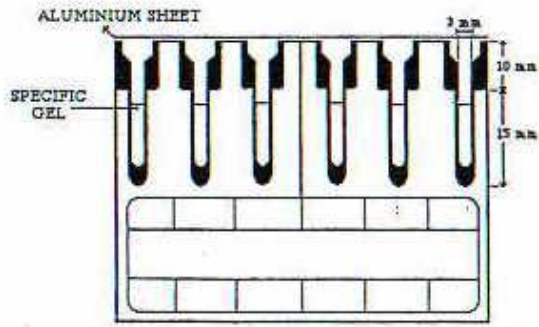


Abb. 1. Testkarte ID-Microtypingsystem

Kommt es zu einer Antigen/Antikörperreaktion mit Agglutination, verfangen sich die entstandenen Agglutinate während der anschließenden Zentrifugation sichtbar im Trennmedium der Säule. Werden zwar Antikörper und/oder Komplementfaktoren spezifisch gebunden, ohne eine Agglutination auszulösen (inkomplette Antikörper), entstehen die Agglutinate während der Passage durch das mit Antihumanglobulinserum durchtränkte Gel im Rahmen der Zentrifugation. Nicht agglutinierte Erythrozyten ohne Beladung mit erythrozytären Antikörpern und/oder Komplement wandern während der Zentrifugation ungehindert zum Boden der konischen Kapillaren. Sie bilden dort einen kompakten Erythrozytenknopf. Sie bilden dort einen kompakten Erythrozytenknopf. Schon wenige kleine Agglutinate können nachgewiesen (Abb. 2). Das Testergebnis im Säulenagglutinationstest ist gut ablesbar und bleibt über einen längeren Zeitraum stabil, so dass eine Zweitablesung nach Stunden noch möglich ist.

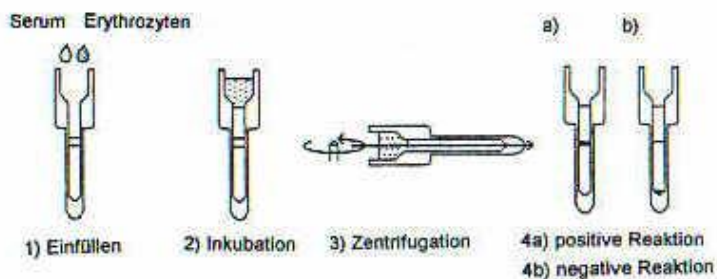


Abb. 2. Testprinzip Gelzentrifugation

Ein weiteres neues Testverfahren beruht auf dem Prinzip des Festphasen-Immuno-Assay (hier: Capture-R-Screening-Test, Firma Immucor™ Incorp., USA): antigenträgende Erythrozytenmembranen werden chemisch als erythrozytärer Monolayer in den konvexen Vertiefungen einer Mikrotiterplatte fixiert und dort in Kontakt mit Probandenserum gebracht. Während der Inkubation werden eventuell vorhandene Antikörper an die korrespondierenden Erythrozytenantigene gebunden. Das übrige Serum mit allen ungebundenen Antikörpern wird dann im folgenden Waschschrift entfernt. Die IgG-Antikörper-Antigen-Komplexe werden durch eine zweite Immunreaktion mit Indikatorerythrozyten, die mit Antikörpern gegen humanes IgG beladen sind, nachgewiesen: Sind Antikörper aus dem Probandenserum an die Erythrozyten des Monolayers gebunden, lagern sich die Indikatorzellen an diese Antikörper an. Nach Zentrifugation bildet sich ein rosafarbener erythrozytärer Zellrasen aus Indikatorerythrozyten, der sich mehr oder weniger gleichmäßig über den gesamten Boden der jeweiligen Konkavität verteilt.

Ist das Probandenserum frei von erythrozytären Antikörpern der Immunglobulinklasse G, so binden die Indikatorzellen nicht an die Zellen des Monolayers und sammeln sich bei der Zentrifugation in die Mitte der konkaven Vertiefung. Sie bilden dort einen kompakten Erythrozytenknopf (Abb. 3).

Der Capture-R-Test ist in zwei Varianten erhältlich: Im Test der 1. Generation sind die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte chemisch so präpariert, daß der Anwender vor jeder Testung einen erythrozytären Monolayer aus Suchzellen oder Patientenerythrozyten zum Eigenansatz selbst herstellt. Im Test der 2. Generation sind die Erythrozyten zweier Suchzellpopulationen bereits in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte fixiert und durch ein spezielles chemisches Verfahren entfernt (sog. "Ghosts").

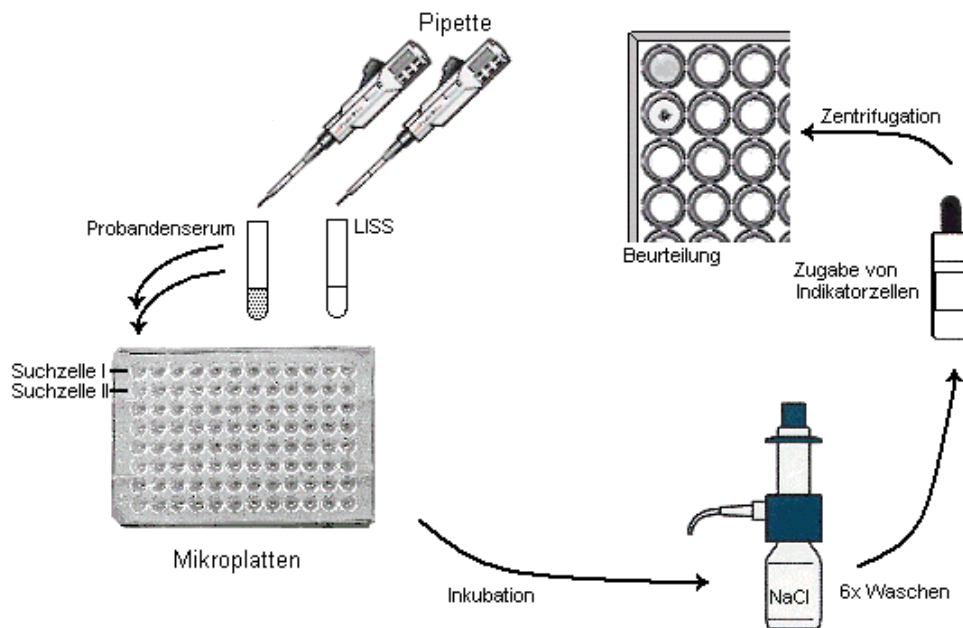


Abb. 3. Testprinzip Festphasentest

Dadurch entfällt die leicht rötliche Grundverfärbung die eine schlechtere Diskrimination gegenüber den Indikatorzellen erlaubt. Der Vorteil des Capture-R-Test begründet sich auf seiner guten Ablesbarkeit und vor allem auf seiner guten Automatisierbarkeit, da er Mikrotiterplatten verwendet [12,13].

Jede neue Testmethode muss vor ihrer Einführung im Vergleich zu den bisher verwendeten Methoden evaluiert werden. Für die Durchführung solcher Untersuchungen und die Interpretation der Ergebnisse sind einige grundsätzliche Vorüberlegungen notwendig.

Die Nachweisreaktion erfolgt in allen Testverfahren, die auf den indirekten Coombstest zurückgreifen, prinzipiell in zwei Stufen. In einem ersten Schritt findet eine Antikörper-Antigen-Bindungsreaktion statt, die in einem zweiten Schritt durch eine Agglutinationsreaktion sichtbar gemacht wird. Der erste Schritt, also die Reaktion zwischen Antikörper und Antigen, ist abhängig von Temperatur und Milieu. Vor allem aber ist sie abhängig vom Vorhandensein eines Antikörpers im Serum in ausreichender Konzentration gegen ein spezifisches Antigen auf der Testzellmembran. Wenn das spezifische Antigen nicht auf der

Erythrozytenmembran angeboten wird, kann der entsprechende Antikörper nicht nachgewiesen werden. Da bei wechselnden Chargen innerhalb desselben Testverfahrens die eingesetzten Erythrozytenpools variieren, bestehen auch innerhalb eines Testverfahrens zwischen den einzelnen Chargen oft Unterschiede bezüglich des Antigenmusters und damit prinzipiell auch des Nachweisspektrums für Antikörper. Will man spezifisch verschiedene Methoden vergleichen, so ist zu fordern, dass in allen untersuchten Testverfahren die gleichen Suchzellpopulationen eingesetzt werden, um Unterschiede, die auf Abweichungen im Antigenmuster beruhen, auszuschalten.

Durch Einfrieren und Auftauen von Serum können pH-Veränderungen auftreten, die die Reaktivität der Antikörper beeinträchtigen und die Ergebnisse verfälschen können. Um Reaktionsunterschiede durch potentielle Lagerungsschäden zu vermeiden, sollten die Proben möglichst frisch und vor allem immer gleichzeitig in allen Vergleichsmethoden bearbeitet werden.

Derzeit existiert keine anerkannte Referenzmethode, mit deren Hilfe alle irregulären erythrozytären Antikörper zuverlässig nachgewiesen werden können. Daher ist es nicht möglich, eine Wertung aus vergleichenden Versuchen herzuleiten, die mit Proben durchgeführt wurden, welche mit nur einem Testverfahren vorselektiert wurden. Dieses Verfahren wäre immer im Vorteil. Es könnten Proben mit Antikörpern unberücksichtigt bleiben, die in einer der Vergleichsmethoden erkannt worden wären, nicht aber im selektierenden Suchverfahren erfasst wurden. Daher muss eine Vergleichsstudie an einem ausreichend großen, nicht vorselektierterem Kollektiv anhand von Paralleluntersuchungen vorgenommen werden.

Die gegenüber dem Röhrentest höhere Sensitivität des Sülagenagglutinationstests im Nachweis irregulärer erythrozytärer Antikörper wurde in mehreren Studien [6, 14,15,16,17,18] gut belegt. Dies wurde dadurch erleichtert, dass in beiden Verfahren die Suchzellen als Suspension eingesetzt werden. Somit konnten unproblematisch identische Erythrozytenpopulationen gleichzeitig in beiden Tests eingesetzt werden.

Da die Testerythrozyten, die im vorgefertigten Capture-R-Test als Monolayer eingearbeitet sind, jedoch nicht als Suspension zur Verfügung stehen, konnte die Forderung nach Verwendung von identischen Suchzellpopulationen in allen Vergleichsmethoden bisher nicht erfüllt werden. Dies schränkt die Aussagekraft bisher vorgelegter Studien [19,20,21,22,23,24,25] stark ein.

Zusätzlich weisen einige Studien weitere methodische Fehler auf, wie die Verwendung von eingefrorenen Seren [19,20,21,22,23,24] oder von selektierten Proben [18,20, 23,26].

Damit lag zu Beginn dieser Studie keine valide Aussage über die Wertigkeit des Festphasentests im Vergleich zum Gelzentrifugationstest vor.

In der hier vorgelegten Studie wurden identische Zellpopulationen als fixierte Membranen im Festphasentest und als Suspension im Sülagenagglutinationstest verwendet. Außerdem wurden frische und unselektierte Proben in einer prospektiven Studie verarbeitet. Damit sind erstmals alle Bedingungen für einen objektiven Vergleich der beiden Methoden hinsichtlich Spezifität und Sensitivität erfüllt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Blutproben: Untersucht wurden 3052 unselektierte Patientenserien aus der Routinediagnostik des Instituts für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Philipps-Universität Marburg, die im Untersuchungszeitraum (Oktober 1994 - Juni 1995) zur Blutgruppenbestimmung, der Kompatibilitätstestung (Kreuzprobe), zur Kontrolle der Rhesus-Prophylaxe bei rhesusnegativen Schwangeren und zum Ausschluß von weiteren Antikörpern bei positivem Antikörperstatus eingeschickt wurden.

Das Institut für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie der Philipps-Universität ist entsprechend den Marburger Klinikstandorten in zwei Bereiche aufgeteilt. Dementsprechend wurden 2008 Seren am Standort Lahnberge (Medizinische Kliniken, Orthopädie, Chirurgie, Urologie) untersucht und 1044 Seren am Standort Lahntal (Kinderklinik, Frauenklinik, HNO-Klinik, Hautklinik). So wurde ein breites Spektrum an Patienten erfasst.

Um zu gewährleisten, dass die Patientenkollektive entsprechend ihrem regulären Aufkommen Eingang in die Studie fanden, wurden an jedem Untersuchungstag jeweils alle an einem der beiden Standorte eintreffenden Seren im Rahmen der Studie untersucht. Damit wurden Verfälschungen durch Selektion vermieden.

Testmaterial/Reagenzien: Verwendet wurden der Gel-Test (ID) der Firma DiaMed AG, Cressiers/Morat, Schweiz und als Festphasen-Immuno-Assay der Capture-R-Screening-Test (CR) der Firma Immucor™ Incorp., Norcross, USA.

Als Testzellen wurden gleichzeitig in beiden Verfahren die jeweils aktuellen Chargen an Erythrozytenpopulationen der Fa. Immucor™ Incorp. eingesetzt. Die im Festphasentest als vorgefertigter Monolayer eingearbeiteten Zellen wurden von der Fa. Immucor™ Incorp. für diese Studie zusätzlich als Suspension bereitgestellt. Somit konnten Reaktionsunterschiede durch unterschiedliche Antigenmuster und -konzentration in den Testverfahren ausgeschlossen werden.

## **2.2 Methoden**

Das Nativblut der Patienten wurde 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abgehoben und bis zur Aufarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Bearbeitung erfolgte stets innerhalb von 24 Stunden nach Eintreffen der Proben im Institut für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie. Vor ihrer Verwendung wurden alle Reagenzien und Materialien auf Raumtemperatur erwärmt.

Die Untersuchungen wurden aus identischem Probenmaterial zeitgleich in beiden Testsystemen durchgeführt. Die Bearbeitung der Seren erfolgte unabhängig von der üblichen Klinikdiagnostik und wurde in allen Fällen von mir durchgeführt.

### **2.2.1 ID-Microtyping-System®**

Testaufbau: In einer Plastikkarte sind sechs schlanke Röhrchen eingearbeitet, die mit einem Sephadex-Gel gefüllt sind. Über jeder Gel-Säule befindet sich eine Kammer zur Aufnahme der Reagentien und des Untersuchungsmaterials. Das Gel liegt als "Neutralgel" und als antihumanglobulinhaltiges "Coombsgel" vor.

Jedes Serum wurde gegen zwei Testzellpopulationen und im Eigenansatz (Patientenserum gegen Patientenerythrozyten) sowohl im indirekten Coombs-Test (ID-L) als auch im Enzymtest (ID-E) untersucht.

Als Suchzellen wurden die Erythrozytenpopulationen (Screen-Panel® I + II; ImmuCor™; Norcross, GA; USA) verwendet, die im jeweils parallel eingesetzten Capture-R-Screening-Test® von Seiten des Herstellers als lineare "Membranghosts" eingearbeitet waren. Die Testerythrozyten wurden zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit LISS (ID-Diluent 2, DiaMed Diagnostika, Bensheim, Deutschland) zu einer 3%igen Suspension aufgeschwemmt. Für den Eigenansatz wurden Patientenerythrozyten dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend ebenfalls mit LISS zu einer 3%igen Suspension aufgeschwemmt.

ID-L: In jede "Coombsgel"-Kammer wurden je 50  $\mu$ l der 3%igen Erythrozytensuspension (Suchzellen und Eigenansatz) und 25  $\mu$ l Patientenserum gegeben (Abb. 4).

ID-E: In die Kammern über dem "Neutralgel" wurden je 50  $\mu$ l der 3%igen Erythrozytensuspension, 25  $\mu$ l Patientenserum und 25  $\mu$ l Bromelin-Lösung pipettiert.

Beide Ansätze wurden 20 Minuten im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert (Abb. 5) und anschließend 10 Minuten in der Spezialzentrifuge (DiaMed Diagnostika) bei 900 U/min zentrifugiert (Abb. 6).

Nach der Zentrifugation wurden die Gelkarten von beiden Kartenseiten gegen eine Lichtquelle abgelesen. Die Testergebnisse wurden nach einer Skala von "0" - "4" eingestuft und dokumentiert.



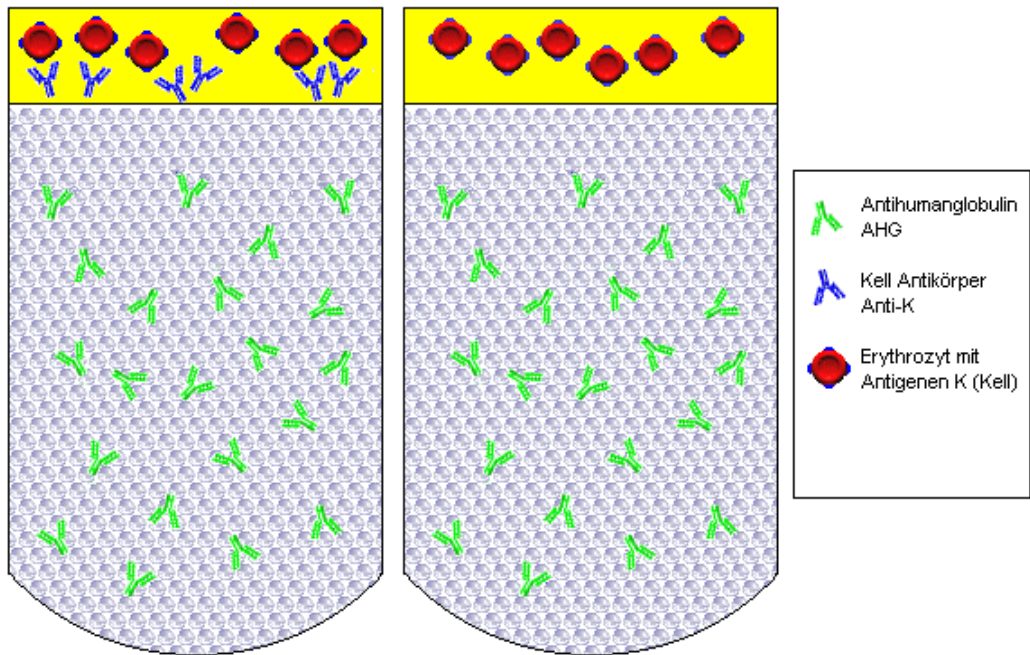


Abb. 4. Ansatz für Geltest mit antikörperhaltigem Probandenserum (links) und antikörperfreiem Probandenserum (rechts). Hier im Beispiel "Anti-Kell"

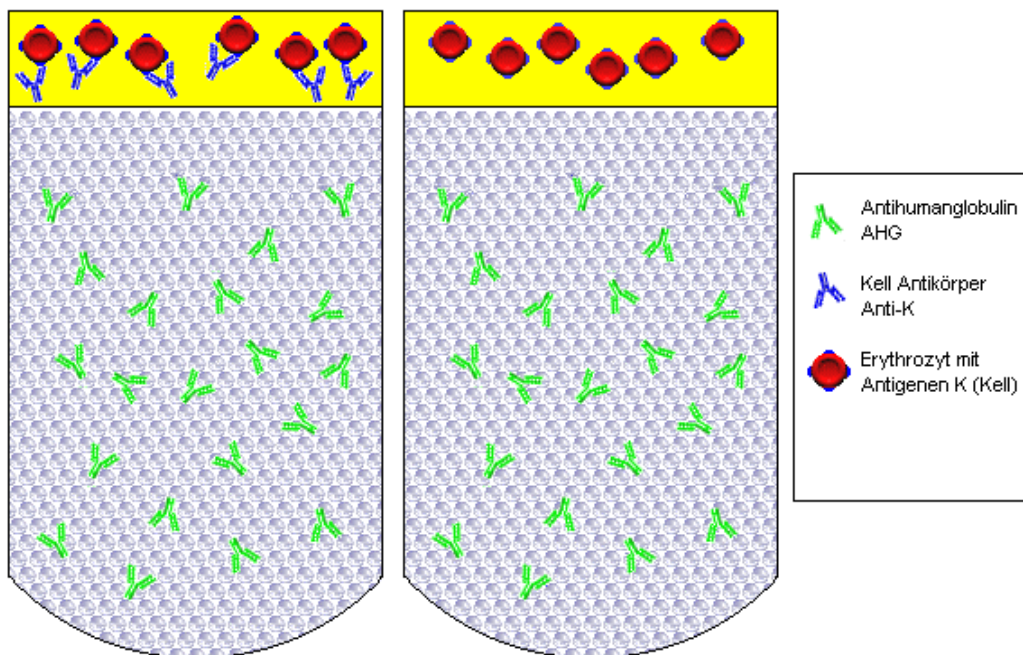


Abb. 5. Antikörperbindung nach Inkubation

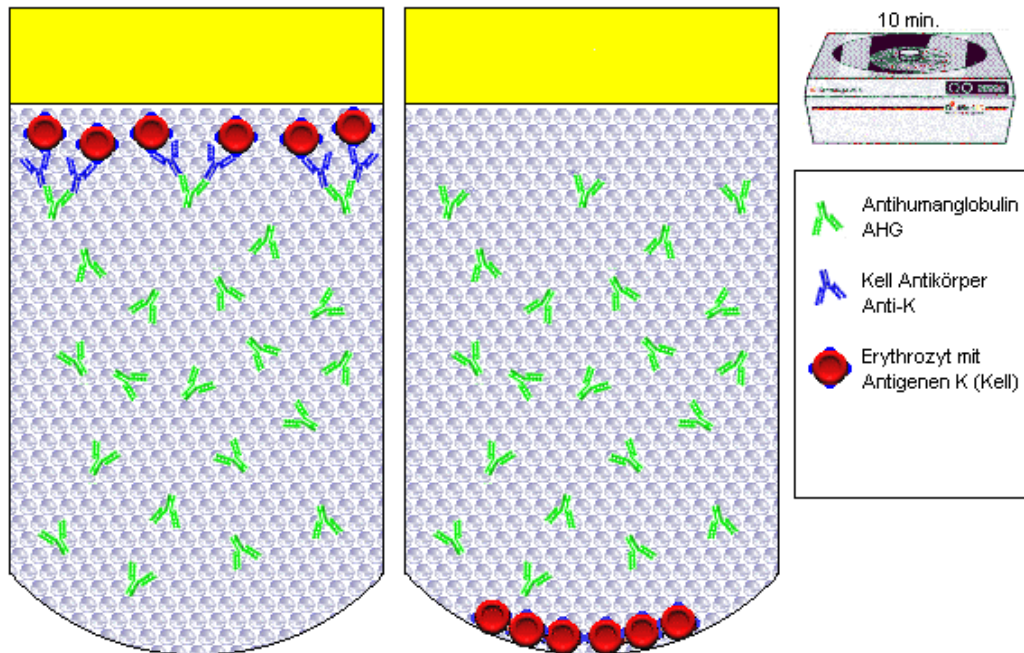


Abb. 6. Testergebnis nach Zentrifugation (links positiv, rechts negativ)

Die Reaktionsstärken wurden in Anlehnung an den Vorschlag Lapierres [15] definiert. Die von Lapierre klassifizierte Reaktionsstufe "5" wurde ebenfalls als "4" gewertet (Abb. 7).

Reaktionsstufen Geltest:

negativer Test:

"0": Alle Erythrozyten bilden am Boden der Gel-Säule einen Knopf, die Säule ist frei von Agglutinat.

positiver Test:

"1": Über dem Erythrozytenknopf sind Agglutinate sichtbar, die in ihrer Ausdehnung nur über maximal ein Viertel der Säule reichen.

"2": Die Agglutinate sind über die ganze Höhe der Gel-Säule verteilt, ihre Menge nimmt nach basal zu, am Boden der Säule findet sich noch ein kleiner Knopf.

"3": Es liegt kein basaler Erythrozytenknopf vor, die Dichte der Agglutinate nimmt von der Spitze der Gel-Säule zur Basis hin ab.

"4": Alle Erythrozyten liegen im oberen Bereich der Säule und dringen kaum in das Gel ein.

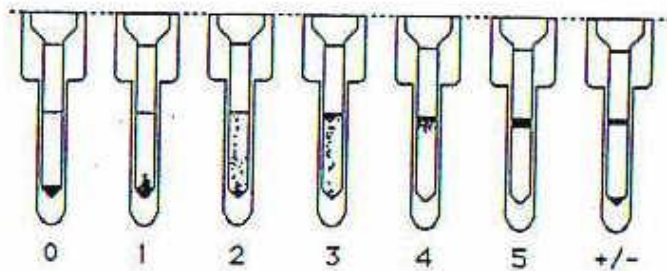


Abb. 7.[14] Reaktionsstärken im Geltest

Darstellung der im Gel gefangenen Agglutinate. Negative Reaktion und Artefakt (+/-) sind Reaktionen (1 – 5) zu unterscheiden

### 2.2.2 Capture-R-Test®

Zur Durchführung des Capture-R-Tests (CR) wurden im Test der 2. Generation je 50  $\mu$ l eines Probandenserums mit 100  $\mu$ l LISS einmal zu jeder Suchzellpopulation pipettiert (Abb. 8).

Die Platte wurde anschließend 20 min bei 37 °C inkubiert (Abb. 9) und danach sechsmal mit physiologischer Kochsalzlösung manuell gewaschen (Abb. 10). In jede Vertiefung wurden dann 50  $\mu$ l der 1%igen Indikatorzelllösung pipettiert (Abb. 11). Anschließend wurde die Platte in der Spezialzentrifuge (ImmuCor) eine Minute lang bei 2350 U/min zentrifugiert. Das Testergebnis wurde von der Rückseite der Platte gegen eine Lichtquelle abgelesen und dokumentiert (Abb. 12).

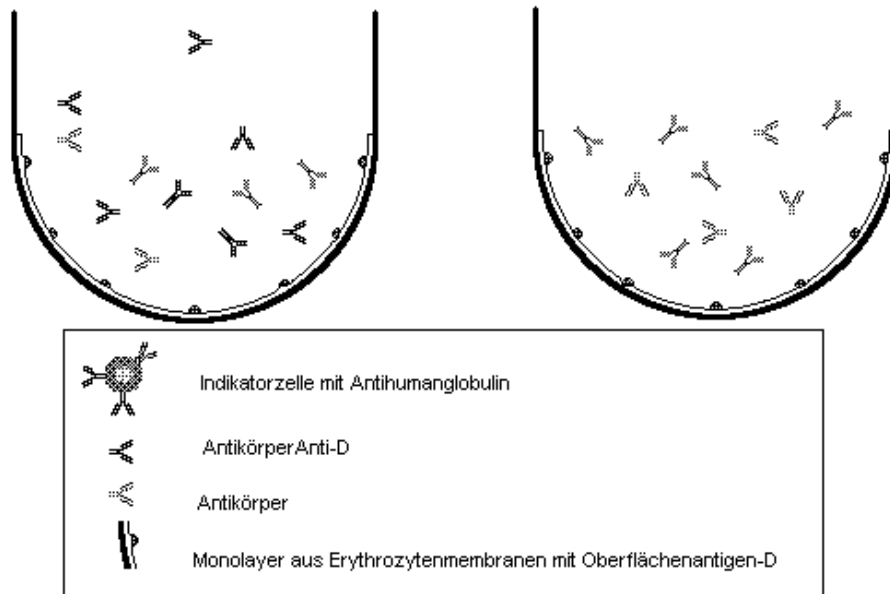


Abb. 8. Ansatz im Festphasentest mit antikörperhaltigem Probandenserum (links) und antikörperfreiem Probandenserum (rechts). Hier im Beispiel "Anti-D".

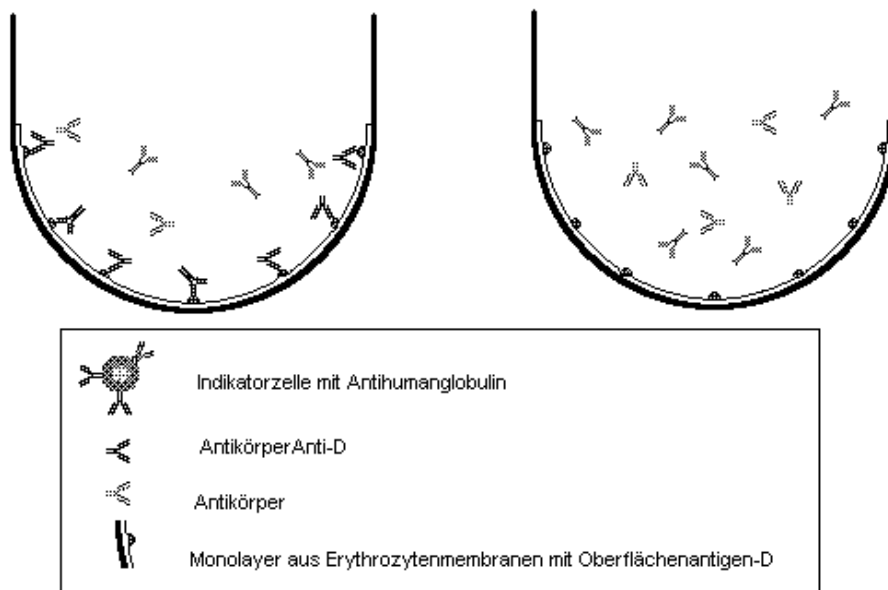


Abb. 9. Nach Inkubation binden vorhandene Antikörper an spezifische Antigene der Erythrozytenmembranen

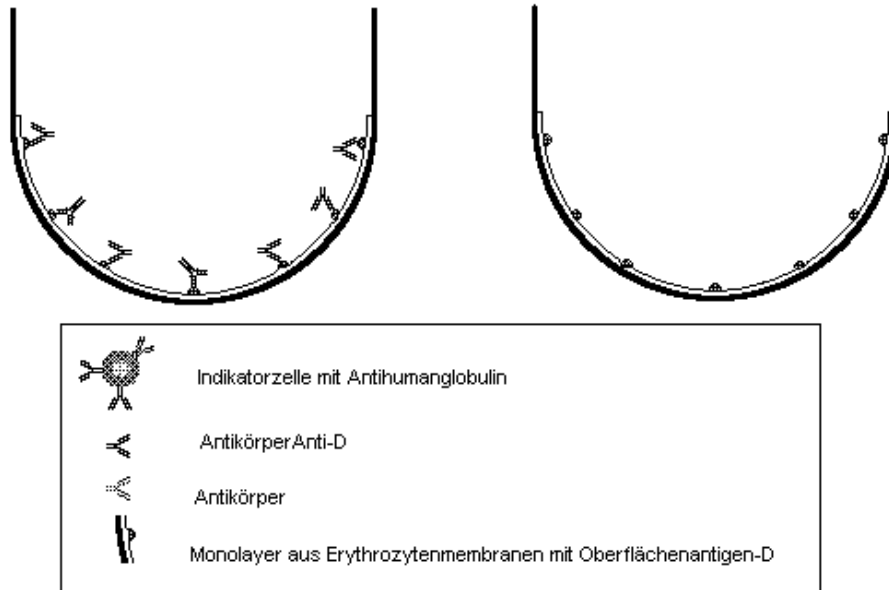


Abb. 10. Durch Waschen werden ungebundene Antikörper entfernt

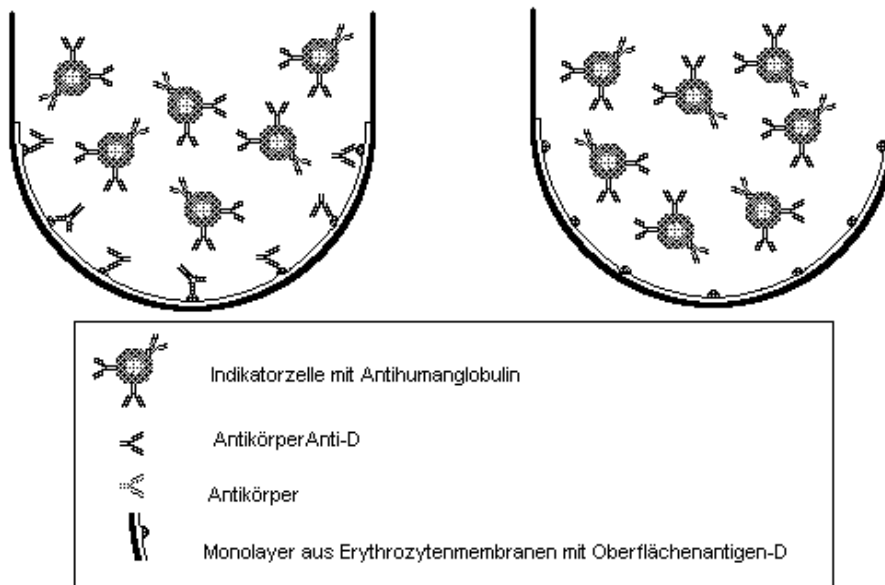


Abb. 11. Nach Zugabe von Indikatorzellen

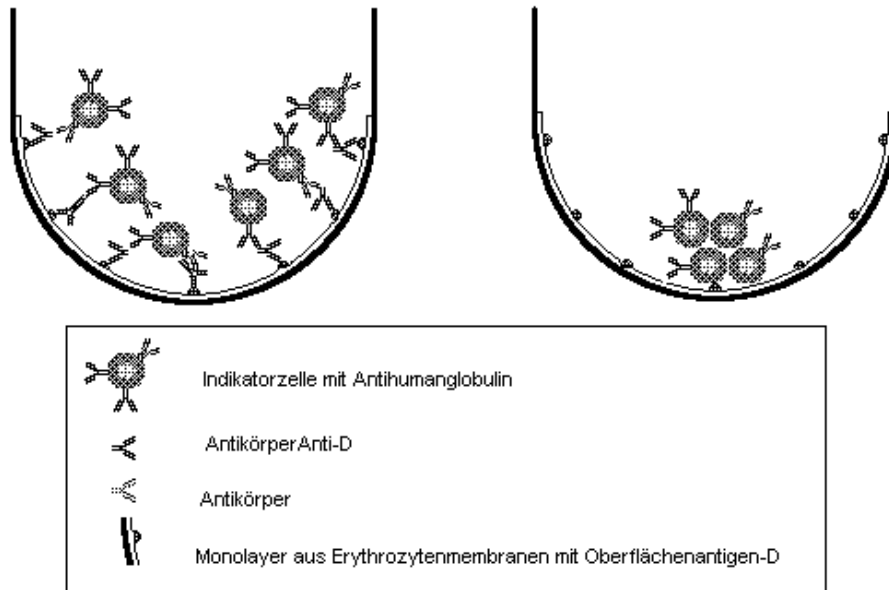


Abb. 12. Testergebnis positiv (links) und negativ (rechts)

Die Ergebnisse wurden analog der Reaktionsstufen für den Geltest nach einer Skala von "0" - "4" klassifiziert (Abb. 13).

Reaktionsstufen Festphasentest:

negativer Test:

"0": Alle Indikatorzellen bilden einen Erythrozytenknopf in der Mitte der Vertiefung mit einem scharf begrenztem "Zentralrot" und einer schmalen, weißlich erscheinenden "Korona". Der Hintergrund ist fensterklar.

positiver Test:

"1": Die Korona ist verbreitert, die Grenze zum "Zentralrot" unscharf. Der Hintergrund um den Knopf ist leicht getrübt.

"2": Das "Zentralrot" weist Defekte auf, die Korona ist weitgehend intakt, aber stark verbreitert und strahlenförmig ausgezogen. Der Hintergrund ist leicht getrübt.

"3": Das "Zentralrot" fehlt vollständig und von der Korona sind nur Fragmente erkennbar. Im Hintergrund findet sich ein rosa Zellrasen, der bis auf 1 - 2 Millimeter an den Rand der Vertiefung reicht.

"4": Die gesamte Vertiefung ist durch einen rosa Zellrasen ausgekleidet, es sind keine Knopfbestandteile sichtbar.

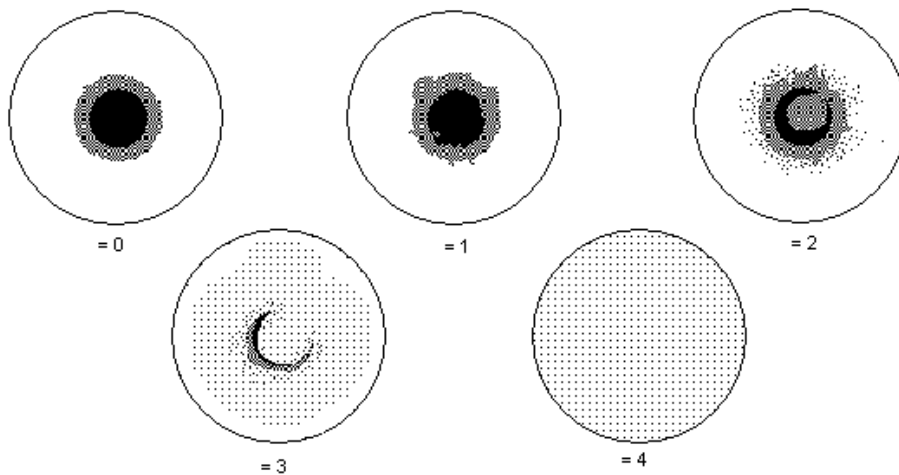


Abb. 13. Reaktionsstärken im CR

Für die Austestung der Proben im Eigenansatz wurde der Test der 1. Generation verwendet. Dabei wurden die Patientenerythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zu einer ca. 3 prozentigen Suspension aufgeschwemmt. 50  $\mu$ l dieser Suspension wurden in je eine Reaktionskammer gegeben, und die Erythrozyten wurden während der folgenden Inkubation über 20 Minuten bei 7 °C fixiert. Der Überstand wurde danach mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und der Test anschliessend wie oben beschrieben weitergeführt.

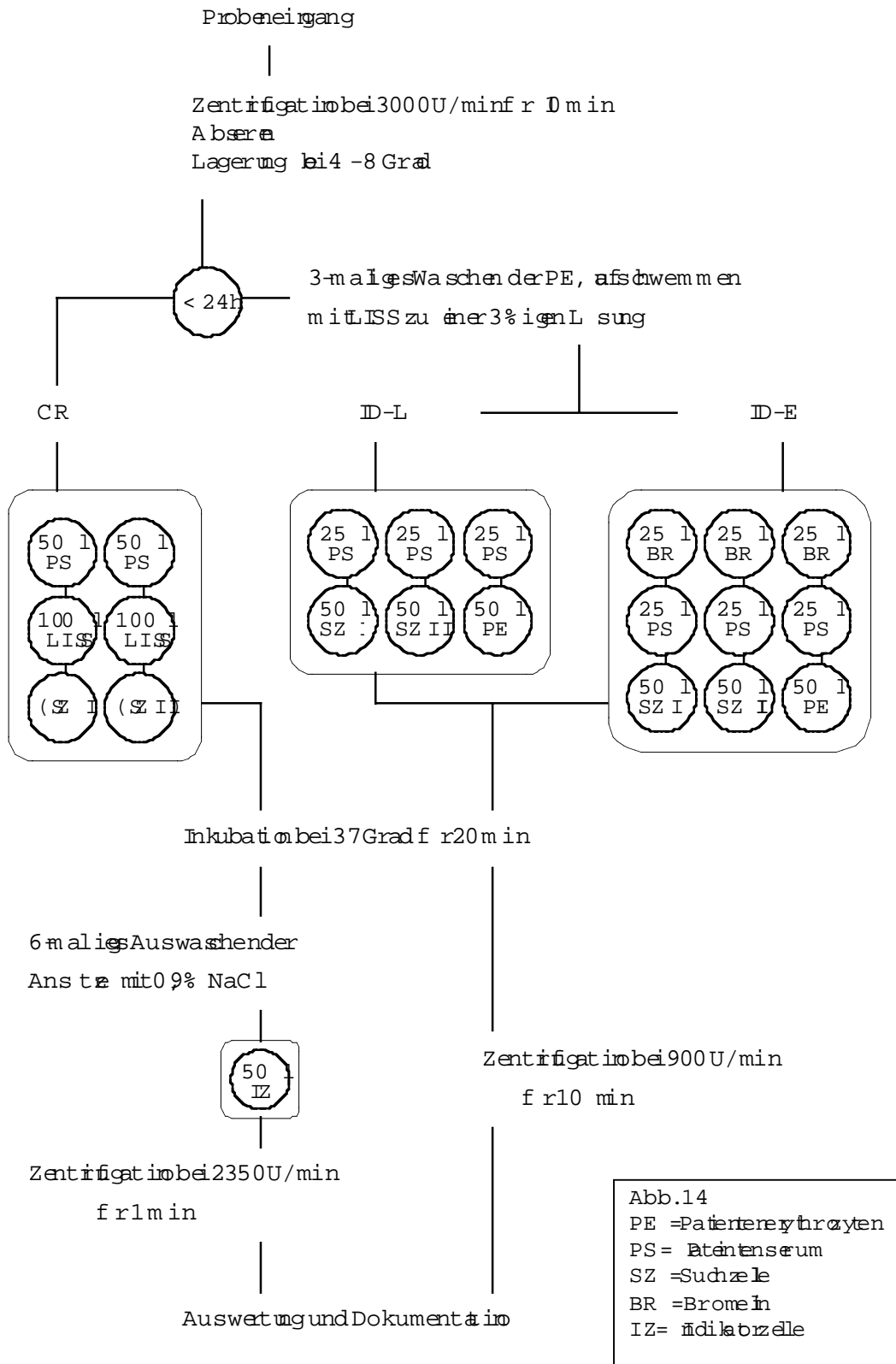
### 2.3 Studiendesign

Reagierte ein Probandenserum mit einer Suchzelle positiv, wurde dieses Serum mit der gleichen Testmethode in einem Differenzierungspanel nach der oben genannten Anleitung untersucht und der Antikörper identifiziert. Positive Eigenansätze im Gel-Test wurden nach erneutem Waschen der Patientenerthrozyten zunächst im direktem Coombs-Test (DCT) mit einer entsprechenden Gel-Karte (Coombs-Gelkarte mit vorbereiteten Säulen mit Anti-IgG, Anti-IgM, Anti-IgA, Anti-C3d und polyvalentem Antihumanglobulin) getestet.

Sofern ein Antikörper aus demselben Serum in beiden Tests nachgewiesen werden konnte, wurde bei noch ausreichender Serummenge eine geometrische Verdünnungsreihe in antikörperfreiem Serum von Spendern der Blutgruppe "AB" hergestellt. Diese Verdünnungsreihe wurde geteilt und dann parallel mit beiden Verfahren untersucht. Dabei wurden alle Testansätze verwendet, die im Suchtest eine positive Reaktion zeigten (d.h. ggf. mit beiden Suchzellpopulationen und ggf. sowohl im ID-L als auch im ID-E für den Geltest). Um das Ergebnis zu quantifizieren wurde für jeden Test die Anzahl der Verdünnungsstufen mit positiver Reaktion notiert und als "Score" die Summe der Reaktionsstärken über alle Verdünnungsstufen addiert. Wurde eine Verdünnungsreihe mit mehreren Ansätzen eines Verfahrens getestet, so wurde für das jeweilige Verfahren nur der Ansatz mit dem besten Ergebnis gewertet.

Abb. 14 zeigt den schematischen Ablauf der Untersuchung als Flußdiagramm.





Aufgrund der besonderen klinischen Relevanz von Anti-Fy<sup>a</sup> (Serum Nr. B 9426651, s.a. Kap. "Ergebnisse"), wurde dieses Serum in besonderer Weise nachuntersucht: 50  $\mu$ l der Suchzellsuspension wurden mit 25  $\mu$ l Probandenserum auf die Anti-Human-IgG-, Anti-Human-IgM- und Anti-Human-IgA-Säule einer DCT-Karte gegeben und anschließend wie oben beschrieben weiterbehandelt.

## 2.4 Auswertung

Die ermittelten Daten wurden zur Berechnung der diagnostischen Sensitivität und der diagnostischen Spezifität in Vierfeldertafeln eingetragen. Die diagnostische Sensitivität ist definiert als Maßzahl für die Sicherheit der Tests, Antikörper richtig zu erkennen, die diagnostische Spezifität als Maßzahl für die Sicherheit der Tests, Antikörper richtig zu ausschließen. Die Berechnung geschah nach den Formeln [11]:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der erkannten AK}}{\text{Anzahl aller AK}} \quad \text{und}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen Tests}}{\text{Anzahl aller negativer Tests}}$$

Um die Signifikanz des Sensitivitäts- und Spezifitätsunterschiedes bei verbundener Stichprobe und nominal skaliertem Ergebnis zu bestimmen, wurde der McNemar-Test eingesetzt[27].

Zur Ermittlung der Signifikanz des Sensitivitätsunterschiedes im Nachweis von Antikörpern in den Verdünnungsreihen wurde der t-Test für verbundene Stichproben

eingesetzt [27]. Als Signifikanzniveau ( $p$ ) wird der Grenzwert bezeichnet, ab dem beim Vergleich zweier Tests ein signifikanter Unterschied der Testergebnisse anerkannt wird. Dieser Grenzwert liegt bei medizinischen Tests (meist) bei 5 % ( $p=0,05$ ). Um einen Test als signifikant empfindlicher im Nachweis desselben Antikörpers gegenüber einem anderen zu bewerten, muß mittels der Testergebnisse ein  $p < 0,05$  errechnet werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Antikörpernachweis

Tab. 1 Im Antikörpersuchtest gefundene Antikörper						
	Antikörper	(n=)	(%)	CR	ID-E	ID-L
<b>Spezifität</b>	<b>Anti-</b>					
Rhesus	D	44	57	43	42	44
	E	6	7,8	6	3	3
	C	2	2,6	1	1	1
	c	1	1,3	1	0	0
	Cw	1	1,3	1	1	1
	C, e	2	2,6	2	1	1
	D, C	2	2,6	2	1	2
	E, D	1	1,3	1	1	1
	E, c	1	1,3	1	1	1
Kell	K	4	5,2	4	1	4
Duffy	Fy <sup>a</sup>	3	3,9	2	1	3
Lewis	Le <sup>a</sup>	4	5,2	0	4	0
	Le <sup>b</sup>	1	1,3	1	0	0
Kidd	c, E, Jk <sup>a</sup>	1	1,3	1	1	1
P	P1	2	2,6	0	2	0
Colton	Co <sup>b+</sup>	1	1,3	1	0	0
MNSs	M	1	1,3	1	0	1
<b>Gesamt:</b>		77	100	68	60	63
(% ) = Prozent der gefundenen Antikörper						

Insgesamt wurden in 86 der 3052 Seren ein bis drei relevante oder potentiell relevante Antikörper gefunden

(Tab.1). Damit wiesen 2,82 % der untersuchten Seren irreguläre Antikörper auf. Im Untersuchungszeitraum wurden von einigen Patienten mehrere Proben eingesandt. Lagen von einem Patienten mehrere antikörperhaltige Proben vor, so wurden diese im weiteren nur einmal gezählt. Damit reduziert sich die Zahl der Antikörper-positiven Proben auf 77 (dies entspricht 2,52 % der untersuchten Seren). Alle weiteren Berechnungen beziehen sich auf diese 77 Proben.

Mit dem CR fanden wir in 68 Seren Antikörper (Tab. 1). Mit dem Geltest konnten 71 Antikörper/-gemische nachgewiesen werden, davon 60 im ID-E und 63 im ID-L (Tab. 1).

Von den 77 verschiedenen Antikörper/-gemischen wurden 62 (80,52 %) von beiden Testsystemen erkannt (Tab. 2).

<b>Tab. 2. In beiden Testsystemen nachgewiesene Antikörper/-gemische</b> [62 (81%) von 77 AK-haltigen Seren]	
<b>Rhesus</b>	Anti-D(44); Anti-E(4); Anti-Cw(1); Anti-c, -E(1); Anti-C, -D(2); Anti-D, -E(2)
<b>Kell</b>	Anti-K(4)
<b>Duffy</b>	Anti-Fy <sup>a</sup> (2)
<b>Kidd</b>	Anti-c, -E, -Jk <sup>a</sup> (1)
<b>MNSs</b>	Anti-M(1)

6 Probandenserien (7,79% aller AK-positiven Seren) reagierten ausschließlich im CR (Tab. 3). 9 mal wurden die Antikörper nur mit ID-Microtyping entdeckt (11,69% aller Antikörper-positiven Seren). Davon wurden in 7 Seren die Antikörper nur im ID-E nachgewiesen (Tab. 4). Ein weiterer Antikörper, der im ID-Microtyping nur im Enzymansatz reagierte (Anti-E, Proben-Nr. A 9501373) konnte auch im CR nachgewiesen werden.

Tab. 3. Nur im CR nachgewiesene Antikörper/-gemische (n = 6)	
AK-Spezifität	Anti-
Rhesus	C, e(1)
	E (2)
	C (1)
Lewis	Le <sup>b</sup> (1)
Colton	Co <sup>b+</sup> (1)

Ein Anti-Fy<sup>a</sup> wurde eindeutig im ID-Microtyping nachgewiesen, während der CR diesen Antikörper nicht erfassen konnte. Dieser Antikörper konnte anhand des ICT mit monospezifischen Anti-Immunglobulinseren der Immunglobulinklasse IgM zugeordnet werden.

Tab. 4 Nur Im ID-Microtyping nachgewiesene Antikörper (n = 9)			
AK-Spezifität	Anti-	ID-E	ID-L
Rhesus	C	1	
	D		1
Lewis	Le <sup>a</sup>	4	
Duffy	Fy <sup>a</sup>		1
P	P <sub>1</sub>	2	

### 3.2 Testsensitivität und -spezifität

In der Vierfeldertafel zur Ermittlung der Sensitivität wurden folgende Ergebnisse eingesetzt (Abb. 15):

- Anzahl der gemeinsam in beiden Testsystemen gefundenen antikörperhaltigen Seren (Feld A; n=62)
- Anzahl der nur im ID-Microtyping-System gefundenen Seren (Feld B; n=9)
- Anzahl der nur im Capture-R-System gefundenen Seren (Feld C; n=6)
- Anzahl der antikörpernegativen Seren (Feld D; n=2975)

71 Seren reagierten im ID-Test richtig-positiv, in 2981 Seren wurde durch das ID-System kein Antikörper gefunden. Durch den CR wurden 68mal Antikörper in den insgesamt 3052 Patientenseren gefunden. 2984 Seren reagierten im CR negativ.

<b>Abb. 15 Vierfeldertafel</b>			
	<b>CR+</b>	<b>CR-</b>	<b>Summe</b>
<b>ID+</b>	(A) 62	(B) 9	71
<b>ID-</b>	(C) 6	(D) 2975	2981
<b>Summe</b>	68	2984	3052
CR+ = Antikörper im CR nachgewiesen CR- = Antikörper im CR nicht nachgewiesen ID+ = Antikörper im ID gefunden ID- = Antikörper im ID nicht gefunden			

Daraus errechnet sich für den CR eine Sensitivität von 88,3%. Bei Verwendung des ID-Microtyping im Enzym- und indirekten Antiglobulintest (IAT) errechnet sich eine Sensitivität von 92,2% (Tab. 6).

Die Anwendung des Mc Nemar-Tests (B/C) [27] als Test auf Signifikanz des Sensitivitätsunterschieds zwischen Antikörpersuche mittels CR und ID ergibt  $p=0,606$ . Der Sensitivitätsunterschied ist nicht signifikant zugunsten eines der Systeme.

Bei 53 Seren (1,7%) traten unspezifische Reaktionen auf, bei denen durch Nachuntersuchungen entweder kein Antikörper identifiziert werden konnte oder die Reaktion nicht reproduzierbar war (Tab. 5). Vier Seren reagierten in beiden Testverfahren unspezifisch. In 24,5% der Fälle (13 von 53) reagierte nur der CR und in 67,9% der Fälle (36 von 53) nur der ID-Microtyping. Von letzteren gingen 91,7% (33 von 36) zu Lasten des Enzymtestes.

<b>Tab. 5. unspezifische Reaktionen</b> im ID-Microtyping (ID) als Enzymtest (ID-E) und IAT (ID-L) und im CR					
	<b>CR</b>	<b>CR + ID</b>	<b>ID-E</b>	<b>ID-L</b>	<b>Summe</b>
<b>n</b>	13	4	33	3	53
<b>%</b>	24,5	7,5	62,3	5,7	100

In der Vierfeldertafel zur Ermittlung der Spezifität wurden folgende Ergebnisse eingesetzt (Abb. 16):

- Anzahl der Seren, die in beiden Tests unspezifisch reagierten (Feld A; n=4)
- Anzahl der im ID-Microtyping-System unspezifisch reagierenden Seren (Feld B; n=36)
- Anzahl der nur im Capture-R-System unspezifisch reagierenden Seren (Feld C; n=13)
- Anzahl der Seren ohne unspezifische Reaktion (Feld D; n=2913)

40 Seren reagierten unspezifisch im ID-Test, 2926 mal war die Reaktion im ID-System richtig-negativ. Unspezifische Reaktionen traten im CR 17 mal auf. 2949 Seren reagierten im CR richtig-negativ.

<b>Abb. 16 Vierfeldertafel</b>			
	<b>CR-fp</b>	<b>CR-rn</b>	<b>Summe</b>
<b>ID-fp</b>	(A) 4	(B) 36	40
<b>ID-rn</b>	(C) 13	(D) 2913	2926
<b>Summe</b>	17	2949	2966
CR-fp = falsch-positive Reaktion im CR CR-rn = richtig-negative Reaktion im CR ID-fp = falsch-positive Reaktion im ID ID-rn = richtig-negative Reaktion im ID			



Aus der Definition [11] ergibt für das Capture-R-Ready-System eine höhere Spezifität (99,4%) als für das ID-Microtyping-System (98,7%) (Tab. 6).

<b>Tab. 6. Sensitivität und Spezifität der Tests</b>		
	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>
<b>Capture-R</b>	88,3 %	99,4 %
<b>ID-Microtyping</b>	92,2 %	98,6 %

Für den Spezifit tsunterschied zwischen Antikörpersuche mittels CR und ID errechnet sich ein Signifikanzniveau von  $p=0,002$ . Der Spezifit tsunterschied ist damit signifikant zugunsten des CR.

### **3.3 Antikörpertiter**

Von 41 der 62 Seren, die in beiden Verfahren reagierten, konnten aufgrund ausreichender Materialmengen geometrische Verdünnungsreihen durchgeführt werden. Der daraus abgeleitete Score aus der Summe aller Reaktionsstärken und die Anzahl der Titerstufen mit positiver Reaktion

ergaben im Mittel eine höhere Sensitivität des CR um ca. 4 Score-Punkte bzw. etwa 0,5 Titerstufen (Tab. 7).

Die Anwendung des t-Tests für verbundene Stichproben [27] auf die erhobenen Daten ergibt  $p<0,001$  für die Berechnung aus den Daten des Verd nnungsscores und  $p=0,01$  für die Titrationsstufen. Der Unterschied in der Nachweisfähigkeit von Antikörpern durch Titration ist signifikant zugunsten des CR.

<b>Tab. 7 Ergebnisse der geometrischen Verdünnungsreihen von 41 antikörperhaltigen Seren</b> , die in beiden Testverfahren positiv reagierten, als Mittelwert (=MW) mit Standardabweichung (=STD) und Standardfehler des Mittelwerts (=SEM).			
	<b>MW</b>	<b>STD</b>	<b>SEM</b>
<b>CR-S</b>	14,88	7,808	1,219
<b>ID-S</b>	11,41	6,753	1,055
<b>CR-V</b>	5,049	1,962	0,3063
<b>ID-V</b>	4,439	2,05	0,3203
CR-S = Score aus der Summe der Reaktionsstufen im CR ID-S = Score aus der Summe der Reaktionsstufen im ID CR-V = Anzahl der Verdünnungsstufen im CR ID-V = Anzahl der Verdünnungsstufen im ID			

### 3.4 Reaktionen im Eigenansatz

In 61 Fällen (2%) reagierte Patientenserum mit Patienteneroxythrozyten im Eigenansatz (Tab.8). Bei der Nachuntersuchung im DCT wurde in 39% (24 von 61) der Fälle eine Immunglobulin- und/oder Komplementbeladung der Erythrozyten gefunden. In 23 Fällen konnte eine Beladung mit Immunglobulinen der Klasse IgG nachgewiesen werden. Von diesen 23 Proben reagierten 15 (65,2%) auch im Eigenansatz des CR.

<b>Ergebnis</b>	<b>ID-ICT</b>	<b>davon im CR-EA</b>
Negativer Test	38	
pol	1	0
IgG, pol	20	15
IgG, C3d, pol	2	0
<p><b>Tab. 8. Häufigkeit von Befundkonstellationen im ID-Microtyping-ICT</b></p> <p>CR-EA = Capture-R-Test im Eigenanstaz</p> <p>ID-DCT = direkter Coombs-Test in der Gel-Karte</p> <p>IgG = Nachweis von Erythrozytenbeladung mit IgG</p> <p>C3d = Nachweis von Erythrozytenbeladung mit Komplement</p> <p>pol = Nachweis von polyvalenter Humanglobulinbeladung</p>		

#### 4 Diskussion

Mit der Säulenagglutination wurde ein Verfahren zum Nachweis von irregulären erythrozytären Antikörpern entwickelt, das infolge seiner einfacheren Durchführbarkeit und seiner höheren Sensitivität und Spezifität deutliche Vorteile gegenüber dem R hrchentest besitzt [6,14,15,16, 17,18]. Daher hat der Säulenagglutinationstest den R hrchentest weitgehend in der Diagnostik abgelöst, um durch den empfindlicheren Nachweis von erythrozytären Antikörpern die Sicherheit von Bluttransfusionen zu erhöhen.

Nun steht mit dem Festphasentest ein weiteres empfindliches Nachweisverfahren zur Verfügung. Der Vorteil dieses neuen Verfahrens liegt in der noch besseren Automatisierbarkeit insbesondere durch die Verwendung von Mikrotiterplatten [28,31]. Jedoch war diese Methode hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität gegenüber dem Geltest noch nicht adäquat untersucht. Die bisher durchgeführten Studien führten teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen, die jedoch auf methodische Mängel dieser Studien zurückzuführen sind [18,19,20,21,22,23,24,25,26].

So untersuchten Hitzler et. al.[23] 131 antikörperhaltige Seren in mehreren Testverfahren, nämlich im ID-Microtyping-Geltest, im R hrchentest, im Capture-R-Test der ersten und zweiten Generation (Ready-ID) und im "Solidscreen "-Festphasentest. Mit dem Geltest wurden in 128 (98%) Seren Antikörper detektiert, mit dem R hrchentest in 103 (78%) Seren, mit dem Capture-R-Test in 80 (53%) Seren, mit dem Ready-ID in 73 (56%) Seren und mit dem Solidscreen in 70 (53%) Seren. Somit ergibt sich für den Geltest die höchste Sensitivität vor dem R hrchentest und vor den Festphasentests. Offen blieb in dieser Studie die Frage nach dem Verfahren, mit dem die 131 untersuchten Seren gefunden wurden. Eine Verfälschung des Studienergebnisses durch diese Vorauswahl kann somit nicht aus-

geschlossen werden. Auch wurden in den verschiedenen Testverfahren unterschiedliche Suchzellpopulationen eingesetzt, die hinsichtlich ihres Antigenmusters sicherlich nicht identisch waren. Das Ergebnis hat also nur für die verwendeten Chargen Gültigkeit, eine abschliessende Beurteilung der Testmethoden kann daraus nicht abgeleitet werden.

Weißhaar et. al. [20] untersuchten Serum von 4069 Blutspendern mit dem CR. Nur Seren, die im Festphasentest positiv reagierten, wurden mit dem ID-Microtyping nachuntersucht um den Antikörper zu bestätigen oder auszuschließen. Außerdem wurden 200 Seren von Schwangeren, die im ID-Microtyping bereits negativ getestet wurden, mit dem CR nachuntersucht. Weiterhin wurden 18 antikörperhaltige Seren, die durch den ID-Microtyping erkannt wurden, mit dem CR nachgetestet. Die Untersucher befanden die beiden Testverfahren als ebenbürtig, da sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den Testergebnissen beider Verfahren zeigte. Lediglich ein Antikörper der Spezifität Anti-D im Serum eines Blutspenders reagierte eindeutig im CR, nicht jedoch in ID-Microtyping. Im Rahmen dieser Studie wurden also Reaktionsergebnisse von solchen Proben verglichen, die durch eines der Verfahren vorselektiert und dann mit zeitlicher Verzögerung im Konkurrenzverfahren getestet wurden. Auch wurden verschiedene Suchzellpopulationen in den beiden Testverfahren eingesetzt. Somit sind verfahrensunabhängige Einflüsse nicht auszuschließen. Eine allgemeingültige Beurteilung der unterschiedlichen Verfahren ist daher nicht möglich. Eine Überlegenheit des ID-Systems konnte bei diesem Versuchsaufbau nicht gefunden werden.

Simson et. al. [21] untersuchten in einer prospektiven Studie 2306 Patientenblutproben im Rahmen der Blutgruppenbestimmung parallel im ID-Microtyping und CR. Sie fanden mit Hilfe des CR deutlich mehr relevante oder poten-

tiell relevante Antikörper (44 Antikörper) als mit dem Geltest (28 Antikörper). Durch den CR wurden folgende Antikörper mit teilweise hoher klinischer Relevanz zusätzlich gefunden: 1x Anti-D, 4x Anti-E, 4x Anti-C, 4x Anti-K, 2x Anti-Fy(a), 1x Anti-Jk(a), 1 Anti-V. Es wurde jedoch auch ein Antikörper der Spezifität Anti-C(w) beschrieben, der nur im Gel-Test nachgewiesen werden konnte. Dies wurde von den Autoren damit begründet, dass das C(w)-Antigen auf den entsprechenden Panels des CR nicht vorhanden war. Diese Aussage belegt die Notwendigkeit, in beiden Testverfahren die gleichen Suchzellpopulationen einzusetzen, damit eine vergleichende Aussage über die Sensitivität und Spezifität der Verfahren selbst gemacht werden kann.

Es zeigt sich also, dass alle bisher veröffentlichten Studien systematische Fehler aufweisen. Diese Fehler wurden in dieser Studie durch die zeitgleiche Bearbeitung frischer und unselektierter Proben mit gleichen Suchzellpopulationen in beiden Verfahren ausgeschlossen.

Keine der hier verwendeten Methoden entdeckte alle der insgesamt gefundenen 77 verschiedenen, antikörperhaltigen Seren. 62 Seren reagierten in beiden Tests, sechs nur im CR (1 Anti-C, Anti-e; 2 Anti-E; 1 Anti-C; 1 Anti-Co; 1 Anti-Le<sup>b</sup>), neun nur im ID-Microtyping (4 Anti-e<sup>a</sup>; 2 Anti-P; 1 Anti-C; 1 Anti-D; 1 Anti-Fy<sup>a</sup>). Von letzteren, konnte der ID-E sieben nachweisen, zwei Seren reagierten nur im ID-L. In Kombination von Enzymtest und IAT entdeckte der ID-Microtyping-Test insgesamt 71 positive Seren und damit mehr als der CR, der 68 Seren aufspürte. Der Sensitivitätsunterschied (92,2% vs. 88,3%) ist jedoch nicht signifikant ( $p=0,606$ ). Diese Aussage stützt sich auf eine reine quantitative Analyse der Testergebnisse. Sie lässt allerdings die Tatsache unberücksichtigt, dass die einzelnen Antikörper eine unterschiedliche klinische Bedeutung besitzen können.

Nicht alle in vitro nachweisbaren Antikörper sind in der Lage, in vivo eine Transfusionsreaktion hervorzurufen. Demzufolge müssen bei Transfusionen nicht alle irregulären Antikörper gleichermaßen berücksichtigt werden. Insbesondere sind hier solche Antikörper zu erwähnen, die nur bei Temperaturen unter 30 °C (sog. "Kälteantikörper") oder nur bei Verwendung enzymbehandelter Testerythrozyten (sog. "Enzyme-Only-Antikörper") in vitro eine Agglutination auszulösen vermögen. Die routinemäßige Erfassung dieser Antikörper ist umstritten, da sie nach der Auffassung einiger Autoren nur in seltenen Fällen eine Transfusionsreaktion verursachen [19,28,29,30,34]. Demgegenüber stehen zahlreiche unspezifische Reaktionen, die bei Anwendung eines Enzymtests auftreten können. Diese müssen mit Personal- und Sachaufwand nachuntersucht werden, wodurch zusätzliche Kosten entstehen. Diesen vermehrten materiellen und personellen Aufwand bei der Durchführung dieser Testverfahren hält u.a. Issitt [28] aufgrund der fehlenden praktischen Konsequenz wirtschaftlich für nicht gerechtfertigt. Darüber hinaus müssen Eingriffe bis zur Klärung dieser vorerst unklaren Befunde zurückgestellt werden. Dies führt indirekt zu weiteren Kosten durch Verlängerung der Liegezeiten und trägt außerdem zur Verunsicherung von Patienten bei. Danach könnte man folgern, daß die sieben "Enzyme-only-Antikörper" unter den neun Antikörpern, die allein der ID-Microtyping-Test nachgewiesen hat, möglicherweise klinisch bedeutungslos sind, auch wenn die nachgewiesenen Antikörper vereinzelt möglicherweise in der Lage sind, Transfusionsreaktionen auszulösen [1,2,3, 31,32,33]. Die Diskussion um die Relevanz verschiedener Antikörpergruppen und -klassen sowie um den notwendigen und vertretbaren Umfang von prätransfusionellen Screeningmethoden ist jedoch noch nicht abgeschlossen [6,19, 28,29,30,34,35,36,37,38,39].

Unter dem Gesichtspunkt der fraglichen klinischen Relevanz von "Enzyme-only"-Antikörpern ist die Interpretation der Bedeutung eines Antikörpers interessant, der im ID-Microtyping nur im Enzymtest ("Enzyme-only") nachgewiesen wurde, jedoch auch im CR detektiert wurde (Probe A 9501373: Anti-E): Grundsätzlich wird empfohlen, Antikörper aus dem Rhesussystem bei Transfusionen strikt zu beachten, vor allem wenn sie zumindest teilweise der Immunglobulinklasse IgG angehören [1,2,3]. Auch wenn die aktuelle Antikörperkonzentration nicht ausreicht, eine akute Transfusionsreaktion auszulösen, so ist die Erkennung von potentiell boosterfähigen Antikörpern wichtig vor Schwangerschaften und zur Vermeidung von verzögerten oder künftigen hämolytischen Transfusionsreaktionen. Für diese konkrete Probe muß man feststellen, daß die Sensitivität des ID-Microtyping im LISS-Ansatz allein nicht ausreicht, um diesen potentiell relevanten Antikörper nachzuweisen. Die Ergänzung durch den Enzymtest ist deshalb sinnvoll, um eventuelle Risiken während Schwangerschaften und bei Transfusionen frühzeitig zu erkennen und zu minimieren. Die Forderung von Haustein [19], Issitt [28] und Riedler [29], auf die routinemäßige Durchführung des Enzymtests gänzlich zu verzichten, kann nach dieser Beobachtung zumindest für den Gel-Test nicht vorbehaltlos unterstützt werden. Es besteht allerdings noch Forschungsbedarf bezüglich der Bedeutung dieser Antikörper bezüglich Schwangerschaft und Transfusion. Immerhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest einer von sieben "Enzyme-only-Antikörpern", der auch im CR reagierte, eine klinische Relevanz besitzt.

Zwei Antikörper konnten nur im ID-L aufgezeigt werden, nicht jedoch im ID-E und nicht im CR. Einer dieser Antikörper (Probe A 9502317: Anti-D) wurde im Rahmen der Erfolgskontrolle nach einer Rhesusprophylaxe bei einer Rh-negativen Schwangeren nachgewiesen. Es ist zu erwar-



ten, dass dieser Antikörper durch das physiologische Turnover der Immunglobuline aus dem Serum der Patientin wieder verschwindet, da er nicht durch immunkompetente Zellen der Betroffenen nachsynthetisiert wird. Ein sensitiver Nachweis von Anti-D sollte jedoch stets erfolgen, solange der Antikörper im Blut zirkuliert, unabhängig davon ob er aktiv oder passiv erworben wurde. Der zweite Antikörper, der ausschließlich im ID-L entdeckt wurde (Probe B 9426651; Anti-Fy<sup>a</sup>), konnte der IgM-Klasse zugeordnet werden. Mit den Methoden des Geltests konnte kein IgG-Anteil nachgewiesen werden. Damit ist erklärt, warum er durch den CR nicht erkannt wurde, da der CR nur Antikörper der Immunglobulinklasse IgG nachweisen kann. IgM-Immunglobuline sind jedoch potentiell gefährlich, da sie durch Komplementaktivierung eine Transfusionsreaktion auslösen können. Als Folge von inkompatiblen Transfusionen auf der Basis unberücksichtiger Antikörper des Duffy-System sind schwerste Transfusionsreaktionen mit teilweise tödlichem Ausgang beschrieben [1]. Daher ist die strikte Beachtung dieser Antikörper bei Transfusionen stets erforderlich, um eine Boosterungsreaktion oder gar einen Transfusionszwischenfall zu vermeiden [1,2,3,40].

Im Gegensatz dazu konnte der CR sechs Antikörper (Anti-C, -e, 2x Anti-E, Anti-C, Anti-Co<sup>b+</sup>, Anti-Le<sup>a</sup>) entdecken, die im ID-Microtyping nicht nachzuweisen waren. Deren klinische Relevanz muss allerdings sehr unterschiedlich bewertet werden. Rhesus-Antikörper können zu schweren Transfusionsreaktionen mit tödlichen Ausgang führen [1,2,3]. Antikörper im Colton-System sind relativ selten, können jedoch als IgG-Immunglobuline ebenfalls hämolytische Transfusionsreaktionen bewirken [1,3,41]. Antikörper aus dem Lewis-System liegen meist als in vivo inaktive Kälteantikörper vor und führen oft erst nach entsprechender Boosterung durch wiederholte inkompatible Transfusionen zu Transfusionsreaktionen.

Für die höhere Empfindlichkeit des CR bezüglich des Nachweises relevanter IgG-Antikörper spricht auch das Titrationsergebnis der untersuchten 41 Seren, die in beiden Testverfahren reagierten. In 25 Fällen reagierte das Serum im CR über mehr Verdünnungsstufen positiv als im ID-Microtyping. Umgekehrt war dies nur in sechs Fällen mit dem ID-Microtyping der Fall. 10 Seren ergaben in beiden Testverfahren die gleichen Titer. In neun von diesen zehn Fällen lag jedoch der Gesamtscore für den CR höher. Im Durchschnitt ergab sich daraus für den CR eine statistisch signifikant höhere Sensitivität, die durchschnittlich etwas weniger als eine Verdünnungsstufe und etwa 4 Scorepunkte betrug.

Im Bezug auf die Spezifität schnitt der CR mit nur 17 unspezifischen Reaktionen gegenüber 40 unspezifischen Reaktionen im ID-Microtyping ebenfalls signifikant günstiger ab. Insbesondere die auch in unserer Studie beobachtete Häufung von falsch-positiven Ergebnissen im ID-E (n=33) wird von den Kritikern dieser Methode [19,28,29, 30] hervorgehoben, um den Enzymtest in Frage zu stellen. Ob der Spezifitätsverlust des Gel-Tests den Zuwachs an Sensitivität vor allem durch Nachweis von "Enzyme-only-Antikörpern" fraglich klinischer Relevanz aufwiegt, kann nach den vorliegenden Daten aus der Literatur und unserer Studie nicht beantwortet werden.

Insgesamt ergeben sich aus diesen Ergebnissen Vorteile für den Festphasentest. Da er durch die ausschließliche Verwendung von Anti-IgG-Globulin jedoch relevante Antikörper, wie in dieser Studie einen Anti-Fy(a), nicht nachweist, wenn sie der IgM-Klasse angehören, kann er nicht als alleiniger Test für die Suche nach irregulären erythrozytären Antikörpern bei Patienten empfohlen werden. Eine Ergänzung durch geeignete Tests wie die Gelzentrifugation z.B. im Rahmen der Kreuzprobe erscheint notwendig, um relevante IgM-Antikörper zu erfassen. Optimal

wäre jedoch eine entsprechende Modifikation des Festphasentests, z.B. durch den Einsatz von Indikatorzellen, die auch IgM-Antikörper erfassen. Da klinisch relevante IgM-Antikörper immer auch das Komplementsystem aktivieren, könnte dieses Ziel auch durch Indikatorzellen erreicht werden, die z.B. C3d-Bindung nachweisen. Allerdings müssten dann die Untersuchungen immer mit Serum statt Citrat- oder EDTA-Plasma durchgeführt werden.

## 5 Zusammenfassung

Um Unterschiede von Sensitivität und Spezifität im Nachweis von irregulären erythrozytären Antikörpern zwischen einem Festphasen-Test (CR) und einem Gelzentrifugationstest mit Enzymtest und indirektem Antiglobulintest (ID-E + ID-L) festzustellen, wurden in einer prospektiven Studie 3052 unselektierte Blutproben in beiden Testverfahren gleichzeitig untersucht. Im Gegensatz zu publizierten Studien wurden in beiden Tests identische Suchzellpopulationen verwandt. Mit 41 antikörperhaltigen Seren wurden zusätzlich in beiden Methoden Titrationsuntersuchungen durchgeführt.

In 77 (2,52%) der getesteten Seren konnten Antikörper/-gemische nachgewiesen werden. 62 Seren reagierten in beiden Tests; sechs Seren reagierten nur im CR (Anti-C,-e, 2x Anti-E, Anti-C, Anti-Co<sup>b+</sup>, Anti-Le<sup>a</sup>). Neun Antikörper wurden ausschließlich mit dem Geltest detektiert (Anti-C, Anti-D, 4x Anti-Le<sup>a</sup>, Anti-Fy<sup>a</sup>, 2x Anti-P<sub>1</sub>), davon sieben sogenannte "Enzyme-Only-Antikörper". Ein Anti-Fy<sup>a</sup> der IgM-Klasse und ein Anti-D wurden im ID-L nachgewiesen, nicht aber im CR. Der Unterschied in der errechneten Sensitivität (ID-Microtyping 92,2% vs. CR 88,3%) war statistisch nicht signifikant (p=0,606).

Bei 53 Seren (1,7%) beruhte die Reaktion auf irrelevanten Kollteantikörpern oder Unspezifität. Vier Seren reagierten in beiden Testmethoden, ansonsten war das ID-Microtyping-System mehr als doppelt so oft von unspezifischen Reaktionen betroffen (1,3% vs. 0,56%), was vor allem am Enzymtest (85% der unspezifischen Reaktionen im ID-Microtyping) lag. Die Spezifität des Festphasentests (99,4%) war signifikant (p=0,002) höher als die des Geltests (98,6%). Unberücksichtigt blieb bei der Berechnung der statistischen Daten die unterschiedliche klinische Relevanz der einzelnen Antikörper. Insbesondere die

Bedeutung von "Enzyme-only-Antikörpern" wird kontrovers diskutiert, was die von uns gefundene hohe Sensitivität des ID-Microtyping zusätzlich in Frage stellt.

Die geometrischen Verdünnungsreihen ergaben jedenfalls im Mittel eine signifikant höhere Empfindlichkeit für den CR um etwa vier Scorepunkte ( $p < 0,001$ ) bzw. etwa eine Titerstufe ( $p = 0,01$ ), die insbesondere für klinisch relevante Antikörper festzustellen war.

Insgesamt ergeben sich Vorteile für den CR gegenüber dem ID-Microtyping. Jedoch ist der CR vom Prinzip her nicht in der Lage, IgM-Antikörper nachzuweisen, was in dieser Studie dazu führte, daß der CR einen relativ stark reagierenden IgM-Antikörper (Anti-Fy<sup>a</sup>) verfehlte. Es muß daher in Frage gestellt werden, ob sich der CR alleine für die Empfängerserologie als Screenigverfahren eignet. Er muß zumindest durch Kompatibilitätsskontrollen ergänzt werden, die IgM-Antikörper sicher erfassen. Besser wäre jedoch eine Modifikation des Testverfahrens.

## 6 Tabellenanhang

Seren, die relevante oder potentiell relevante AK enthielten						
Lfd.- Nr.	Proben- Nr.	CR	ID-E	ID-L	AK	Bemerkung
1	B 9426046	1	1	1	Anti-D	Pat. ident. mit 3
2	B 9426079	1	0	0	Anti-E	Pat. ident. mit 9
3	B 9426085	1	1	1	Anti-D	Pat. ident. mit 1
4	B 9426099	1	0	0	Anti-E	Anti-E nur in CR reaktiv
5	B 9426099	1	0	1	Anti-K	
6	B 9426152	1	1	1	Anti-E	
7	B 9426184	1	1	1	Anti-C, -e	Pat. ident. mit 11
8	B 9426277	1	0	0	Anti-Le <sup>b</sup>	
9	B 9426280	1	0	0	Ant-E	Pat. ident. mit 2
10	B 9426393	1	1	1	Anti-D	
11	B 9426434	1	1	1	Anti-C, -e	Pat. ident. mit 7
12	B 9426536	1	0	0	Anti-C, -e	
13	B 9426651	0	0	1	Anti-Fy <sup>a</sup>	Pat. ident. mit 15
14	B 9426771	1	1	1	Anti-c, -E, -Jk <sup>a</sup>	
15	B 9426921	0	0	1	Anti-Fy <sup>a</sup>	Pat. ident. mit 13
16	B 9436930	1	0	1	Anti-K	
17	B 9427671	0	1	0	Anti-P1	
18	B 9428201	1	0	1	Anti-D, -C	
19	B 9500707	1	1	1	Anti-D	Pat. ident. mit 20
20	B 9500879	1	1	1	Anti-D	Pat. ident. mit 19
21	B 9500962	1	0	1	Anti-E	
22	B 9503308	1	1	1	Anti-D	
23	B 9503786	1	1	1	Anti-K	
24	B 9503826	0	1	0	Anti-P <sub>1</sub>	
25	B 9503827	0	1	0	Anti-C	
26	B 9503950	1	1	1	Anti-Fy <sup>a</sup>	
27	B 9503996	1	0	1	Anti-C	
28	B 9504141	1	0	0	Anti-c	
29	B 9504836	1	1	1	Anti-D	
30	B 9504955	1	1	1	Anti-D, -C	
31	B 9504975	1	1	1	Anti-E, -D	
32	B 9505298	0	1	0	Anti-Le <sup>a</sup>	
33	A 9500858	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
34	A 9500916	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
35	A 9500930	1	1	1	Anti-E	
36	A 9500953	1	1	1	Anti-D	
37	A 9500981	0	1	0	Anti-Le <sup>a</sup>	

Lfd.- Nr.	Proben- Nr.	CR	ID-E	ID-L	AK	Bemerkung
38	A 9501019	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
39	A 9501030	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
40	A 9501031	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
41	A 9501032	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.; Pat.ident. mit 59
42	A 9501048	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.; Pat. ident. mit 58, 61
43	A 9501069	1	0	1	Anti-K	
44	A 9501085	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.; Pat. ident. mit 48
45	A 9501099	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
46	A 9501104	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
47	A 9501127	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
48	A 9501128	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.; Pat. ident. mit 44
49	A 9501152	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
50	A 9501160	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
51	A 9501161	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
52	A 9501174	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
53	A 9501182	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
54	A 9501215	0	1	0	Anti-Le <sup>a</sup>	
55	A 9501232	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
56	A 9501246	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
57	A 9501247	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
58	A 9501256	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.; Pat. ident. mit 42, 61
59	A 9501257	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.; Pat. ident. mit 41
60	A 9501287	1	1	1	Anti-E, -c	
61	A 9501327	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.; Pat. ident. mit 42, 58
62	A 9501373	1	1	0	Anti-E	
63	A 9501376	1	0	1	Anti-M	
64	A 9501777	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
65	A 9501813	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
66	A 9501819	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
67	A 9501826	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
68	A 9501640	1	0	0	Anti-Co <sup>b+</sup>	
69	A 9501878	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
70	A 9501884	0	1	0	Anti-Le <sup>a</sup>	
71	A 9501993	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
72	A 9502038	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.

Lfd.-Nr.	Proben-Nr.	CR	ID-E	ID-L	AK	Bemerkung
----------	------------	----	------	------	----	-----------

73	A 9502060	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
74	A 9502066	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
75	A 9502273	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
76	A 9502317	0	0	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
77	A 9502365	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
78	A 9502380	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
79	A 9502354	1	0	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
80	A 9502545	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
81	A 9502566	1	0	1	Anti-Fy <sup>a</sup>	
82	A 9502567	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
83	A 9502606	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
84	A 9502628	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
85	A 9502629	1	1	1	Anti-D	n. Rh-Proph.
86	S 9405978	1	1	1	Anti-Cw	

Legende: 1 = positive Testreaktion

(Tab.1.) 0 = negative Testreaktion

CR = Capture-R-Test

ID-E = Enzym-(Bromelin-)verstärkter Coombs-Test

ID-L = ID-Microtyping-ICT in LISS

n. Rh-Proph. = nach Rhesusprophylaxe

Titration Antikörperhaltiger Seren in geometrischen Verdünnungsreihen im Capture-R-Ready und ID-Microtyping

Proben-Nr.	AK	CR-S	CR-V	ID-S	ID-V
B 9500879	Anti-D	13	5	8	3
B 9500962	Anti-c	15	5	8	4
B 9503308	Anti-D	35	10	27	9
B 9503950	Anti-Fy <sup>a</sup>	31	9	21	8
B 9503996	Anti-C	10	5	2	1
B 9504836	Anti-D	10	4	8	3
B 9504950	Anti-D, -C	17	5	8	3
B 9504975	Anti-E, -D	28	8	19	6
A 9500858	Anti-D	6	3	8	3
A 9500916	Anti-D	3	2	4	3
A 9500930	Anti-E	6	3	24	8
A 9501030	Anti-D	10	4	6	3
A 9501031	Anti-D	5	2	3	2
A 9501032	Anti-D	14	4	12	5
A 9501048	Anti-D	9	4	7	3
A 9501104	Anti-D	16	5	12	4
A 9501127	Anti-D	20	6	12	6



	Proben-Nr.	AK	CR-S	CR-V	ID-S	ID-V
A	9501128	Anti-D	15	5	13	4
A	9501160	Anti-D	12	4	11	4
A	9501161	Anti-D	12	5	11	3
A	9501174	Anti-D	22	6	14	6
A	9501182	Anti-D	16	5	11	5
A	9501232	Anti-D	8	3	6	3
A	9501246	Anti-D	20	6	15	6
A	9501247	Anti-D	5	2	4	3
A	9501256	Anti-D	16	5	13	5
A	9501327	Anti-D	19	6	17	6
A	9501813	Anti-D	18	6	6	3
A	9501826	Anti-D	5	3	3	2
A	9501878	Anti-D	18	6	22	7
A	9502038	Anti-D	5	3	3	2
A	9502060	Anti-D	23	8	19	7
A	9502273	Anti-D	17	6	12	4
A	9502365	Anti-D	17	6	13	5
A	9502380	Anti-D	15	5	20	7
A	9502534	Anti-D	5	2	2	1
A	9502566	Anti-Fy <sup>a</sup>	14	5	5	3
A	9502567	Anti-D	24	8	20	7
A	9502606	Anti-D	6	3	2	2
A	9502629	Anti-D	20	7	19	6
S	9405978	Anti-c(w)	30	8	18	7
	Median		15	5	11	4
	Mittelwert		14,4	4,9	11,1	4,3
	Standardabw.		7,6	1,9	6,7	2,1

AK = Antikörper im Serum

CR-V = Anzahl der Verdünnungsstufen im Capture-R

CR-S = Score aus der Summe der Reaktionsstufen im Capture-R

ID-V = Anzahl der Verdünnungsstufen im ID-Microtyping

ID-S = Score aus der Summe der Reaktionsstufen im ID-Microtyping

unspezifische Reaktionen in Capture-R-Ready und ID-Microtyping							
Proben-Nr.	CR	ID-E	ID-L	Proben-Nr.	CR	ID-E	ID-L
B 9426040	1	0	0	B 9503327	0	1	0
B 9426065	0	1	0	B 9503363	0	1	0
B 9426095	0	1	0	B 9504155	1	0	0
B 9426177	1	0	0	B 9504653	1	0	0
B 9426300	0	1	0	B 9504661	1	1	0

Proben-Nr.	CR	ID-E	ID-L	Proben-Nr.	CR	ID-E	ID-L
B 9426415	0	1	0	B 9504677	1	0	0
B 9426512	1	0	0	B 9504699	1	1	0
B 9426514	1	0	0	B 9504713	0	1	0
B 9426573	0	1	0	B 9504809	1	0	0
B 9426647	0	0	1	B 9505231	0	1	0
B 9426681	0	1	0	B 9505239	1	0	0
B 9426766	0	0	1	A 9500863	0	1	0
B 9426776	1	1	1	A 9500870	0	1	0
B 9426793	0	0	1	A 9500927	1	0	0
B 9426934	1	0	0	A 9500929	0	1	0
B 9427043	0	1	0	A 9500947	0	1	0
B 9427411	0	1	0	A 9500993	0	1	0
B 9428002	0	1	0	A 9500999	0	1	0
B 9428210	0	1	0	A 9501059	0	1	0
B 9428219	1	1	0	A 9501077	0	1	0
B 9500657	1	0	0	A 9501099	0	1	0
B 9500658	0	1	0	A 9502020	0	1	0
B 9500668	1	0	0	A 9502070	0	1	0
B 9500857	0	1	0	A 9502074	0	1	0
B 9500936	0	1	0	A 9502207	0	1	0
B 9500985	0	1	0				

Legende: 1 = positive Testreaktion

0 = negative Testreaktion

CR = Capture-R-Test

ID-E = Enzym-(Bromelin-)verstärkter Coombs-Test

ID-L = ID-Microtyping-ICT in LISS

Serien, die im ID-Microtyping-Eigenansatz reagierten, mit den Befunden des DCT und der Reaktivität im Capture-R-Ready-Eigenansatz.					
Proben-Nr	ID-DCT	CR-EA	Proben-Nr	ID-DCT	CR-EA
B 9426020	0		B 9426970	0	
B 9426028	IgG, pol	1	B 9426976	0	
B 9426032	IgG, pol	1	B 9426978	0	
B 9426079	IgG, pol	1	B 9427029	IgG, pol	1
B 9426144	IgG, C3d, pol	0	B 9427039	IgG, pol	0
B 9426156	IdG, C3d, pol	0	B 9427406	IgG, pol	1
B 9426181	0		B 9427853	IgG, pol	0

Proben-Nr	ID-DCT	CR-EA	Proben-Nr	ID-DCT	CR-EA
B 9426185	IgG, pol	0	B 9427855	0	
B 9426280	IgG, pol	1	B 9427867	0	
B 9426332	0		B 9427874	0	
B 9425336	0		B 9500976	0	
B 9426345	0		B 9503324	IgG, pol	1
B 9426348	0		B 9503345	0	
B 9426390	IgG, pol		B 9503947	IgG, pol	1
B 9426419	0		B 9503988	IgG, pol	1
B 942605	0		B 9504135	0	
B 9426511	0		B 9504662	pol	0
B 9426514	0		B 9504668	0	
B 9426520	0		B 9504701	IgG, pol	1
B 9426527	0		B 9504809	IgG, pol	0
B 9426532	0		A 9504834	0	
B 9426577	0		A 9505239	IgG, pol	0
B 9426652	0		A 9500926	0	
B 9426667	0		A 9500949	IgG, pol	1
B 9426674	0		A 9500992	IgG, pol	1
B 9426756	0		A 9500993	0	
B 9426779	0		A 9501109	IgG, pol	1
B 9426820	0		A 9501137	IgG, pol	1
B 9426935	0		A 9502021	0	
B 9426939	0				

Legende: 1 = positive Testreaktion

0 = negative Testreaktion

CR-EA = Capture-R-Test im Eigenanstaz

ID-DCT = direkter Coombs-Test in der Gel-Karte

IgG = Nachweis von Erythrozytenbeladung mit IgG

C3d = Nachweis von Erythrozytenbeladung mit

Komplement

pol = Nachweis von polyvalenter

Humanglobulinbeladung

## 7 Literaturliste

1. W Spielmann, P Köhnl  
Blutgruppenkunde  
Stuttgart, Thieme, 1982
  
2. M Metaxas-Böhler  
Blutgruppen und Transfusion: Theorie und Praxis  
Bern, Huber, 1986
  
3. H Begemann, J Rastetter  
Klinische Hämatologie  
Stuttgart, Thieme, 4. Auflage
  
4. C. Mueller-Eckhardt (Hrsg.)  
Transfusionsmedizin  
Stuttgart, Springer 2. Auflage
  
5. K Landsteiner  
Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes  
Klin Wochenschr 1901;12:1132
  
6. K.J. Reis, R. Chachowski, A. Cupido, D. Davies, J.  
Jakway, T.M. Setcavage;  
Column agglutination technology: the antiglobulin test  
Transfusion 1993;33:639-943
  
7. JA Morton, MM Pickles  
Use of trypsin in the detection of incomplete anti-Rh  
antibodies  
Nature 1947;159:770-781
  
8. WJ Kuhns, A Bailey  
Use of red cells modified by papain for detection of Rh  
antibodies  
Am J Clin Path 1950;20:1067-1069

9. B Pirofski, MEJ Mangum  
Use of Bromelin to demonstrate erythrocyte antibodies  
Proc Soc Exp Biol Med 1959;101:49-52
  
10. B Löw, L Messeter  
Antiglobulin test in low-ionic strength salt solution for rapid  
antibody screening and crossmatching  
Vox Sang 1974;26:53-61
  
11. H Greiling, AM Gressner  
Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie  
Stuttgart, Schattauer, 3. Auflage 1995
  
12. M.L. Scott;  
The principles and applications of solid-phase blood group  
serology  
Transfus Med Rev 1992;1:60-72
  
13. A. Chung, P. Birch, K. Ilagan; Ottawa, Kananda  
A microplate system for ABO and Rh(D) blood grouping  
Transfusion 1993;33:384-388
  
14. H. Eichler, U. Klinge, V. Kretschmer; Marburg  
Gel Test and column agglutination technology - Comparative  
study of two red cell antibody screening and identification  
systems  
Beitr Infusionsther Transfusionsmed 1994;32:149-52
  
15. Y. Lapierre, D. Rigal, J. Adam, D. Josef, F. Meyer,  
J. Jakway, C. Drot;  
The gel test: A new way to detect red cell antigen-antibody  
reactions.  
Transfusion 1990;30:109-113

16. V. Kretschmer, A. Heuckeroth, T. Schulzki, G. Dietrich;  
Superiority of gel centrifugation in antibody screening and identification  
Infusionstherapie 1992;19:226-230
17. E Strobl, J Willenweber  
Beobachtungen bei Antikörperprobe und -differenzierung mit papainisierten Testerythrozyten in der Gelzentrifugationstechnik ID-Microtyping-System®)  
Infusionsther Transfusionsmed 1995;22:25-3
18. ST Lillevang, J Georgsen, T Kristensen  
An Antibody Screening Test Based on the Antiglobulin Gel Technique, Pooled Test Cells and Plasma  
Vox Sang 1994;66:210-215
19. B. Haustein, M. Seifertova; Leipzig  
Rührchentest und Capture-R, eine zuverlässige Kombination im erythrozytären Patienten-Antikörpercreening
20. D. Weisshaar, B. Kreutzig, C. Rapp; Kassel  
Ein neuer Festphasen-Immunoassay der 2. Generation als Poolzellensuchtest
21. G. Simson; R. Lynen; C. Bialek; T. Kloppmann; I. Bargmann; M. Köhler; Göttingen  
Erste Ergebnisse einer prospektiven Studie mit automatisationsfähigen Festphasen- und Söulenagglutinations-techniken beim Screening auf transfusionsrelevante IgG-Antikörper  
Infusionsther Transfusionsmed 1993;20 (suppl 2):25-27
22. A. Schrem, W.A. Flegel; Ulm  
Comparison of Solid-Phase Antibody Screening Test with Pooled Red Cells in Blood Donors  
Vox Sanguinis 1996;71:37-42

23. W. Hitzler, C. Johanson, J. Schömig-Brekner, D. Mathias  
Comparative Study of Antibody Identification in the Gel Centrifugation Test (ID-Microtyping System), Solid Phase System (Solidscreen, Capture R, Ready ID) and Tube Test  
Das ärztliche Laboratorium 1991;37:137-146
24. R. Lynen, C. Bialek, H. Neumeyer;  
Sensitivity and specificity of the capture R test in the screening for red cell antibodies of the IgG class.  
Lab Med 1991;15:248
25. R Stute  
3 Jahre Erfahrung mit dem Capture-R-Solid-Phase-Antikörpersuchtest  
Infusionsther Transfusionsmed 1993;20 (suppl.2):58-60
26. D.L. Stone, R.A. Eatz, S.D. Rolih, S.J. Farlow, G.S. Hudson, L.T.Sinor;  
Red cell antibody identification by solid phase red cell adherence utilizing dried RBC monolayers.  
Immunohematology 1990;6:12-17
27. SA Glantz  
Biostatistik  
The McGraw-Hill Publishing Company, 1998
28. P.D. Issitt, M.R. Combs, S.J. Bredehoeft, M.L. Campbell, M.Heimer, L. Joyner, L. Lorensten, C. Remley, S. Bullock, J. Bumgarner, M. Zakeriniasar, A. Kirkland, H. Melroy, D. Millikin; Durham, North Carolina  
Lack of clinical significance of "enzyme-only" red cell alloantibodies  
Transfusion 1993;33:284-293

29. GF Riedler

"Type and screen": Die immunhämatologische Sicherheit ist gewährleistet und die Kosten werden gesenkt  
Schweiz Med Wochenschr 1996;126:1946-1951

30. R Lynen, E Sindu, E Gallasch

Antikörpersuchtest und Kreuzprobe: Erfahrung bei ausschließlicher Anwendung der LISS-Technik  
Lab med 1989;13:131-135

31. M Cheng

Potent anti-P1 following blood transfusion  
Transfusion 1984;24:183

32. CA Cronin, BA Pohl, WV Miller

Crossmatch compatible blood for patients with anti-P1  
Transfusion 1978;18:728-730

33. L Moltahan, TJ Matulewicz, B Bansal-Carver, EJ Benz

An immediate hemolytic transfusion reaction due to anti-C and an delayed transfusion reaction due to anti-Ce+e:  
hemoglobinemia, hemoglobinuria and transient impaired renal function

Vox Sang 1984;47:348-353

34. P.D. Issitt

Applied Blood Group Serology, Third edition  
Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA 1985

35. FK Widmann

To much pretransfusion testing?  
Transfusion 1993;33:186-188



36. NM Heddle, L Klama, R Frascetto, P O'Hoski, B Leaman  
A retrospective study to determine the risk of red cell  
alloimmunisation and transfusion during pregnancy  
Transfusion 1993;33:217-220
37. SF Garner, A Devenish. H Barber, M Contreras  
The importance of monitoring "enzyme-only" red cell antibodies  
during pregnancy  
Vox Sang 1991;61:219-220
38. BA van Dijk  
lack of clinical significance of "enzyme-only" red cell  
antibodies; letter to the editor  
Transfusion 1993;33:960
39. W.J. Judd, E.A. Steiner, H.A. Obermann, S.J. Nance;  
Michigan/Los Angeles, USA  
Can the reading for serologic reactivity following 37 °C  
incubation be omitted?  
Transfusion 1992;32:304-308
40. VP Shah, BK Gilja  
hemolytic disease of newborn due to anti-Fy(a)  
NY state J of med 1983;83:244-5
41. EL Lee, C Bennett  
Anti-Co(b) causing acute hemolytic transfusion reaction  
Transfusion 1982;22:159-160

## **Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren

Arnold

Aumüller

Basler

Bauer

Baum

Engel

Eschenbach

Ganz

Geus

Griss

Golenhofen

Gotzen

Gressner

Habermehl

Happle

Huffmann

Kern

Kleinsasser

Klenk

Kretschmer

Krieg

Lennarz

Pohlen

Schachtschabel

Schulz

Siegrist

Thomas

Unsicker

## **Danksagung**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Volker Kretschmer für die Themenstellung, die Ratschläge und die Unterstützung meiner Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Thomas Zeiler für die Betreuung während der Versuchsdurchführung und die Korrektur meiner Dissertationsschrift.