

Automatisierte HLA-Klasse-II-Typisierung an Bead-separierten B- und unseparierten mononukleären Zellen mit einem PC-gesteuerten Mikroskop-Photometersystem

Automated HLA Class II typing of bead-separated B cells and unseparated mononuclear cells using a PC-based microscope photometer system

Gesine Kögler, P. Wernet, U. Kiesel, J. Enczmann, U. Göbel, H. Th. Brüster

Knochenmarkspender-Register NRW, Zentrale Düsseldorf: Institut für Blutgerinnung und Transfusionsmedizin sowie Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Kinderklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Zusammenfassung:

Durch die Automatisierung der Arbeitsschritte in der HLA-Serologie und die automatische Ablesung der Typisierungsplatten mit einem Personal Computer (PC)-gesteuerten Mikroskop-Photometersystem wurden 34000 freiwillige Knochenmarkfremdsponder von März 1991 bis November 1992 in der Zentrale Düsseldorf des Knochenmarkspender-Registers NRW HLA-Klasse-I (A, B) typisiert. Korrelierend zu dieser hohen HLA-Klasse-I-Typisierungsfrequenz (2000–2500 Typisierungen/Monat) stiegen die Anforderungen für die HLA-Klasse-II (DR-DQ)-Typisierungen unverwandter Knochenmarkspender an das Register. Daher wurde auch für die HLA-Klasse II Serologie eine weitgehende Automatisierung entwickelt, die im Folgenden vorgestellt wird. Zur Gewährleistung einer akkuraten und schnellen serologischen HLA-DR,-DQ-Typisierung wurden isolierte B-Zellen oder unseparierte mononukleäre Zellen in einen Doppelfluoreszenz-zytotoxischen Test eingesetzt. Der Vorteil der B-/T-Zellseparation mit immunomagnetischen Beads liegt in der resultierenden hohen Reinheit von 95–100% der HLA-Klasse-II tragenden B-Zellpräparationen und der erheblichen Reduktion des Zeitaufwandes im Vergleich zur Anreicherung über Nylonwolle. Die automatische Ablesung mit einem PC-gesteuerten Mikroskop-Photometersystem führt neben hoher Präzision der Ablesung zu einer weiteren erheblichen Zeitersparnis; 5–15 Min. pro Platte sind visuell, aber nur 20 sec automatisch gelesen, erforderlich. Erst dadurch werden die praktischen Voraussetzungen für einen hohen Probendurchsatz pro Tag geschaffen. Der Vergleich der HLA-DR,-DQ-Auswertung zwischen automatischer und visueller Ablesung zeigt eine 99%ige Übereinstimmung (Basis 1600 Typisierungen). Die Konkordanz der Ablesung beträgt 93,9%, ermittelt durch den Vergleich der serologischen Einzelreaktionen von 100 definierten DR 72-Well-Platten = 72000 wells, bei denen statistisch eine Crosstabulierung der Scores durchgeführt wurde. Wichtig im Hinblick auf potentiell infektiöses Zellmaterial ist, daß für diese Art der HLA-Klasse II Serologie auch unseparierte B- und T-Zellen, d.h. mononukleäre Zellen eingesetzt werden können. Letzteres Verfahren ist wegen der elektronisch erfolgenden Platten-spezifischen Backgroundermittlung besonders dann geeignet, wenn für die Bestimmung der HLA-DR und HLA-DQ-Allele getrennte Testplatten verwendet werden; sind DR, DQ Seren auf einer HLA-Platte vorhanden, ist die Auswertung aufgrund der unterschiedlichen Serenreaktionen in bezug auf die elektronische Background-Ermittlung für DR und DQ schwieriger.

Schlüsselwörter:

HLA-DR,-DQ-Typisierung – PC-gesteuertes Mikroskop-Photometersystem (Patimed) – Automatisierung der Klasse-II-Serologie

Summary:

By means of automation of the serological working steps and automated reading of typing trays by a PC-based microscope photometer system, 34000 voluntary unrelated bone marrow donors were been HLA-class I (A, B)-typed from March 1991 to November 1992 in the laboratory of the Düsseldorf Center of the Bone Marrow Donor Registry of

North Rhine Westfalia. This high frequency of HLA-class I typing (2000–2500/month) correlates with the increase in the number of requests for HLA-class II (DR, DQ) typing. In order to ensure rapid and accurate DR, DQ typing, either isolated B-cell preparations or unseparated mononuclear cells were employed in the dual color fluorescent cytotoxicity test. The advantage of B/T cell separation with immunomagnetic beads lies in the extreme purity of the isolated B lymphocyte subset (95–100%) and in a noticeable saving of time in comparison to nylon wool-enriched B-lymphocyte preparations. In particular, automated reading of the HLA class II typing trays using a PC-based microscope photometer system results in superior precision as well as further considerable saving of time. Thus the effective reading time has been reduced from 5–15 min per tray (visual) to 20 sec. This, furthermore, provides the prerequisite for the high frequency of typings per day. The direct comparison of HLA-DR, DQ typing between automated and visual reading shows a very high degree of reliability (99%, basis 1600 DR, DQ typings). The concordance of both readouts (visual and by automatic microscope) is 93.9%. This calculation is based on the comparison of the serological scores of 100 defined DR72 well trays equaling 72000 wells, which were examined for consistency on a score-by-score basis, and by cross-tabulation of these data. The fact that unseparated B and T cells, i. e. mononuclear cell can also be employed directly for the automated reading of class II typing trays, is of particular importance in regard to infectious cell material, e. g. from HIV positive individuals. The automatic microscope sets an electronic tray specific sensitivity standard with respect to HLA-DR and -DQ typing. This methodological variation is particularly effective when separate trays are used for the DR and DQ reading. Reading by the automatic microscope, however, becomes complicated because of the different sera reactions for DR and DQ, if DR and DQ specific sera are on the same tray, sharing their positive and negative control reactions.

Keywords:

HLA DR,DQ typing – PC-based microscope photometer system (Patimed) – Automated HLA class II serology

Einleitung

Die Anreicherung von B-Zellen über Nylonwolle (1) und der Zweifarbenfluoreszenztest wurden bereits früher für die serologische Definition der HLA-Klasse-II-Antigene und zur Ermittlung HLA-DR-spezifischer Seren eingesetzt (2). Durch Vartdal et al. (3, 4) wurde 1986 mit der Verwendung immunomagnetischer Beads eine neue Technik der T-/B-Zellseparation in die HLA-Serologie eingeführt. Parallel dazu entwickelten Naipal et al. (5) einen Einfarbenfluoreszenztest mit Propidiumjodid zur Bestimmung der HLA-DR, MB, MT Antigene auf unseparierten mononukleären Zellen und deren Ablesung mit dem automatischen Mikroskop. Letzterer wurde von Rubinstein (6) und Bruning (7, 8) wieder zu einem Zweifarbenfluoreszenztest modifiziert, um so mononukleäre Zellen ohne Trennung von B- und T-Zellen für die HLA-DR, DQ-Serologie verwenden zu können. Die Voraussetzung hierfür ist eine automatische Ablesung, da das Auge Reaktionsunterschiede bei der HLA-DR,-DQ-Typisierung auf der Basis mononukleärer Zellen wegen des geringen relativen Anteils an B-Zellen (5–15%) nicht eindeutig differenzieren kann. Aufgrund der hohen Zahl an HLA-Klasse-I-Typisierungen und der dadurch zwangsläufig steigenden Anfragen für eine HLA-DR,-DQ-Typisierung potentieller Knochenmarkfremdspender, war im HLA-Labor der Düsseldorf Spenderzentrale des Knochenmarkspender-Registers NRW eine Anpassung der Automatisierung der HLA Klasse II-Serologie für den großen Probendurchsatz mit höchster Qualitätsanforderung sinnvoll.

Material und Methoden

Blutabnahme und Aufarbeitung des Blutes

Von den freiwilligen Knochenmarkspendern wurden 5 bis 50 ml Blut in 10-ml-Glas-Vacutainer-Systemen mit Acid-Citrat-Dextrose (ACD, Verhältnis Blut:ACD 10:1) oder Heparin (Becton Dickinson) abgenommen. 1 ml Blut wurde für die spätere molekularbiologische HLA-DR Oligonukleotidtypisierung bei –20°C asserviert. Das restliche Blut wurde 1:2 mit PBS (pH 7,4) verdünnt, nach Standardprotokoll auf Ficoll (Dichte 1,077) überschichtet, zentrifugiert (20 min, 830 g) und 3x mit PBS gewaschen (10 min, 230 g).

Einfrieren der mononukleären Zellen

Wenn aus Kapazitätsgründen des Labors nicht sofort eine HLA-DR, DQ-Bestimmung durchgeführt werden konnte, bzw. mehr mononukleäre Zellen als für den eigentlichen Test benötigt, vorhanden waren, wurden die Zellen wie folgt eingefroren: Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden in 0,5 ml 50% (v/v) FCS/RPMI) aufgenommen, mit 0,5 ml 22% (v/v) DMSO/RPMI (kalt 4°C) versetzt und sofort in Kryoröhrchen bei –80°C tiefgefroren.

Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Ampullen mit mononukleären Zellen wurden direkt im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension in 1 ml

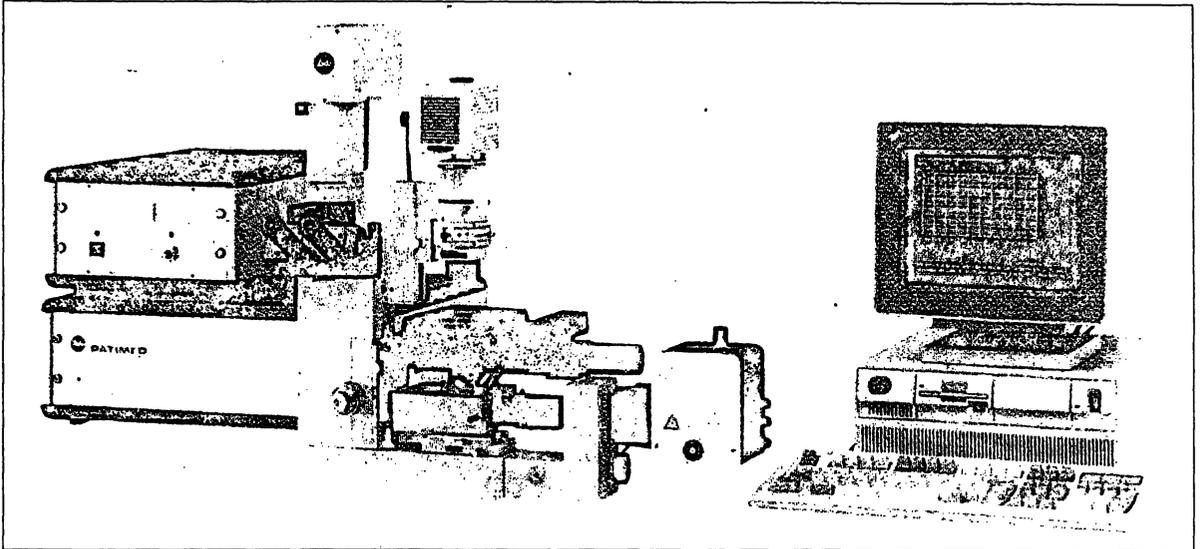


Abb. 1: PC-gesteuertes Mikroskop-Photometersystem (Fa. Leica, Wetzlar)

50% (v/v) FCS in RPMI überführt, mit 7 ml 15% (v/v) FCS in RPMI aufgefüllt und 10 Min. bei 225 g gewaschen. Nach diesem letzten Waschschritt in PBS (pH 7,4) sind die Zellen für die HLA-Klasse II-Typisierung vorbereitet.

Herstellung der Reagenzien für die Doppelfluoreszenz

a) *Carboxy-Fluoresceindiacetat (C-FDA)*: Es wird eine Auswertung der jeweiligen Charge 5/6-Dicarboxyfluoresceindiacetat oder 5-Dicarboxyfluorescein-diacetat (Fa. Sigma) vor Beginn des eigentlichen Testes empfohlen. C-FDA muß lichtgeschützt behandelt und aufbewahrt werden. 100 mg C-FDA (grüner Fluoreszenzfarbstoff) werden in

einem Glasgefäß tropfenweise mit Aceton (p.a.) versetzt und so lange geschüttelt, bis die Lösung klar ist. Die minimale Menge Aceton (40–60 Tropfen für 100 ml) sollte verwendet werden. Das Gefäß mit gelöstem C-FDA wird auf Eis mit 100 ml kalter PBS versetzt, in 2-ml-Glas-Beckman-Röhrchen aliquotiert und bei -30°C eingefroren.

b) *Herstellung der Hämoglobin-Lösung (Quench und Stopp-Reagenz)*: 100 g lyophilisiertes Hämoglobin (Hämoglobin bovine, Sigma) wurden in 1000 ml 5% EDTA-PBS gelöst und 15 min bei 20000 g abzentrifugiert. Das Hämoglobin wurde aliquotiert bei -30°C eingefroren.

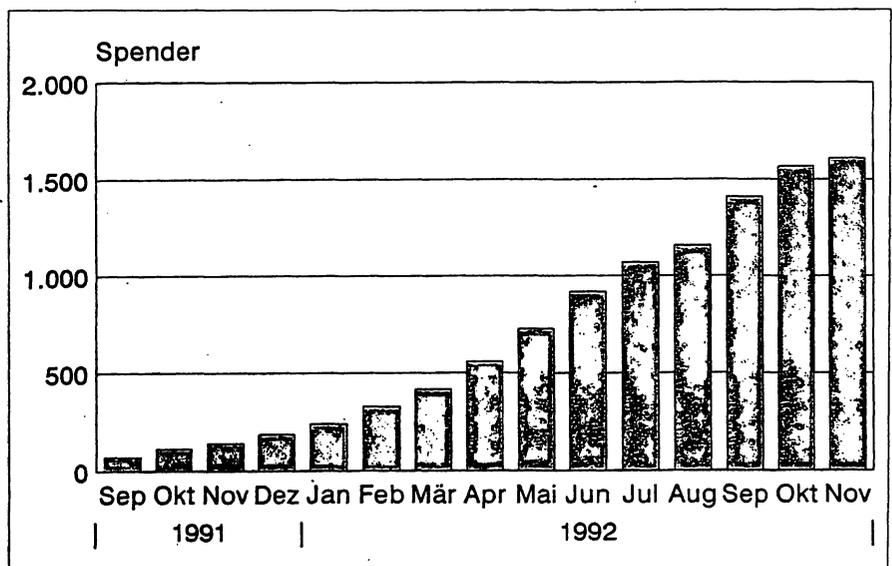


Abb. 2: Kumulative Zunahme der HLA-DR-Typisierungen im Knochenmarkspender-Register Düsseldorf

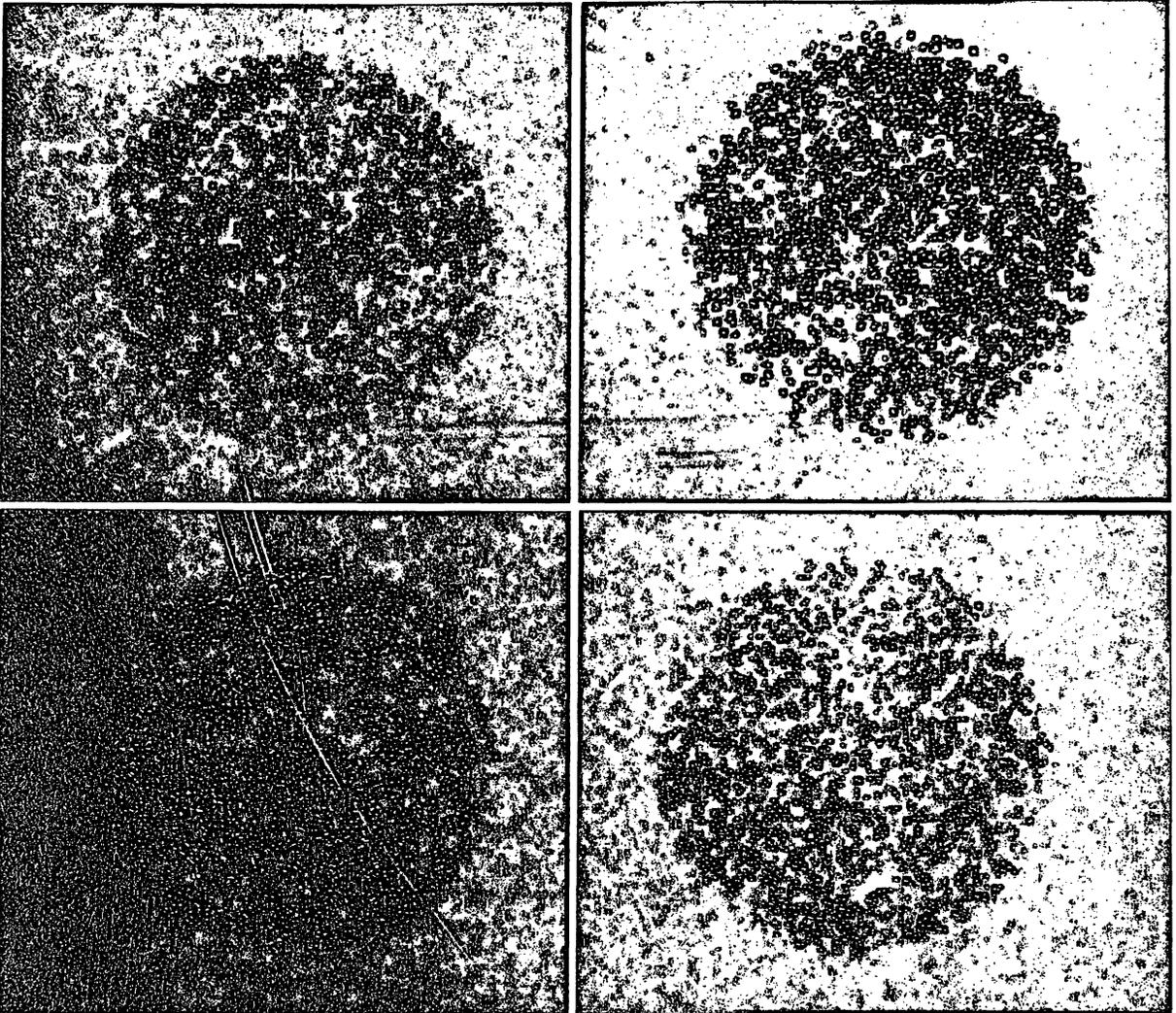


Abb 3 Charakteristisches Beispiel einer C-FDA, PJ-Färbung mit Immunobeads angereicherten B-Zellen

- a) oben links Negativkontrolle, Score 1
 b) oben rechts 25% rote (tote Zellen), Score 2
 c) unten links 45-50% rote Zellen, Score 4
 d) unten rechts Positivkontrolle, 100% rote Zellen, Score 8

c) Herstellung der Propidiumjodid (PJ)-Lösung: 50 mg Propidiumjodid (Fa. Sigma) wurden in 50 ml PBS gelöst.

d) Herstellung der Ink-PJ-Albumin-EDTA-Lösung als Quench- und Stoppreagenz: Propidiumjodid (PJ) wurde als Stocklösung zu 1 mg/ml in 5% Na_2EDTA angesetzt. Die Quenching-Ink (Higgins Black India oder Leitz-Ink) muß im Verhältnis 1:3 mit dest. Wasser durch Wägung verdünnt werden.

e) Staining-Quenching-Lösung: 10g Rinderserumalbumin (Cohn fraction V, Sigma Nr. 4503) wurde in 100 ml EDTA (4,9%, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,0) gelöst. Anschließend

wurde 2 ml PJ-Stocklösung und 1 ml Ink-Lösung zugegeben und bei -20°C aufbewahrt.

f) Immunomagnetische Beads: Die Dynabeads M450 (Fa. Dynal, Hamburg) sind gekoppelt mit einem monoklonalen Antikörper gegen die HLA-Klasse II- β -Kette erhältlich. Das Produkt wurde in 0,1% BSA, 0,01% Natriumazid aufbewahrt. Zur B-/T-Zelltrennung wurde der Magnetic Particle Concentrator (MPC 6, Fa. Dynal) verwendet.

g) HLA-Platten: Für die HLA-DR, DQ-Serologie wurden routinemäßig die DR-72-Well-Platten der Firma BMT Laborprodukte, Krefeld, eingesetzt.

Perfektion in Vollendung



Das vollkommene Analysenteam von Behring! Hepatitis-B-Reagenzien und ELISA-Prozessoren.

Das Analysenteam bietet:

- Die vollständige Hepatitis-B-Palette, Enzygnost® HB_s Ag monoclonal, Anti-HB_s micro, Anti-HBc monoclonal, Anti-HBc IgM, HBe, Anti-HBe in bewährter Behring Qualität und höchster Präzision.
- Flexibilität in der Anpassung an das Labor durch unterschiedliche Analyser für alle Serienlängen.
- Enorme Sicherheitsvorteile durch Barcode-Identifizierung von Mikrotitrationsplatten, Einzelriegeln und Reagenzien.
- Vereinfachtes Handling durch weitgehende Automatisierung und geringe Zahl an Arbeitsschritten.

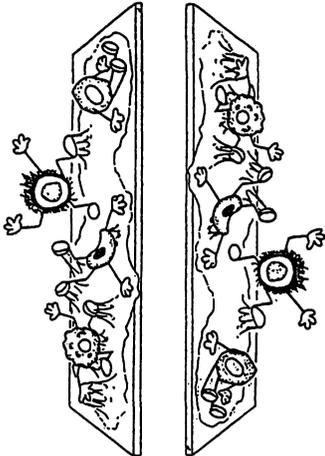
Behringwerke AG
Postfach 11 40, 3550 Marburg/Lahn

Behringwerke AG
Med. Information und Verkauf
Postfach 1212
6237 Liederbach 1



Adhäsions- objekträger

Zur Verankerung lebender
Zellen ohne Verlust von
Antigenität und Funktionalität.



- Ideal zur Untersuchung von
 - Oberflächenantigenen
 - Intrazellulären Antigenen
 - Immuncytochemischen Methoden
 - Morphologischen Eigenschaften
- Geeignet für verschiedenste Techniken
- Dauerhafte Dokumentation

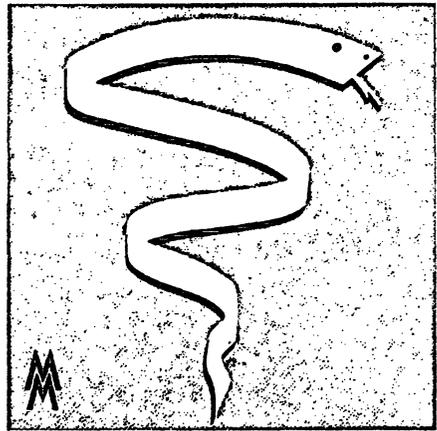
**Fordern Sie Ihr kostenloses
Muster an:**

Telefon (089) 31 88 41 48

BIO-RAD

**BIO-RAD
Laboratories GmbH**

Klinische Diagnostik
Heidemannstraße 164
D-8000 München 45
Telefon (089) 31 88 41 40
Telefax (089) 31 88 41 00



Fachmesse und Kongreß

EUROMED '93

mit **Ärztlichem Fortbildungskongreß**

*Trotz Schulden ruhig schlafen:
effektive Praxis- und
Krankenhausorganisation*

*Die EUROMED '93 als führende medizinische
Fachmesse der neuen Bundesländer bietet
umfassende Information. Ihr Messebesuch in
Leipzig schafft die ideale Entscheidungs-
grundlage für Investition und Organisation
in Praxis, Klinik und Labor.*

*Für Ihre Fortbildung: der 2. Ärztliche Fortbil-
dungskongreß mit den Schwerpunkten:
Gesundheitsreformgesetz, ambulante Krebs-
behandlung/Vorsorge, psychosomatische
Krankheitsbilder und Geriatrie. Fordern Sie
das ausführliche Kongreßprogramm an.*

23.-26. APRIL 1993
Leipzig, Messengelände

Leipziger Messe GmbH
Postfach 720, Markt 11-15, O-7010 Leipzig

Tab. 1: Cross-Tabulierung der Anzahl der Scores mit visueller und automatischer Ablesung

Automat. score	visueller Score					
	Negativ		Positiv			nicht bewertbar
	1	2	4	6	8	9
1	4279	68	46	31	9	0
2	205	206	83	61	11	0
4	64	21	122	124	88	0
6	34	7	23	228	277	0
8	8	4	6	37	1060	0
9	5	0	0	0	0	3

h) Benötigte Blutmenge für die DR/DQ-Bestimmung mit immunomagnetischen Beads: Bei Gesunden sind 10 bis 20 ml Blut ausreichend, wenn die HLA-Klasse I- und die HLA-DR,-DQ-Typisierungen direkt durchgeführt werden. In Extremfällen (bei Säuglingen oder Kleinkindern) ist die HLA-DR,-DQ-Typisierung mit der hier vorgestellten Methode aus nur 4 bis 5 ml Blut möglich. Die nach der B-Zellseparation übriggebliebenen mononukleären Zellen (meist T-Zellen) können unmittelbar für die HLA-Klasse I-Typisierung weiter verwendet werden. 20 ml sind eine routinemäßig praktikable Blutmenge, wobei die restlichen mononukleären Zellen für eine mögliche Nachtypisierung eingefroren werden können.

Separation der B-Zellen mit immunomagnetischen Beads, Durchführung des Zytotoxizitätstestes

a) Vorbereitung der Reagenzien und Materialien für die B-Zellanreicherung: Die Aufbereitung der Zellen erfolgte in nicht-silikonisierten Glasröhrchen auf Eis bzw. mit vorgekühlten Lösungen. Die Beads (70 µl pro Probe) wurden vor der Verwendung mit kaltem 0,1% BSA/PBS einmal am Magneten gewaschen und in 100 µl kaltem PBS aufgenommen. Die C-FDA-Gebrauchslösung (250 µl C-FDA-StammLösung/5 ml PBS) wurde frisch angesetzt.

b) Separation der B-Zellen: Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden 10 Min. bei 230 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Zellpellet resuspendiert und danach in 2,5 ml 0,6% Natriumcitrat-Lösung aufgenommen. Die HLA-Klasse II-Beads (100 µl pro Probe) wurden mit den suspendierten Zellen 4 Min. in Eis inkubiert, wobei durch Drehen der Röhrchen die Zellsuspension vorsichtig durchmischt wurde. Nach zweiminütiger Verweildauer der Glasröhrchen im MPC-6, wurde der Überstand (zu 90% T-Zellen, NK-Zellen) in ein neues Glasröhrchen pipettiert. Das Waschen der Zellen erfolgte am Magneten. Für den ersten Waschvorgang wurden 2,5 ml 0,6% Na-Citrat-PBS verwendet, dabei wurde die Pipette gegen die Röhrchenwand gehalten, um ein langsames Auftropfen auf die Zell-Bead-Suspension zu gewährleisten. Nach nochmaligem Waschen mit 2 ml PBS und Abpipettieren des Überstandes ist die HLA-Klasse II-positive B-Zellpopulation für die Markierung mit C-FDA vorbereitet.

c) Markierung der Bead-gekoppelten B-Zellen mit C-FDA: 5 ml C-FDA-Lösung wurden zu den an die Beads gekoppelten Zellen gegeben, danach 12 min bei Raumtempera-

Antigen	+/+	+/-	-/+	-/-
DR1	36	0	0	64
DR2	23	0	0	77
DR15	21	0	0	79
DR3	25	0	0	75
DR17	15	0	0	85
DR4	26	0	0	74
DR5	25	0	0	75
DR11	21	0	0	79
DR12	4	0	0	96
DR6	20	0	0	80
DR13	10	4	0	86
DR14	6	0	0	94
DR7	19	0	0	81
DRw8	6	0	0	94
DRw9	1	0	0	99
DRw10	1	0	0	99
DQw1	77	0	0	23
DQ6	28	0	0	72
DQw2	32	0	0	68
DQw3	47	0	0	53
DQ7	32	0	0	68
DQw4	5	0	0	95
Σ DR	182	4	0	818
Σ DR	161	0	0	239
Σ DR/DQ	343	4	0	1057

+/+, Antigen visuell und automatisch bestimmbar; +/-, Antigen visuell aber nicht automatisch bestimmbar; -/+, Antigen nicht visuell aber automatisch bestimmbar; -/-, Antigen weder visuell noch automatisch bestimmbar

tur im Dunkeln inkubiert. Das Röhrchen mit der Zellsuspension wurde anschließend für 2 min in den MPC-6 Konzentratoren gestellt, zweimal mit PBS am Magneten gewaschen und die an Beads gekoppelten Zellen in 100 µl 10% FCS/RPMI aufgenommen. Die Einstellung und Kontrolle der Zellzahl muß in jedem Fall mikroskopisch überprüft werden; dies wird aufgrund der Markierung der lebenden Zellen mit C-FDA erleichtert. Im Bedarfsfall kann mit FCS/RPMI-Lösung verdünnt werden. Besonders genau muß die Beadkonzentration überprüft werden. Diese darf nicht zu hoch sein, da sonst eine Ablesung mit dem Patimed-Mikroskop kritisch ist. Die eingestellte Zell-Bead-Suspension wird dann mit Hamilton-Spritzen auf die HLA-DR 72-Platte aufgetragen und für 30 Min. abgedunkelt mit den Antiseren inkubiert. Im nächsten Schritt werden 6 µl Komplement pro Well ohne Farbstoffe, oder Komplement mit Propidiumjodid (100 µl Propidiumjodid (PJ) auf 5 ml Komplement) zugegeben. Es folgt eine 60minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Wenn das Komplement kein PJ enthält, wird die Reaktion mit 6 µl Ink-PJ-Albumin-EDTA durch vorsichtiges Aufsetzen der Tropfen mit einer Multidispenserspritze abgestoppt. Alternativ kann dafür auch Hämoglobin verwendet werden, wenn in der Komplementlösung bereits PJ enthalten ist.

HLA-Klasse-II-Typisierung ohne Trennung der B- und T-Zellen

Die Isolierung der mononukleären Zellen, das Einfrieren und Auftauen der Zellen erfolgt wie oben beschrieben.

Wild-Leitz PATIMED V4.2

HLA - Results

17-11-92 13:54:04

Cell-no Tray-Name L-controls H-controls Techn Delta Operator L-median H-median
 1586 1586 5 / 5 5 / 5 DS 50 INGE 230 574
 5 / 5 5 / 5 50 165 332

	A				B				C				D				E				F			
1	302 NS	21X	234	41X	677 ABS	130X	170	3X	557 ABS	103X	192	-7X	703 ABS	117X	159	2X	475 DR1	71X	315	90X	372 DR1	41X	297	79X
	2				8				8				8				1				2			
2	224 DR2	-2X	256	54X	296 DR2	19X	240	45X	237 DR1,10,103	2X	275	66X	280 DR1,10,103	15X	252	52X	255 DR1,103	7X	270	63X	230 DR1	0X	220	33X
	1				2				1				2				1				1			
3	224 DR2	-2X	256	54X	301 DR15	21X	275	66X	280 DR15	15X	287	73X	260 DR15	9X	242	46X	424 DR3	56X	243	47X	436 DR3	60X	197	19X
	1				2				1				1				6				6			
4	483 DR4	74X	204	23X	551 DR4	93X	214	29X	381 DR18	44X	268	62X	317 DR18	25X	261	57X	565 DR3	97X	244	47X	641 DR3	119X	201	22X
	6				6				4				2				6				8			
5	436 DR4	60X	217	31X	475 DR4	71X	199	20X	275 DR11	13X	285	72X	350 DR11	35X	312	88X	331 DR11	29X	329	98X	287 DR11	17X	225	36X
	6				6				1				2				2				2			
6	277 DR9,14	14X	287	73X	303 DR7,9	21X	270	63X	263 DR7	10X	281	69X	407 DR7	51X	290	75X	357 DR7	37X	323	95X	280 DR11	15X	305	84X
	1				2				1				2				2				1			
7	288 DR9	17X	277	67X	296 DR10	19X	271	63X	333 DR10	30X	312	88X	331 DR8	29X	305	84X	296 DR8	19X	299	80X	124 DR8,12	-31X	156	-5X
	1				2				2				2				1				1			
8	320 DR14,5,8	26X	305	84X	295 DR13,3,11	19X	261	57X	263 DR13,8	10X	332	100X	279 DR13	14X	308	86X	271 DR12	12X	364	119X	278 DR12	14X	347	109X
	2				2				1				1				1				1			
9	424 DR3,13,14	56X	229	38X	416 DR3,13,14	54X	220	33X	463 DR52	68X	196	19X	456 DR52	66X	183	11X	466 DR52	69X	178	8X	427 DR52	57X	186	13X
	4				6				6				8				8				8			
10	347 DQ6	34X	267	61X	320 DQ6	26X	223	35X	272 DQ1	12X	227	37X	252 DQ1	6X	239	44X	427 DR53	57X	175	6X	442 DR53	62X	199	20X
	2				1				2				1				8				6			
11	362 DQ2	38X	182	10X	360 DQ2	38X	165	0X	361 DQ2	38X	172	4X	380 DQ3	44X	167	1X	365 DQ3	39X	181	10X	376 DQ3	42X	157	-5X
	6				8				8				8				6				8			
12	345 DQ4	33X	215	30X	246 DQ4	5X	253	53X	332 DQ7	30X	209	26X	242 DQ7	3X	253	53X	346 DQ7	34X	222	34X	514 DQ3	100X	299	80X
	4				1				4				1				4				4			

HLA-Typ: DR1, DR4, DQw1, DQw3

Abb. 4: Beispiel eines Computerausdrucks für eine HLA-DR,DQ-Typisierung an Bead-separierten B-Zellen und automatischen Ableseung durch das Leitz Patimed-System

Nach dem Auftauprozess werden die Zellen für 30 min bis 2 Std. in 50% FCS/RPMI bei 37°C inkubiert, zweimal in PBS gewaschen und in 1 ml C-FDA (250 µl Stammlösung auf 5 ml PBS) aufgenommen. Danach erfolgt eine zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Diese Markierungsreaktion wird mit 10% FCS/RPMI-Lösung abgestoppt. Die Zellen werden dann nochmals zwei-

mal in 10% FCS/RPMI gewaschen und auf eine Zellzahl von 12000/µl eingestellt. Nach diesem Schritt werden sie mit einem Lambda Jet Gerät (BmT Laborprodukte) auf die HLA-DR-72 Well-Platten aufgebracht und 1 Stunde mit deren Antiseren inkubiert. Danach werden mit Hilfe des Lambda Dot Gerätes 6 µl Komplement pro Well auf die HLA-Platten zugegeben und für 1,5 Std. inkubiert. Das Ab-

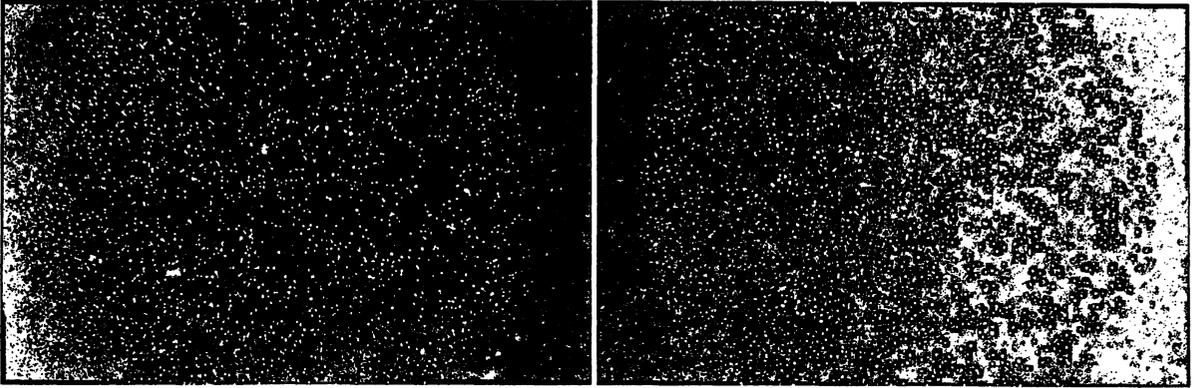


Abb. 5: Charakteristisches Beispiel einer C-FDA, PJ-Färbung von unseparierten mononukleären Zellen und automatische Ablesung mit dem Leitz Patimed-System

a) links Negativkontrolle, Score 1

b) rechts Positivkontrolle (anti-B-Zellserum), 15% tote (rote Zellen)

stoppen der Reaktion erfolgt mit einem Gemisch aus Ink-BSA-PJ und EDTA. Die so hergestellten HLA-Platten können nun mit dem Patimed automatisch abgelesen werden. Visuelles Ablesen ist bei dieser Methode nicht möglich.

Das automatische Mikroskop

a) **Systembeschreibung:** Für die automatische Ablesung wurde ein PC-gesteuertes Mikroskop-Photometersystem (Patimed der Firma Leica, Wetzlar) verwendet (Abb. 1). Apparative Details des Systems sind bei Wernet et al. (10) beschrieben. Mit Hilfe von zwei Filterblocksystemen für die Fluoreszenzillumination (L3 für C-FDA, also grün markierte lebende Zellen, und N2 für EB oder PJ, also rot markierte tote Zellen) wird die Lichtemission von EB oder PJ und C-FDA getrennt über einen Photomultiplier gemessen.

b) **Kontrollsystem:** Aus fünf auf der HLA-Platte vorhandenen Negativkontrollen (eine Negativkontrolle = Normalserum und vier negative Reaktionen) und fünf positiven Kontrollen (ein anti-B-Zell-spezifisches Serum (ABS) als B-Zellkontrolle, ein Anti-Lymphozytenserum (ALS) und drei starke positive Reaktionen auf der aktuellen Platte) wurden Mediane für die 72-Well-Platte elektronisch kalkuliert, welche als Referenzwerte für die Normierung der prozentualen Zytotoxizität benutzt werden.

c) **Auswertung:** Anhand der Positivkontrolle (ALS oder ABS) wird die Intensität der Halogenlampe des inversen Mikroskopes so eingestellt, daß ein Wert von 500–600 mV erreicht wird. Durch den „Double Scan“ des Patimed-systems (erster Scan mißt die mit PJ oder EB gefärbten, also rot leuchtenden, Zellen; zweiter Scan mißt die mit C-FDA gefärbten, also grün leuchtenden Zellen) erhält man 144 verschiedene Intensitätswerte gemessen in Millivolt (mV). Mit einem Algorithmus werden über den Computer aus dem Median der fünf Positivkontrollen (= 100%

Zytotoxizität) und dem Median der fünf Negativkontrollen (= 0% Zytotoxizität) alle anderen mV-Werte dieser Prozentskala zugeordnet. Wie bereits bei Wernet et al. (10) beschrieben, erfolgt die Berechnung der Ergebnisse mit anschließender Konvertierung in serologische Scores (Abb. 5) durch folgende Formel:

$$\% \text{ PJ-Werte} / \% \text{ PJ-Werte} + \% \text{ CFDA-Werte} \times 100\% = \% \text{ Zytotoxizität}$$

Für die automatische Beurteilung wurden Scores entsprechend denen für die visuelle Betrachtung verwendet: 1 bis 20% = 1, 21 bis 40% = 2, 41 bis 60% = 4, 61 bis 80% = 6, 81 bis 100% = 8.

Ergebnisse

Anzahl der HLA-Klasse II-Typisierungen

Aufgrund der anwachsenden Zahl HLA-Klasse I-typisierter freiwilliger Knochenmarkfremdspender konnten bei aktuellen Anfragen immer häufiger HLA-AB-identische Spender gefunden werden. Entsprechend stiegen die Folgeanfragen einer HLA-DR,-DQ-Typisierung immer mehr. Die Abb. 2 zeigt die monatliche Zunahme an HLA-DR, DQ-Typisierungen potentieller Spender.

Zur Prüfung der Verlässlichkeit der Automatisierung wurde ein Vergleich der HLA-DR,-DQ-Typisierung zwischen automatischer Ablesung und visueller Auswertung an 1600 Individuen durchgeführt. Die HLA-DR,-DQ-Typisierung wurde hierfür an Bead-separierten B-Zellen durchgeführt. Die Abb. 3 zeigt die optimale Verteilung der Zellen sowie die für eine Ablesung mit dem automatischen Mikroskop notwendige C-FDA/PJ-Färbung. Die visuelle Beurteilung ist für a: Score 1, für b: Score 2, für c: Score 4, für d: Score 8. Die visuelle Beurteilung kann mit dem automatischen Mikroskop bestätigt werden.

Abb. 4 zeigt einen Computerausdruck einer automatisch abgelesenen HLA-DR,-DQ-Typisierung. Mit dem Patimed-

Wild-Leitz PATIMED V4.2

HLA - Results

17-11-92 13:54:04

Cell-no Tray-Name L-controls H-controls Techn Delta Operator L-median H-median
 1586 1586 5 / 5 5 / 5 DS 50 INGE 230 574
 5 / 5 5 / 5 50 165 332

	A				B				C				D				E				F			
1	302 NS	21%	234	41%	677 ABS	130%	170	3%	557 ABS	103%	192	-7%	703 ABS	117%	159	2%	475 DR1	71%	315	90%	372 DR1	41%	297	79%
	2				8				8				8				1				2			
2	224 DR2	-2%	256	54%	296 DR2	19%	240	45%	237 DR1,10,103	2%	275	66%	280 DR1,10,103	15%	252	52%	255 DR1,103	7%	270	63%	230 DR1	0%	220	33%
	1				2				1				2				1				1			
3	224 DR2	-2%	256	54%	301 DR15	21%	275	66%	280 DR15	15%	287	73%	260 DR15	9%	242	46%	424 DR3	56%	243	47%	436 DR3	60%	197	19%
	1				2				1				1				6				6			
4	483 DR4	74%	204	23%	551 DR4	93%	214	29%	381 DR18	44%	268	62%	317 DR18	25%	261	57%	565 DR3	97%	244	47%	641 DR3	119%	201	22%
	6				6				4				2				6				8			
5	436 DR4	60%	217	31%	475 DR4	71%	199	20%	275 DR11	13%	285	72%	350 DR11	35%	312	88%	331 DR11	29%	329	98%	287 DR11	17%	225	36%
	6				6				1				2				2				2			
6	277 DR9,14	14%	287	73%	303 DR7,9	21%	270	63%	263 DR7	10%	281	69%	407 DR7	51%	290	75%	357 DR7	37%	323	95%	280 DR11	15%	305	84%
	1				2				1				2				2				1			
7	288 DR9	17%	277	67%	296 DR10	19%	271	63%	333 DR10	30%	312	88%	331 DR8	29%	305	84%	296 DR8	19%	299	80%	124 DR8,12	-31%	156	-5%
	1				2				2				2				1				1			
8	320 DR14,5,8	26%	305	84%	295 DR13,3,11	19%	261	57%	263 DR13,8	10%	332	100%	279 DR13	14%	308	86%	271 DR12	12%	364	119%	278 DR12	14%	347	109%
	2				2				1				1				1				1			
9	424 DR3,13,14	56%	229	38%	416 DR3,13,14	54%	220	33%	463 DR52	68%	196	19%	456 DR52	66%	183	11%	466 DR52	69%	178	8%	427 DR52	57%	186	13%
	4				6				6				8				8				8			
10	347 DQ6	34%	267	61%	320 DQ6	26%	223	35%	272 DQ1	12%	227	37%	252 DQ1	6%	239	44%	427 DR53	57%	175	6%	442 DR53	62%	199	20%
	2				1				2				1				8				6			
11	362 DQ2	38%	182	10%	360 DQ2	38%	165	0%	361 DQ2	38%	172	4%	380 DQ3	44%	167	1%	365 DQ3	39%	181	10%	376 DQ3	42%	157	-5%
	6				8				8				8				6				8			
12	345 DQ4	33%	215	30%	246 DQ4	5%	253	53%	332 DQ7	30%	209	26%	242 DQ7	3%	253	53%	346 DQ7	34%	222	34%	574 DQ3	100%	299	80%
	4				1				4				1				4				4			

HLA-Typ: DR3, DR4, DQw2, DQw3

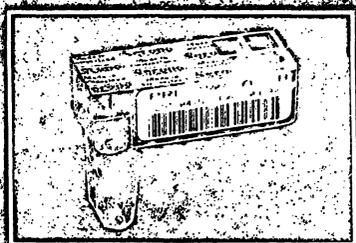
Abb. 6: Beispiel eines Computerausdrucks für eine HLA-DR,DQ-Typisierung aus unseparierten mononukleären Zellen

System wurde hier eine DR-72-Well-Platte (DR72, BMT-Laborprodukte) ausgewertet. In den Feldern des Computerausdrucks sind die HLA-DR und DQ-Antigene mit den dazugehörigen Scorewerten dargestellt. Die „Cell-No“ 343 entspricht der Labornummer der Fremdsponder-typisierung. Unter dem „Tray-Name“ wird sowohl das Tray (DR72) als auch die Probennummer (343) abgelegt. Die unter L (low)-controls and H (high)-controls gezeigten

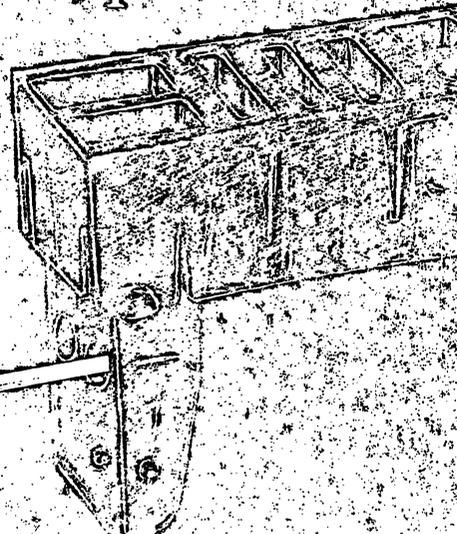
Werte belegen, inwieweit die geforderten Kontrollen auch tatsächlich auf dem Tray vorhanden sind. Der Deltawert (50) gibt an, inwieweit Abweichungen vom Median der Positiv- und Negativkontrollen akzeptabel sind.

Qualität der Anreicherung der B-Zellen mit Dynabeads Die routinemäßig in unserem Labor verwendete HLA-DR72 Well-Platte besitzt ein internes Kontrollsystem für

CSRI



Diagnostische Transparenz:
jederzeit, schnell, präzise.



**Das EIA-Testsystem
der neuen Generation**

- Vollständig automatisierter Testablauf
- flexibel durch freie Wahl des Analysenverfahrens
- simultane Bearbeitung von Miniserialen, Einzelproben jederzeit
- ansorgerte Datenverarbeitung
- kompaktes Tischformat

Tests aus den Bereichen:

- Fertilität
- Schwangerschaft
- Schilddrüse
- Stoffwechsel
- Tumormarker



In Deutschland:
Serono Diagnostika GmbH
Merzhauser Straße 134
W-7800 Freiburg
Tel. Zentrale (0761) 4 01 67-0
Telefax (0761) 4 01 67 70

In Österreich:
Serono Diagnostika GmbH
Informationsbüro Wien
Driesterweggasse 13
A 1110 Wien
Telefon 02 22 8 91 61 18
Telefax 02 22 8 91 03 57



Kongreß für Laboratoriumsmedizin

32. Tagung
der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin



Stuttgart 10.–12. Mai 1993
Kultur- und Kongreßzentrum Liederhalle

Programm (ganztägige Symposien)

- * **Labormedizin in Europa**
gemeinsam mit der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC)
- * **Pathobiochemie und Analytik der Spurenelemente**
gemeinsam mit der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente (GMS)
- * **Pathobiochemie der Kohlenhydratstoffwechselstörungen**
gemeinsam mit der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG)
- * **Immunhämatocytologie**
gemeinsam mit der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO)
- * **Präthrombotische Marker und Thrombophilie**
gemeinsam mit der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH)
- * **Molekularbiologische Infektionsdiagnostik**
gemeinsam mit der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)

Ausstellung

Während des gesamten Kongresses findet im Foyer eine umfangreiche wissenschaftliche Poster-Ausstellung der Industrie statt

Tagungspräsident

Prof. Dr. med. Jürgen D. Kruse-Jarres, Präsident der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Katharinenhospital Stuttgart, Telefon (07 11) 2 78-48 00, Telefax (07 11) 2 78-48 09

Organisation

Zietemann GmbH Ausstellungs- und Kongreßorganisation, Obere Gaß 6, 7500 Karlsruhe 41, Telefon (07 21) 47 34 67, Telefax (07 21) 47 30 75

den Nachweis von B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, Granulozyten sowie Gesamt-T-Zellen. Wie an der Positivkontrolle (Position 1B, anti-B-Zellserum) in der Abb. 5 dokumentiert, konnte für die B-Zellen eine 100%ige Anreicherung (29 mV für C-FDA entspricht 0% lebende Zellen, entspricht Score 8) erreicht werden. Die anderen Kontrollen für T-Zellen, Granulozyten und Monozyten waren im Gegensatz dazu eindeutig negativ (Score 1). Generell lag die Anreicherung nie unter 95%. Die Abbildung belegt, daß die HLA-DR,-DQ-Typisierung eindeutig mit DR1, DR4, DRw53, DQw1, DQw3 ablesbar ist.

Vergleich zwischen visueller und automatischer Ablesung

99% der Typisierungen waren visuell als auch automatisch auswertbar, wobei die gute Serenqualität (36 Antiseren, davon bis auf drei alle monospezifisch sowie 36 monoklonale Antikörper) wesentlich war. Die serologischen Scores wurden für den Vergleich der zwei Techniken auf Konkordanz (Basis 100 DR-Typisierungen) überprüft. Die Cross-Tabulierung dieser Score-Werte ist in der Tab 1. gezeigt. Diese Scores wurden in die positiven oder negativen Äquivalente konvertiert, so daß daraus folgende Kontingenztafel resultiert:

+/+ = 1602, +/- = 324, -/+ = 82 -/- = 5184;
die Konkordanz beträgt 93,9%.

Der HLA-Phänotyp wurde an 100 Testzellen basierend auf serologischen Scores der Antiseren bestimmt. Die Ergebnisse des Vergleichs sind in Tabelle 2 dargestellt. Diskrepanzen wurden nur in der Beurteilung der Reaktionsstärke des DRw13 monoklonalen Antikörpers in 4/100 Fällen festgestellt. Hierbei ergibt die visuelle Beurteilung einen höheren Score als die automatische Ablesung (z.B. visuell 6, automatisch 2 oder 4). Prinzipiell wurden die DRw13-Antigene aufgrund der DQw6-Assoziation bzw. deutlich positiver Reaktion des DRw13-monoklonalen Antikörpers bestimmt. Die Definition der DR6-Splits war nicht möglich, wenn die Kombination DRw15/DR6 sowie DR1/DR6 vorlag, da DQw6 dann nicht eindeutig bestimmbar bzw. in Assoziation mit DRw15 vorlag. DRw13 konnte auch in der Kombination DR4/DR6 DQw1, DQw3 nicht eindeutig bestimmt werden, da das Antiserum DQw6 auch eine Reaktion mit DQw3 aufweist. Insgesamt können 14 DR-Spezifitäten direkt bzw. 18 durch entsprechenden Ausschluß mit dem hier eingesetzten DR-72 Tray (Abb. 4) erfaßt werden.

HLA-Klasse II-Typisierung ohne Trennung der B- und T-Zellen

Diese Methode wurde eingesetzt, wenn Nachtypisierungen aus eingefrorenen mononukleären Zellen notwendig wurden oder wenn potentiell infektiöses Zellmaterial vorhanden war. Die zu 3–20% aus B-Zellen und zu 3–10% aus Monozyten bestehenden mononukleären Zellen wurden in den Zytotoxizitätstest eingesetzt, wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Abb. 5 zeigt eine Negativkontrolle (0% Zytotoxizität, Abb. 5a) und eine Positivkontrolle (15% Zytotoxizität, Abb. 5b). Die positiven Serenreaktionen liegen zwischen 10 und 15% Zytotoxizität. Mit dem Auge ist so ein differenziertes Lesen des Prozentsat-

zes Zytotoxizität unmöglich. Auf der Basis der Doppelmarkierung mit C-FDA und PJ und der automatischen Ablesung können die Differenzen zwischen 0 und 20% eindeutig als mV-Daten (Intensitätswerte) gemessen und in Scoredaten konvertiert werden (Abb. 6). Diese Berechnung ist nur auf der Basis des Kontrollsystems möglich. Eine Voraussetzung für die problemlose Auswertung ist, daß keine anti-T-Zellseren oder anti-Lymphozyten-Seren (ALS) auf den HLA-Trays vorhanden sein dürfen, da durch diese hervorgerufene überstarke Reaktionen (mV-Daten) das Kontrollsystem stören würden. Kommerziell erhältliche Platten, die sowohl ALS als auch anti-T-Zellseren enthalten, sind deshalb nur bedingt verwendbar. Die qualitativ beste Messung kann erfolgen, wenn getrennte Trays für HLA-DR- und DQ-Seren verwendet werden, da die Reaktionen der Zellen mit DR- und DQ-Seren unterschiedlich sind.

Diskussion

Korrelierend zu der hohen HLA-Klasse I-(HLA-A,B)-Typisierungsfrequenz (2000–2500 pro Monat) steigt die Anzahl der Anfragen für die HLA-Klasse II-(HLA-DR,-DQ)-Typisierung unverwandter HLA-A,-B-identischer Knochenmarkspender an das Register. Zur Gewährleistung einer exakten und schnellen serologischen HLA-DR,DQ-Typisierung wurde auf der Basis eines Doppelfluoreszenztestes und der automatischen Ablesung mit einem PC-gesteuerten Mikroskop-Photometersystem das Ablesen jeder einzelnen kommerziell verfügbaren HLA-DR72 Well-Platte von 5–15 Min. auf 20 Sek. reduziert. Die Resultate der HLA-DR, DQ-Typisierung mit isolierten B-Zellen zwischen automatischer und visueller Ablesung zeigen, daß hinsichtlich der Auswertung eine 99%ige Übereinstimmung vorliegt. Die Qualität der Beurteilung der Reaktionsstärke mit der automatischen Ablesung ist mit der visuellen vergleichbar und in kritischen Fällen – da objektiver – sogar überlegen. Die Cross-Tabulierung der Anzahl der Score-Werte, die mit visueller und automatischer Ablesung ermittelt wurde, führte zur Ermittlung einer 93,9%igen Konkordanz der Ablesung. Eine Konkordanzrate von über 90% wird generell als gute Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse eines qualitativen Testindikators angesehen (11). Die Basis der Cross-Tabulierung sind 100 DR, DQ-Typisierungen, die randomisiert alphabetisch ausgewählt wurden, insgesamt wurden so 72000 Wells qualitativ analysiert. Die Konkordanz der Ablesung liegt geringfügig über der von Naipal et al. (5) angegebenen von 91,7%, die jedoch dort mit der Methode unseparierter mononukleärer Zellen durchgeführt wurde. Die Reinheit der Bead-separierten B-Zellen mit über 95%, mit denen die Konkordanzberechnungen in unserem Testsystem durchgeführt wurden, ist demnach ein Vorteil für die Ablesung. Die Methode der unseparierten mononukleären Zellen ist für die HLA-DR,-DQ-Bestimmung besonders dann problemlos geeignet, wenn für die Bestimmung der HLA-DR und HLA-DQ-Allele getrennte Testplatten verwendet werden, oder Testplatten, bei denen kein ALS oder anti-T-Zellserum vorhanden ist. Dieses Verfahren ist vorteilhaft, wenn primär nur eine geringe Blutmenge zum Testen zur Verfügung steht, wie z.B. bei Kleinkindern oder wenn infektiöse Blutproben bearbeitet werden müssen, wie z.B. bei Hepatitis- oder HIV-

Infizierten. Der entscheidende Nachteil hier ist jedoch, daß kommerziell verfügbare HLA-Typisierungsplatten nur bedingt eingesetzt werden können. Die entscheidenden Vorteile der automatischen Ablesung für die DR-Serologie sind außer der erheblichen Zeitersparnis, daß Lese- und Schreibfehler, die bei der manuellen Auswertung auftreten können, vermieden werden und die Leseanstrengungen für das Auge wegfallen.

Literatur:

1. Lowry, R., Goguen, J., Carpenter, C. B., Strom, T. B., Garavoy, M. R. (1979) Improved B-cell typing for HLA-DR using nylon wool column enriched B-lymphocyte preparations. *Tissue Antigens* 14, 325-330.
2. Wernet, P. (1976) Human Ia-Type Alloantigens: Methods of Detection, Aspects of Chemistry and Biology, Markers for Disease States. *Transplant. Rev.* 30, 271.
3. Vartdal, F., Gaudernack, G., Funderud, S., Brattlie, A., Lea, T., Ugelstad, J., Thorsby, E. (1986) HLA class I and II typing using cells positively selected from blood by immunomagnetic isolation - A fast and reliable technique. *Tissue Antigens* 28, 301-312.
4. Lea, T., Vartdal, F., Davies, C., Ugelstad, J. (1985) Magnetic monosized polymer particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells. *Scand. J. Immunol.* 22, 207-216.
5. Naipal, A. M. I. H., D'Amato, J. D., Bruning, J. W., van Leeuwen, A., van Rood, J. J. (1984) Automated reading of Propidium Iodide lymphocytotoxicity tests for HLA-DR, MB, MT-typing. *Tissue Antigens* 24, 302-306.
6. Rubinstein, P., Walker, M. E., Swope, E., Rothman, W., Calahan, T., Siegel, J., Genzer, M. (1986) Serology for automated cytotoxicity testing. II. Routine reading of HLA-typing using the Contrast Fluorescence Test. *Tissue Antigens* 27, 209-216.
7. Bruning, J. W., Claas, F. H., Kardol, M. J., Landsbergen, Q., Naipal, A. M., Tanke, H. J. (1982) Automated Reading of HLA-A,B,C-Typing and Screening. The Propidium Iodide (PJ) method. *Human Immunology* 5, 225.
8. Bruning, J. W. (1989) Automated reading of lymphocytotoxicity assay. Typing and Screening for HLA class I and II. Use of Dynabead separated cells. The 32nd Japan Histocompatibility Meeting, 15-16.
9. Parleviet J., Niteriak, J. G., Larsen-Nyhus, E., Fylling-Jensen, O., Bruning, J. W., Claas, F. H. J. HLA class I and class II typing using immunomagnetically isolated lymphocytes. Submitted to *J. Immunol. Methods*.
10. Wernet, P., Kögler, G., Kiesel, U., Enczmann, J., Flohr, M., Sarnowski, A., Gilgen, B., Göbel, U., Brüster, H. Th. (1992) Automatisierte HLA-Klasse-I-Typisierung mit dem Leitz-Patimed-System für die Etablierung eines großen Knochenmark-Fremdspender-Registers. *GIT Labor-Medizin* 15, 5-13.
11. Dannehl, K., Baur, M. P. (1983) Diagnostische und prognostische Testanforderungen aus biostatistischer Sicht. *Gynäkologie* 16, 177-187.

Danksagung:

Besonderen Dank für exzellente technische Hilfe schulden wir unseren Labormitarbeiterinnen M. Flohr, A. Helmy, I. Kubitzky und A. Sarnowski. Für die methodische Unterstützung danken wir Dr. H. Bruning und Dr. F. Claas (Dept. Immunohematology and Blood Bank, University Hospital, Leiden). Frau T. Theurer-Maier verdient besondere Anerkennung für ihren unermüdlischen Einsatz bei der Bewältigung organisatorischer Probleme. Eine expertische Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde von Herrn Dannehl (Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf) durchgeführt. Wir sind Herrn Verwaltungsdirektor Glasow für die wertvolle Unterstützung bei der Beschaffung der Laborräume für das Knochenmarkspender-Register sehr zu Dank verpflichtet.

Für die unermüdlige Unterstützung durch die „Elterninitiative Kinderkrebsklinik Düsseldorf e.V.“, insbesondere Frau U. Zappey und Herrn H. Herrmanns, sowie des „Verein zur Unterstützung krebskranker Kinder e.V. Viersen“, insbesondere Herrn J. Schürgers, sagen wir unseren herzlichsten Dank.

Korrespondierender Autor:

Peter Wernet
Medizinische Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität
Knochenmarkspender-Register NRW
Zentrale Düsseldorf
Moorenstraße 5
4000 Düsseldorf 1



Behringwerke AG
Postfach 11 40, 3550 Marburg/Lahn

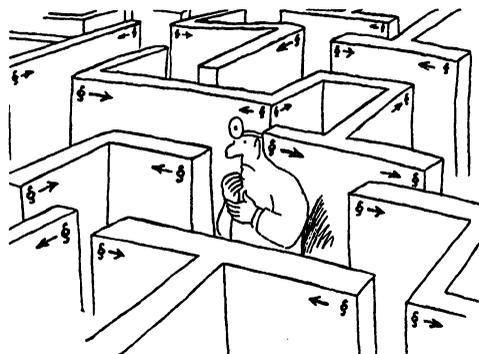
Behringwerke AG
Med. Information und Verkauf
Postfach 12 12
6237 Liederbach/Ts. 1



Vorankündigung

Lieber Doktor, kennen Sie alle Antworten?

> Gibt es ein spezielles Erbrecht für Ärzte und Zahnärzte? > Vertragsarzt stirbt – dürfen die Erben die Praxis fortführen? > Erben auch Schwiegerkinder und geschiedene Ehepartner? > Ehepartner verstorben – erbt der überlebende Ehepartner alles? > Welche erbrechtlichen Vorteile hat die Gütertrennung? > Können die Kinder den überlebenden Ehepartner zwingen, die Familienimmobilie zu veräußern? > Wann erbt der Staat? > Pflichtteil – stets Geldanspruch? > Wie sichert man den überlebenden Ehepartner durch ein Testament? > Wie errichtet



man ein eigenhändiges Testament? > Die Enterbung von gesetzlichen Erben – zulässig? > Nichteheleliche Lebensgemeinschaft – empfiehlt sich die Errichtung eines Testaments? > Nach dem Ableben eines Arztes – was ist aus rechtlicher Sicht zu tun? > Praxisübernahme – darf die Patientenkartei dem Erwerber der Praxis übergeben werden? > Schulden geerbt – arm durch Erbschaft? > Ein offenes Wort zum Thema „Schwarzgeld“ – wird „Schwarzgeld“ auch vererbt? > Nach dem Erbfall – Hochsaison für Betrüger? > Hohe Praxisschulden – haftet der Ehepartner kraft Gesetzes?

Nein? Dann bestellen Sie

Nentwig/Osmers Erbrecht für Ärzte und Zahnärzte

Verlag Kirchheim + Co GmbH, Postfach 2524, W-6500 Mainz 1

- Ich bestelle Expl. Erbrecht für Ärzte und Zahnärzte, Erscheinungstermin Herbst 1993, ca. 250 Seiten, ca. 165,- DM
 Bitte senden Sie mir nähere Informationen zu Erbrecht für Ärzte und Zahnärzte – Erben, Vererben, Testieren.

Name:

Straße: PLZ/Ort:

Datum: Unterschrift: