

Erste Erfahrungen mit einem Festphasen-Immunoassay für erythrozytäre IgG-Antikörper

W. R. Mayr, H. Gassner, A. Kempkes, D. Mayr, B. Goertz-Kaiser

Institut für Transfusionsmedizin, Klinikum der RWTH, Pauwelsstraße, Aachen

Zusammenfassung:

Es wird über die ersten Erfahrungen mit einem kommerziell erhältlichen Festphasen-Immunoassay berichtet, der zum Nachweis von erythrozytären IgG-Antikörpern oder zur Bestimmung von Membranantigenen an Erythrozyten mit Hilfe von IgG-Antikörpern verwendbar ist. Dieser Test weist im Vergleich zu den Standardhämagglutinationsmethoden zahlreiche Vorteile auf.

Schlüsselwörter:

Festphasen-Immunoassay – erythrozytäre Antikörper – Erythrozytenantigene

Summary:

The first results obtained by using a commercially available solid phase immuno-assay are presented. This test can be used in order to detect IgG antibodies directed against erythrocyte antigens or in order to define the surface antigens of red blood cells with known antisera. Compared with the standard hemagglutination methods, the solid phase immuno-assay has several significant advantages.

Keywords:

Solid phase immuno-assay – erythrocyte antibodies – erythrocyte antigens

Einleitung

Festphasen-Immunoassays setzen sich in der letzten Zeit wegen ihrer Einfachheit, ihrer Empfindlichkeit und des geringen Zeitaufwands, der für den Test benötigt wird, immer mehr durch.

Ein derartiges System (2, 3), das zur Anwendung mit erythrozytären IgG-Antikörpern geeignet ist, wurde von Immucor entwickelt und ist unter dem Namen Capture-R® kommerziell erhältlich. Das Prinzip des Tests ist wie folgt: in einem ersten Schritt werden Erythrozyten über chemische Bindungen als Monolayer auf den Boden einer Mikrotiterplatte mit U-förmigen Kavitäten fixiert, danach werden Sera mit einer LISS-Lösung zugesetzt, 15 min bei 37°C inkubiert und nach mehrmaligem Waschen wird die eventuell erfolgte Fixierung von IgG-Antikörpern an die Erythrozyten mit Indikatorerythrozyten, an deren Oberfläche Anti-IgG gebunden ist, nachgewiesen. Bei einem positiven Resultat sind die Indikatorzellen gleichmäßig und rasenförmig am Boden der Kavitäten ausgebreitet, während bei einem negativen Resultat ein deutlich erkennbares Erythrozytenaggregat in der Mitte des Näpfchens liegt.

Die folgenden Untersuchungen wurden zur Analyse der Qualität des Festphasen-Immunoassays durchgeführt.

Material und Methoden

Capture-R®

Verwendung nach Angaben des Herstellers (Immucor, Norcross, USA).

Erythrozytenproben

Rote Blutkörperchen wurden von gesunden Blutspendern und von Probanden, die bei Paternitätsfällen involviert waren, entnommen. Bei allen Individuen wurden die

Phänotypen mit den üblichen Standardhämagglutinationstechniken bestimmt.

Erythrozytäre Antikörper

Testsera verschiedener Hersteller und Patientensera mit IgG-Antikörpern.

Ergebnisse

Reproduzierbarkeit

12 Blutproben wurden an 2 konsekutiven Tagen mit 12 entsprechend verdünnten Testsera mit IgG-Antikörpern (Anti-D, -C, -c, -E, -e, -C^w, -K, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b und -Lu^a) im Festphasen-Immunoassay ausgewertet. Dabei waren keine diskordanten Resultate zu beobachten.

Empfindlichkeit

Die Titer von 26 Testsera mit IgG-Antikörpern wurden im Festphasen-Immunoassay und in den Standardmethoden (Agglutination im Albuminmilieu oder indirekter Antihumanglobulintest, je nach Spezifität des Antikörpers, nach Angaben der Hersteller der Testsera) mit Hilfe geometrischer Verdünnungsreihen bestimmt. Zweimal waren die Standardmethoden um je eine Titerstufe empfindlicher, einmal waren beide Techniken äquivalent, in den restlichen 23 Untersuchungen wies der Festphasen-Immunoassay eine deutlich höhere Empfindlichkeit auf (im Durchschnitt um 2 Titerstufen).

Auswertung von erythrozytären Erbmerkmalen

Insgesamt wurden 1338 Tests zum Nachweis erythrozytärer Erbmerkmale im Festphasen-Immunoassay und parallel dazu in den Standardmethoden durchgeführt. Für den Festphasen-Immunoassay wurden die Sera in Abhängigkeit von ihrem Titer in dieser Technik vorverdünnt

Tab. 1: Vergleichender Antigennachweis mittels Festphasen-Immunassay und Standardhämagglutination

Antikörper-Spezifität	Antikörper-Verdünnung (FPhI)	++ ¹	FPhI +- ²	vs. -+ ³	StHA -- ⁴	n
Anti-D	1:20	54	0	0	30	84
Anti-C	1:20	44	0	0	40	84
Anti-c	1:15	61	0	0	23	84
Anti-E	1:20	20	0	0	64	84
Anti-e	1:10	76	0	0	8	84
Anti-C ^w	1:15	7	0	0	65	72
Anti-M	1:4	34	0	0	6	40
Anti-N	1:4	26	0	0	14	40
Anti-S	1:4	52	0	0	30	82
Anti-s	1:4	66	0	0	14	80
Anti-K	1:4	14	0	0	70	84
Anti-Fy ^a	1:4	57	0	0	23	80
Anti-Fy ^b	1:4	52	0	0	28	80
Anti-Jk ^a	1:4	59	0	0	21	80
Anti-Jk ^b	1:4	57	0	0	23	80
Anti-Lu ^a	1:2	9	0	0	75	84
Anti-Lu ^b	1:2	71	0	0	1	72
Anti-Co ^b	1:2	4	0	0	40	44

1338

FPhI = Festphasen-Immunassay

StHA = Standardhämagglutinationsmethode

¹ = übereinstimmend positiv

² und ³ = divergierend

⁴ = übereinstimmend negativ

(siehe Tab.1), in der Standardhämagglutination kamen sie unverdünnt zur Anwendung. Die beim Vergleich der Techniken erhaltenen Resultate sind in Tab.1 angegeben. Wie ersichtlich, liegt keine Diskrepanz zwischen beiden Methoden vor.

Interessant ist dabei, daß 2 in Mäusen produzierte monoklonale Antikörper, ein Anti-M und ein Anti-N, auch im Festphasen-Immunassay reagierten, da das Anti-IgG an den Indikatorzellen anscheinend mit den Mäuseantikörpern kreuzreagiert (eine Reaktion der monoklonalen Antikörper mit M- bzw. N-Antigenen der Indikatorerythrozyten konnte durch den Einsatz von unbeladenen roten Blutkörperchen ausgeschlossen werden).

D^u konnte im Festphasen-Immunassay problemlos an Hand der schwächeren Reaktion mit Anti-D-Sera identifiziert werden. Humane Antikörper der Klasse IgM reagierten im Festphasen-Immunassay nicht (Anti-Le^a, -Le^b und -P₁).

Nachweis erythrozytärer Antikörper in Patientensera

19 ausgewählte Patientensera mit IgG-Antikörpern gegen erythrozytäre Merkmale wurden in beiden Methoden analysiert. Die Spezifitäten der Antikörper waren: Anti-D, -C+D (2 Sera), -D+E, -D+K, -D+S, -D+Fy^a, -D+Jk^a, -c+E, -c+K, -c+Fy^a, -E (2 Sera), -K (3 Sera), -S, -M und -Le^a. Auch hier traten keine Diskrepanzen der Befunde auf, im Festphasen-Immunassay waren allerdings wegen der höheren Empfindlichkeit deutlichere und leichter interpretierbare Resultate zu beobachten.

Diskussion

Der Festphasen-Immunassay Capture-R® hat sich in den durchgeführten Auswertungen im Vergleich zu den Standardmethoden bewährt. Die Methode ist reproduzierbar,

rasch durchführbar (Gesamtdauer des Tests mit 96 Reaktionen ca. 40 min, eine eingearbeitete Kraft kann in 8 Std. problemlos mehr als 7000 Reaktionen ansetzen und ablesen), weist eine höhere Empfindlichkeit als die Standardmethoden auf und benötigt sehr geringe Mengen an Reagenzien (50 µl einer 0,3% Erythrozytensuspension zum Herstellen des Monolayers, 50 µl zumeist verdünntes Testserum).

Weitere Vorteile des Festphasen-Immunassays sind in den Tatsachen zu sehen, daß die Ablesung der Reaktionen wesentlich einfacher ist als bei der Hämagglutination (bei letzterer Methode werden schwache Reaktionen von unerfahrenen Untersuchern oft falsch interpretiert) und daß die Mikrotiterplatten nach dem Ende des Tests mindestens 48 Std. für Kontrollablesungen aufbewahrt werden können.

Die Anwendungsgebiete für den Festphasen-Immunassay in der Blutgruppenserologie sind: Bestimmung der erythrozytären Phänotypen mit bekannten Testsera und Nachweis von erythrozytären IgG-Antikörpern in Patientensera. Bei der Bestimmung der erythrozytären Phänotypen können für fast alle Merkmale IgG-Antikörper, die im Festphasen-Immunassay reagieren, ausgewählt werden. Probleme in dieser Beziehung dürften bei Le^a, Le^b und P₁ vorliegen, doch dürften auch für diese Spezifitäten IgG-Antikörper (oder eventuell monoklonale IgG-Antikörper von der Maus, die mit dem Anti-IgG der Indikatorzellen kreuzreagieren) zu finden sein. Bezüglich des Antikörpersuchtests ist die Situation schwieriger, da der Festphasen-Immunassay nur in der Lage ist, IgG-Antikörper nachzuweisen. Obwohl mit dieser Methode sicherlich ein überwiegender Teil der klinisch relevanten erythrozytären Antikörper aufgedeckt werden kann, besteht die Möglichkeit, daß bei alleiniger Verwendung des Festphasen-Immunassays mit Anti-IgG-Indikatorzellen komplementbindenden Antikörper, die unter Umständen zu hämolytischen Reaktionen führen (1), nicht auffindbar sind. Eine Möglichkeit zur Vermeidung dieses Problems wäre die Koppelung von Anti-C3c und eventuell Anti-C3d an die Anti-IgG tragenden Indikatorzellen.

Eigene vorläufige Versuche deuten darauf hin, daß mit Erythrozytenmonolayer beschichtete Mikrotiterplatten längere Zeit bei 4°C aufbewahrt werden können, wodurch es möglich sein dürfte, stets ein Erythrozytenpanel zur Differenzierung von Antikörpern zur Verfügung zu haben. Ebenso können auf diese Weise Erythrozyten mit seltenen Merkmalen für Testzwecke gelagert werden.

Weiter ist es, wie bei allen Mikrotitermethoden, leicht möglich, eine Semiautomatation des Festphasen-Immunassays einzuführen, so daß einer rationellen Durchführung des Tests nichts im Wege steht.

Schrifttum:

1. MOLLISON, P. L., ENGELFRIET, C. P., CONTRERAS, M.: Blood transfusion in clinical medicine, 8th edition, Blackwell, Oxford, 1987.
2. PLAPP, F. V., SINOR, L. T., RACHEL, J. M., BECK, M. L., COENEN, W. M., BAYER, W. L.: A solid phase antibody screen. Am. J. Clin. Pathol. 82, 719-721 (1984).
3. ROLIH, S. D., EISINGER, R. W., MOHENG, M. C., DEAN, W. D., EATZ, R. A.: Solid phase adherence assays: alternatives to conventional blood bank tests. Laboratory Medicine 16, 766-770 (1985).

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. W. R. Mayr
Inst. f. Transfusionsmedizin
Klinikum der RWTH
Pauwelsstraße
5100 Aachen