

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin, Zentrum für Innere Medizin
Leiter : Professor Dr. med. Volker Kiefel

Methoden zum HLA- Klasse- I- Antikörpernachweis im Vergleich

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Gundula Löwe
geboren in Görlitz
aus Rostock

Rostock, 2011

Dekan: Professor Dr. med. Emil Christian Reisinger

Dekan: Professor Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke, Universität Rostock,
Medizinische Fakultät, Institut für Immunologie
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Ulrich Sachs, Justus-Liebig- Universität Gießen,
Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
3. Gutachter: Prof. Dr. Volker Kiefel, Universität Rostock, Medizinische
Fakultät, Abteilung für Transfusionsmedizin

Datum der Einreichung: 03.08.2011

Datum der Verteidigung: 04.04.2012

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	Seite
1.1 Das HLA- System	6
1.1.1 genetischer Aufbau von HLA- Antigenen	7
1.1.2 Domänenstruktur und Funktion von HLA- Molekülen	8
1.1.3 Nomenklatur	12
1.1.4 Nachweismethoden	15
1.2 HLA- Antikörper	
1.2.1 HLA- Antikörperbildung	15
1.2.2 Kreuzreaktivität von HLA- Antikörpern	17
1.2.3 klinische Bedeutung von HLA- Antikörpern	18
1.2.4 Nachweismethoden von HLA- Antikörpern	23
1.3 Fragestellung	25
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Probanden und Serumgewinnung	26
2.2 MAIPA- Assay – monoclonal antibody immobilization of platelet antigens	26
2.3 LCT – Lymphozytotoxischer Test	30
2.4 LIFT – Lymphozytenimmunfluoreszenztest	32
2.5 Lymphozytenisolierung	35
2.5.1 für LCT- Lymphozyten	35
2.5.2 für LIFT- Lymphozyten	36
2.6 weitere Verfahren	37
2.7 statistische Verfahren	38
3. ERGEBNISSE	
3.1 Patientengruppe	
3.1.1 Patienten: allgemeine Daten	39
3.1.2 Ergebnisse Patienten	39
3.2 Spenderinnengruppe	
3.2.1 Spenderinnen: Verteilung- Alter, Schwangerschaften, Bluttransfusionen	43
3.2.2 Ergebnisse Spenderinnen Gruppe 2	45
3.2.3 Ergebnisse Spenderinnen Gruppe 3	47

4. DISKUSSION	55
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. THESEN	66
7. LITERATURVERZEICHNIS	67
8. TABELLENVERZEICHNIS	75
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	76
10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
11. LEBENSLAUF	
12. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	78
13. DANKSAGUNG	79

1. Einleitung

1.1 Das HLA- System

Humanes Leukozytenantigen-System (HLA- System, HL- Antigene, engl. human leukocyte antigens) ist die Bezeichnung für den humanen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), die bei allen Vertebraten Gene mit immunologischen und nicht- immunologischen Funktionen umfasst. Die Entdeckung der sogenannten Transplantationsantigene hatte ihren Ursprung in tierexperimentellen Untersuchungen zur Gewebeübertragung bei Mäusen Anfang der 50er Jahre. Hier zeigte sich, dass Hauttransplantate zwischen genetisch nicht identischen Tieren abgestoßen wurden [1]. 1954 legte Jean Dausset den Grundstein für die systematische Analyse des humanen HLA- Systems. Er stellte fest, dass das Serum polytransfundierter Patienten Antikörper aufwies, die die Leukozyten anscheinend agglutinieren [2]. Dausset beschrieb weiterhin 1958 mit dem „Mac“ das erste Leukozytenantigen, welches heute als HLA- A2 bekannt ist [3]. Weitere Studien erfolgten vor allem in der Arbeitsgruppe von van Rood, bei denen 1963 die Antigene 4a und 4b (HLA- Bw4 und Bw6) entdeckt wurden [4].

Das HLA- System ist jedoch nicht nur in der Transplantationsimmunologie von Bedeutung. Durch ihre Funktion als Antigenpräsentation nehmen die MHC- Moleküle eine zentrale Rolle in der Erkennung und Unterscheidung von ‚selbst‘ und ‚nicht- selbst‘ sowie der Aktivierung spezifischer Abwehrmechanismen ein. Dies geschieht sowohl bei der Prägung des Immunsystems als auch in der Auseinandersetzung mit Proteinantigenen, die fremder Herkunft (allogen) oder körpereigen (autolog) sein können [5]. Ein wesentliches Merkmal der antigenspezifischen zellulären Immunantwort ist die Notwendigkeit zur Prozessierung und Präsentation eines Antigens. Dies wird durch die Haupthistokompatibilitätsantigene als antigenpräsentierende Moleküle erreicht. Um eine antigenspezifische Immunantwort auszulösen, ist hierzu die Aktivierung von antigenspezifischen T- Zellen notwendig. T- Zellen können jedoch nur Proteinantigene erkennen, wenn sie diese als Proteinfragmente (Peptide) zusammen mit dem MHC- Molekülen von den antigenpräsentierenden Zellen auf deren Zelloberfläche angeboten bekommen. Das Phänomen des ternären Komplexes zur Antigenerkennung bestehend aus MHC- Molekül mit dem daran gebundenen Antigen und mit dem antigenerkennenden T- Lymphozyten- Rezeptor wird als MHC- Restriktion bezeichnet. Unterschiedliche MHC- Moleküle sind dazu fähig eine umschriebene Anzahl an unterschiedlichen Peptiden zu binden. Damit wird ein Repertoire an Antigenen festgelegt, welches den T- Zellen dargeboten wird. Noch vor der Erkennung des Antigens durch den T- Zell- Rezeptor findet somit eine Determinantenselektion statt. [6, 7, 8]

1.1.1 Genetischer Aufbau von HLA- Antigenen

Das HLA- System ist in einem Komplex auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert (6p21.1 – 6p21.3). In diesem Komplex liegen die für die Klassen I – III gehörigen Genabschnitte. Telomerwärts des Komplexes befindet sich die Region der HLA- Klasse- I- Gene. Die HLA- Klasse- II- Gene liegen zentromer des HLA- Komplexes. Zwischen diesen Genorten befindet sich der Abschnitt, der historisch als Klasse III bezeichnet wurde. In diesem Bereich werden neben Genen, die für Komplementfaktoren kodieren auch Gene des Tumornekrosefaktors, der Hitzeschockproteine sowie der Steroid- 21- Hydroxylasen gefunden (Abb. 1.1) [9].

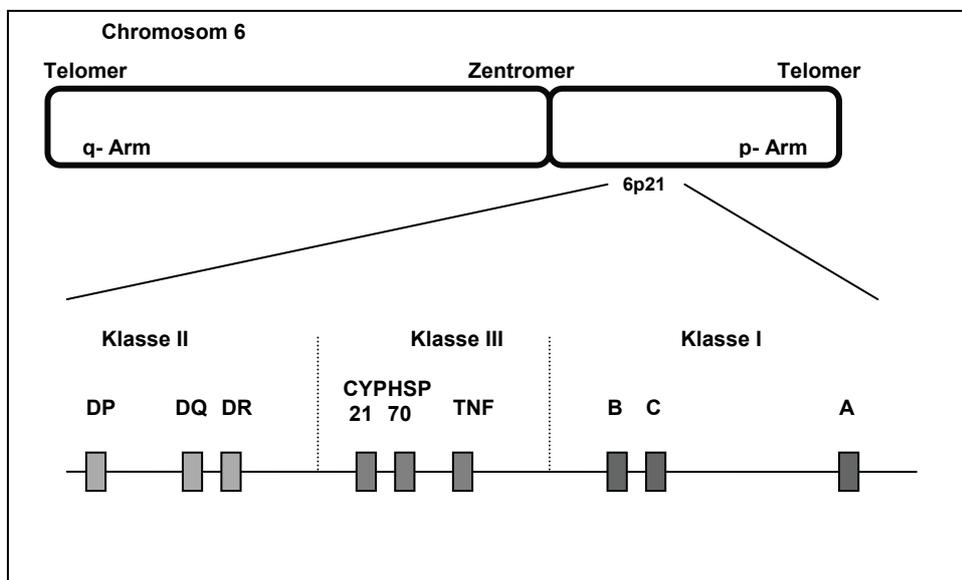


Abbildung 1.1: Chromosom 6, Lokalisation der HLA- Genorte (modifiziert nach [10])

Die Genprodukte des MHC weisen einen extrem ausgeprägten Polymorphismus auf. Dies spiegelt die zentrale Rolle des Systems im gesamten Immunsystem wieder. Da wie oben genannt sämtliche zu präsentierende Proteinfragmente an die Antigenbindungsstelle gebunden werden müssen, muss sichergestellt werden, dass die Bindung strukturell unterschiedlicher Proteinfragmente gewährleistet werden kann. Hierzu stehen jedem Individuum zwei verschiedene Klassen von HLA- Molekülen mit ihrerseits mehreren Genorten (Isotypen) zur Verfügung.

Im Jahr 1968 teilten Kissmeyer- Nilsen et al. in seiner Arbeit mit, dass zwei HLA- Loci existieren, HLA- A und HLA- B [11]. Weitere Studien zeigten damals, dass diese eng miteinander verknüpft sind und aus mindestens sieben bis acht Allelen bestehen müssen. Die Existenz des HLA- C- Genort wurde Anfang der 70er Jahre von der Arbeitsgruppe Solheim et al. nachgewiesen [12, 13]. Es werden demnach im Bereich des HLA- Klasse- I

die drei Genorte HLA- A, -B und -C unterschieden, die die klassischen, serologisch definierten Antigenpezifitäten kodieren. Weiterhin unterscheidet man HLA- E, -F und -G, die ebenfalls funktionell aktive Klasse- I- Moleküle exprimieren, jedoch als nicht- klassische HLA- Klasse- I- Gene bezeichnet werden. HLA- E besitzt eine wichtige Funktion bei der Regulation der Aktivität der Natürlichen Killerzellen, daher wird HLA- E auf nahezu allen Zellen exprimiert. Bei HLA- F erscheint die Funktion bislang unklar, es konnte bisher nur eine Expression auf extravillösen Trophoblastzellen nachgewiesen werden. Hier wird auch HLA- G produziert, welches eine Rolle bei der maternalen Toleranz gegenüber dem ‚semiallogenen‘ Feten / Embryo aufweist. Es existiert für HLA- G eine membranständige und lösliche Form. Als Pseudogene werden die Genorte für HLA- H, -J, -K, -L, -N, -S, -X und -Z bezeichnet, für die bisher noch keine Genprodukte identifiziert wurden [5].

Innerhalb der Klasse- II- Region können verschiedene Subregionen unterschieden werden, HLA- DR, -DQ und -DP. In diesen Regionen werden jeweils ein bzw. mehrere α - sowie β Kettengene kodiert. Zugleich befinden sich hier andere Gene, deren Genprodukte unter anderem an der Assoziation von Peptid und MHC- Molekül oder der Antigenprozessierung beteiligt sind (HLA- DM und -DO).

1.1.2 Domänenstruktur und Funktion von HLA- Molekülen

HLA- Klasse- I - und -II- Moleküle unterscheiden sich trotz großer äußerer Ähnlichkeiten in Aufbau, Gewebeverteilung und Funktion voneinander.

Die HLA- Klasse- I- Moleküle sind Heterodimere, die aus einer schweren polymorphen α - Kette von 44 kDa und einer leichten extrazellulär gelegenen β - Kette von 12 kDa, dem β 2- Mikroglobulin bestehen. Die schwere Kette besteht aus einem intrazellulären, transmembranen und extrazellulärem Abschnitt, wobei der extrazelluläre Anteil aus drei Domänen (α 1, α 2 und α 3) besteht. Die α - und β - Ketten gehen eine nicht- kovalente Bindung ein (Abb. 1.2). Erstmals wurde dies 1987 anhand des HLA- A2- Moleküls von Bjorkman et al. präsentiert [14, 15].

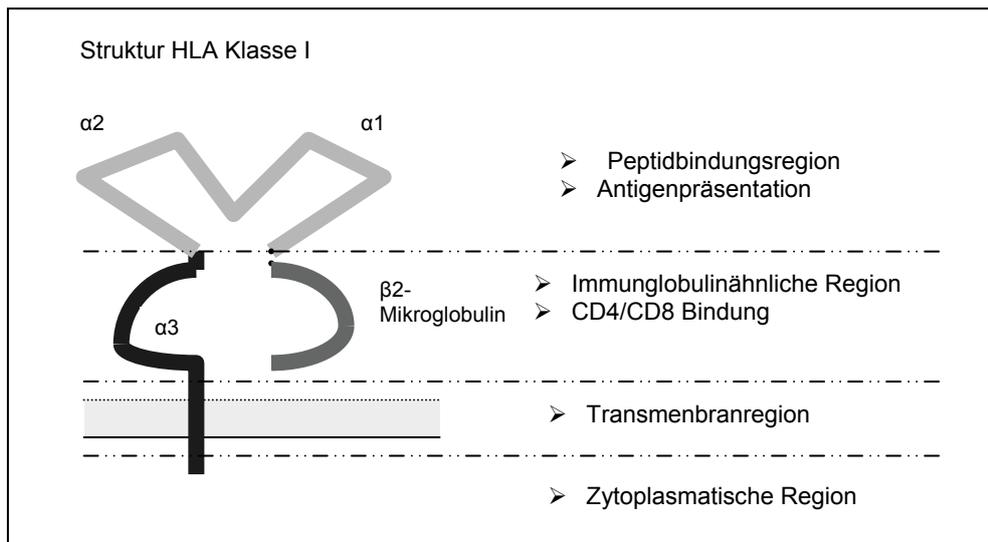


Abbildung 1.2: Struktur des HLA- Klasse- I- Moleküls (modifiziert nach [5])

Klasse- I- Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen sowie Thrombozyten exprimiert, mit Ausnahme von Trophoblasten der Plazenta, Spermien und neuronalen Zellen im Gehirn [16].

HLA- I- Moleküle werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Hier können sie dann auf endogene, d.h. innerhalb der Zelle gebildete Antigene oder virale Proteine treffen, die zuvor durch Proteasomen im Zytoplasma in kleine Peptide zerlegt worden sind. Diese bestehen aus ca. 8- 13 Aminosäuren [8], die nun an entsprechende Antigen- bindende Regionen der MHC- Moleküle heften. Passen MHC- Molekül und Peptid zusammen, wird dieser Komplex an die Zelloberfläche befördert und den CD8+- T- Zellen präsentiert. Diese können bei Aktivierung durch den MHC- I- Peptidkomplex die Sekretion von lytischen Enzymen bewirken und damit die exprimierende Zelle lysieren (Abb. 1.3) [14].

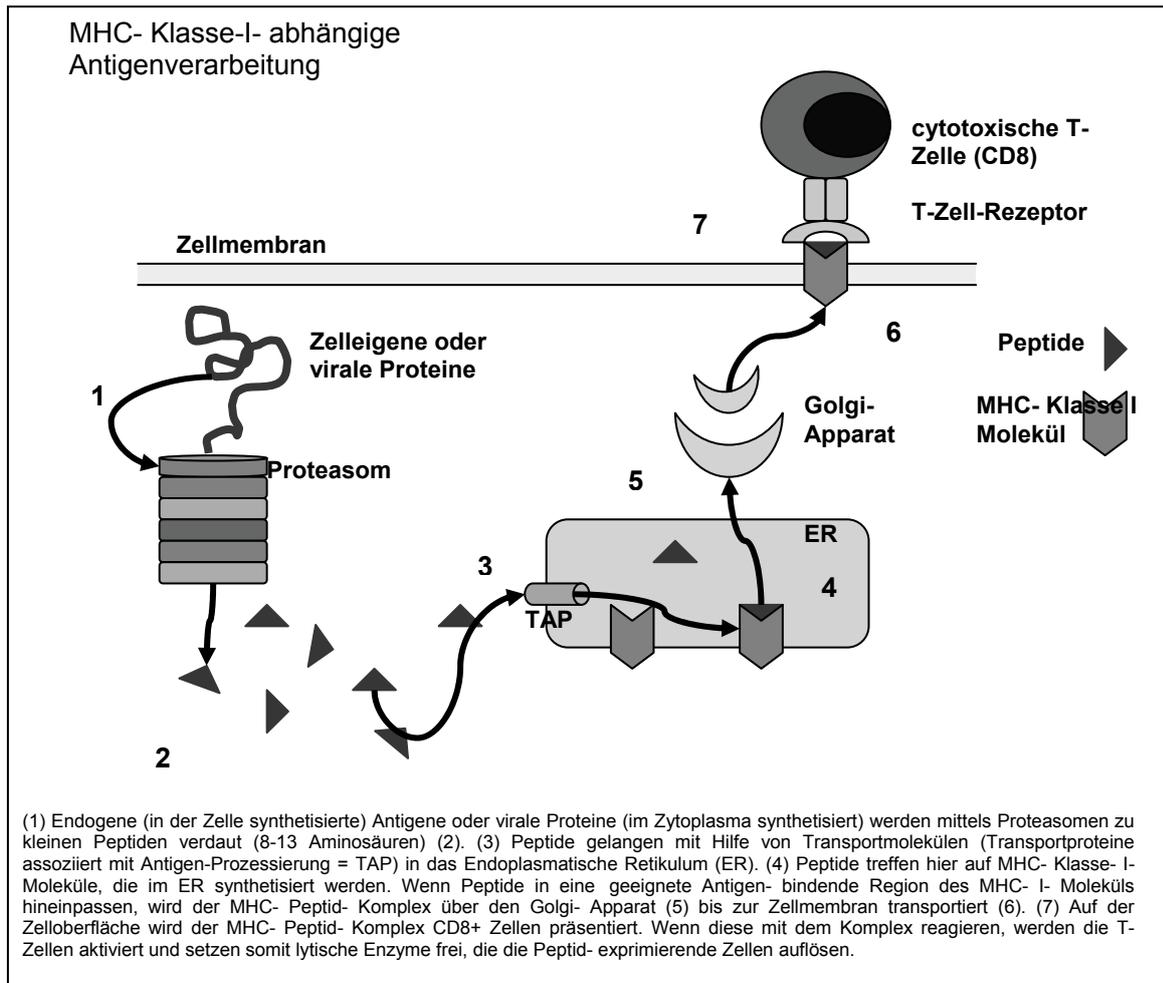


Abbildung 1.3: Antigenverarbeitung mittels HLA- Klasse- I- Moleküls (modifiziert nach [14])

HLA- Klasse- II- Moleküle bestehen ebenfalls aus zwei nicht- kovalent gebundenen Polypeptidketten, einer α - Kette mit 33- 35 kDa und einer β - Kette mit 26- 28 kDa. Jede Kette besteht aus zwei Domänen, einer Peptid- Bindungs- Domäne ($\alpha 1$ bzw. $\beta 1$) und einer immunglobulinähnlichen Domäne ($\alpha 2$ bzw. $\beta 2$). An diesem schließen sich eine transmembranöse Region sowie eine intrazellulär gelegene Region (Zytoplasma- Anker) an (Abb. 1.4).

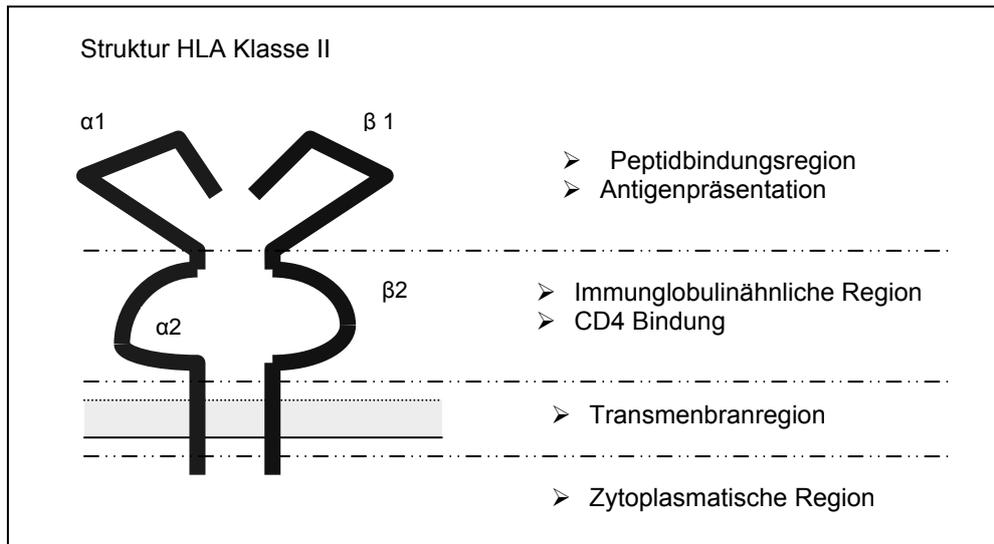


Abbildung 1.4 Struktur des HLA- Klasse- II- Moleküls (modifiziert nach [5])

Klasse- II- Moleküle werden nur auf bestimmten Zellen exprimiert. Zu diesen Antigen präsentierenden Zellen gehören in erster Linie B- Lymphozyten, aktivierte T- Zellen, Makrophagen, epidermale Langerhanszellen, dendritische Zellen und Thymusepithelzellen [17]. Bei Anwesenheit von Interferon- γ können HLA- Klasse- II- Moleküle auch von anderen Zellen exprimiert werden. Dies zeigte eine kanadische Studie. Sie wies nach, dass in Anwesenheit von Interferon- γ die Proliferation der mRNA für HLA- DP, HLA- DQ und HLA- DR in Epithelzellen des Ösophagus ansteigt [18, 19].

Exogene Antigene binden sich an MHC- II- Moleküle im Zellinneren. Hierbei sind die zu präsentierenden Peptide von 13- 25 Aminosäuren durch die Phagozytose von aufgenommenen Proteinen in Phagolysosomen entstanden. Nach Fusion mit den Vesikeln vom endoplasmatischen Retikulum, welche die MHC- II- Moleküle enthalten, können diese nach entsprechender Antigenbindung an die Zelloberfläche transportiert werden. Dieser Komplex kann CD4+- T- Zellen aktivieren und zur Proliferation und Sekretion verschiedener Zytokine führen. Aktivierte CD4+- T- Zellen können B- Zellen zur Antikörperbildung anregen (Abb. 1.5) [14].

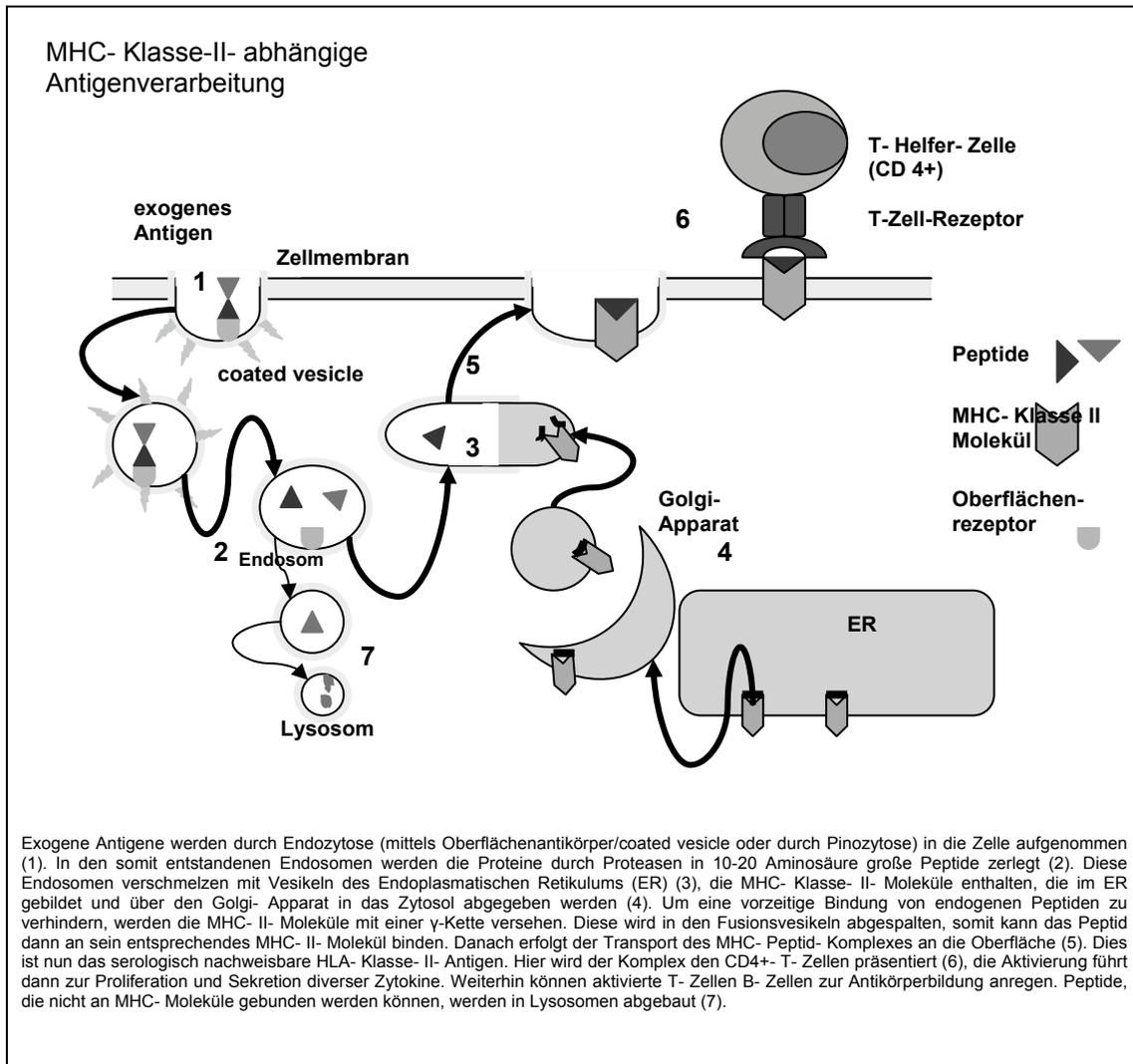


Abbildung 1.5: Antigenverarbeitung mittels HLA- Klasse- II- Moleküls (modifiziert nach [14])

Somit führen die differenten Antigenpräsentationen über MHC- Moleküle zu unterschiedlichen Effektormechanismen, einerseits Aktivierung von zytotoxischen T- Zellen (CD8+), andererseits zur Aktivierung von T- Helfer- Zellen (CD4+) [20, 21].

1.1.3 Nomenklatur

Das WHO Nomenclature Committee legt die gültige Nomenklatur für Faktoren des HLA- Systems fest. Das WHO Nomenclature Committee gründete sich 1968 kurz nach dem dritten „International Histocompatibility Workshop (IHWSS)“ und ist seitdem für die Benennung neuer Gene, Allele und ihrer Genprodukte verantwortlich [1]. Derzeit (Stand 07/11) sind 5301 HLA- Klasse- I- Allele bekannt, davon 1698 HLA- A, 2271 HLA- B und 1213 HLA- C. In der HLA- Klasse- II sind bisher 1509 Allele nachgewiesen worden [22]. In Tabelle 1.1 werden die aktuellen Bezeichnungen serologisch unterscheidbarer HLA- Klasse- I und II – Antigene aufgelistet.

HLA- A	HLA- B		HLA- C	HLA- DR	HLA- DQ	HLA- DP
A1	B5	B50(21)	Cw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B51(5)	Cw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	B5102	Cw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B5103	Cw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B52(5)	Cw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B53	Cw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B54(22)	Cw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B55(22)	Cw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B56(22)	Cw9(w3)	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B57(17)	Cw10(w3)	DR9		
A24(9)	B18	B58(17)		DR10		
A2403	B21	B59		DR11(5)		
A25(10)	B22	B60(40)		DR12(5)		
A26(10)	B27	B61(40)		DR13(6)		
A28	B2708	B62(15)		DR14(6)		
A29(19)	B35	B63(15)		DR1403		
A30(19)	B37	B64(14)		DR1404		
A31(19)	B38(16)	B65(14)		DR15(2)		
A32(19)	B39(16)	B67		DR16(2)		
A33(19)	B3901	B70		DR17(3)		
A34(10)	B3902	B71(70)		DR18(3)		
A36	B40	B72(70)				
A43	B4005	B73		DR51		
A66(10)	B41	B75(15)		DR52		
A68(28)	B42	B76(15)		DR53		
A69(28)	B44(12)	B77(15)				
A74(19)	B45(12)	B78				
A80	B46	B81				
	B47	B82				
	B48	Bw4				
	B49(21)	Bw6				

Tabelle 1.1: serologisch definierte HLA- Spezifitäten

Die Nomenklatur der HLA- Antigene setzt sich aus dem ursprünglich hervorgegangen serologischen Bezeichnungssystem und der heute angewandten Gensequenzierung zusammen. Letzteres erbrachte einen weitaus größeren Informationsgehalt, der allein durch das frühere System nicht beschrieben werden konnte. Anfänglich erfolgte der HLA- Antigennachweis mittels serologischem Testverfahren, diesem lag die Bindung von Antikörpern zugrunde (Mikrolymphozytotoxizitätstest). Hierbei konnte mit Hilfe spezifischer Antikörper HLA- Merkmale in Haupt- und Feinspezifitäten eingeteilt werden. Das bedeutet, dass ein HLA- Merkmal neben seiner höchsteigenen (individuellen) Antigenstruktur, die nur bei diesem Merkmal auftritt, eine zweite allgemeine Antigenstruktur (Hauptspezifität) besitzt (Bsp.: HLA- A9 als Hauptspezifität, dazugehörige „splits“ HLA- A23, 24).

Die klassischen serologisch definierten HLA- Merkmale werden durch den Namen ihres Genortes (A, B, DR u.s.w.) und die Nummer ihrer Spezifität benannt, wobei zunächst die individuelle Spezifitätsnummer und in Klammern die zugehörige allgemeine Spezifität angegeben wird (Bsp. HLA- A24(9)). Das entsprechende Allel wird mittels Genort und getrennt durch ein Sternchen (*) mit einer Allelnummer beschrieben. Im April 2010 ist eine Aktualisierung der Schreibweise für HLA- Allele in Kraft getreten, da mit der herkömmlichen Schreibweise die Fülle der nachgewiesenen Allele nicht mehr ausreichend dargestellt werden konnte [23, 24]. Die bisherige Schreibweise machte es erforderlich, dass alle Zifferngruppen aus zwei Ziffern bestanden, was die Zahl der aufzunehmenden Allele zunächst auf 99 begrenzte. Die Neuregelung besagt, dass ein Allel bzw. eine Allelgruppe mit bis zu vier Zifferngruppen beschrieben werden kann, wobei eine Ziffer mindestens zweistellig ist und die einzelnen Zifferngruppen mit einem Doppelpunkt „:“ getrennt werden. Die erste Zifferngruppe beschreibt die Hauptgruppe, die auch serologisch nachgewiesen werden kann. Die nächste Zifferngruppe bezeichnet die Subtypen der gleichen Spezifität mit einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz. Die darauffolgende Zifferngruppe stellt den Unterschied in der Nukleotidsequenz im Bereich des Exons dar (stumme Mutation), wobei die vierte Zifferngruppe den Nukleotidunterschied in nicht- kodierenden Bereichen (Introns) anzeigt. Diese Veränderungen führen jedoch zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz (Abb. 1.6).

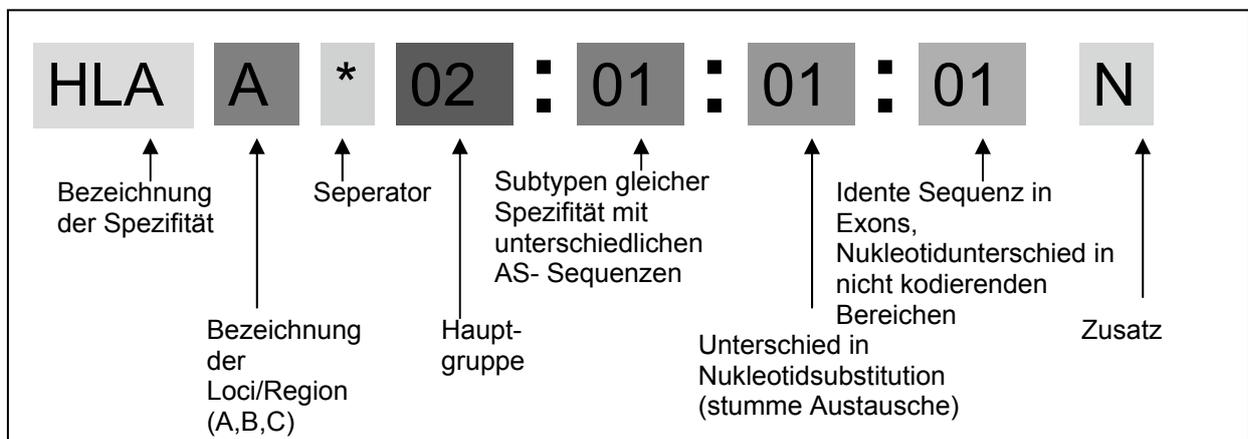


Abbildung 1.6: Nomenklatur der HLA- Allele

Als Zusatzbezeichnung kann der Beschreibung ein Buchstabe angehängt werden, der das Expressionsverhalten der Allele beschreibt [25]:

- „N“ Nullallel, nicht exprimiert
- „L“ low, schwach exprimiert
- „S“ secreted, im Plasma nachweisbar, nicht in Zellmembran
- „Q“ questionable, Beeinflussung der Mutation bei der Ausprägung des Genproduktes

- „A“ aberrant, unklare Expression
- „C“ cytoplasmatic, nur im Zytoplasma, nicht an der Zellmembran nachweisbar

1.1.4 Nachweismethoden

Für die Bestimmung der HLA- Antigene wurden aufgrund der verschiedenen Indikationen (Transfusion, Transplantation, Krankheitsassoziation, forensische Fragestellungen) zahlreiche Verfahren entwickelt. Grob lassen sich diese Verfahren in serologische, zelluläre und biochemische Methoden auf der einen und molekulargenetische Methoden auf der anderen Seite einteilen. Zu den erstgenannten Verfahren ist zum Nachweis die Expression der HLA-Moleküle auf den Zellen notwendig. Als serologische Standardmethode für viele medizinische Fragestellungen gilt hier der mikrolymphozytotoxische Test (nach Terasaki) [26]. Dabei werden Seren mit spezifischen HLA- Antikörpern (nach Immunisierung durch Bluttransfusion, Schwangerschaften, Organtransplantationen) mit den zu testenden Zellen (v.a. periphere Lymphozyten) zusammengeführt. Bei Anwesenheit der korrespondierenden Spezifität führt die Verbindung unter Komplementaktivierung zur Lyse der Zellen. Diese Reaktion kann dann mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden, hierbei erscheinen intakte, vitale Lymphozyten (keine Antigen- Antikörperreaktion) grün und avitale Lymphozyten (Lyse durch Antigen- Antikörperreaktion) rot.

Molekulargenetische Methoden beruhen häufig auf einer Polymerasekettenreaktion mit sequenzspezifischen Primern [25]. Vor allem bei mangelnder Expression der HLA- Moleküle ist diese Methode den serologischen Verfahren überlegen. Hier werden verschiedene Methoden unterschieden:

- Gensondenanalytik: PCR- SSO/SSOP (sequence-specific oligonucleotide/ sequence-specific oligonucleotide probe)
- Primeranalytik: PCR- SSP (sequence specific priming)
- direkte Sequenzierung: PCR- SBT (sequencing- based typing)

1.2 HLA- Antikörper

1.2.1 HLA- Antikörperbildung

1958 veröffentlichte van Rood et. al einen Fallbericht, bei dem eine Frau mit zuvor sechs durchgemachten Schwangerschaften nach einer Bluttransfusion plötzlich eine febrile Reaktion zeigte. Das daraufhin untersuchte Serum zeigte leukozytäre Antikörper, die sehr wahrscheinlich bereits vor der Bluttransfusion vorhanden waren. Es wurde damals angenommen, dass diese Immunisierung durch die Schwangerschaften hervorgerufen

wurde, da die Patientin zuvor keine anderen Transfusionen erhielt. Weiterhin zeigte diese Arbeit, dass sich bei Frauen, die im Durchschnitt sieben Schwangerschaften durchmachten, leukozytäre Antikörper im Serum nachweisen ließen (6 Patienten, 3- 11 Schwangerschaften). Bei einem Durchschnitt von drei Schwangerschaften (34 Patienten, 1- 8 Schwangerschaften) konnten dahingegen keine leukozytären Antikörper im Serum nachgewiesen werden [27]. Gleichzeitig beschrieb ebenso Rose Payne Antikörper im Serum von Frauen mit mehrfachen Schwangerschaften entdeckt zu haben [28].

Für die Immunisierung und damit verbunden die Bildung von HLA- Antikörpern gegen HLA- Antigene kommen nun vor allem folgende Sensibilisierungsmöglichkeiten zum tragen [5]:

- Schwangerschaften
- Bluttransfusionen
- Transplantationen.

Man spricht hierbei auch von einer Alloimmunisierung, da Antikörper gegen fremde MHC- Moleküle gebildet werden.

Bei einer Schwangerschaft können fetale Zellen in den mütterlichen Kreislauf gelangen. Indem diese Zellen zur Hälfte väterlich sind, können Alloantikörper dagegen gebildet werden. Denmore et al. wiesen 1999 bei weiblichen Blutspendern eine Immunisierungsrate von 17% nach, wobei der Hauptanteil an immunisierten Spenderinnen 3 und mehr Schwangerschaften aufwiesen [29]. 2008 wurde in einer anderen Studie von Powers et al. eine Immunisierungsrate von ca. 25% ermittelt. Hier wurden Blutspenderinnen untersucht, die in der Anamnese Schwangerschaften und/oder Transfusionen angaben [30]. Ebenfalls kann vor allem bei Thrombozytentransfusionen aber auch mittels anderer Blutkomponenten durch kontaminierende Leukozyten eine Immunisierung gegen HLA- Klasse- I- Antigene stattfinden. Ein wichtiger Faktor für die Bildung von HLA- Antikörper nach einer Transfusion stellt nicht nur die Anwesenheit sondern auch die Anzahl der Leukozyten im Blutprodukt dar. Hier zeigten Studien bereits Anfang der 90er Jahre, dass Konzentrationen unter 50×10^6 Leukozyten in einem Präparat eine deutliche geringere Bildungsrate (8%) von HLA- Antikörpern bei den Empfängern aufweisen als Blutpräparate mit Konzentrationen über 50×10^6 Leukozyten (59%) [31]. Dieses Ergebnis wird in einer Metaanalyse aus dem Jahr 1992 bestätigt [32]. Diese zeigt eine deutliche Reduktion der HLA Immunisierungsrate bei Patienten, die leukozytendepletierte Blutkomponenten erhielten im Gegensatz zu der Patientengruppe, die mit nicht- leukozytendepletierten Präparaten behandelt wurden.

Eine HLA- Klasse- II- Antigen- Sensibilisierung kann zusätzlich bei einer Granulozytentransfusion auftreten, da hierbei neben den Granulozyten auch Lymphozyten übertragen werden [5]. In einer amerikanischen Studie zeigte sich, dass bei Patienten mit einer schweren aplastischen Anämie, die zur Behandlung Granulozytenpräparate erhielten, 17% HLA- Antikörper während der Therapie entwickelten [33].

Eine weitere Expositionsquelle stellt die Organtransplantation dar, da hier eine mögliche Bildung von Alloantikörpern gegen die Antigene auf dem Transplantat stattfinden kann. Als Zeichen einer Alloreaktion bei einer Transplantatabstoßung werden häufig lymphozytotoxische bzw. Anti- HLA- Antikörper beobachtet. Wurden einmal Antikörper bei einem Patienten nachgewiesen, sollten diese bei jeder weiteren Transplantation bzw. Transfusion berücksichtigt werden. Eine erneute Exposition mit dem Antigen könnte wiederholte und auch schwerere Reaktionen verursachen (Boostereffekt). Diese Boostersituation liegt auch dann vor, wenn die Immunisierung gegen die Alloantigene während einer vorangegangenen Schwangerschaft oder Transfusion erfolgte.

Anti- HLA- Antikörper gehören vor allem der Immunglobulinklasse G (IgG) an, während IgM Antikörper nur kurz nach Antigenexposition zu beobachten sind. Darüber hinaus kann man komplementaktivierende und Komplement nicht aktivierende HLA- Antikörper unterscheiden [5].

1.2.2 Kreuzreaktivität von HLA- Antikörpern

Gruppen von HLA- Antigenen weisen in ihrer Struktur Ähnlichkeiten auf: sie besitzen ein oder mehrere gleiche Epitope. Damit können HLA- Antigene von Antikörpern erkannt werden, die ursprünglich gegen andere HLA- Alloantigene gebildet wurden. Man spricht in diesem Zusammenhang davon, dass HLA- Antikörper mit verschiedenen HLA- Antigenen kreuzreagieren können. Antigene, die untereinander Kreuzreaktionen aufweisen, werden unter dem Begriff Cross Reactive Epitope Groups (CREG) zusammengefasst [34]. In diesem Zusammenhang kann weiterhin zwischen individuellen und allgemeinen Spezifitäten unterschieden werden. Dabei werden individuelle Antigene (private) nur durch einen spezifischen Antikörper erkannt, eine weitere Unterteilung durch weitere Antikörper ist dann nicht mehr möglich. Im Gegensatz dazu bedeutet der Begriff allgemeine Spezifität (public), wenn eine weitere Unterteilung in Subtypen möglich ist. Gleichbedeutend zu diesen Subtypen wird von Splitantigenen gesprochen. Tabelle 1.2 zeigt die CREG- Antigene, wie sie von McKenna und Takemoto definiert werden [35].

CREG	beteiligte Antigene
A1C	A1, 3, 11, 19(29,30,31), 36, 80
A2	A2, 9(23,24), 28(68,69), B17 (57,58)
A10C	A10(25,26,34,66), 32, 33, 43, 74
BW4	A9(23,24), 25, 32, B13, 27, 37, 38, 44, 47, 49, 51, 52, 53, 57, 58, 59, 63, 77
B5C	B5 (51,52)18, 35, 53
B5C2	B5(51, 52),15(62, 63, 71, 72, 75, 76, 77),17(57, 58), 21(49, 50), 35, 53, 73, 78
BW6	B7, 8, 18, 35, 39, 40(60, 61), 41, 42, 45, 46, 48, 50, 54, 55, 56, 62, 64, 65, 67, 71, 72, 73, 75, 76
B7C	B7, 8, 13, 27, 41, 42, 47, 48, 54, 55, 56, 60, 61, 81
B8C	B8, 18, 38, 39, 64, 65
B12C	B12(44, 45), 13, 37, 41, 47, 21(49, 50),40(60, 61)

Tabelle 1.2: CREG- Antigene aufgestellt von McKenna und Takemoto

Die CREG- Eigenschaften der HLA- A und -B Antigene können bei der Zuordnung potentieller Organe vor einer bevorstehenden Organtransplantation berücksichtigt werden („matching“), da hierdurch die Versorgung kompatibler Organe in einer größeren Patientenpopulation möglich ist. Unklar erscheint bisher, inwieweit dadurch in Hinsicht auf ein vollständig HLA- kompatibles Organ ein verbessertes Transplantatüberleben ebenfalls möglich erscheint [36, 37]. Jedoch können kreuzreagierende Antikörper bei einer Nierentransplantation eine akute Antikörper- vermittelte Abstoßung des Organs bewirken (AMR). Dieses macht die Suche nach einem passenden Spenderorgan zusätzlich komplizierter [38]. Durch die Reaktion des HLA- Antikörpers mit anderen HLA- Antigenen, sollten diese ebenso nicht auf dem Spenderorgan zu finden sein. Auch Thrombozytentransfusionen können bei kreuzreagierenden Antikörpern des Empfängers in ihrer Wirksamkeit beeinträchtigt sein (siehe auch „Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusionen“, Abschnitt 1.2.3).

1.2.3 klinische Bedeutung von HLA- Antikörpern

Eine HLA- Alloimmunisierung kann bei Substitution mit Blutkomponenten zu verschiedenen Problemen führen. Reaktionen können einerseits durch HLA- Antikörper in immunisierten Empfängern von Blutprodukten ausgelöst werden, aber auch durch HLA- Antikörper in den transfundierenden Einheiten.

Klinisch kann sich eine Alloimmunisierung in einer **febrilen nicht- hämolytischen- Transfusionsreaktion (FNHTR)** und in einem Refraktärzustand gegen allogene Thrombozytenkonzentrate bzw. Granulozytenpräparate darstellen. Die FNHTR ist definiert als eine Reaktion mit Temperaturanstieg um 1°C in Verbindung mit einer Transfusion innerhalb der letzten 30- 60 Minuten. Des Weiteren treten Schüttelfrost, Dyspnoe und Hypotension auf. Als Hauptursachen werden die Interaktion von HLA- I- Antikörpern mit Spenderleukozyten sowie das Wirken von Antikörpern gegen Spendergranulozyten diskutiert [39]. Ferner sind Zytokine, die während der Lagerung des Blutproduktes aus Leukozyten freigesetzt werden, identifiziert worden, die maßgeblich eine Rolle bei der Entwicklung der FNHTR spielen. [40, 41]

Seit dem 01.10.2001 wurde die generelle Leukozytendepletion von zellulären Blutprodukten in Deutschland eingeführt [42]. Hierbei dürfen ausschließlich Erythrozytenkonzentrate und Thrombozytenkonzentrate mit einem Leukozytengehalt von weniger als 1×10^6 pro Einheit (Blutkomponente) in Verkehr gebracht werden. Durch die Transfusion leukozytendepletierter Blutprodukte kann eine deutliche Reduktion für das Risiko der HLA-Immunsierung sowie eine abnehmende Inzidenz von febrilen nicht- hämolytischen Transfusionsreaktionen erreicht werden [40, 43]. Demnach profitieren besonders Patienten nach Immunisierung gegen leukozytäre Antikörper als auch Patienten mit vorausgegangenem febrilen nicht- hämolytischen Transfusionsreaktionen bei der Gabe von leukozytendepletierten Blutkomponenten. Außerdem erzielen vor allem auch Patienten mit erforderlicher Langzeittransfusion, Schwangere und unreife Geborene eine bessere Transfusionsverträglichkeit [44]. Derzeit wird für Deutschland das Risiko eine FNHTR pro Transfusionseinheit zu entwickeln unter 0,1% angegeben, wobei das Risiko hierfür bei einer Thrombozytentransfusion deutlich höher liegen kann [45, 46].

Zur Inzidenz für eine **transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI)** werden in der Literatur unterschiedliche Zahlen genannt. Sie schwanken zwischen 1:5000 [47] aller transfundierten Einheiten und einem Fall pro 55 000 transfundierter Einheiten [48]. In den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten“ wird das Risiko für therapeutisches Einzelspenderplasma und für Thrombozytenkonzentrate mit $1:10^4$ – $1:10^5$ angegeben. Für Erythrozytenkonzentrate liegt das Risiko hingegen bei kleiner $1:10^6$ [45]. Die deutschen Hämovigilanzdaten (2006-2007) zeigen eine Frequenz für die Entstehung einer TRALI bei der Transfusion von Frischplasma von 1:66000, für Thrombozytenkonzentrate 1:420000 und für Erythrozytenkonzentrate 1:2,86 Millionen [49].

Ursächlich für eine TRALI sind im Spenderblut nachgewiesene leukozytäre Antikörper. Diese werden vor allem bei einer Frischplasma- und Thrombozytentransfusion in den Kreislauf des Empfängers übertragen. Hierbei binden sich die leukozytären Antikörper an die

entsprechenden Antigene auf neutrophilen Granulozyten und aktivieren bzw. agglutinieren diese. Diese Reaktion bewirkt eine Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Enzymen, welche die Endothelzellen schädigen. Dies führt zu einer gesteigerten Kapillarpermeabilität und somit zum Plasmaausstrom in das Lungengewebe, infolgedessen entsteht ein Lungenödem.

Zu den leukozytären Antikörpern zählen Antikörper gegen die humanen neutrophilen Alloantigene (HNA) und die humanen Leukozytenantigene (HLA). Es zeigte sich, dass unter den Anti- HLA- Antikörpern vorwiegend HLA- Antikörper der Klasse II für die Auslösung einer TRALI verantwortlich erscheint. Der Pathomechanismus muss hierbei jedoch weitaus komplexer sein, da HLA- Klasse- II- Moleküle auf ruhenden neutrophilen Granulozyten nicht vorliegen [50]. Die Giessener Forschungsgruppe um Sachs et al. zeigte in einer 2010 publizierten Studie, dass Monozyten die Reaktionskaskade auszulösen vermochten, wenn an diese korrespondierende HLA- II- Antikörper gebunden werden. Die aktivierten Monozyten aktivieren wiederum die neutrophilen Granulozyten und darüber wird das Endothel, wie oben bereits beschrieben, geschädigt [51]. Auch HLA- Klasse- I- Antikörper können zu dieser Reaktion führen, wobei hier beschrieben wird, dass bei lebensbedrohlichen Reaktionen Anti- HLA- A2- Antikörper eine große Rolle spielen, da diese sehr starke Granulozytenagglutinine darstellen. [52, 53]. Ebenso sind in der Literatur Fälle bekannt, bei denen im Empfängerblut HLA- Antikörper nachgewiesen wurden, die eine TRALI ausgelöst haben [53]. Die Patienten erhielten Erythrozytentransfusionen, die mit Leukozyten kontaminiert waren. Wenn das entsprechende Antigen auf diesen Leukozyten vorhanden war, konnten diese analog zu dem oben genannten Mechanismen eine TRALI verursachen. Seit der Einführung der leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentrate im Jahr 2001 konnte dies nicht mehr beobachtet werden.

Neben der laborseitigen Diagnostik (Nachweis von leukozytären Antikörper beim Spender oder Empfänger) sind klinische Kriterien an eine TRALI zu denken:

- Während oder innerhalb von 6 Stunden nach einer Bluttransfusion tritt plötzlich Atemnot auf.
- Im Thoraxröntgen sind neu aufgetretene bilaterale Lungeninfiltrationen zu erkennen.
- Hinweise auf eine kardiologische Genese für ein Lungenödem bzw. für die Volumenüberladung fehlen.

Therapeutische Maßnahmen sind in erster Linie eine ausreichende Sauerstoffzufuhr und gegebenenfalls Beatmung. Trotz der intensivmedizinischen Behandlung wird die Letalität im Jahr 2001 mit schätzungsweise 6-10% der Fälle angegeben [54]. Neuere Daten zeigen in den deutschen, französischen und englischen Hämovigilanzdaten, dass mittlerweile bis zu 20% der Fälle, bei denen eine TRALI diagnostiziert wurde, diese als Ursache für einen letalen Ausgang anzusehen ist [55].

Ein weiteres klinisches Problem stellt hinsichtlich einer HLA- Immunisierung bei Patienten, wie oben bereits erwähnt, der **Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusionen** dar. Hierunter wird das fehlende Ansteigen der Thrombozytenzahl nach Übertragung von frischen vitalen Plättchen verstanden [25, 56]. Gründe hierfür können nicht- immunologischer und immunologischer Art sein. Zu ersteren gehören vor allem Milzvergrößerungen, Verbrauchskoagulopathie und septische, fieberhafte Verläufe sowie lagerungsbedingte Funktionseinschränkungen bei den zu transfundierenden Thrombozyten. Daneben sollte auch immer eine Reihe von Medikamenten als Ursache für eine anhaltende Thrombozytopenie in Betracht gezogen werden, da diese zu einer medikamenteninduzierten Thrombozytopenie führen können (unter anderem Ampicillin, Penicillin, Vancomycin, Diclofenac, Ibuprofen).

Immunologische Faktoren, die zu einem Refraktärzustand führen, konnte Doughty 1994 in einer Studie in 25% der Fälle nachweisen [57]. Hierunter sind plättchenreaktive Alloantikörper zu verstehen. Am häufigsten sind hier HLA- Antikörper, seltener plättchenspezifische Antikörper (HPA) und Antikörper gegen A- und B- Antigene des AB0- Systems verantwortlich. Die Bedeutung im letztgenannten System erscheint klinisch gering, da sich inkompatible Transfusionen leicht vermeiden lassen. In weiteren Studien zeigten sich zudem, dass vor allem HLA- Antikörper im Zusammenhang mit einem Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusion durch eine Immunisierung anzutreffen sind [58, 59]. Kiefel et. al zeigten, dass in lediglich 8% der immunisierten Patienten plättchenspezifische Alloantikörper mit und ohne HLA- Antikörper auftreten, wobei ein alleiniges Auftreten von plättchenspezifischen Antikörpern selten anzutreffen ist [59].

Wenn als Ursache HLA- Antikörper gefunden wurden, besteht die Therapie in einer HLA- angepassten Thrombozytentransfusion. Um kompatible Thrombozytenpräparate ausfindig zu machen, existieren vor allem zwei Strategien dazu: HLA- match und das Crossmatch.

Bei einem HLA- match erfolgt die Auswahl des passenden Präparates für den Empfänger anhand des HLA- Antigenmusters, welches möglichst komplett mit dem des Spenders übereinstimmt. Der Nachteil bei der Methode ist, dass hierfür ein deutlich größerer Spenderpool benötigt wird um für einen Patienten das passende Thrombozytenkonzentrat zur Verfügung zu stellen. Daher ist dieses Vorgehen vor allem für stärker immunisierte Patienten (breit reagierender Antikörper, sehr stark reagierende Antikörper) in Betracht zu ziehen. Für Patienten mit schwachen Antikörpern ist ein Crossmatch- Verfahren ausreichend um passende Thrombozytenpräparate ausfindig zu machen. Hierbei ist der Pool deutlich größer und die Bereitstellung der Präparate erfolgt schneller, da die passenden Spender nicht erst einbestellt werden müssen. Somit ist die Versorgung von Patienten mit Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusion mittels des Crossmatches einfacher [60].

HLA- Antikörper besitzen ebenfalls eine klinische Bedeutung in der **Transplantationsmedizin**: Organtransplantation sowie Stammzelltransplantation. Ein besonderes Augenmerk liegt bei der Organtransplantation im Zusammenhang mit HLA- Antikörpern im Bereich der Nierentransplantation. Aber auch bei Pankreas-, Herz-, Lungen- und Corneatransplantationen zeigten Studien, dass HLA- Antikörper mit einer erhöhten Gefahr der akuten und chronischen Abstoßungsreaktion bzw. mit einem verminderten Transplantatüberleben assoziiert sind [61].

Bei Nierentransplantationen wird versucht für den Empfänger eine möglichst gute Übereinstimmung in den HLA- A, -B und -DR Merkmalen des Organspenders zu erzielen. Dies ist auf Grund der zahlreichen dialysepflichtigen Patienten, die auf eine neue Niere warten, nicht immer möglich und es kann zu Transplantationen mit nicht übereinstimmenden HLA- Merkmalen kommen. Dies veranlasst, dass HLA- Antikörper in regelmäßigen Abständen (mindestens einmal im Jahr) bei Patienten bestimmt werden müssen, die auf eine Nierentransplantation warten. Hierdurch soll bereits im Vorfeld nichtgeeignete Antigene erkannt bzw. ein akzeptables Mismatch für eine Transplantation abgegrenzt werden, da präformierte Antikörper im Empfänger eine Abstoßungsreaktion verursachen können. Auch der lymphozytäre Crossmatch vor einer Nierentransplantation dient der Zuordnung eines passenden Organs zu einem Empfänger, bzw. wird das Crossmatch bereits im Vorfeld eine Unverträglichkeit durch präformierte HLA- Antikörper zwischen Spender und Empfänger zeigen [62]. Zahlreiche Studien zeigen, dass nach einer Nierentransplantation HLA- Antikörper gebildet werden. Diese erschweren bei einer weiteren notwendigen Nierentransplantation die Suche nach einem passenden Organ [63]. Neben HLA- Antikörpern existieren für das Transplantatüberleben weitere Einflussfaktoren, wie die kalte Ischämiezeit, die Todesursache des Organspenders und das Alter des Organspenders bzw. des Empfängers [62].

Für eine vorgesehene Stammzelltransplantation sind vor allem die HLA- Merkmale von Interesse. Hier sollte der Spender mit dem Empfänger in den HLA- Merkmalen übereinstimmen (match). Wenn dies nicht möglich ist, kann auf einen Spender zurückgegriffen werden, der nur eine geringe HLA- Inkompatibilität aufweist, zum Beispiel haploidente Spender. Grund hierfür ist, dass der Grad des HLA- Mismatches für das Auftreten und die Schwere einer Graft- versus- Host- disease (GvHD) angesehen wird. Zudem sollte bei Empfängern, bei denen keine Transplantation mit einem HLA- identen Spender möglich ist, der Antikörperstatus durch die serologisch lymphozytäre Kreuzprobe ermittelt werden. Hier können vor allem HLA- Antikörper durch vorige Immunisierung bei einem Mismatch Verhältnis im HLA- A und HLA- B- Bereich zu einer Host- versus- Graft- Reaktion, dass heißt zu einer Transplantatabstoßung, führen [64].

1.2.4 Nachweismethoden von HLA- Antikörpern

Das Standardverfahren zum Nachweis lymphozytotoxischer Antikörper ist analog zur serologischen Diagnostik von HLA- Merkmalen der komplementabhängige Lymphozytotoxische Test (LCT). Hierbei werden jedoch Leukozyten mit bekannter Spezifität eingesetzt um Antikörper im zu untersuchenden Serum nachweisen und differenzieren zu können (siehe Abschnitt 2.3).

Eine weitere Nachweismethode stellt der monoclonal antibody immobilization of platelet antigens (MAIPA) – Assay dar (siehe Abschnitt 2.2), bei dem HLA- Klasse- I- Antikörper aber auch thrombozytäre Antikörper (HPA) nachgewiesen werden [65]. Mit einer Modifikation dieses Verfahrens ist auch der Nachweis mit Leukozyten möglich (monoclonal antibody immobilization of lymphocyte antigens- MAILA) [66].

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz bzw. der Durchflusszytometrie ist ein HLA- Antikörpernachweis ebenso möglich – Lymphozytenimmunfluoreszenztest (LIFT). Diese Methode stellt ein weiteres hochsensitives Verfahren zum Nachweis von HLA- Antikörpern dar. Es handelt sich um ein optisches Messverfahren. Fluoreszenzmarkierte Antikörper, die an bekannten Spezifitäten von Leukozyten entsprechend gebunden haben, werden hiermit analysiert. Hier werden ebenfalls wie beim LCT Panelzellen eingesetzt und durch die Korrelation des Reaktionsmusters kann auf die entsprechenden HLA- Antikörper- Spezifität geschlossen werden. Der Nachweis erfolgt somit indirekt.

Kommerzielle Verfahren basieren auf einem Festphasen- Enzymimmunoassay (ELISA), zum Beispiel „AbScreen HLA class I“ von Bio-Rad. Dies sind im Gegensatz zu den bisher genannten Verfahren direkte Nachweismethoden für HLA- Antikörper. Hierbei kommen hochgereinigte HLA- Klasse- I- Glykoproteine eines Pools humaner Thrombozyten zum Einsatz. Ein Pool besteht hier aus mindestens 300 Spendern, damit jedes HLA- Klasse- I- Antigen präsentiert werden kann. Neben diesem Screening- Test gibt es ebenso Tests als Enzymimmunoassay zur Antikörperdifferenzierung.

Eine neuere Methode für den HLA- Antikörpernachweis stellen die Single- Antigen- Immunoassays dar, die zum einen über die ELISA- Technik den Nachweis für HLA- Antikörper liefern können, zum anderen sei hier die Bead- basierte Multiplexanalyse - das sogenannte Luminex[®]- Verfahren – erwähnt und näher beschrieben [67]. Diese Methode eignet sich nicht nur für den Antikörpernachweis, sondern kann auch in der umgekehrten Richtung angewendet und somit für die HLA- Typisierung eingesetzt werden. Bei dieser Technik werden Beads (Mikropartikel) markiert mit Farbstoffgemischen zweier Farben

eingesetzt. Damit ist ein Assay mit bis zu 100 verschiedenen Bead- Populationen möglich. Jede Bead- Population steht hierbei für ein Merkmal. Um die Beads für diagnostische Zwecke einsetzen zu können, müssen diese vorher mit Biomolekülen auf der Oberfläche gekoppelt werden (sogenanntes Coating). Dies sind Antikörper, Antigene oder DNA, womit ersichtlich wird, dass diese Technik, wie oben genannt, nicht allein auf den Antikörpernachweis beschränkt bleibt (Abb. 7).

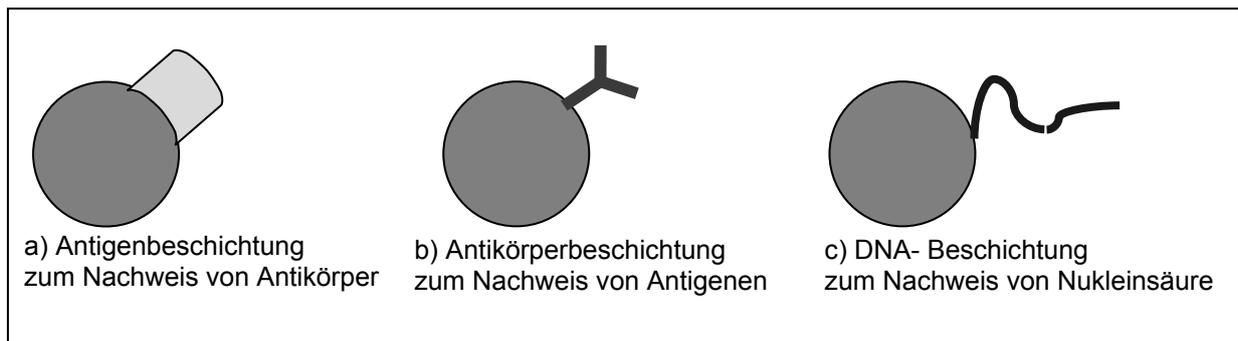


Abbildung 1.7: Beadmoleküle mit Antigen (a), Antikörper (b) und DNA (c) beschichtet (modifiziert nach [67])

Nach der Inkubation mit dem zu untersuchendem Material (hier also Serum mit fraglichem Antikörper) erfolgt wie bei ELISA- Techniken verschiedene Waschschrte und darauf die Zugabe eines Konjugates, den so genannten Detektionsantikörper. Dieser ist fluoreszenzmarkiert und dient zum Nachweis von Antigen- Antikörperreaktionen auf der Beadoberfläche (Abb. 8).

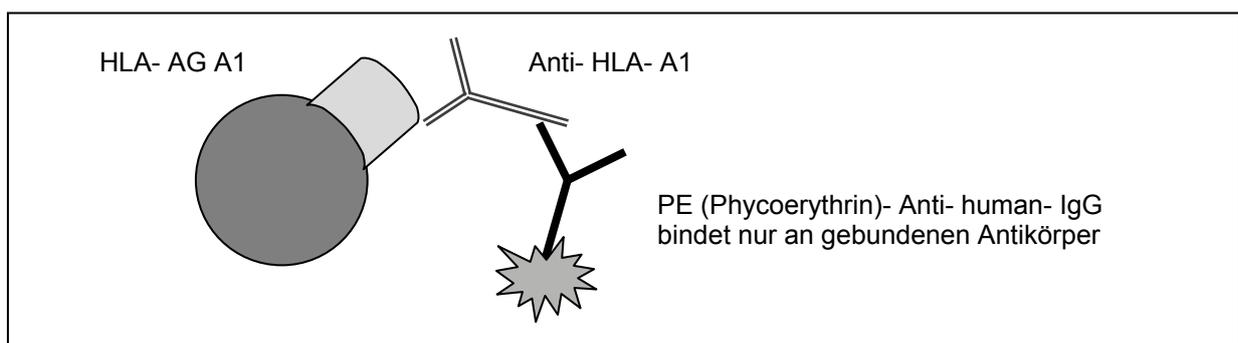


Abbildung 1.8: Antigen- Antikörper- Reaktion auf der Beadoberfläche mit Detektionsantikörper (modifiziert nach [67])

Mittels eines Durchflusszytometers (Luminex[®]- LX100) kann nun die Reaktion nachgewiesen werden. Hierzu kommen zwei unterschiedliche Laser zum Einsatz. Diese ermitteln zum einen die Bead- Population und zum anderen werden die Antigen- Antikörper- Reaktion mit dem gebundenen Detektionsantikörper festgestellt. Somit können mit dieser Technik einzelne Antikörperspezifitäten nachgewiesen werden.

1.3 Fragestellung

Auf Grund der klinischen Bedeutung der Anti- HLA- Antikörper im Bezug auf Transplantation und Transfusion (hier vor allem Thrombozytentransfusionen) auf Seiten der vom Patienten gebildeten Antikörper sowie hinsichtlich Transfusionszwischenfällen (z. Bsp. TRALI) durch vom Spender gebildete Antikörper ist eine genaue Bestimmung auf Vorhandensein und Differenzierung der HLA- Antikörper notwendig. Hierzu dienen verschiedene Verfahren wie der LCT und der MAIPA- Assay.

Im transfusionsmedizinischen Labor des Universitätsklinikum Rostock zeigten sich in der Routinediagnostik vereinzelt Diskrepanzen im Nachweis der HLA- Antikörper mittels der In-House- Techniken LCT und MAIPA- Assay bei Patientenserien. Diese Unstimmigkeiten sollten in dieser Arbeit darauf hin untersucht werden, ob sie reproduzierbar waren und ob sich hierzu Ursachen finden ließen. Gleichzeitig wurde ein weiteres Verfahren mit einem anderen Ansatzpunkt zur Antikörperdiagnostik zum Vergleichen hinzugezogen, dem so genannten Lymphozytenimmunfluoreszenztest (LIFT).

Daneben sollte die Frage geklärt werden, ob eines dieser Verfahren zum Screening bei Blutspendern zum Nachweis von HLA- Antikörpern geeignet ist. Damit kann man unter Umständen durch vorzeitiges Erkennen von HLA- Antikörpern beim Spender eine Transfusionsreaktion bzw. Transfusionszwischenfall beim Empfänger vermeiden.

Hinsichtlich des MAIPA- Verfahrens sollte in dieser Arbeit weiterhin untersucht werden, ob der eingesetzte HLA- Pool aus Thrombozyten von 8 ausgewählten Spendern genügend viele verschiedene HLA- I- Antigene enthält, um klinisch relevante HLA- Antikörper ausreichend zuverlässig zu entdecken. Vergleichend ist ein kommerzieller ELISA- Test zum Nachweis von HLA-Antikörper hinzugezogen worden.

Zusätzlich ist die Untersuchung bezüglich der Immunisierungsrate bei weiblichen Blutspenderinnen von Interesse. Hiermit kann ein Eindruck gewonnen werden, inwieweit Schwangerschaften und andere Sensibilisierungsereignisse zu einer HLA- Antikörperbildung führen.

2. Material und Methoden

2.1 Probanden und Serumgewinnung

Es wurden von 152 gesunden, freiwilligen Spenderinnen aus der Blutspende des Universitätsklinikum Rostock jeweils 10 ml Blut in einem Serum- Röhrchen entnommen. Diese Spenderinnen wurden mittels Fragebogen über Alter, Anzahl der Schwangerschaften, Anzahl Kinder und bisherige Bluttransfusionen befragt. Es erfolgte die Unterteilung der Spenderinnen in drei Gruppen:

- Gruppe 1: Spenderinnen 1 - 40, ausgewählte Spenderinnen mit positiver Schwangerschaftsanamnese
- Gruppe 2: Spenderinnen 41 – 152, unabhängig von Schwangerschaftsanamnese
- Gruppe 3: Spenderinnen 1 – 40 + alle Spenderinnen der Gruppe 2 mit einer positiven Schwangerschaftsanamnese

Die Serumröhrchen sind bei 2500 x g für 10 Minuten zentrifugiert worden, der Überstand abgehoben, das gewonnene Serum wurde in Reaktionsgefäße portioniert und bei -22°C eingefroren.

Ferner wurden 31 Seren von ausgewählten Patienten mit den folgenden In- House- Verfahren untersucht. Diese waren teilweise im Thrombozyten- und HLA- Labor hinsichtlich diskrepanter positiver Reaktionen in der HLA- Antikörperdiagnostik auffällig gewesen bzw. entstammen aus der Dialysedatenbank, wobei hier das Einschlusskriterium ein positiver HLA- Antikörpernachweis war.

2.2 MAIPA- Assay - monoclonal antibody immobilization of platelet antigens

Prinzip:

Das MAIPA- Testverfahren kann antigenspezifische Antikörper (HLA und HPA) mittels Thrombozyten nachweisen. Hierbei werden nacheinander bekannte Testthrombozyten mit dem zu untersuchenden Serum und mit monoklonalen Mausantikörpern inkubiert. Diese richten sich gegen Determinanten eines HLA- Klasse- I- Moleküls bzw. Glykoproteins. Somit entsteht bei vorhandenem humanem Antikörper ein Komplex aus Glykoprotein bzw. HLA- Molekül, humanem Antikörper und Mausantikörper. Nach Lyse der Thrombozyten durch einen Solubilisationspuffer, werden Zelltrümmer und Immunkomplexe durch Zentrifugation getrennt. Der Überstand wird in eine Mikrotiterplatte, die zuvor mit Ziege- Anti- Maus- IgG beschichtet wurde, pipettiert. Die mit monoklonalen Mausantikörper markierten HLA- Klasse- I- Moleküle bzw. Glykoproteine werden auf der Platte festgehalten (immobilisiert). Der

Nachweis von möglicherweise gebundenen humanen Antikörpern erfolgt durch eine Enzym-Substrat- Reaktion. Hierbei wird ein mit Peroxidase markierter Sekundärantikörper gegen humanes IgG eingesetzt, als Substrat fungiert OPD. Die Substratreaktion wird am Photometer gemessen (Abb. 2.1).

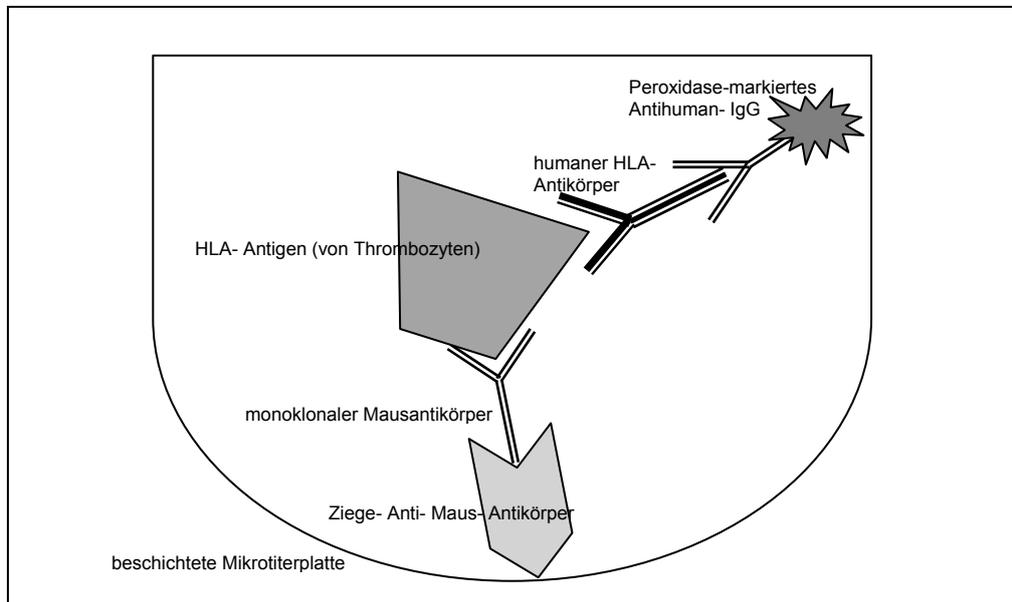


Abbildung 2.1: MAIPA- Assay - schematische Darstellung der Reaktion in der Mikrotiterplatte

Für den Nachweis von Anti- HLA- I- Antikörpern werden für die Patientengruppe jeweils HLA- Poolansätze mit Thrombozyten von 8 Spendern als auch Einzelansätze mit den Thrombozyten der Spender verwendet, um eventuell schwache Reaktionen eines einzelnen Anti- HLA Antikörper zu entdecken. Für das Screening sind für die zu testenden Spenderinnen nur der HLA- Pool vorgesehen.

Reagenzien und Geräte

- Coating- Puffer pH 9,6 zum Beschichten der Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit Proteinen:
 - Natriumcarbonat (wasserfrei) 1,59g,
 - Natriumhydrogencarbonat 4,20g,
 - Natriumacid 0,20g,
 - mit destilliertem Wasser auf 1000ml
- Ziege- Anti- Maus- IgG, Fcγ Fragment specific (goat anti mouse: GAM IgG), Codenummer 115-005-071 (Jackson Immuno Research, UK)

- gepoolte Testthrombozyten: Suspension gleicher Anteile von Thrombozyten von 8 ausgewählten Spendern in isotonischer Kochsalzlösung mit 0,1% NaN₃ (20 x 10⁶ Zellen)
- PBS- BSA 2%:
 - Dulbeccos phosphate buffered saline 10x pH 7,2 (80,00g NaCl, 2,00g KCl, 16,92g Dinatriumhydrogenphosphat x2H₂O, 2,00g Kaliumdihydrogenphosphat, Wasser zu 1000ml) 1:10 in destilliertem Wasser verdünnen
 - je 1ml einer 30%-igen Lösung von Rinderserumalbumin (BSA 30%, Biotest, Dreieich) mit je 14ml PBS 1x zur Endkonzentration von PBS- BSA 2% ergänzt
- Monoklonale Antikörper (MAK): monoclonal antibody Anti- β2- microglobulin, Clone B1G6 (Beckman Coulter, Krefeld)
- Solubilisationspuffer pH = 7,4:
 - Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid 1,21g,
 - Triton x 100 5,00ml,
 - isotonische NaCl- Lösung zu 1000,0ml
- TBS- Waschpuffer pH = 7,4:
 - Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid 1,21g,
 - Triton x 100 5,0ml,
 - Tween 20 0,5ml,
 - Calciumchloridlösung 25mmol/l 20,0ml,
 - isotonische NaCl- Lösung zu 1000,0ml
- Konjugatlösung: GAM- IgG- Antikörper (peroxidase- conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcy Fragment Specific, Codenummer 109-035-098 (Jackson Immuno Research, UK)) mit TBS- Puffer
- Substrat- Lösung (OPD- Lösung):
 - OPD- Tabletten 2mg (enthält 2,9% 1,2-phenylenediamenine Dihydrochloride) (DAKO, Hamburg) S 2045
 - je Tablette 3ml Aqua dest. und 1,25µl H₂O₂ (35%)
- Natriumchlorid (NaCl) 0,9%
- Schwefelsäure (H₂SO₄) 2,5mol/l
- Mikrotiterplatte, hohe Bindungskapazität, F- Form (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Reaktionsgefäße 1,5ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Multipette plus (Eppendorf, Hamburg)
- Pipette, Eppendorf research plus
- Brutschrank
- Mikrotiterplatten- Photometer Anthos htll

Durchführung

Es wird eine Lösung bestehend aus 11ml Coating- Puffer und 23µl GAM- IgG hergestellt. Von dieser Lösung werden jeweils 100µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mittels Multipette pipettiert und für mindestens 3 Stunden Raumtemperatur bzw. über ca. 24 Stunden bei 4°C abgedeckt stehen gelassen, damit die Vertiefungen der Mikrotiterplatte ausreichend mit GAM- IgG beschichtet werden können.

In isotonischer Kochsalzlösung mit 0,1% Natriumacid suspendierten Thrombozyten (20×10^6 pro Ansatz) werden in die Reaktionsgefäße pipettiert. Nach Zugabe von jeweils 100µl NaCl werden diese bei 8000 x g eine Minute zentrifugiert. Anschließend werden die Überstände abgesaugt, so dass nur noch das Thrombozytenpellet zurück bleibt. Es werden jeweils 30µl PBS- BSA und 60µl Patienten- bzw. Spenderserum hinzugegeben und gemischt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 30 Minuten.

Die Thrombozyten werden mit je 100µl NaCl gewaschen (Zentrifuge 8000 x g, eine Minute) und dann erneut mit jeweils 30µl PBS- BSA und 10µl MAK resuspendiert. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 30 Minuten.

Anschließend werden die Thrombozyten dreimal mit NaCl gewaschen (s.o.). Nach der letzten Zentrifugation wird das Pellet mit jeweils 100µl Solubilisationspuffer aufgenommen und bei 4°C 30 Minuten inkubiert. Die Reaktionsgefäße werden dann bei 15000 x g 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Die beschichtete Platte wird 5mal mit TBS- Puffer gewaschen. Aus den zentrifugierten Reaktionsgefäßen werden jeweils 50µl aus dem Überstand in den mit 200µl TBS- Puffer vorbereiteten Gefäßen verdünnt. Aus dieser Verdünnung werden zweimal jeweils 100µl untereinander in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. In die ersten zwei oberen Reihen der Platte werden TBS- Puffer (Leerwert) bzw. Testserum (AB- Serum) pipettiert. Es erfolgt die Inkubation bei 4°C für 90 Minuten.

Die Konjugatlösung wird mit 5µl GAH- IgG- AK und 495µl TBS- Puffer, davon 200µl in 12ml TBS- Puffer (Verdünnung 1:6000) vorbereitet.

Die Platte wird 5mal mit TBS- Puffer gewaschen und anschließend werden je Vertiefung 100µl des peroxidase markierten GAH- IgG- AK hinzugegeben. Die Inkubation erfolgt bei 4°C für 120 Minuten.

Die OPD- Lösung wird mit 12ml Aqua dest. und 4 OPD- Tabletten 10- 15 Minuten vor Gebrauch vorbereitet und bei 37°C dunkel belassen. Erst kurz vor Gebrauch wird 5µl H₂O₂ hinzupipettiert.

Die Platte wird erneut 6mal mit TBS- Puffer gewaschen. Danach werden jeweils 100µl der OPD- Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur dunkel für 15 Minuten.

Die Enzymreaktion wird mit je 50µl einer 2,5- molaren Schwefelsäure je Vertiefung beendet. Falls Luftblasen vorhanden sind, müssen diese vor der Messung mit einer Kanüle beseitigt werden. Die Extinktion wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 492nm, Referenzwellenlänge 620nm gemessen.

Die Auswertung erfolgt durch Berechnung des Mittelwertes der gemessenen Extinktionen (abzüglich des Leerwertes) und die Einstufung der Reaktionsstärken. Die Scores zu den Reaktionsstärken dienen dazu die Reaktionsstärken des MAIPA- Assays mit denen der semiquantitativen Tests (LIFT, LCT) vergleichbar zu machen.

Extinktion	Reaktionsstärke
0 - 0,15	negativ
0,15 - 0,20	(+)
0,20 - 0,40	+
0,40 - 0,80	++
0,80 - 1,20	+++
> 1,20	++++

2.3 LCT - Lymphozytotoxischer Test

Prinzip

Im LCT können komplementabhängige HLA- Antikörper der Klasse I nachgewiesen werden. Hierzu werden Lymphozyten mit bekannten HLA- Klasse- I- Molekülen mit dem zu untersuchenden Seren inkubiert. Sind HLA- Antikörper vorhanden, binden sich diese auf der mit entsprechenden Antigenen behafteten Lymphozytenoberfläche zu einem Antigen-Antikörper- Komplex. Dieser schädigt nach Komplementaktivierung die Lymphozytenmembran und damit auch die Zelle. Durch ein Farbstoffgemisch, das in die geschädigte Zelle eindringt, kann die Reaktion dargestellt und mittels Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Der größte Teil der Lymphozyten, der beim LCT eingesetzt wird, besteht aus T- Lymphozyten, ein kleinerer Anteil aus B- Lymphozyten. Daher können Anti- HLA- Klasse- II Antikörper schwache Reaktionen in diesem Verfahren auslösen. Zugleich können neben IgG- Antikörper auch IgM- Antikörper nachgewiesen werden. Diese können unter Verwendung von DTT (Dithiothreitol) ausgeschlossen bzw. bestätigt werden.

Für die Beurteilung der klinischen Relevanz bzw. des Sensibilisierungsgrades wird die Reaktion mittels des Panel- Reaktiven- Antikörper- Wertes (PRA- Wert in %) dargestellt. Der PRA- Wert spiegelt wieder, mit wie vielen in der Population vorkommenden HLA- Antigenen der Antikörper reagieren kann.

Reagenzien und Geräte

- Lymphozyten: kryokonservierte aufgetaute oder frisch gewonnene Lymphozyten von Spendern mit bekannten HLA- Antigenen
- Phenolrot:
 - Phenolrot 0,5g
 - Natronlauge 0,1% 14,1ml
 - Wasser zu 100,0ml
- Paraffinöl dickflüssig DAB 10 (Caelo, Hilden)
- positives Kontrollserum, negatives Kontrollserum (AB- Serum eines AB Rh negativen Spenders)
- Komplement (lyophilisiert.) vom Kaninchen (Biotest, Dreieich)
- Aqua dest.
- Tusche (Fa. Schmincke)
- Acridinorange- Ethidiumbromid- Stammlösung:
 - Ethidiumbromid 50mg
 - Acridinorange 15mg in 1ml 95% Ethanol
 - H₂O 49ml
- Polystyrol (PS)- Vorratsgefäß, 60K, 83,0/58/15mm, Seromat (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Mikrotestkammer- Terasaki- Platte (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Mikroliterspritze mit Dosiervorrichtung, Abgabevolumen 1,0µl (Hamilton)
- Mikrodispenser 6- Kanal, Abgabevolumen 3µl (Hamilton)
- Fluoreszenzmikroskop: Mikroskop Fluoreszenz Axiovert 100

Durchführung

In dem PS- Vorratsgefäß wird je Vertiefung 1µl Phenolrot und 100µl Serum pipettiert. Oben links wird das AB- Serum (negativ- Kontrolle), unten rechts die Standard- sowie Positivkontrolle pipettiert. Je nach Größe des Panels (je bekannte Lymphozyten eine Mikrotestplatte) wird die entsprechende Anzahl an Mikrotestplatten mit ca. 5µl Paraffinöl vorbereitet. Mit Hilfe des Mikrodispenser 6- Kanal werden aus dem PS- Vorratsgefäß je 1µl auf die vorgeölten Mikrotestplatte getropft. Es müssen sofort die Lymphozyten dazu getropft werden oder die Platten werden bei -20°C eingefroren.

Je Mikrotestplatte wird je Kavität 1µl einer bekannten Lymphozytensuspension getropft. Es erfolgt die Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten.

Der Komplementmix wird je 1ml Komplement mit 25µl Acridinorange- Ethidiumbromid- Stammlösung und 15µl Tusche hergestellt. Hiervon werden nun mittels Mikrodispenser 6- Kanal 6µl je Kavität getropft. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur und dunkel gelagert für 60 Minuten.

Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop bei 100facher Vergrößerung. Intakte Zellen erscheinen grün, geschädigte (die durch den AG- AK- Komplex und anschließender Komplementaktivierung geschädigt worden sind) erscheinen rot (Abb. 2.2 a-b).

Prozentsatz der geschädigten Zellen			Score
0	-	20%	1
20	-	40%	2
40	-	60%	4
60	-	80%	6
80	-	100%	8

Als positiv gelten Reaktionsstärken ab einem Score von 4.

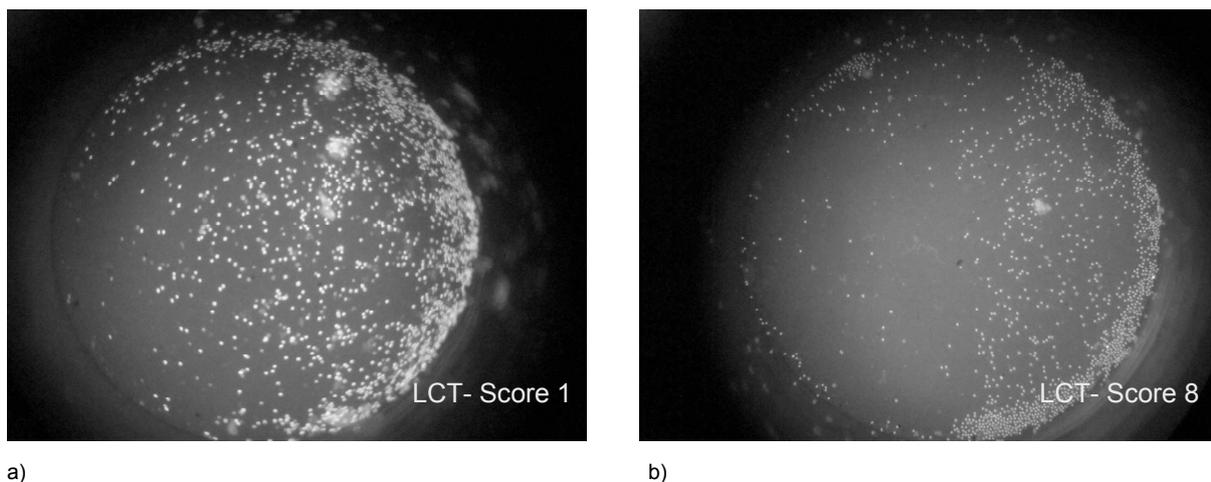


Abbildung 2.2 a-b: Reaktionsbild unter dem Fluoreszenzmikroskop, a) intakte Zellen, b) geschädigte Zellen

2.4 LIFT – Lymphozytenimmunfluoreszenztest

Prinzip

Im LIFT können HLA- Klasse- I- Antikörper mit Hilfe von Lymphozyten komplementunabhängig nachgewiesen werden. Nach Inkubation des zu untersuchenden Serums mit den isolierten Lymphozyten können sich vorhandene Antikörper mit den korrespondierenden Antigenen auf der Lymphozytenmembran binden. Diese AG- AK- Reaktion wird durch Zugabe von einem fluoreszenzmarkierten Antihumanglobulin (IgG, IgM,

IgA) sichtbar gemacht. Die Reaktion kann entweder mittels Durchflusszytometer gemessen oder am Fluoreszenzmikroskop bewertet werden.

Reagenzien und Geräte

- frisch isolierte Lymphozyten (A-D) von Spender/innen der Blutgruppe 0
- PBS- Puffer: DBPS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 10x ohne CaCl_2 und MgCl_2 (Gibco BRL), mit Aqua dest. auf 1x verdünnt
- Konjugat: (DakoCytomation, Dänemark)
 - polyclonal Rabbit Anti- Human IgG/FITC Rabbit F(ab')₂, Codenummer F 0315
 - polyclonal Rabbit Anti- Human IgM/FITC Rabbit F(ab')₂, Codenummer F 0317
 - polyclonal Rabbit Anti- Human IgA/FITC Rabbit F(ab')₂, Codenummer F 0316
- Rundbodenplatte, 96 well (Sarstedt, Nümbrecht)
- Multipette plus (Eppendorf, Hamburg)
- Pipette research plus (Eppendorf, Hamburg)
- Objektträger und Deckgläser (Menzel-Gläser)
- Plattenrüttler
- Plattenzentrifuge
- Axioskop 40, Zeiss

Testoptimierung

Die Ansätze für den LIFT wurden anfänglich in Reaktionsgefäßen angesetzt. Jedoch ist dies für ein Screeningverfahren zu aufwendig und wurde daher bereits auch von anderen Laboren auf Rundbodenplatte umgestellt. Dies erbrachte vorerst in unserem Labor nur mäßige Ergebnisse und musste daher für dieses Labor optimiert werden.

Die zu untersuchenden Variablen bestanden aus: Blutröhrchen für die Zellisolierung, Häufigkeit der Waschvorgänge, Umdrehungszahl der Zentrifugation und Konjugatverdünnung. Hierzu wurden jeweils zwei Negativkontrollen und Positivkontrollen, sowie jeweils zwei Blutgruppen- 0- Spender- Lymphozyten verwendet.

Zuerst wurden Waschvorgänge und Umdrehungszahl variiert und diese gegen die Reaktion im Reaktionsgefäß verglichen. Bei zu geringer Umdrehungszahl und zu häufigem Waschen auf der Platte konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop nur noch wenige Zellen ausfindig gemacht werden, so dass eine Bewertung nicht möglich war. Ein ausreichend geringer Background mit aber noch ausreichend Lymphozyten war durch jeweils 4maligen waschen vor und nach der Zugabe des Konjugates zu erreichen. Eine optimale Umdrehungszahl bei der Plattenzentrifugation, bei der nicht zu viele Lymphozyten verloren gingen bzw.

geschädigt wurden, lag bei 1200 x g. Des Weiteren wurde die FITC- IgG- Verdünnung 1:100 vs. 1:50 ausgetestet, wobei der Background bei 1:50 vertretbar war und eine sehr starke positive Reaktion zeigte.

Es zeigte sich beim Vergleich EDTA- Röhrchen versus Heparin- Röhrchen, dass Lymphozyten aus dem EDTA- Röhrchen in höherer Anzahl isoliert werden konnten und eine bessere positive Reaktion auf der Platte präsentierten.

Der abschließende Vergleich zwischen Reaktionsgefäß und Platte mit den oben genannten Veränderungen zeigte weiterhin einen Unterschied, da auf der Platte zwar weiter weniger Zellen nach dem Waschen vorhanden sind, diese aber für eine Bewertung ausreichen. Dieser Unterschied ist vertretbar und der Test wurde auf der Rundbodenplatte durchgeführt.

Konjugataustestung

Auf Grund der Umstellung des Verfahrens auf Platte und Untersuchung mit weiteren FITC- Immunglobulinen erfolgte eine Konjugataustestung. Bei FITC- IgG erfolgte der Vergleich von 1:50 vs. 1:100 und Platte versus Reaktionsgefäß wie oben bereits erwähnt.

Für die Austestung FITC- IgA und FITC- IgM wurde eine Verdünnungsreihe erstellt (1:80, 1:60, 1:40, 1:30, 1:20, 1:15) und mit zwei Negativkontrollen durchgeführt. Als Kriterium für die Sensitivität wurde der Background bewertet, bei der gerade noch keine Reaktion der Lymphozyten zu erkennen war. Bei FITC- IgA ist dies bei 1:60 erfolgt, bei FITC- IgM bei 1:80.

Durchführung

Auf der Rundbodenplatte werden in der waagerechten Reihe die Lymphozyten A- D und in der senkrechten Reihe die zu untersuchenden Seren pipettiert. Es werden hierfür je Vertiefung 40µl (15×10^3 Zellen/µl) fixierte Lymphozyten und 20µl Serum benötigt. Die Platte wird für ca. zwei Minuten auf dem Rüttler gemischt. Es erfolgt die Inkubation bei 37°C für 30 Minuten.

Anschließend wird die Platte 4mal mit PBS- Puffer gewaschen. Hierzu werden je Vertiefung 75µl des Puffers mittels Multipette pipettiert, für zwei Minuten auf dem Rüttler gemischt und danach erfolgt die Zentrifugation in der Plattenzentrifuge bei 1200 x g für zwei Minuten. Der Überstand muss vorsichtig abgeschüttet werden und die restliche Flüssigkeit sollte von einem Tuch aufgesaugt werden. Während des letzten Waschschrittes wird die Konjugatlösung vorbereitet. Hierbei wird entsprechend der Größe des Ansatzes PBS- Puffer und FITC- markierte Antikörper gemischt. Die Verdünnung für FITC- IgG beträgt 1:50, für FITC- IgM 1:80, für FITC- IgA 1:60. Je Vertiefung werden 40µl des Konjugates nach dem

letzten Waschvorgang pipettiert und auf dem Rüttler für ca. zwei Minuten gemischt. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 Minuten.

Die Platte wird erneut 4mal mit PBS- Puffer wie oben beschrieben gewaschen. Anschließend wird je Vertiefung 30µl Glycerin- PBS pipettiert und auf dem Rüttler gemischt. Nach Resuspendierung mittels Pipette werden jeweils 30µl auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Bewertung der Reaktion erfolgt durch Ablesen am Fluoreszenzmikroskop:

- 0 - keine Reaktion
- 1 - schwache Reaktion
- 2 - starke Reaktion
- 3 - sehr starke Reaktion

2.5 Lymphozytenisolierung

Prinzip

Für die Testverfahren LIFT und LCT ist es nötig frische Lymphozyten zu gewinnen. Für die Lymphozyten, die im LIFT benötigt werden, zeigte sich, dass die gewonnene Menge aus EDTA- Röhrchen höher ist. Für den LCT ist eine geringe Menge gewonnen aus Heparinblut ausreichend.

Durch Verdünnung des Blutes und darauf folgende Überschichtung auf Lymphoflot mit anschließender Zentrifugation und Waschung können die Lymphozyten von den restlichen Blutbestandteilen getrennt werden.

2.5.1 für LCT- Lymphozyten

Reagenzien und Geräte

- Heparin- Blut von bekannten Spender/innen (Antigene bekannt)
- HBSS- Puffer (Hank´s balanced salt solution, Gibco BRL) pH 7,2 ohne Na- Citrat
- Lymphoflot (Biotest, Dreieich), Dichtegradient zur Isolierung von Lymphozyten:
 - Na- Diatrizoat 9,1%
 - Ficoll 5,7%
- Lymphostabil (Biotest, Dreieich), zur Stabilisierung von Lymphozyten
- Transferpipette 1,0ml
- Polystyrol (PS)- Röhrchen 12ml (Greiner bio-one, Frickenhausen)

Durchführung

Heparin- Blut wird mit HBSS- Puffer 1:1 verdünnt und anschließend auf 2,5ml Lymphoflot langsam übergeschichtet. Die Röhrchen werden bei 1100 x g 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der Ring wird danach aus dem Interface abgehoben und in ein weiteres Röhrchen überführt und mit HBSS- Puffer aufgefüllt. Dies wird bei 130 x g für 10 Minuten zentrifugiert, anschließend abgeschüttet und erneut mit HBSS- Puffer gewaschen und zentrifugiert. Anschließend erfolgt die Aufschwemmung der isolierten Lymphozyten mit einer Konzentration von 2000- 3000 Lymphozyten/ μ l in Lymphostabil. Damit sind diese Zellen bis zu 4 Tagen bei einer Temperatur von 2- 8° C haltbar.

2.5.2 für LIFT- Lymphozyten

Reagenzien und Geräte

- EDTA- Blut, BG 0 (A- D)- Spender/innen
- HBSS- Puffer (Hank's balanced salt solution) pH 7,2 ohne Na- Citrat:
 - Natriumchlorid 2,4g
 - Kaliumchlorid 0,12g
 - Calciumchlorid 0,057g 2H₂O
 - Magnesiumsulfat Sicc. 0,03g
 - Glucose wasserfrei 0,3g
 - Kaliumdihydrogenphosphat 0,018g zu 300 ml H₂O
 - Dinatriumhydrogenphosphat 0,018g 2H₂O
- Lymphoflot (Biotest, Dreieich), Dichtegradient zur Isolierung von Lymphozyten:
 - Na- Diatrizoat 9,1%
 - Ficoll 5,7%
- PBS- Puffer: DBPS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 10x ohne CaCl₂ und MgCl₂ (Gibco BRL), mit Aqua dest. auf 1x verdünnt
- Erythrozytenlyse- Puffer pH 7,2- 7,4:
 - Kaliumhydrogencarbonat 0,5005g
 - Ammoniumchlorid 4,145g
 - Titriplex III 0,0185g
 - H₂O zu 500,0ml
- Paraformaldehydlösung 4% pH 7,0- 7,4
- Polystyrol (PS)- Röhrchen 12ml (Greiner bio-one, Frickenhausen)
- Transferpipette 1,0ml

- Sysmex KX 21

Durchführung

Das EDTA- Blut wird 1:1 mit HBSS- Puffer verdünnt. Anschließend wird das Gemisch langsam mittels Transferpipette auf 2,5ml Lymphoflot in PS-Röhrchen übergeschichtet. Die folgende Zentrifugation erfolgt bei 1100 x g für 20 Minuten ohne Bremse. Danach wird der Ring aus dem Interface, der die Lymphozyten enthält, mittels Transferpipette abgesaugt und in ein weiteres Röhrchen überführt und mit PBS- Puffer aufgefüllt. Es wird bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgeschüttet. 2ml Erylysepuffer wird je Röhrchen hinzugegeben, gemischt und für 5 Minuten kühl gestellt. Anschließend erfolgt erneut ein Waschvorgang mit PBS- Puffer. Nach dem Abschütten werden 1,5ml PBS- Puffer und 0,5ml Formaldehydlösung auf die Lymphozyten gegeben, gemischt und für 5 Minuten dunkel gelagert. Danach wird noch zweimal gewaschen und schließlich die Lymphozyten je nach Menge (erstmal mittels Augenmaß) mit PBS- Puffer verdünnt und am Sysmex gemessen. Die Einstellung erfolgt auf ca. 15×10^3 Zellen/ μ l.

2.6 weitere Verfahren

Als kommerzielles Screeningverfahren wurde der „AbScreen HLA class I“ von Bio-Rad (München) verwendet. Dies ist ein Festphasen- Enzymimmunoassay (ELISA) zum direkten Nachweis von HLA- Klasse- I- IgG- Antikörpern. Diese werden gegen ein Pool aus hochgereinigten HLA- Klasse- I- Glykoproteinen angesetzt. Um sicherzustellen, dass jedes Antigen im Pool präsentiert werden kann, werden dazu Antigene von mindestens 300 Spendern eingesetzt. Sind entsprechende Antikörper gegen anwesende Antigene vorhanden, werden diese auf der Platte festgehalten. Der Nachweis der Antigen- Antikörper- Reaktion erfolgt mittels eines enzymmarkierten Antikörpers. Dieser wird durch eine abschließende Enzymreaktion mit dem Substrat nachgewiesen. Die Reaktion wird photometrisch bei 405 nm gemessen. Als positiv gelten Werte, die über dem entsprechenden cut- off- Wert jeder Durchführung liegen. Der cut- off- Wert schwankt bei jeder Durchführung, da dieser von den gemessenen Werten der Negativkontrolle, die bei jedem Versuch mitgeführt wird, abhängig ist. Werte, die 15% unterhalb des cut- off liegen, befinden sich definitionsgemäß im Grauzonenbereich, werden jedoch in dieser Arbeit als negativ eingestuft. Zur weiteren Differenzierung der positiven Seren im „AbScreen HLA class I“ erfolgte die Untersuchung im „AbIdent HLA class I“ von Bio-Rad (München), ebenfalls ein direkter Nachweis von HLA- Antikörper mittels der ELISA- Technik. Hierbei wird ein Panel mit HLA- Klasse- I- Glykoproteine von 40 Spendern verwendet. Anhand des Reaktionsmusters kann dann auf den entsprechenden Antikörper geschlossen werden.

Zum Ausschluss bzw. Differenzierung der HLA- Klasse- II- Antikörper wurden zwei weitere kommerzielle Tests eingesetzt. Als B- Zell- Screen kam der Test „AbScreen HLA class II“ und zur weiteren Differenzierung „AbIdent HLA class II“, beides von Bio-Rad (München), zum Einsatz. Auch diese beiden Verfahren beruhen auf dem Prinzip des Festphasen-Enzymimmunoassays zum in- vitro Nachweis von HLA- Klasse- II- IgG- Antikörpern.

Die Anwendung dieser vier Verfahren erfolgt entsprechend der beigelegten Anleitungen zur Durchführung der Assays.

2.7 Statistische Verfahren

Zur Zusammenstellung der Daten wurde EXCEL (Microsoft®) verwendet, die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware „R“ [68].

3. Ergebnisse

3.1 Patientengruppe

3.1.1 Patienten: allgemeine Daten

Unter den 31 Seren der Patientengruppe fanden sich 17 Dialysepatienten. Die 14 weiteren Patienten sind in der Klinik durch transfusionsbedingte Zwischenfälle bzw. nicht adäquaten Thrombozytenanstieg nach Transfusion auffällig geworden. Hierunter befanden sich 9 weibliche Patienten, bei denen keine Schwangerschaftsanamnese erhoben wurde. Bei diesen Patienten fiel bei den diagnostischen Untersuchungen auf HLA- Antikörper in mindestens einem der Verfahren (MAIPA- Assay, LCT) eine positive Reaktion auf.

3.1.2 Ergebnisse Patientengruppe

Alle Seren waren in mindestens einem Testverfahren reaktiv aufgefallen. Insgesamt ergaben 19 von 31 Seren in der Patientengruppe in allen drei Verfahren ein positives Resultat, während bei 12 Seren Diskrepanzen auftraten (Tab. 3.1).

		HLA-Pool		LCT		LIFT			AbScreen
	D?	Rkt.	Score		PRA %	IgG	IgM	IgA	HLA class II
1	P	0,996	3+	negativ	0	negativ	negativ	negativ	n.d.
2	P	1,533	4+	negativ	0	positiv	negativ	negativ	n.d.
3	P	0,745	2+	negativ	0	negativ	negativ	negativ	n.d.
4	P D	2,862	4+	positiv	51,6	positiv	negativ	negativ	negativ
5	P	0,376	1+	negativ	0	positiv	negativ	negativ	n.d.
6	P	2,52	4+	positiv	92,6	positiv	negativ	negativ	negativ
7	P	0,923	3+	positiv	77,8	positiv	negativ	negativ	positiv
8	P	0,367	1+	negativ	0	negativ	negativ	negativ	n.d.
9	P D	0,777	2+	positiv	33,3	positiv	negativ	negativ	positiv
10	P D	1,237	4+	positiv	48,1	positiv	negativ	negativ	negativ
11	P D	1,517	4+	positiv	14,8	positiv	negativ	negativ	positiv
12	P D	1,695	4+	positiv	22,2	negativ	negativ	negativ	negativ
13	P D	1,746	4+	positiv	55,5	positiv	negativ	negativ	positiv
14	P D	2,406	4+	positiv	51,6	positiv	negativ	negativ	negativ
15	P	>3,000	4+	positiv	85,2	positiv	negativ	negativ	negativ
16	P	1,063	3+	positiv	29,6	positiv	negativ	negativ	negativ
17	P D	1,144	3+	GZ negativ	(7,4)	positiv	negativ	negativ	positiv
18	P D	0,465	2+	positiv	55,5	positiv	negativ	negativ	positiv
19	P D	0,495	2+	GZ negativ	(7,4)	negativ	negativ	negativ	negativ
20	P	>3,000	4+	positiv	92,6	positiv	negativ	positiv	negativ
21	P	1,771	4+	positiv	18,5	positiv	negativ	negativ	negativ
22	P	2,809	4+	positiv	29,6	positiv	negativ	negativ	positiv
23	P	>3,000	4+	positiv	96,3	positiv	negativ	negativ	positiv
24	P D	2,233	4+	positiv	11,1	positiv	negativ	negativ	positiv
25	P D	0,133	negativ	positiv	22,2	negativ	negativ	negativ	negativ
26	P D	0,925	3+	positiv	37,0	positiv	negativ	negativ	negativ
27	P D	0,974	3+	positiv	22,2	positiv	positiv	positiv	positiv
28	P D	0,21	1+	positiv	14,8	negativ	negativ	negativ	positiv
29	P D	0,017	negativ	positiv	14,8	negativ	negativ	negativ	positiv
30	P	0,81	3+	positiv	33,3	positiv	negativ	negativ	negativ
31	P D	1,096	3+	negativ	0	negativ	negativ	negativ	positiv

Tabelle 3.1 : Ergebnisse der Untersuchungen der Patientengruppe
P Patient, D(?) Dialysepatient(?), Rkt. Reaktionsstärke, GZ Grauzone, PRA Panel reactive antibody, n.d. nicht durchgeführt

Hierbei zeigten sich im MAIPA- Assay im HLA- Pool 29 von 31 Seren positiv (93,6% positive Resultate, 95%- Konfidenzintervall: 78,6% - 99,2%). Bei zwei Seren konnten in dieser Untersuchung keine positiven Reaktionen nachgewiesen werden. Die zwei negativ getesteten Seren blieben auch im LIFT negativ, wobei das Resultat im lymphozytotoxischen Test positiv war. Der LCT konnte weiterhin bei insgesamt 23 Seren positive Reaktionen bestimmen, während 8 Seren negativ ausfielen (74,2% positive Resultate, 95%- Konfidenzintervall: 55,4% - 88,1%). Der LIFT erzielte bei 22 Seren eine positive Reaktion (relative Häufigkeit bei 71%, 95%- Konfidenzintervall: 52% - 85,8%) (Abb. 3.1).

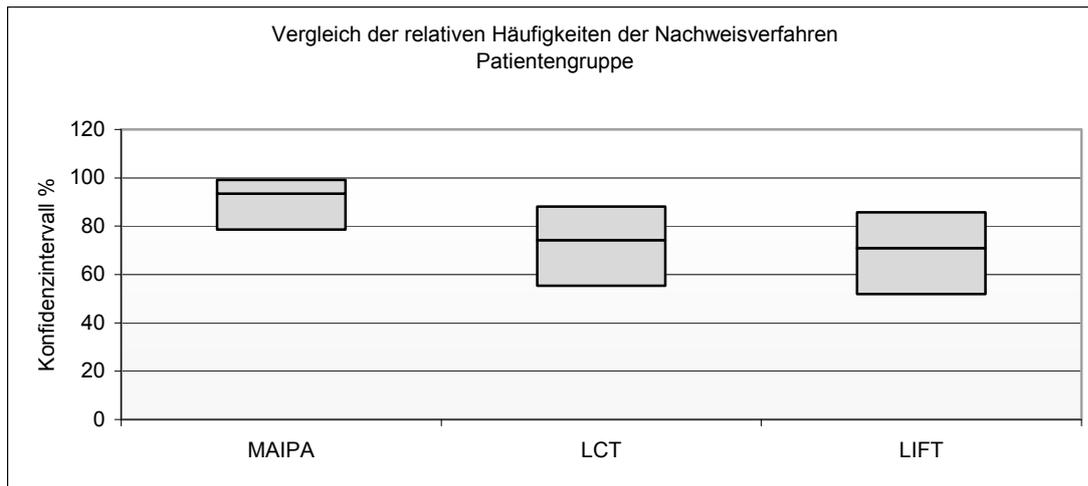


Abbildung 3.1: relative Häufigkeit mit 95%- Konfidenzintervall in der Untersuchungsgruppe der Patienten für die Verfahren MAIPA- Assay, LCT, LIFT (IgG)

Das Ausmaß von Übereinstimmungen bzw. Diskrepanzen (positive/negative Resultate) zwischen den Testverfahren wurde mit McNemar's Test überprüft. Dabei fanden sich keine überzufälligen Unterschiede zwischen LIFT und LCT, wogegen sich im MAIPA- Assay überzufällig häufiger positive Resultate (als bei Untersuchungen im LIFT) ergaben (Tab. 3.2).

		LCT	
		+	-
MAIPA	+	21	8
	-	2	0
		p= 0,114	

a)

		LIFT	
		+	-
MAIPA	+	22	7
	-	0	2
		p= 0,023	

b)

		LCT	
		+	-
LIFT	+	19	3
	-	4	5
		p= 1	

c)

Tabelle 3.2 a-c: Vierfeldertafel und p- Werte für die vergleichende Untersuchung MAIPA/LCT, MAIPA/LIFT, LCT/LIFT(IgG) in der Patientengruppe

Die Seren der Patientengruppe sind im MAIPA- Assay neben dem Ansatz im HLA- Pool auch als Einzelansatz mit den 8 Testthrombozyten der Spender angesetzt worden (Tab. 3.3). Seren, die im Pool keine Reaktion zeigten, sind in dem Einzelansatz ebenfalls negativ geblieben. Eine ausreichend sichere Feststellung der Antikörperspezifität ist bei dem verwendeten kleinen Testzellpanel im MAIPA- Assay in der Regel nicht möglich.

		HLA- Pool	Zelle 1	Zelle 2	Zelle 3	Zelle 4	Zelle 5	Zelle 6	Zelle 7	Zelle 8
Patient			A2,3, B51,47	A1,66, B8,65	A3,26 B44,38	A24,25 B18,55	A3,11 B7,62	A24,31 B63,35	A3,68 B50,60	A1,11 B7,57
1		0,996	0,488	0,012	0,021	0,295	1,149	0,077	0,64	1,532
2		1,533	0,03	0,029	2,13	0,442	0,088	0,06	0,041	0,175
3		0,745	0,354	0,703	0,27	0,248	0,342	0,586	0,057	1,218
4	D	2,862	>3,000	0,266	0,64	0,94	2,801	0,65	2,598	>3,000
5		0,376	0,048	0,067	0,021	0,028	1,288	1,628	0,048	0,403
6		2,52	1,791	2,395	0,319	2,679	>3,000	2,291	2,213	>3,000
7		0,923	0,944	0,036	0,211	0,23	1,198	1,126	0,624	0,724
8		0,367	0,171	0,022	0,035	0,129	0,762	0,065	0,298	1,006
9	D	0,777	0,279	0,977	0,377	0,917	0,275	0,135	0,032	0,413
10	D	1,237	1,782	1,14	2,281	1,623	2,267	2,324	2,952	>3,000
11	D	1,517	0,35	0,01	0,011	0,598	1,719	0,09	0,417	2,567
12	D	1,695	1,025	0,205	0,022	0,485	0,536	2,323	0,583	0,324
13	D	1,746	1,805	0,373	0,583	1,473	0,554	>3,000	0,251	0,694
14	D	2,406	>3,000	0,718	2,798	0,39	2,308	0,972	2,694	1,571
15		>3,000	>3,000	0,217	0,107	1,482	>3,000	>3,000	2,325	>3,000
16		1,063	2,673	0,06	0,011	0,748	0,437	0,163	0,054	0,998
17	D	1,144	1,737	0,063	0,328	0,562	0,599	0,806	0,535	0,688
18	D	0,465	1,016	0,253	0,553	0,153	1,278	0,417	0,513	2,411
19	D	0,495	0,027	0,029	0,028	0,485	0,032	1,572	0,034	0,187
20		>3,000	>3,000	1,979	2,799	1,115	>3,000	>3,000	>3,000	>3,000
21		1,771	0,765	0,048	1,141	0,367	0,777	2,749	0,249	1,424
22		2,809	>3,000	0,042	>3,000	>3,000	0,032	>3,000	0,099	>3,000
23		>3,000	>3,000	2,155	1,469	2,201	>3,000	>3,000	>3,000	>3,000
24	D	2,233	1,052	0,864	0,144	0,322	2,198	0,209	2,464	>3,000
25	D	0,133	0,103	0,11	0,068	0,08	0,078	0,091	0,07	0,067
26	D	0,925	1,088	0,025	0,028	0,103	0,017	0,133	0,547	0,23
27	D	0,974	0,498	0,855	0,534	0,447	0,367	0,641	0,445	1,298
28	D	0,21	0,117	0,03	0,015	0,34	0,067	1,004	0,183	0,156
29	D	0,042	0,024	0,064	0,049	0,023	0,029	0,105	0,051	0,029
30		0,81	2,261	0,018	0,031	1,094	0,014	1,448	2,422	0,966
31	D	1,096	1,171	0,132	0,642	0,657	0,902	0,922	0,317	0,457

Tabelle 3.3: MAIPA- Assay Ergebnisse der Patientengruppe, HLA- Pool und Einzelsatz, D Dialyse, Extinktion negativ - (+), + - ++, +++, +++++

Des Weiteren sind alle Seren hinsichtlich eines IgM- und IgA- HLA- Klasse- I- Antikörpers im LIFT untersucht worden (Tab. 3.1). Patientenserum 27 reagierte hierbei sowohl im LIFT- IgM als auch im LIFT- IgA positiv. Patientenserum 20 reagierte im Ansatz für den Nachweis für IgA- Antikörper mit einer positiven Reaktion. Alle weiteren Seren fielen bezüglich eines IgM- oder IgA- Antikörper negativ aus.

Die Seren der Patientengruppe, die im LCT reagierten, wurden in einem kommerziellen Enzymimmuntest angesetzt. Hiermit soll eine Reaktion, ausgelöst durch von B- Zell-Lymphozyten gebildete HLA- Klasse- II- Antikörper, ausgeschlossen werden. Hierfür wurde der „AbScreen HLA class II“ von Bio-Rad verwendet. In der Patientengruppe sind bei dieser Methode 11 Seren positiv getestet worden, so dass eine mögliche Reaktion im LCT durch

HLA- Klasse- II- Antikörper denkbar ist. Weiterhin fielen zwei Seren auf, die trotzdem sie im LCT negativ erschienen, im „AbScreen HLA class II“ angesetzt worden sind und ebenfalls hier eine positive Reaktion zeigten. Weitere Patientenserum, die trotz negativen LCT- Ergebnis in diesem Verfahren getestet sind, blieben negativ (Tab. 3.1).

3.2 Spenderinnengruppe

3.2.1 Spenderinnen: Verteilung- Alter, Schwangerschaften, Bluttransfusionen

Insgesamt sind Seren von 152 Blutspenderinnen (Gesamtgruppe) im Alter von 18 bis 65 Jahren in den drei In- House- Verfahren (MAIPA- Assay, LCT, LIFT) sowie mit einer kommerziellen ELISA- Technik („AbScreen class I“, Bio-Rad) getestet worden. Die ersten 40 Spenderinnen (Gruppe 1) sind dafür ausschließlich nach stattgefundener Schwangerschaft eingeschlossen worden. Die Spenderinnen 41 bis 152 (Gruppe 2, 112 Spenderinnen) waren unausgewählt, also unabhängig von stattgefundenen Schwangerschaften, in die Studie aufgenommen. Damit sollte die Spenderinnenpopulation hinsichtlich der Untersuchung eines möglichen Screeningverfahren besser wiedergegeben werden. Zur Gruppe 3 werden alle Spenderinnen gezählt, die in ihrer Anamnese eine Schwangerschaft (Geburt, Fehlgeburt, Abbruch) angaben. Das betrafen insgesamt 112 Seren von den Spenderinnen aus der Gesamtgruppe (Serum 1 - 40 sowie alle Spenderinnen der Gruppe 2 mit positiver Schwangerschaftsanamnese).

Die Auswertung erfolgt in den Gruppen 2 und 3. Diese sind in der Verteilung (unausgewählte Spenderinnen bzw. Spenderinnen mit anamnestischer Angabe einer stattgefundenen Schwangerschaft) für die Beurteilung der Blutspenderinnenpopulation hinsichtlich einer Immunisierung gegen HLA- Antigene geeignet.

Spenderinnen mit ausschließlich einer Transfusionsanamnese als Sensibilisierungsereignis konnten in diese Studie nicht einbezogen werden. Von allen eingeschlossenen Spenderinnen berichteten 8 Spenderinnen von einer Blutübertragung (1 – 2 Bluttransfusionen) in der Vergangenheit. Diese 8 Spenderinnen haben dazu auch eine positive Schwangerschaftsanamnese angegeben.

Das Durchschnittsalter der Blutspenderinnen der Gruppe 2 liegt bei 37,5 Jahren. Der Median liegt bei 36 Jahren. Der größte Anteil von Spenderinnen ist im Bereich 26 - 35 Jahren zu finden (Abb. 3.2).

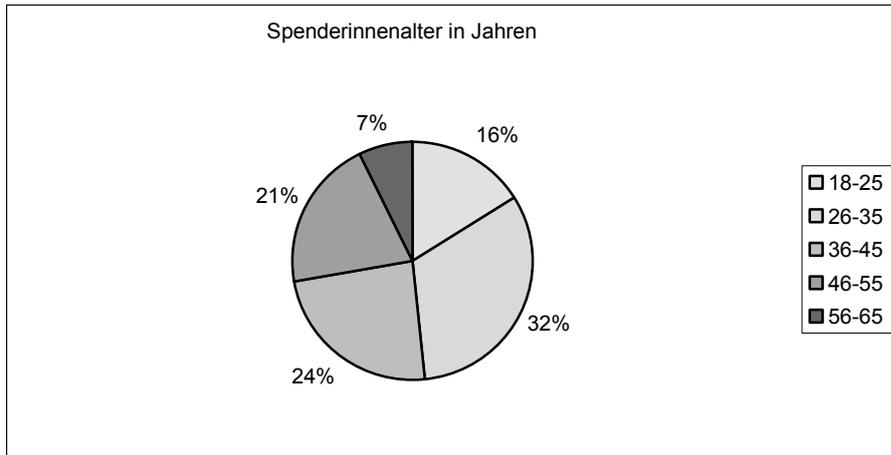


Abbildung 3.2: Verteilung Spenderinnen nach Alter in der Blutspendeeinrichtung der Abteilung für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Rostock

In dieser Gruppe konnte bei 64,3% (72/112) der Blutspenderinnen eine Schwangerschaft eruiert werden. Davon gaben insgesamt 4,5% (5/112) der Spenderinnen ausschließlich ein Schwangerschaftsabbruch bzw. Fehlgeburt an. 35,7% (40/112) der Spenderinnen verneinten ein Sensibilisierungsereignis in der Vorgeschichte (Abb. 3.3).

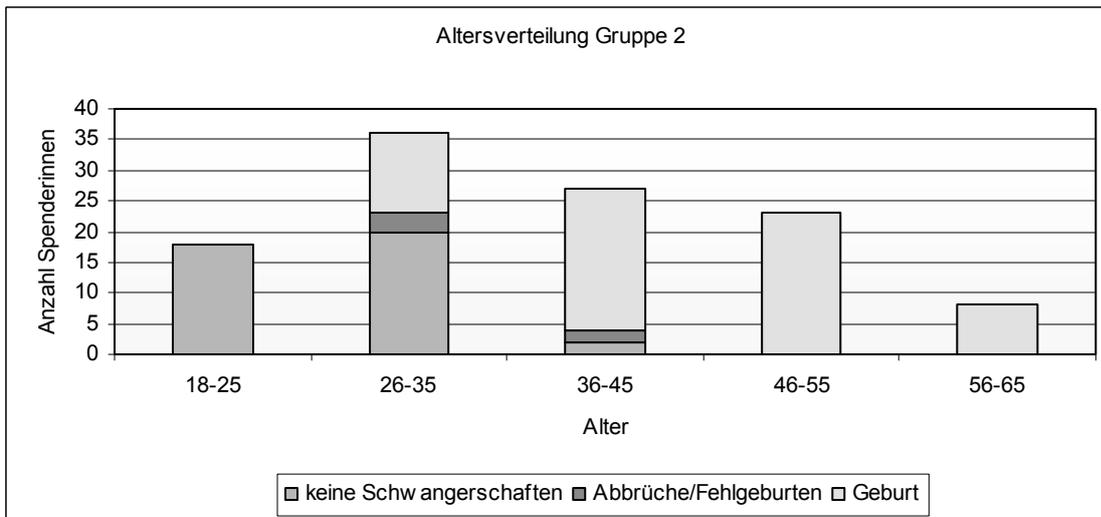


Abbildung 3.3: Altersverteilung der Spenderinnen der Gruppe 2 mit der dazugehörigen Schwangerschaftsanamnese

In der Gruppe 3 beträgt das Durchschnittsalter 44,3 Jahre. Der Median liegt bei 37,5 Jahren. In dieser Gruppe findet sich der größte Anteil an Spenderinnen im Bereich 46 – 55 Jahren auf Grund der Auswahl der Spenderinnen nach Schwangerschaften. Bei 7,1% (8/112) der Spenderinnen im Alter von 18 – 25 Jahren dieser Gruppe konnte in der Schwangerschaftsanamnese keine ausgetragene Schwangerschaft eruiert werden (Abb. 3.4).

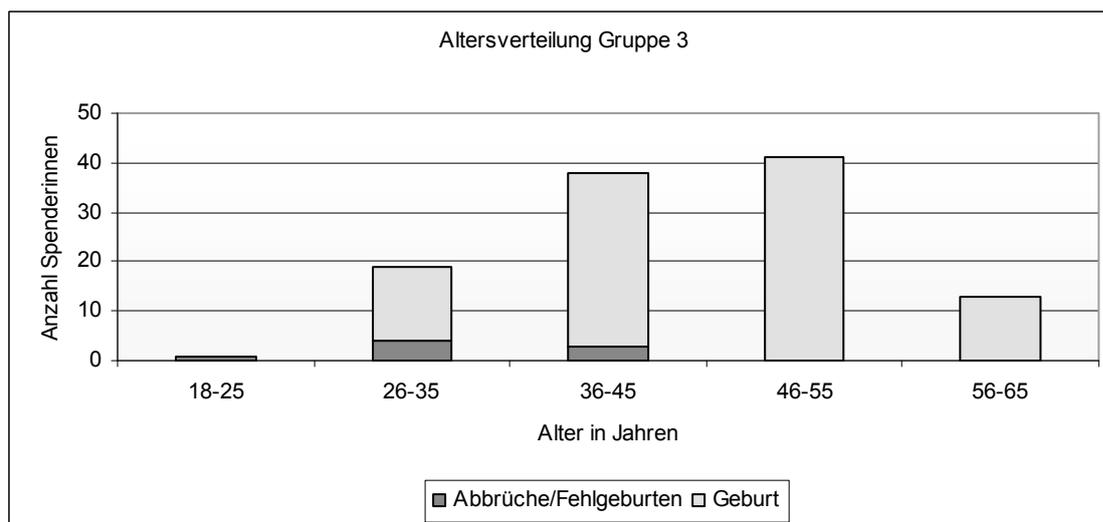


Abbildung 3.4: Altersverteilung der Spenderinnen der Gruppe 3 mit der dazugehörigen Schwangerschaftsanamnese

Daneben wurde die Anzahl der erfolgten Schwangerschaften bei den Blutspenderinnen (Abbrüche, Fehlgeburten, Geburten) erfragt. 66,1% (74/112) gaben 1 - 2 Schwangerschaften an, 32,1% (36/112) der Spenderinnen angegeben worden, 1,8% (2/112) Spenderinnen hatten mehr als 5 Schwangerschaften in ihrer Anamnese aufzuweisen (Abb. 3.5).

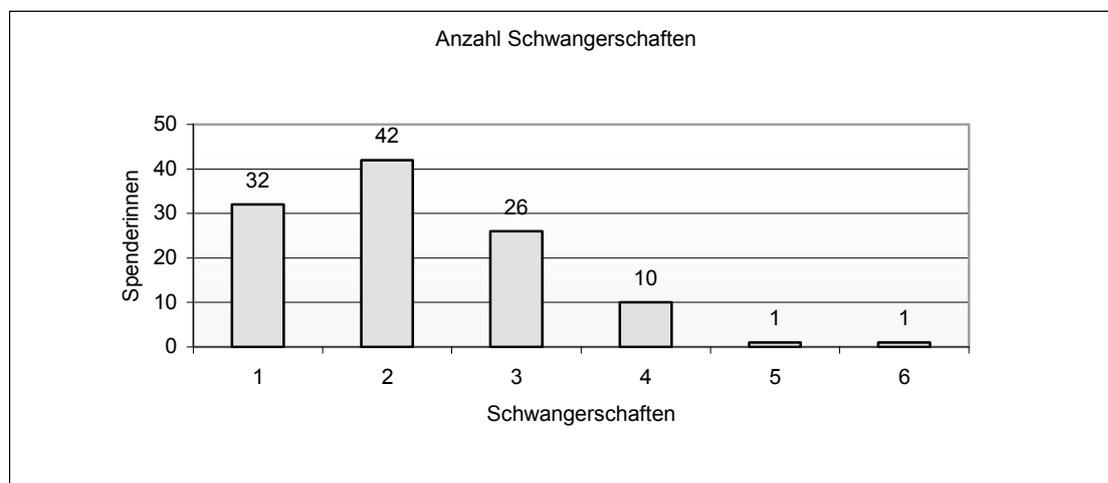


Abbildung 3.5: Anzahl der Schwangerschaften der Spenderinnen der Gruppe 3

3.2.2 Ergebnisse Spenderinnen Gruppe 2

In der Gruppe 2 konnten insgesamt bei 16,1% (18/112) der Spenderinnen Antikörper in den Verfahren positiv getestet werden (Tab. 3.7, Abschnitt Ergebnisse Spenderinnen Gruppe 3). Alle positiv getesteten Spenderinnen weisen durchgemachte Schwangerschaften auf, fünf zusätzlich eine erfolgte Bluttransfusion (Nr. 65, 78, 113, 127, 137). Von diesen 18 Seren reagierte ein Serum (Nr. 78) in allen vier Verfahren positiv. Dieses Serum zeigte als einziges

eine 4fache Reaktionsstärke im MAIPA- Assay und konnte im LCT als Anti- HLA A1 identifiziert werden.

7 Seren (Nr. 78, 81, 85, 90, 98, 113, 116) zeigten im MAIPA- Assay eine Reaktion, womit sich eine relative Häufigkeit für den Nachweis von HLA- Antikörper von 6,3% (7/112) mit einem 95%- Konfidenzintervall von 2,6% – 12,5% ergibt. Im LCT reagierte ein weiteres Serum (Nr. 84) positiv (1,8% (2/112) positive Resultate, 95%- Konfidenzintervall 0,2% – 6,3%). Eine Identifizierung des Anti- HLA Antikörpers konnte bei dem Serum nicht erfolgen. Der LIFT zum Nachweis für HLA- Antikörper der Immunglobulinklasse G zeigte keine weiteren Reaktionen bis auf das bereits oben genannte Serum Nr. 78 (0,9% (1/112) positive Resultate, 95%- Konfidenzintervall 0,02% – 4,9%).

Im kommerziellen Screeningtest („AbScreen HLA class I“, Bio-Rad) reagierten 15,2% (17/112) der Seren mit einer positiven Reaktion. Das entsprechende 95%- Konfidenzintervall liegt zwischen 9,1 – 23,2% (Abb. 3.6).

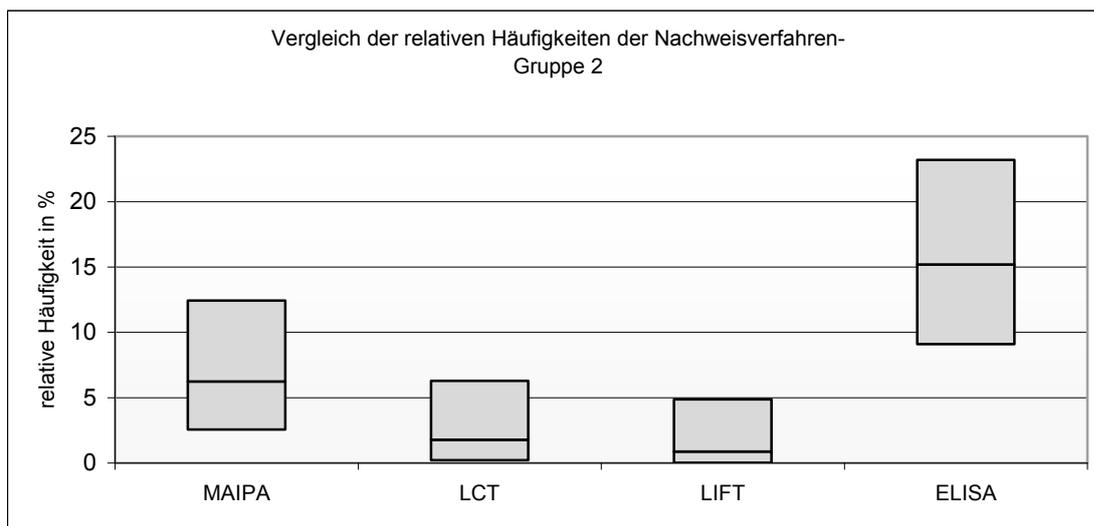


Abbildung 3.6: relative Häufigkeit und 95%- Konfidenzintervall in der Untersuchungsgruppe 2 für positive Ergebnisse in den Verfahren MAIPA- Assay, LCT, LIFT (IgG), ELISA

Wie in der Patientengruppe zeigte sich bei der Überprüfung des Ausmaßes der Diskrepanzen (positive/negative Resultate) mit dem McNemar Test, dass sich keine überzufälligen Unterschiede zwischen LIFT und LCT fanden, wogegen der MAIPA- Assay im Gegensatz zum LIFT und LCT häufiger positive Ergebnisse erzielte. Die größte Asymmetrie bei den vergleichenden Testverfahren zeigte sich in den Gegenüberstellungen mit dem ELISA, dieser zeigte die meisten positiven Resultate (Tab. 3.4).

		LCT	
		+	-
MAIPA	+	1	6
	-	1	104
p= 0,13			

a)

		LIFT	
		+	-
MAIPA	+	1	6
	-	0	105
p= 0,041			

b)

		LCT	
		+	-
LIFT	+	1	0
	-	1	110
p= 1			

c)

		ELISA	
		+	-
MAIPA	+	7	0
	-	10	95
p= 0,0044			

d)

		ELISA	
		+	-
LCT	+	1	1
	-	16	94
p= 6,9x10 ⁻⁴			

e)

		ELISA	
		+	-
LIFT	+	1	0
	-	16	95
p= 1,8x10 ⁻⁴			

f)

Tabelle 3.4 a-f: Vierfeldertafel und p- Werte für die vergleichende Untersuchung MAIPA/LCT, MAIPA/LIFT, LCT/LIFT(IgG), ELISA/MAIPA, ELISA/LCT, ELISA/LIFT in der Gruppe 2

Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung der Seren im LIFT zum Nachweis vorhandener Anti- HLA- I- Antikörper vom IgM- bzw. IgA- Typ. Bei keinen der Seren konnten Antikörper vom IgM- bzw. IgA- Typ nachgewiesen werden.

Legt man den MAIPA- Assay und LCT zusammen als Grundlage zur Berechnung der Immunisierungsrate, so ergibt sich in dieser Gruppe eine Rate von 7,1% (8/112). Mit dem „AbScreen HLA class I“ fand sich in dieser Spenderinnenpopulation eine Immunisierungsrate von 15,2% (17/112).

3.2.3 Ergebnisse Spenderinnen Gruppe 3

Unter allen Spenderinnen, die anamnestisch eine Schwangerschaft angegeben hatten, reagierten insgesamt 23,2% (26/112) der Seren in einem der vier Nachweisverfahren positiv (Tab. 3.5). Zusätzlich gaben fünf unter den positiv getesteten Spenderinnen eine Bluttransfusion analog zur Gruppe 2 an (Nr. 65, 78, 127, 137, 113).

	1	6	11	20	30	31	36	37	50	53	54	60	65	69	78	81	84	85	90	98	113	116	118	126	127	137		
MAIPA		2+	2+	1+											4+	1+		1+	1+	1+	2+	2+					(+)	
LCT						x	x	x							x		x											
LIFT		x		x											x													
ELISA	x	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

Tabelle 3.5 Ergebnisse zusammenfassend der positiv reagierenden Seren in den Verfahren MAIPA, LCT, LIFT IgG, ELISA

Serum Nr. 78 zeigte als einziges in allen vier Verfahren eine positive Reaktion (s. Ergebnisse Gruppe 2). Im MAIPA- Assay reagierten 10 Seren (Nr. 6, 11, 20, 78, 81, 85, 90, 98, 113, 116) mit einer 1- 4fachen positiven Reaktionsstärke. Die relative Häufigkeit HLA- Antikörper im MAIPA- Assay nachzuweisen liegt damit bei 8,9% (10/112) mit einem 95%-

Konfidenzintervall zwischen 4,4% – 15,8%. Unter diesen 10 Seren befanden sich drei Seren (Nr. 6, 20, 78), bei denen sich im LIFT ebenfalls eine Reaktion nachweisen ließ (2,7% (3/112) positive Resultate, 95%- Konfidenzintervall 0,6% – 7,6%). Der LCT zeigte zusätzlich zu den bereits unter der Gruppe 2 genannten Seren (Nr. 78, 84) bei drei weiteren Seren (Nr. 31, 36, 37) eine positive Reaktion (4,5% positive Resultate (5/112), 95%- Konfidenzintervall 1,5% - 10,1%). Eine genaue Anti- HLA- Antikörperdifferenzierung war hier nicht möglich. Im „AbScreen HLA class I“ reagierten 19,6% (22/112) der Seren positiv. Das 95%-Konfidenzintervall liegt hier zwischen 12,7% – 28,2% (Abb. 3.7).

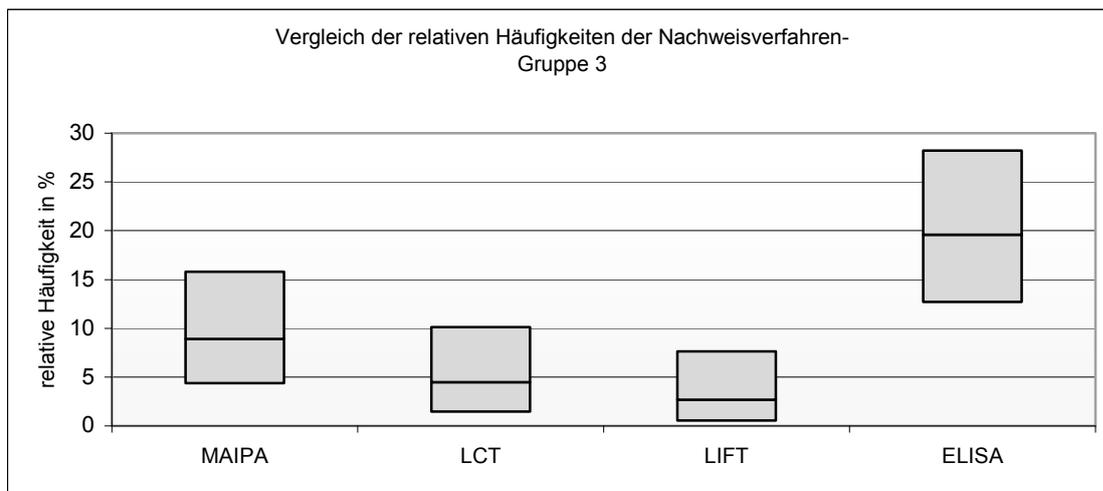


Abbildung 3.7: relative Häufigkeit und 95%- Konfidenzintervall in der Untersuchungsgruppe 3 für positive Ergebnisse in den Verfahren MAIPA- Assay, LCT, LIFT (IgG), ELISA

Beim Vergleich der Testverfahren zeigte in dieser Gruppe, dass sich im ELISA bei der Gegenüberstellung mit den anderen Verfahren deutlich häufiger positive Ergebnisse ergaben, wobei der Unterschied im Vergleich mit dem LIFT am größten erscheint ($p= 3,6 \times 10^{-5}$ McNemar's Test). Ebenso konnten im MAIPA- Assay im Vergleich mit dem LIFT häufiger positive Resultate beobachtet werden (Tab. 3.6).

		LCT	
		+	-
MAIPA	+	1	9
	-	4	98
p= 0,267			

a)

		LIFT	
		+	-
MAIPA	+	3	7
	-	0	102
p= 0,023			

b)

		LCT	
		+	-
LIFT	+	1	2
	-	4	105
p= 0,683			

c)

		ELISA	
		+	-
MAIPA	+	10	0
	-	12	90
p= 0,0015			

d)

		ELISA	
		+	-
LCT	+	1	4
	-	21	86
p= 0,001			

e)

		ELISA	
		+	-
LIFT	+	3	0
	-	19	90
p= 3,6x10 ⁻⁵			

f)

Tabelle 3.6 a-f: Vierfeldertafel und p- Werte für die vergleichende Untersuchung MAIPA/LCT, MAIPA/LIFT, LCT/LIFT(IgG), ELISA/MAIPA, ELISA/LCT, ELISA/LIFT in der Gruppe 3

Wie auch in der Gruppe 2 zeigte sich im LIFT- Ansatz gegen Antikörper vom IgA bzw. IgM- Typ keine der Seren mit einer positive Reaktion (Tab. 3.7).

Nr.	Alter	SS	T/so.	MAIPA		LCT		LIFT			ELISA
				Score	Rkt.		PRA %	IgG	IgM	IgA	
1	40	4	0	negativ	0,024	negativ		negativ	negativ	negativ	positiv
2	28	1	0	negativ	0,012	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
3	24	1	0	negativ	0,006	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
4	39	3	0	negativ	0,012	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
5	49	3	0	negativ	0,011	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
6	52	4	0	2+	0,437	negativ		positiv	negativ	negativ	positiv
7	37	2	0	(+), neg.	0,155	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
8	48	2	0	negativ	0,043	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
9	36	2	0	negativ	0,054	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
10	46	3	0	negativ	0,019	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
11	41	1	0	2+	0,489	negativ		negativ	negativ	negativ	positiv
12	50	1	0	negativ	0,017	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
13	46	4	0	negativ	0,085	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
14	54	2	0	negativ	0,02	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
15	54	1	0	negativ	0,033	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
16	56	4	0	negativ	0,017	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
17	47	2	0	negativ	0,015	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
18	43	3	0	negativ	0,013	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
19	47	5	0	negativ	0,011	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
20	56	2	0	1+	0,399	negativ		positiv	negativ	negativ	positiv
21	41	1	0	negativ	0,008	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
22	50	2	0	negativ	0,03	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
23	51	1	0	negativ	0,011	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
24	51	3	0	negativ	0,011	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
25	32	1	0	negativ	0,021	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
26	43	4	0	negativ	0,009	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
27	53	1	0	negativ	0,008	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
28	51	2	0	negativ	0,064	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
29	64	2	0	negativ	0,024	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
30	44	1	0	negativ	0,048	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.

Nr.	Alter	SS	T/so.	MAIPA		LCT		LIFT			ELISA
				Score	Rkt.		PRA %	IgG	IgM	IgA	
31	52	3	0	negativ	0,017	positiv	74,1	negativ	negativ	negativ	frgl(neg)
32	56	2	0	negativ	0,018	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
33	40	2	0	negativ	0,021	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
34	39	1	0	negativ	0,021	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
35	39	4	0	negativ	0,014	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
36	28	1	0	negativ	0,043	positiv	37,0	negativ	negativ	negativ	frgl(neg)
37	52	3	0	negativ	0,037	positiv	14,8	negativ	negativ	negativ	negativ
38	44	3	0	negativ	0,019	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
39	59	2	0	negativ	0,016	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
40	47	2	0	negativ	0,015	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
41	22	0	0	negativ	0,068	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
42	47	2	0	negativ	0,01	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
43	38	0	0	negativ	0,013	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
44	43	0	0	negativ	0,014	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
45	53	2	0	negativ	0,043	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
46	50	2	0	negativ	0,03	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
47	28	0	0	negativ	0,013	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
48	26	0	0	negativ	0,029	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
49	54	2	eig. BT	negativ	0,074	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
50	47	4	0	negativ	0,049	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
51	21	0	0	negativ	0,019	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
52	23	0	0	negativ	0,044	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
53	38	1	0	negativ	0,081	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
54	55	1	0	negativ	0,106	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
55	46	3	0	negativ	0,072	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
56	26	0	0	negativ	0,037	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
57	36	1	0	negativ	0,019	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
58	24	0	0	negativ	0,032	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
59	23	0	0	negativ	0,025	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
60	54	4	0	negativ	0,142	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
61	25	0	0	negativ	0,025	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
62	36	1	0	negativ	0,029	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
63	40	2	0	negativ	0,019	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
64	34	2	0	negativ	0,043	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
65	57	3	1	negativ	0,113	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
66	30	0	0	negativ	0,015	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
67	35	1	0	negativ	0,015	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
68	22	0	0	negativ	0,053	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
69	29	1	0	negativ	0,118	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
70	59	2	2	negativ	0,024	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
71	59	3	0	negativ	0,016	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
72	39	2	0	negativ	0,075	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
73	44	2	0	negativ	0,061	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
74	31	1	0	negativ	0,07	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
75	42	3	0	negativ	0,055	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
76	30	0	0	negativ	0,079	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
77	55	3	0	negativ	0,075	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
78	34	2	1	4+	1,598	positiv	29,6	positiv	negativ	negativ	positiv
79	39	2	0	negativ	0,063	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
80	29	2	0	negativ	0,115	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
81	51	6	0	1+	0,21	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.

Nr.	Alter	SS	T/so.	MAIPA		LCT		LIFT			ELISA
				Score	Rkt.		PRA %	IgG	IgM	IgA	
82	31	0	0	negativ	0,102	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
83	29	1	0	negativ	0,049	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
84	31	1	0	negativ	0,048	positiv	14,8	negativ	negativ	negativ	negativ
85	48	4	0	1+	0,209	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
86	39	2	0	negativ	0,064	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
87	44	2	0	negativ	0,086	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
88	48	3	1	negativ	0,134	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
89	25	0	0	negativ	0,054	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
90	49	2	0	1+	0,386	negativ		negativ	negativ	negativ	positiv
91	44	2	0	negativ	0,059	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
92	34	3	0	negativ	0,059	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
93	22	0	0	negativ	0,044	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
94	27	0	0	negativ	0,078	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
95	45	1	0	negativ	0,048	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
96	25	0	0	negativ	0,07	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
97	28	0	0	negativ	0,06	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
98	41	2	0	1+	0,285	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
99	53	2	0	negativ	0,085	negativ		negativ	negativ	negativ	frgl(neg)
100	57	3	0	negativ	0,082	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
101	21	0	0	negativ	0,03	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
102	27	0	0	negativ	0,085	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
103	54	1	0	negativ	0,101	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
104	39	2	0	negativ	0,059	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
105	28	0	0	negativ	0,047	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
106	30	2	0	negativ	0,062	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
107	52	2	0	negativ	0,072	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
108	33	2	0	negativ	0,08	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
109	56	3	0	negativ	0,042	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
110	42	1	0	negativ	0,078	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
111	40	3	0	negativ	0,069	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
112	56	3	0	negativ	0,05	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
113	58	3	1	2+	0,606	negativ		negativ	negativ	negativ	positiv
114	29	0	0	negativ	0,038	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
115	23	0	0	negativ	0,085	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
116	42	3	HLA-im	2+	0,782	negativ		negativ	negativ	negativ	positiv
117	24	0	0	negativ	0,046	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
118	29	1	0	negativ	0,068	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
119	23	0	0	negativ	0,043	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
120	25	0	0	negativ	0,043	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
121	48	2	1	negativ	0,062	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
122	28	0	0	negativ	0,061	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
123	25	0	0	negativ	0,037	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
124	27	0	0	negativ	0,053	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
125	28	0	0	negativ	0,037	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
126	46	2	0	negativ	0,083	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
127	28	1	1	negativ	0,057	negativ		negativ	negativ	negativ	sch.pos.
128	49	2	0	negativ	0,046	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
129	26	0	0	negativ	0,068	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
130	27	0	0	negativ	0,08	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
131	30	1	0	negativ	0,085	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
132	39	2	0	negativ	0,03	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ

Nr.	Alter	SS	T/so.	MAIPA		LCT		LIFT			ELISA
				Score	Rkt.		PRA %	IgG	IgM	IgA	
133	29	1	0	negativ	0,043	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
134	25	0	0	negativ	0,043	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
135	28	0	0	negativ	0,047	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
136	54	4	0	negativ	0,032	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
137	54	1	1	(+),neg	0,153	negativ		negativ	negativ	negativ	positiv
138	31	2	0	negativ	0,042	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
139	40	3	0	negativ	0,076	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
140	36	2	0	negativ	0,067	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
141	49	1	0	negativ	0,033	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
142	60	3	0	negativ	0,024	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
143	38	3	0	negativ	0,035	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
144	50	3	0	negativ	0,073	negativ		negativ	negativ	negativ	frgl(neg)
145	36	2	0	negativ	0,06	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
146	45	1	0	negativ	0,033	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
147	20	0	0	negativ	0,04	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
148	28	0	0	negativ	0,035	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
149	43	3	0	negativ	0,053	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
150	31	0	0	negativ	0,037	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
151	45	1	0	negativ	0,037	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ
152	29	0	0	negativ	0,034	negativ		negativ	negativ	negativ	negativ

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Spenderinnen 1-152

SS Schwangerschaften, T Transfusionen, so sonstige Bemerkungen, BT Bluttransfusion, HLA im HLA Immunisierung, Rkt gemessene Reaktion, PRA (in %) Panel reactive antibodies, neg negativ, GZ Grauzone (negativ), frgl(neg) fraglich (negativ), sch.pos. schwach positiv

Aufgrund der Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen LCT und MAIPA- Assay, sind die Seren Nr. 31, 36, 37, 84 im MAIPA- Assay erneut gegen den HLA- Pool sowie im Einzelansatz mit den 8 Testthrombozyten der Spender angesetzt worden. Die Seren zeigten hier wiederholt im Pool keine Reaktionen. Das Serum getestet gegen den Einzelansatz der Zellen erbrachte ebenfalls keine positiven Hinweise auf einen HLA- Antikörper (Tab. 3.8).

Spenderin	31	36	37	84
HLA-Pool	0,052	0,038	0,039	0,034
A1,11, B7,57	0,072	0,042	0,055	0,047
A1,31, B8,60	0,044	0,041	0,043	0,035
A3,26, B44,38	0,04	0,037	0,04	0,023
A24(9),25(10), B18,55(22)	0,042	0,054	0,029	0,049
A3,11, B7,62	0,033	0,045	0,038	0,032
A11,28, B27,35	0,027	0,032	0,031	0,04
A1,28, B39,37	0,03	0,074	0,034	0,074
A23,25, B18,49	0,026	0,03	0,036	0,036
Ergebnis MAIPA	negativ	negativ	negativ	negativ
LIFT	negativ	negativ	negativ	negativ
LCT	positiv	positiv	positiv	positiv
B-Screen	negativ	positiv	negativ	negativ

Tabelle 3.8: Ergebnisse der Seren 31, 36, 37, 84 in den Verfahren MAIPA Pool, MAIPA Einzelansatz, LIFT IgG, LCT, B-Screen (kommerziell)

Von den Seren, die im MAIPA- Assay negativ reagierten und im ELISA positiv erschienen, zeigten 8 Seren Reaktionsstärken im ELISA, die kleiner 0,1 über dem cut- off- Wert lagen, 4 Seren hatten Reaktionsstärken größer 0,1 über dem cut- off- Wert. Seren, die sowohl im MAIPA- Assay als auch im ELISA sich positiv zeigten, hatten 2 Seren Reaktionsstärken unter 0,1 über dem cut- off und 8 Seren lagen mit der Reaktionsstärke größer 0,1 über dem cut- off (Abb. 3.8).

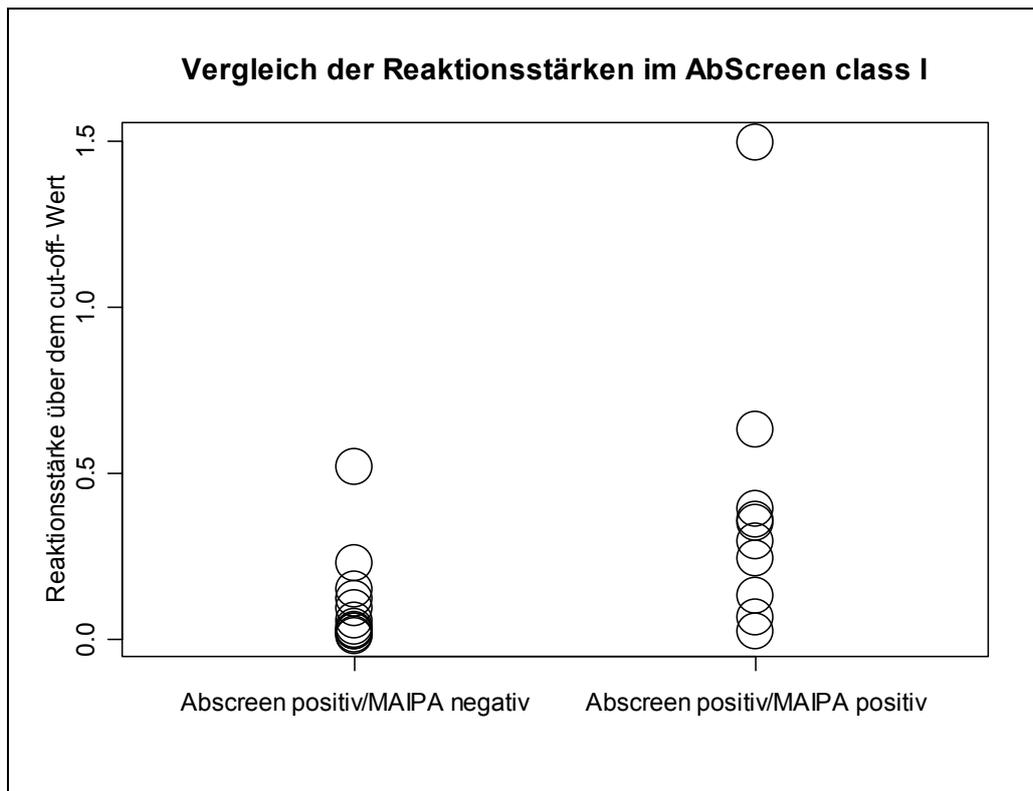


Abbildung 3.8: Reaktionsstärken über dem cut- off von den Seren, die im „AbScreen HLA class I“ positiv und im MAIPA- Assay negativ reagierten mit denen, die in beiden Verfahren positiv erschienen

Die Seren der Spenderinnen, die im „AbScreen HLA class I“ positiv und im MAIPA- Assay negativ reagierten (1, 30, 50, 53, 54, 60, 65, 69, 118, 126, 127, 137), wurden mit Hilfe des ELISA- Verfahrens („AbIdent HLA class I“, Bio-Rad) weiter differenziert (Tab. 3.9). Hierbei zeigten 5 Seren (30, 50, 60, 65, 137) keine Reaktion. Bei 2 Seren konnte eine HLA- Antikörperspezifität ausgemacht und bei 3 weiteren der Verdacht für eine Spezifität geäußert werden. 2 Seren zeigten sich breit reagierend, eine Antikörperspezifität war mit dem gegebenen Panel nicht ausfindig zu machen.

Spenderin	AbScreen über cut- off	Abldent HLA class I Differenzierung	höchste Extinktion über cut- off	PRA in %	Bemerkung
1	0,517	Vd. Anti- HLA B 18, 38(16), 39(16), +	0,028	30,0	
30	0,024	negativ		0,0	
50	0,016	negativ		0,0	
53	0,026	Vd. Anti- HLA B7	0,014	15,0	kreuzreagierend mit B27, 60, 8
54	0,094	Anti- HLA B 37	0,029	5,0	
60	0,122	negativ	0,003	2,5	
65	0,056	negativ		0,0	
69	0,038	Anti- HLA A 2, +	0,076	37,5	
118	0,01	breit reagierend	0,149	97,5	leicht lipämisches Serum
126	0,03	Vd. Anti- HLA B 37	0,244	15,0	
127	0,149	breit reagierend	0,233	92,5	
137	0,229	negativ		0,0	

Tabelle 3.9: Ergebnisse Spenderinnen „AbScreen HLA class I“ positiv/MAIPA negativ im „Abldent HLA class I“

Wie auch in der Patientengruppe erfolgten hier bei Seren, die im LCT positiv reagierten, weitere Untersuchungen um HLA- Antikörper der Klasse II ausschließen zu können. Hierzu kam wie zuvor der „AbScreen HLA class II“ zum Einsatz.

Unter den Seren der Blutspenderinnen reagierte Serum Nr. 36 mit einer schwachen Reaktion im „AbScreen HLA class II“. Serum Nr. 78 erschien deutlich positiv. Die Seren Nr. 31, 37, 84 zeigten keine Reaktion hinsichtlich eventuell vorhandener HLA- Klasse- II- Antikörper (Tab. 3.8). Serum Nr. 36 und 78 wurden daraufhin im „Abldent HLA class II“ genauer untersucht, um eventuelle Spezifitäten ausfindig zu machen. In der B- Zell- Differenzierung zeigte sich am ehesten für Serum Nr. 36 Antikörper gegen DR01, DR09, DRW51, DQ08, DR11. Für Serum Nr. 78 lässt sich keine Spezifität erkennen.

In dieser Gruppe, Spenderinnen mit einer positiven Schwangerschaftsanamnese, liegt die Immunisierungsrate bei 2,68% (3/112) bei der Bestimmung mit Hilfe des LIFTs. Für den LCT ergibt sich eine Immunisierungsrate von 4,46% (5/112), wobei unter den Spenderinnen mit 1 - 2 Schwangerschaften 4,1% (3/74) und mit 3 und mehr Schwangerschaften 5,3% (2/38) positive Resultate erzielten. Der MAIPA- Assay zeigte bei 8,92% (10/112) der Spenderinnen eine Immunisierung. Unter den Spenderinnen mit 1 – 2 Schwangerschaften in der Anamnese reagierten 6,8% (5/74) im MAIPA- Assay positiv, unter den Spenderinnen mit größer/gleich 3 Schwangerschaften stellten sich 13,2% (5/38) im MAIPA- Assay positiv dar. Im „AbScreen HLA class I“ zeigt sich eine Immunisierungsrate von 19,6% (22/112), wobei unter den Spenderinnen mit 1-2 Schwangerschaften die Rate bei 17,6% (13/74) liegt. Bei den Spenderinnen mit 3 und mehr Schwangerschaften erzielte der Test eine Immunisierungsrate von 23,7% (9/38).

4. Diskussion

Das Ziel dieser Studie bestand darin, verschiedene In- House- Nachweisverfahren für HLA- Antikörper miteinander zu vergleichen und diese zudem mit einem kommerziellen Test (ELISA) gegenüberzustellen. Hierbei sollten Diskrepanzen aufgezeigt und deren mögliche Ursachen ausfindig gemacht werden. Mit dem Wissen der Grenzen der einzelnen Methoden kann eine genauere Beurteilung der Befunde vorgenommen und damit eventuell ergänzende Verfahren hinzugezogen werden um HLA- Antikörper bei klinischer Symptomatik bzw. bei Verdacht auf solche nicht zu übersehen. Mit dem Nachweis von HLA- Antikörpern kann rechtzeitig in die Therapie eingegriffen werden um diese gegebenenfalls zu optimieren, zum Beispiel um Thrombozytenkonzentrate HLA- gematcht zu transfundieren.

Vor allem in der Transplantationsmedizin besitzen HLA- Antikörper einen hohen Stellenwert hinsichtlich einer Transplantatabstoßung. So ist der frühzeitige Nachweis von HLA- Antikörpern und die Bestimmung ihrer Spezifität eine der Voraussetzungen für die Auswahl eines passenden Organs. Hier sollte die Empfindlichkeit des Verfahrens hoch genug sein, Antikörper zeitnah zu entdecken.

Zum anderen sollen für ein Screening auf HLA- Antikörper bei Blutspendern Methoden qualitativ und in ihrer Praktikabilität beurteilt werden. Durch Transfusion übertragene HLA- Antikörper können wie bereits beschrieben zu transfusionsbedingten Zwischenfällen (TRALI) führen. Somit ist die Kenntnis über vorhandene HLA- Antikörper bei Spendern für die Herstellung von plasmahaltigen Blutprodukten sinnvoll. Plasma- und Thrombozytenpräparate sollen daher von Spendern mit HLA- Antikörpern nicht an Patienten angewendet werden.

In der Patientengruppe erfolgte ausschließlich ein Vergleich von Seren, die bereits im Vorfeld bei der routinemäßigen Untersuchung mit positiven Reaktionen in den HLA- Nachweisverfahren (MAIPA- Assay, LCT) auffielen. Bei der erneuten Untersuchung auf HLA- Antikörper mit dem MAIPA- Assay, dem LCT und dem LIFT konnten ebenfalls bei allen Seren zwar positive Reaktionen beobachtet werden, jedoch konnte keines der angewendeten Verfahren in allen 31 Seren Antikörper nachweisen. 19 Seren wurden von allen drei Verfahren als positiv erkannt, während bei 12 Seren Diskrepanzen auftraten (Tab. 3.1). Die meisten positiven Resultate mit 93,6% (29/31) erzielte der MAIPA- Assay, gefolgt von dem LCT mit 74,2% (23/31) positive Reaktionen während der LIFT nur bei 71% (22/31) positive Reaktionen zeigte. Es ergab sich nur im direkten Vergleich MAIPA- Assay gegen LIFT einen signifikanten Unterschied von $p = 0,023$. Offensichtlich erscheint jedoch auch, dass ausschließlich Seren im LIFT positiv erschienen, die auch im MAIPA- Assay reagierten. Keines der Seren, die im MAIPA- Assay negativ und LCT positiv reagierten, zeigten

Reaktionen im LIFT. Das gleiche Ergebnis ließ sich auch in der Spenderinnengruppe (s.u.) ableiten.

Der zweite Abschnitt der Untersuchung beinhaltet den Nachweis von HLA- Antikörper bei Spenderinnen der Spendeinrichtung der Abteilung für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Rostock. Hierbei erfolgte im Gegensatz zu der Patientengruppe erstmalig die Untersuchung auf HLA- Antikörper, somit fehlte hier die Kenntnis über eventuelle Antikörper. Die Spenderinnengruppen sind in zwei unterschiedliche Gruppen aufgeteilt worden. Zum einen alle Spenderinnen unabhängig von ihrer Anamnese hinsichtlich eines Immunisierungsereignisses (Gruppe 2: 112 Spenderinnen insgesamt, 40 Spenderinnen ohne, 72 Spenderinnen mit einem Immunisierungsereignis). Zum anderen alle Spenderinnen, die bereits mindestens eine Schwangerschaft durchgemacht oder eine Bluttransfusion erhalten hatten (Gruppe 3: 112 Spenderinnen), wobei in dieser Studie keine der Spenderinnen eine positive Transfusionsanamnese ohne eine positive Schwangerschaftsanamnese aufwies. Somit ist eine Unterscheidung für eine ausgelöste HLA- Immunisierung durch Schwangerschaft oder durch Bluttransfusion in dieser Studie nicht möglich.

Die Seren der Spenderinnen wurden neben den oben bereits bei der Patientengruppe verwendeten Verfahren MAIPA- Assay, LCT und LIFT in einem kommerziellen ELISA- Verfahren („AbScreen HLA class I“, Bio-Rad) angesetzt. Hier zeigte sich, dass das ELISA- Verfahren mit 15,2% (17/112, Gruppe 2) bzw. 19,6% (22/112, Gruppe 3) am meisten positive Reaktionen hervorbrachte. Danach folgt entsprechend der Patientengruppe das MAIPA- Verfahren mit 6,25% (7/112) bzw. 8,92% (10/112) und der LCT 1,79% (2/112) bzw. 4,46% (5/112) positiven Resultaten. Am schlechtesten ließen sich Antikörper in LIFT nachweisen, 0,89% (1/112) bzw. 2,68% (3/112). Nur ein Serum reagierte in allen vier Verfahren stark positiv und konnte mittels des LCT als Anti- HLA A1 identifiziert werden.

Der Lymphozytenimmunfluoreszenztest schnitt in dieser Studie am schlechtesten ab, obwohl andere Studien zeigten, dass er ein sicheres Verfahren zum Nachweis von HLA- Antikörpern darstellt und damit auch für Crossmatch- Untersuchungen eingesetzt werden kann [69]. Jedoch erfolgte in dieser Studie nur die Auswertung mittels eines Fluoreszenzmikroskops und nicht mittels der Durchflusszytometrie, wie sie in den meisten publizierten Fällen für diese Methode eingesetzt wird. Frühere Studien zeigten, dass eine Beladung mit dem Fluoreszenz Anti- IgG auch auf B- Zellen und Monozyten möglich ist und diese unter dem Mikroskop mit erscheinen (sogenannter Background) und daher die Auswertung erschweren [70]. Diese ungewollten Reaktionen kommen jedoch bei der Auswertung mittels des Durchflusszytometers nicht zum tragen [71] und damit gelingt die Auswertung leichter und sicherer und ist objektivierbar im Gegensatz zur Auswertung unter dem Mikroskop.

Vergleiche der LIFT- Methode mit den anderen Verfahren in früheren Studien zeigten, dass diese Methode dem LCT überlegen erscheint. 2001 publizierte Lubenko et al. [72] eine Studie, bei der untersucht werden sollte, ob der LIFT mit Auswertung unter Verwendung der Durchflusszytometrie dem LCT überlegen ist. Sie untersuchten Seren von Patienten, die in der Klinik mit einer febrilen Transfusionsreaktion oder einem Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusion auffielen, im LIFT und im LCT. Hierbei wurden für den LIFT 15 verschiedene Spenderlymphozyten (3 Poolansätze mit jeweils 5 Spenderlymphozyten) und für den LCT 28 verschiedene Spenderlymphozyten eingesetzt. Es zeigte sich, dass bei 35,5% (120/338) der Seren beide Verfahren positiv reagierten. 8% (26/338) der untersuchten Seren fielen allein im LCT positiv auf, während im LIFT weitere 16% (55/338) positiv bewertet wurden. Damit zeigt sich, dass trotz einer scheinbar geringeren Antigenvielfalt (15 verschiedene Lymphozyten versus 28) doppelt so viele Seren positiv im Nachweis von HLA-Antikörpern im LIFT reagieren. Lubenko et al. begründen die deutlich sensitivere Methode damit, dass der LCT offensichtlich mehr IgG- Antikörper zum Nachweis benötigt als der LIFT. Hinsichtlich der aktuellen Studie ist neben der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop auch die deutlich geringere Antigendiversität (4 verschiedene Lymphozytenspender) nachteilig für den HLA- Antikörpernachweis anzusehen. Im Gegensatz zur Literatur konnten bis auf ein Serum mit einem starken Antikörper (Serum 78) keine Seren identifiziert werden, die LCT+/LIFT+ reagierten. Aus diesen Gründen heraus ergibt sich wohl hier auch der errechnete signifikante Unterschied des LIFTs mit den anderen Verfahren MAIPA- Assay und LCT und ist eigentlich in diesem Fall nicht aussagekräftig, wie andere Studien beweisen. Eine ähnliche Studie wie die der Arbeitsgruppe um Lubenko wurde bereits von Köhler et al. 1996 durchgeführt [73]. Hierbei untersuchten die Autoren Seren von Patienten mit malignen Erkrankungen, die mit einer Thrombozytopenie einhergehen, im LCT und im Immunfluoreszenztest mittels der Durchflusszytometrie simultan mit Lymphozyten (FCL) und Thrombozyten (FCP). Es zeigte sich in beiden Vergleichen, dass es Unterschiede im Nachweis von HLA- Antikörper zum LCT gibt. Bei der Verwendung von Thrombozyten in der Immunfluoreszenz wurden 15,5% der Seren positiv bestimmt, die im LCT negativ blieben. Umgekehrt wurden nur 8,9% im LCT zusätzlich positiv, die im Immunfluoreszenztest negativ reagierten. Im Gegensatz dazu zeigte diese Studie eher einen schlechteren Nachweis von Antikörpern mittels dem Immunfluoreszenztestes mit Lymphozyten gegenüber dem LCT (LCT+/FCL- 8,1%, LCT-/FCL+ 5,9%). Begründet liegt dies laut der Arbeitsgruppe darin, dass der LCT falsch positive Resultate erzielte, da bei einer Wiederholung der LCT+/FCL- Seren im LCT die Reaktionen teilweise nicht reproduzierbar waren. Die Immunfluoreszenzverfahren in dieser Studie schnitten in der Sensitivität und Spezifität ebenso besser ab als der LCT. McGrath et al. veröffentlichten 1988 eine Studie, in der der LCT dem LIFT überlegen erscheint [74]. Hierbei wurden jedoch nur Seren untersucht, die im LCT bereits ein positives

Ergebnis geliefert hatten und somit keine Ergebnisse mit negativem LCT entdeckt werden konnten.

Unter den beiden Testverfahren, die mit Lymphozyten arbeiten, scheint der LIFT, ausgewertet mittels eines Durchflusszytometers, als komplementunabhängiger Test mehr HLA- Antikörper zu entdecken als der LCT. Hierfür muss im Gegensatz zur aktuellen Studie für ein ausreichend großes Zellpanel gesorgt werden, dass alle wichtigen HLA- Antigene umfasst.

Ein Vorteil für die LIFT- Methode scheint aber auch der relativ einfache Nachweis von IgA- und IgM- Antikörpern zu sein. In der aktuellen Studie gelang im Unterschied zu der Studie von Décarý et al. 1975 [70] im Immunfluoreszenztest unter dem Mikroskop in der Patientengruppe der Nachweis von IgA- Antikörpern bei zwei Patienten. Zusätzlich fanden sich bei einem dieser Patienten im Serum auch IgM- Antikörper. In der Spenderinnengruppe konnten dagegen keine IgA- bzw. IgM- Antikörper nachgewiesen werden. Eine größere Antigenvielfalt und die Bewertung im Durchflusszytometer hätten vielleicht mehr IgA- und IgM- Antikörper aufdecken können.

Im Vergleich MAIPA- Assay und LCT scheinen die aktuellen Ergebnisse mit früheren Studien konform zu gehen. 2001 untersuchte die Arbeitsgruppe Kiefel et al. 252 Seren von hämato-onkologischen Patienten auf HLA- Antikörper mit Hilfe des MAIPA- Verfahren und im LCT [59]. Insgesamt zeigten 42,9% positive Reaktionen in mindestens eines der Verfahren. In der vorliegenden Studie konnte insgesamt mittels aller vier Testverfahren bei 23,2% der Spenderinnen mit einer positiven Schwangerschaftsanamnese bzw. bei 16,1% aller Spenderinnen unabhängig von vorherigen Schwangerschaften positive Befunde erzielt werden. Begründet liegt der Unterschied wohl am ehesten an den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen, da hämato- onkologische Patienten durch häufige Bluttransfusionen mehr mögliche Immunisierungsereignisse aufweisen und daher die Wahrscheinlichkeit höher ist, HLA- Antikörper zu bilden als bei gesunden Spenderinnen.

Zusätzlich untersuchte die Arbeitsgruppe um Kiefel 40 Seren in beiden Verfahren mit Thrombozyten (MAIPA- Assay) und Leukozyten (LCT) von 6 verschiedenen Spendern. Hier zeigten sich deutliche Diskrepanzen. 9 Seren reagierten in beiden Verfahren positiv, 2 negativ. 29 Seren brachten unterschiedliche Ergebnisse in den einzelnen Zellansätzen hervor, wobei 17 allein im MAIPA- Assay positiv wurden und 10 im LCT. In der aktuellen Studie wurde der MAIPA- Assay- HLA- Pool nach dem Kriterium zusammengestellt, das dieser so viel wie möglich an HLA- Antikörpern erkennen kann, jedoch sollte er aber nicht so viele Spender beinhalten, dass seltene Antigene dann bei der Erkennung in der Masse untergehen. Das erfolgt hier mit 8 verschiedenen Spendern. Beim LCT wurden von 27 Spendern Leukozyten verwendet, hiermit ist dann auch eine Spezifizierung eines Antikörpers möglich. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Verfahren konnte zwar in der

aktuellen Studie nicht dargelegt werden, jedoch ist die Diskrepanz erkennbar. Nur ein Serum wurde von beiden Verfahren gleichermaßen erkannt, während 13 Seren unterschiedlich reagierten. Im LCT sind 4 Seren und im MAIPA- Assay 9 Seren auffällig geworden (Tab. 3.6 a, Abschnitt 3.2.3). Die 4 LCT+ Seren wurden im Einzelansatz mit den 8 Testthrombozyten angesetzt, wobei hier auch keine positiven Reaktionen gefunden werden konnten. Das heißt somit, dass der Pool nicht zu „verdünnt“ erscheint in Bezug auf die Anzahl der eingesetzten Testthrombozyten. Kiefel et al. geben als einen Grund für den Unterschied die Komplementabhängigkeit des LCTs an. Mit komplementunabhängigen Verfahren können weitaus mehr HLA- Antikörper gefunden werden, zum Beispiel im MAIPA- Assay, LIFT und im ELISA. Andererseits ist bekannt, dass gelegentlich sogenannte Autolymphocytotoxine im Serum für positive Reaktionen im LCT verantwortlich scheinen ohne das HLA- Antikörper vorhanden sind. Solche Antikörper reagieren mit Strukturen auf Lymphozyten, bei denen es sich nicht um HLA- Klasse- I- Antigene handelt. Dies könnte auch der Grund für die von Köhler et al. (s.o.) beschriebenen falsch positiven Resultate im LCT sein.

In früheren Studien ist mehrfach beschrieben worden, dass es Unterschiede in der Expression von HLA- Molekülen auf Zelloberflächen gibt. Diese sind eventuell mitverantwortlich für die Diskrepanzen zwischen den Resultaten der Methoden. Bereits 1977 beschreiben Liebert und Aster, dass sich die Expression von HLA B12 auf Thrombozyten und Lymphozyten unterscheidet [75]. Sie zeigten, dass in Anwesenheit von HLA A11 die Expression auf Thrombozyten steigt und im Zusammenhang mit HLA A2, A3 sinkt. 1980 wurden diese Beobachtungen von Szatkowski und Aster ergänzt [76]. Sie zeigten, dass die HLA- Antigene B5, B7, B27 und B13 kaum in der Expression auf Thrombozyten variieren und bestätigten, dass B8 und B44 (12) Schwankungen unterliegen. Weiterhin untersuchten sie die Abhängigkeit der Expression von Bw4 und Bw6. Diese ist stark abhängig von den anderen Loci (B5, B7, B8, B13, B14, B27, B44) auf Thrombozyten während sie auf Lymphozyten unabhängig davon exprimiert werden. Nicht nur die HLA- Moleküle beeinflussen sich untereinander in ihrer Expression, auch die Dichte von anderen Oberflächenmarkern soll angeblich einen Einfluss auf die HLA- I- Antigendichte ausüben. Pereira et al. teilte Thrombozyten anhand der Dichte des Alloantigens HPA- 1a (PI^{A1}) in Thrombozyten mit hoher (HD) und niedriger Dichte (LD) ein und zeigte, dass LD- Thrombozyten mehr HLA A2- Moleküle auf der Oberfläche exprimieren als HD- Thrombozyten [77]. Workfolk und MacPherson zeigten 1991 ebenso bei der Untersuchung auf HLA- Antikörper mittels der Durchflusszytometrie, dass Spenderthrombozyten mit HLA B8 und B12 teilweise nicht auf Anti- HLA B8 und B12 reagierten, aber deren Leukozyten [71]. Somit ist ein Nachteil beim Nachweis von HLA- Antikörper mit Thrombozyten, dass der Antikörper sein entsprechendes Antigen nicht vorfinden kann, obwohl dieses genetisch vorhanden ist. Jedoch kann man mit dem Wissen, welche HLA- Moleküle die Expression beeinflussen, sich entsprechend einen geeigneten Pool zusammenstellen und diese

Schwachstelle damit umgehen. Daneben könnte man mögliche Testthrombozyten für einen HLA- Pool mit spezifischen Antiseren vorab testen, ob sie die Antikörper sicher erkennen. Des Weiteren können ebenso unspezifische Reaktionen durch Antikörper der IgM- Klasse, therapeutische Antikörper (intravenöse Immunglobuline, Antithymozytenglobulin) oder auch Non- HLA- Antikörper eine Reaktion im LCT verursachen [5].

Ähnliche Ergebnisse wie Kiefel et al. lieferten Kurz et al. ebenfalls 2001 [78]. Sie untersuchten Seren von 55 Patienten unter Chemotherapie, die Thrombozytentransfusionen erhielten, im MAIPA- Assay und im LCT in einem Zeitraum von 4 Wochen. Es zeigte sich, dass hiervon 24,5% der Serumproben im MAIPA- Assay positiv wurden und nur 8,2% im LCT. Der MAIPA- Assay- HLA- Pool setzt sich in dieser Studie aus 60 Spendern zusammen die damit 90% der Antigene präsentieren. Im Gegensatz zu anderen Studien, konnten hier keine LCT+/MAIPA- Seren ausfindig gemacht werden. Weiterhin zeigten die Autoren dieser Arbeitsgruppe, dass bei 15 Patienten nur vorübergehend HLA- Antikörper nachgewiesen werden konnten. Auch eine de novo- Synthese von HLA- Antikörpern konnten sie beobachten, wobei sie feststellten, dass HLA- Antikörper zuerst im MAIPA- Assay entdeckt werden konnten und zu einem späteren Zeitpunkt auch mit dem LCT zu finden waren. Jedoch konnten sie nicht bei allen Proben der Patienten mit einem unzureichendem Thrombozytenanstieg nach Thrombozytentransfusion HLA- Antikörper mit den Verfahren nachweisen. Daher bleibt die Frage, ob der MAIPA- Assay, wie er in der Studie [78] verwendet wird, alle HLA- Antikörper wirklich entdecken kann, oder ob seltene Antigene durch die enorme Vielfalt an Antigenstellen (60 Spender) dann nicht mehr ausreichend präsentiert werden, der Antikörper also sein Gegenstück in der Masse nicht auffindet.

Wie auch in früheren Studien schnitt bei der aktuellen Untersuchung der kommerzielle ELISA- Test zum Nachweis von HLA- Antikörpern am besten ab. Der ELISA zeigte deutlich signifikante Unterschiede im Vergleich mit den anderen Testverfahren MAIPA- Assay, LCT und LIFT. Wobei im Vergleich mit dem LIFT der Unterschied am größten erscheint, dies aber auf Grund der bereits oben genannten Gründe eine schlechte Aussagekraft in dieser Studie besitzt.

Lubenko und Rodi verglichen 1998 bereits ELISA- Verfahren mit dem LCT, da ihnen bei Patienten aufgefallen ist, dass trotz negativem Crossmatch im LCT nur ein schlechtes Thrombozytenüberleben nach Transfusion erfolgt [79]. Um auch die Antikörper nachweisen zu können, die komplementunabhängig reagieren, entschied sich die Arbeitsgruppe alternativ zu einem komplementunabhängigen Immunfluoreszenzverfahren die Seren in einem kommerziellen ELISA zu untersuchen. Die Seren stammen von 252 Patienten mit einem Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusion, febrilen Transfusionsreaktionen oder Patienten mit nichtspezifischen Hämagglutinationen im indirekten Antiglobulintest.

Insgesamt erbrachte der ELISA bei 99 Seren eine positive Reaktion, der LCT bei 89 Seren. Bei 33 Seren der 99 ELISA+ blieb der LCT negativ, umgekehrt blieb bei 23 Seren von 89 LCT+ der ELISA negativ. Weiterhin zeigte diese Arbeitsgruppe, dass im ELISA bei nur 79,4% ein zytotoxischer HLA- Antikörper mit schmaler serologischer Spezifität entdeckt werden kann. Gründe für das Missverhältnis sehen sie darin, dass einige Seren reine IgM- Antikörper enthalten, welche durch den ELISA auf diese Weise nicht erfasst werden konnten. Ferner beobachteten sie, dass Seren vor allem dann auch im ELISA positiv wurden, wenn im LCT der PRA (panel reactive antibodies) > 50% lag. In der hier vorgelegten Studie, kann diese Beobachtung nicht bestätigt werden. Während Serum 31 einen PRA von 74,1% besitzt, dieser weder im MAIPA- Assay noch im ELISA erkannt wurde, konnte das Serum 78 mit einem PRA von 29,6 in allen vier Verfahren erkannt werden, da hier ein sehr starker Antikörper vorliegt. Es kommt demzufolge nicht nur auf den PRA an, sondern auch auf die Konzentration und Affinität der Antikörper, die sich in der Reaktionsstärke im ELISA widerspiegeln. Die drei weiteren LCT+ Seren, die in keinem anderen Testsystem erkannt wurden, 36, 37 und 84 liegen unter einem PRA von 50%. Ob diese Seren IgM- Antikörper enthalten, ist fraglich, da sie darauf nicht weiter im LCT untersucht wurden. Ein richtiger Vergleich ist zur oben genannten Studie jedoch schwierig, da bei der aktuellen Studie weitaus weniger Seren LCT+ auf Grund der Untersuchungspopulation ausgemacht werden konnten.

2003 stellte Levin et al. seine Studie zum Nachweis von HLA- Antikörpern vor, bei der diese Autoren Serum von hämato- onkologischen Patienten im LCT, LIFT und ELISA testeten [80]. In den Vergleichen der ELISA- Technik mit dem LIFT und dem LCT konnten bei beiden signifikante Unterschiede für den Nachweis von HLA- Antikörpern erzielt werden. Die Studiengruppe ist der Meinung, dass der ELISA dem LIFT und noch mehr dem LCT überlegen ist. In der aktuellen Studie sind gleiche Erkenntnisse, wie oben bereits erwähnt, gewonnen worden, bei dem der ELISA dem MAIPA- Assay, LCT und dem LIFT überragender im Nachweis von HLA- Antikörpern erscheint (Tab. 3.6 d-f, Abschnitt 3.2.3).

Auf Grund der Diskrepanzen in der aktuellen Studie erfolgte eine genauere Betrachtung der Reaktionsstärken im ELISA von den Seren, die im ELISA+/MAIPA+ mit denen, die im ELISA+/MAIPA- reagierten (Abb.3.8, Abschnitt 3.2.3). Es fanden sich in der Gruppe ELISA+/MAIPA- vor allem Reaktionsstärken im ELISA schwach über dem cut-off- Wert (8 Seren mit Werten unter 0,1 über dem cut-off- Wert), während die Seren ELISA+/MAIPA+ hauptsächlich höhere Reaktionsstärken erzielten (8 Seren mit Werten über 0,1 über dem cut-off- Wert). Daraus lässt sich zum einen spekulieren, dass der MAIPA- Assay eventuell sehr schwache Antikörper nicht entdeckt. Zum anderen könnte jedoch auch der ELISA falsch positive Werte liefern. Daraufhin erfolgte die weitere Spezifizierung der Seren, die ELISA+/MAIPA- waren, in einem kommerziellen ELISA- Test zur Differenzierung von HLA- Klasse- I- Antikörpern (Tab. 3.9, Abschnitt 3.2.3). Von diesen 12 Spenderinnenserien konnten

bei 5 Seren keine Reaktionen gefunden werden, wobei zwei Seren im Screening ELISA Werte über 0,1 über dem cut-off- Wert zeigten. Dies spricht für den Verdacht, dass mit dem kommerziellen ELISA möglicherweise auch positive Reaktionen als unspezifisch einzustufen sind. Ein möglicher Grund für die unspezifischen Reaktionen könnten die gereinigten Antigene sein, die für die Festphasenassays benötigt werden. Durch deren Bearbeitung und Fixierung könnte es zu strukturellen Veränderungen auf deren Oberfläche kommen, die dann nicht nur HLA- Antikörper binden und damit eine unspezifische Reaktion auslösen könnten. Eine weitere Ursache für unspezifische Reaktionen ist die Adsorption von IgG an die Kunststoffoberfläche der Mikrotiterplatten- Vertiefungen, die man mit Antigen- freien Kontrollansätzen überprüfen könnte; der von uns verwendete ELISA enthielt solche Anätze jedoch nicht. Daher ist es nötig, bei einem positiven Screening im ELISA eine Spezifizierung des Antikörpers anzuschließen, um diese Reaktionen besser bewerten zu können und somit einen Antikörper nachzuweisen bzw. auszuschließen. Bei den anderen 7 Seren konnten bei zwei Seren ein Antikörper eindeutig definiert werden, bei drei weiteren der Verdacht auf eine Spezifität geäußert werden und bei zwei konnte keine Spezifität erkannt werden, da diese sehr breit im Panel reagierten. Auffällig hierbei erschien, dass der ELISA einen HLA A2- Antikörper nachgewiesen hat, der im MAIPA- Assay nicht erkannt wurde, obwohl der HLA- Pool A2 aufweist. Dies deutet darauf hin, dass schwache Antikörper im MAIPA- Assay eventuell nicht nachgewiesen werden können. Das kann daran liegen, dass im dargebotenen Pool nur eine Thrombozytenpopulation HLA A2 aufweist und dieses womöglich nicht ausreichend exprimiert wird um auch schwach konzentrierte Antikörper aufzudecken.

Um zu sehen, wie empfindlich der HLA- Pool mit den eingesetzten Testthrombozyten ist, wurden alle Patientenproben auch im Einzelansatz mit den 8 Testthrombozyten getestet. Die Seren, die im HLA- Pool negativ reagierten, zeigten auch keine Reaktionen in den Einzelansätzen, gleiches ist auch in der Spenderinnengruppe beobachtet worden (s.o.). Umgekehrt zeigten die Einzelansätze zwar stärkere Extinktionen als der HLA- Pool, dennoch erscheint die Antigenpräsenz im Pool ausreichend zu sein um die Antikörper zu erkennen. Ähnliches Problem könnte jedoch auch der ELISA haben, da hier ein Pool aus 300 Spenderthrombozyten entsteht und somit zwar eine enorme Antigenvarianz besteht, jedoch auch seltene Antigene in der Masse untergehen können. Jedoch gab es in dieser Arbeit kein Serum, das ausschließlich nur im MAIPA- Assay reagiert und im ELISA negativ ausfiel. Demzufolge erkennt der MAIPA- Assay- HLA- Pool mit 8 Testthrombozyten HLA- Antikörper recht gut. In der ELISA- Technik ist die Nachweisempfindlichkeit dagegen deutlich höher, auch wenn bei einem positiven Testresultat nicht immer ein HLA- Antikörper vorliegt. Jedoch ist die Durchführung weniger zeitintensiv im Gegensatz zum MAIPA- Assay und der ELISA ist einfach auszuführen. Um Antikörper in der Klinik auszuschließen bzw. zu bestätigen, scheint es ratsam, auffällige Seren weiter in einem ELISA zu spezifizieren. Für ein Screening

unter Spenderinnen eignet sich somit am ehesten der ELISA, da er schnell und einfach durchzuführen ist und eine hohe Nachweisempfindlichkeit besitzt.

Wie bereits schon erwähnt, sind Diskrepanzen zwischen ELISA und LCT ebenso vorhanden. Beide weisen bei unterschiedlichen Seren positive Reaktionen nach. Dies kann unter Umständen an der Komplementabhängigkeit der Antikörper liegen, aber auch an der, wie bereits besprochen, unterschiedlichen Zellart (Leukozyten im LCT, Thrombozyten im ELISA). Ebenso spielt die Art der Auswertung eine Rolle, da hier auf der einen Seite objektive Bewertungen (ELISA, MAIPA- Assay) vorliegen und auf der anderen Seite subjektiv bewertet (LCT, LIFT) werden muss und hier die Ergebnisse von Untersucher zu Untersucher unterschiedlich ausfallen können. Ein weiterer Einflussfaktor sind auch HLA- Klasse- II- Antikörper und Antikörper vom IgM- Typ. ELISA („AbScreen HLA class I“, Bio-Rad) und der MAIPA- Assay erkennen in der vorgegebenen Form nur IgG- Antikörper und sind spezifisch für HLA- Klasse- I- Antikörper. In der Patientengruppe zeigte sich ein Serum, welches im MAIPA- Assay negativ und im LCT positiv reagierte im „AbScreen HLA class II“ positiv. Auch in der Spenderinnengruppe ist ein Serum MAIPA-/LCT+ im ELISA gegen HLA- Klasse- II- Antikörper aufgefallen. Beide Seren könnten demnach HLA- Klasse- II- Antikörper enthalten, diese können jedoch nicht im MAIPA- Assay bzw. im ELISA gegen Klasse- I- Antikörper nachgewiesen werden. Um IgM- Antikörper auszuschließen bzw. zu bestätigen, muss das Serum im LCT mit DTT (Dithiothreitol) untersucht werden [25]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte keine Unterscheidung von IgG- und IgM- Antikörper im LCT, lediglich im LIFT hätten diese erkannt werden können. Auffällig erschien bei der genaueren Untersuchung, dass zwei Seren der Patientengruppe mit MAIPA+/LCT- Reaktionen im „AbScreen HLA class II“ reagierten. Hier könnten HLA- Klasse- I- Antikörper vorliegen, die komplementunabhängig reagieren und HLA- Klasse- II- Antikörper, die zu schwach sind, um im LCT erkannt zu werden. Da in der eingesetzten Lymphozytenpopulation vor allem T- Zellen vorliegen und im geringeren Umfang B- Zellen, mit denen HLA- Klasse- II- Antikörper nachgewiesen werden können, können schwache Antikörper unerkannt bleiben. Um so weit wie möglich in der Diagnostik alle klinisch relevanten Antikörper zu erkennen, sollte eine Kombination der Testverfahren durchgeführt werden: ELISA (oder auch der MAIPA- Assay mit einem sorgfältig ausgewähltem Zellpanel) und LCT. Vor allem sollte dies erfolgen, wenn es klinische Hinweise auf einen Antikörper gibt (zum Beispiel Transfusionsreaktionen), dieser aber in dem zu erst gewählten Verfahren nicht nachweisbar ist.

In der aktuellen Studie zeigte sich im Screening eine Immunisierungsrate unter allen Spenderinnen mit einer positiven Schwangerschaftsanamnese von 23,2%, wenn alle vier Verfahren hierfür herangezogen werden. Im ELISA allein liegt die Rate bei 19,1%, wobei unter den Spenderinnen mit 1-2 Schwangerschaften 17,6% und Spenderinnen mit 3 und

mehr Schwangerschaften sich deutlich mehr (23,7%) immunisierten. In einer Studie von Maślanka et al. 2007 wurden bei den weiblichen Spenderinnen mit positiver Schwangerschaftsanamnese eine Immunisierungsrate von 9,8%, nachgewiesen im ELISA, festgestellt [81], wobei hiervon 45,2% HLA- Klasse- I- Antikörper, 33,9% Klasse- II- und 20,9% Klasse I+ II- Antikörper nachgewiesen wurden. Dies erscheint ungewöhnlich niedrig zur aktuellen Studie und zu weiteren Studien. Übereinstimmend ist jedoch der Zusammenhang zwischen Anzahl von Schwangerschaften und einem positiven HLA- Antikörper- Screening.

Eine Immunisierungsrate von 17% unter den Spenderinnen (unabhängig von der Schwangerschaftsanamnese) demonstrierte 1999 die Arbeitsgruppe um Densmore allein mit dem LCT [29]. Der LCT liefert in der aktuellen Untersuchung nur eine Rate von 1,79% unter der Spenderinnengruppe 2, der ELISA weist hier eine Nachweisrate von HLA- Antikörper von 15,2% auf. Densmore et al. zeigten ebenso, dass die Immunisierungswahrscheinlichkeit mit der Anzahl der Schwangerschaften steigt.

Aus dem Grund der Immunisierungsmöglichkeit bei Frauen wurde im Januar 2009 das Votum 39 des Arbeitskreises Blut verabschiedet. Dies beinhaltet die Empfehlung, dass kein Plasma von Frauen, die eine oder mehrere Geburten in ihrer Anamnese vorweisen, in den Verkehr gebracht werden soll. Dies soll eine Reduktion von TRALI- Reaktionen bewirken [55]. Auch Powers et al. beschrieben 2008 einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Immunisierungsrate bei Spenderinnen mit der Schwangerschaftszahl [30]. Bei 25,4% (256/1009) der Spenderinnen zeigte sich der Screening- Test positiv, wobei unter den 27 positiv getesteten Spenderinnen mit einer negativen Schwangerschafts- und negativer Transfusionsanamnese (insgesamt 459) nur ein Serum sich als richtig positiv darstellte. Bei genauerer Betrachtung erzielte die Arbeitsgruppe damit ausschließlich bei Spenderinnen mit einer positiven Schwangerschaftsanamnese eine Immunisierungsrate von 41,6%. Als Nachweismethode nutzten sie die Bead- basierte- Durchflusszytometrie (Luminex®). Diese Methode ist in den letzten Jahren entwickelt worden und scheint deutlich sensitiver zu sein als bisherige Festphasenassays und es kann anhand dieser Methode direkt der Antikörpertiter und die Antikörperspezifität bestimmt werden [82, 83]. Diese Methode wird in einigen Laboren bereits in der Transplantationsmedizin zur HLA- Antikörperbestimmung eingesetzt. Jedoch werden hier auch viele falsch positive Ergebnisse gewonnen, wie unter anderem auch die Studie von Powers et al. zeigt. Mit einem vom Anwender modifiziertem cut- off- Wert könnten diese Ergebnisse möglicherweise besser interpretiert werden [84]. Die klinische Relevanz der Menge an den gefundenen HLA- Antikörpern mit der Luminex®- Methode für die Transplantationsmedizin ist bisher nicht eindeutig geklärt und sollte Gegenstand weiterer Studien sein [85]. Dennoch zeigt uns diese Methode, dass offensichtlich mehr HLA- Antikörper bei Patienten und Spendern im Serum vorhanden sind, wie bisher angenommen.

5. Zusammenfassung

HLA- Klasse- I- Antikörper besitzen in der klinischen Medizin eine bedeutsame Rolle bei immunologischen Reaktionen: Transplantatabstoßung, Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusion und Transfusionsreaktionen bei zuvor immunisierten Patienten bzw. Transfusionsreaktionen bei Patienten mit übertragenden HLA- Antikörpern vom Spender (TRALI). Daher ist der sichere Nachweis von HLA- Klasse- I- Antikörper bei Patienten und Spendern wichtig in der immunologischen Diagnostik. Hierzu stehen verschiedene Methoden zur Auswahl, die jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. In dieser Studie sollten vier verschiedene Verfahren daraufhin untersucht werden, inwieweit diese Diskrepanzen auftreten und welche Ursachen dafür in Frage kommen. Es wurden drei In- House- Verfahren (MAIPA- Assay, LCT, LIFT) und ein kommerzieller ELISA- Test („AbScreen HLA class I“, Bio-Rad) miteinander verglichen, indem sie bei 152 Seren von Spenderinnen der Blutspendeeinrichtung der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Rostock eingesetzt wurden. Weiterhin erfolgte die Untersuchung von 31 Patientenseren in den In- House- Verfahren, die bereits im Vorfeld in einem der Verfahren positiv reagierten bzw. bereits diskrepante Ergebnisse lieferten.

Es zeigte sich, dass der ELISA- Test am empfindlichsten hinsichtlich eines HLA- Klasse- I- Antikörper- Nachweises ist. Unter den In- House- Verfahren schnitt am besten der MAIPA- Assay ab, der LCT wies deutlich weniger HLA- Klasse- I- Antikörper nach, der LIFT zeigte in der Studie die schlechteste Empfindlichkeit im Nachweis. ELISA/MAIPA- Assay weisen weiterhin bei anderen Seren HLA- Klasse- I- Antikörper nach als der LCT. Gründe für den Unterschied lagen zum einen an der Komplementabhängigkeit der Antikörper, die im LCT erforderlich und bei den anderen Verfahren nicht nötig ist. Dadurch können mehr Antikörper nachgewiesen werden. Zum anderen kann die Zellart die Empfindlichkeit mit beeinflussen, weil die Expression von HLA- Antigenen auf Leukozyten (LCT, LIFT) und Thrombozyten (MAIPA- Assay, ELISA) unterschiedlich sein kann. Aber auch die Auswertungsmethoden haben Einfluss auf die Ergebnisse, die subjektiven Verfahren (LCT, LIFT) zeigten eine niedrigere Nachweisrate als die objektiven Verfahren (MAIPA- Assay, ELISA). Jedoch reagierte der ELISA auch unspezifisch, dies zeigte sich in der weiteren Differenzierung von im Screening positiv getesteten Seren. Für einen sicheren Nachweis bzw. Ausschluss von HLA- Klasse- I- Antikörper, vor allem bei einem klinischen Verdacht, sollte eine Kombination von mehreren Verfahren eingesetzt werden (zum Beispiel ELISA und LCT).

Weiterhin zeigte diese Studie eine Immunisierungsrate von 23,2 % für HLA- Klasse- I- Antikörper unter den Spenderinnen mit einer positiven Schwangerschaftsanamnese als Immunisierungsereignis. Unter den weiblichen Spenderinnen unabhängig von einem Immunisierungsereignis liegt die Immunisierungsrate bei 16,1%.

6. Thesen

1. Die Immunisierungsrate für HLA- Klasse- I- Antikörper für weibliche Spender mit einer positiven Schwangerschaftsanamnese in der Blutspendeeinrichtung des Universitätsklinikum Rostock beträgt 23,2%.
2. Unter den weiblichen Spenderinnen unabhängig eines Immunisierungsereignisses (Transfusion, Schwangerschaft) liegt die Immunisierungsrate bei 16,1%.
3. Mit keinem der verwendeten Screeningverfahren (ELISA, MAIPA- Assay, LCT, LIFT) können alle HLA- Klasse- I- Antikörper erkannt bzw. nachgewiesen werden.
4. Für einen sicheren Nachweis bzw. Ausschluss von HLA- Klasse- I- Antikörpern sollte bei klinischen Verdacht eine Kombination aus mehreren Nachweisverfahren verwendet werden (z. B. ELISA und LCT).
5. Für ein Screening auf HLA- Klasse- I- Antikörper unter den Spenderinnen eignet sich am besten der kommerzielle ELISA- Test.
6. Unter den In- House- Verfahren zeigt der MAIPA- Assay die meiste Empfindlichkeit gegenüber von HLA- Klasse- I- Antikörpern.
7. Der Thrombozyten- Pool, der im MAIPA- Assay zum Screening verwendet wird, ist mit Thrombozyten von nur 8 verschiedenen Spendern in der Empfindlichkeit offenbar ausreichend, wenn bei der Auswahl der Testthrombozyten die wichtigsten HLA- Klasse- I- Antigene berücksichtigt werden.
10. Der LCT identifiziert andere Seren als reaktiv verglichen mit den Verfahren ELISA und MAIPA- Assay auf Grund von HLA- Klasse- II- Antikörpern, IgM- Antikörpern und der Tatsache, dass der LCT nur komplementabhängige Antikörper identifiziert.
11. Der ELISA liefert im Screening falsch positive Befunde im Nachweis von HLA- Klasse- I- Antikörper und daher muss eine weitere Differenzierung oder eine Überprüfung mit anderen Methoden bei auffälligen Befunden erfolgen.
12. Für die Nachweisempfindlichkeit von HLA- Klasse- I- Antikörper in einem Screening im Rahmen dieser Untersuchung zeigt sich folgende Reihung: ELISA > MAIPA > LCT > LIFT.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Thorsby E; A short history of HLA, Tissue Antigens, 2009 (74): 101-16
- 2 Dausset J, Nenna A, Brecy H; Leukoagglutinins. V. Leukoagglutinins in chronic idiopathic or symptomatic pancytopenia and in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Blood 1954 (9):696-720
- 3 Dausset J; Iso-leuco-anticorps, Acta Haematologica, 1958 (20):156-66 in: Dausset J; This Week's Citation Classic 1983 (15)
- 4 van Rood J, van Leeuwen A; leukocyte grouping. A method and its application, Journal of Clinical Investigation, 1963 (42):1382-90
- 5 Waßmuth R; Einführung in das HLA- System, ecomed, 2005, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage
- 6 Zinkernagel RM, Doherty PC; Restriction of in vitro T cell- mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenic or semiallogeneic system, Nature, 1974 (248): 701-2
- 7 Sette A, Buus S, Ettore A, Luciano A, Grey HM; Structural Requirements for the Interaction between Class II KHC Molecules and Peptide Antigens, Immunologic Research, 1990 (9): 2-7
- 8 Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER; Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules, Nature 1985 (317): 359-361
- 9 Horton R, Wilming L, Rand V et al; Gene map of the extended human MHC, Nature Reviews Genetic, 2004 (5): 889-99
- 10 Mehra NK, Kaur G; MHC- based vaccination approaches: progress and perspectives, expert reviews in molecular medicine, 2003 (5): 1-17
- 11 Kissmeyer-Nielsen F, Svejgaard A, Hauge M. Genetics of the human HL-A transplantation system, Nature, 1968 (219): 1116-9

- 12 Solheim BG, Bratlie A, Sandberg A, Staub-Nielsen L, Thorsby E; Further evidence of a third HL-A locus, *Tissue Antigens* 1973 (3): 439-53
- 13 Thorsby E, Sandberg L, Lindholm A, Kissmeyer-Nielsen F; The HL-A system: evidence of a third sub-locus, *Scandinavian Journal of Haematology*, 1970 (7): 195-200
- 14 Burmester GR, Pezzutto A; *Taschenatlas der Immunologie*, Thieme Verlag, 1998
- 15 Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC; Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA- A2, *Nature*, 1987 (329): 506-12
- 16 Daar AS, Fuggle SV, Fabbre JW, Ting A, Morris PJ; The detailed distribution of HLA-A,B,C Antigens in normal human organs, *Transplantation* 1984 (38): 287-92
- 17 Daar AS, Fuggle SV, Fabbre JW, Ting A, Morris PJ; The detailed distribution MHC Class II Antigens in normal human organs, *Transplantation* 1984 (38): 293-98
- 18 Mulder DJ, Pooni A, Mak N, Hurlbut DJ, Basta S, Justinich CJ; Antigen Presentation and MHC Class II Expression by Human Esophageal Epithelial Cells, *The American Journal of Pathology*, 2011 (178): 744-53
- 19 Klein J, Sato A; The HLA- System – first of two parts, *The New England Journal of Medicine*, 2000 (343): 702-09
- 20 Townsend ARM, Rothbard J, Gotch FM, Bahadur G, Wraith D, McMichael AJ; The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides, *Cell* 1986 (44): 959-68
- 21 Ziegler K, Unanue ER; Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes, *The Journal of Immunology*, 1981 (127): 1869-75
- 22 European Bioinformatics Institute: IMGT/HLA Database www.ebi.ac.uk/imgt/hla/
- 23 Marsh S et al, Nomenclature for factors of the HLA, *Tissue Antigens*, 2010 (75): 291-455

- 24 Tait BD; The ever- expanding list of HLA alleles: changing HLA nomenclature and its relevance to clinical transplantation, *Transplantation Reviews*, 2011 (25): 1-8
- 25 Kiefel V; *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, Springer Verlag, 4. Auflage 2010
- 26 Terasaki P, McClelland JD; Microdroplest assay of human serum cytotoxins, *Nature*, 1964 (204): 998-1000
- 27 van Rood JJ, Eernisse JG, van Leeuwen A; Leukocyte Antibodies in sera from pregnant women, *Nature*, 1958 June 21 (4625): 1735-6
- 28 Payne R, Rolfs MR; Fetomaternal Leukocyte Incompatibility, *Journal of Clinical Investigation*, 1958 (37):1756-63
- 29 Densmore TL, Goodnough LT, Ali S, Dynis M, Chaplin H; Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors, *Transfusion*, 1999 (39): 103-6
- 30 Powers A, Stowell CP, Dzik WH, Saidman SL, Lee H, Makar RS; Testing only donors with a prior history of pregnancy or transfusion is a logical and cost-effective transfusion-related acute lung injury prevention strategy, *Transfusion*, 2008 (48): 2549-58
- 31 van Marwijk Kooy M, van Prooijen HC, Moes M, Bosma-Stants I, Akkerman JW; Use of leukocyte-depleted platelet concentrates for the prevention of refractoriness and primary HLA alloimmunization: a prospective, randomized trial, *Blood* 1991 (77): 201-5
- 32 Reesink HW, Nydegger UE; Should all platelet concentrates issued be leukocyte-poor, *Vox Sanguinis*, 1992 (62): 57-64
- 33 Quillen K, Wong E, Scheinberg P, Young NS, Walsh TJ, Wu CO, Leitman SF; Granulocyte transfusions in severe aplastic anemia: an eleven-year experience, *haematological*, 2009 (94): 1661-8
- 34 Dyer P, Middleton D; *Histocompatibility testing- A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University press, 1993

- 35 McKenna RM, Takemoto SK; Improving HLA matching for kidney transplantation by use of CREGs, *The Lancet*, 2000 (355): 1842-3
- 36 Cecka JM; The Role of HLA in Renal Transplantation, *Human Immunology*, 1997 (56): 6-16
- 37 Rodey GE, Neylan JF, Welchel JD, Revels KW, Bray RA; Epitope Specificity of HLA Class I Alloantibodies, I. frequency Analysis of Antibodies to Private versus Public Specificities in Potential Transplant Recipients, *Human Immunology* 1994 (39): 272-80
- 38 Nainani N, Singh N et al.; Cross reactive Epitope Group antibodies in sensitized kidneys transplant recipients was associated with early acute Antibody Mediated Rejection, *Transplant Immunology*, 2009 (20): 113-7
- 39 Heddle NM; Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions, *Current Opinion in Hematology*, 1999 (6): 420-26
- 40 Bordin JO, Heddle NM, Blajchman MA; Biologic effects of leukocytes present in transfused cellular blood products, *Blood*, 1994 (84):1703-21
- 41 Heddle NM, Klama LN, Griffith L, Roberts R, Shukla G, Kelton JG; A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusions, *Transfusion*, 1993 (33): 794-7
- 42 Paul Ehrlich Institut, Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Instituts über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Einführung der Leukozytendepletion von zellulären Blutprodukten zur Transfusion (vom 18. August 2000), *Bundesanzeiger*, 2000 (174): 18396, (http://www.pei.de/cln_180/nn_155914/SharedDocs/bekanntmachungen/2000/banz-174-14-09-2000-s18396.html)
- 43 Miller JP, Mintz PD; The use of leukocyte- reduced blood components, *HematologyOncology Clinics of North America*, 1995 (9): 69-90
- 44 Robert-Koch-Institut, Stellungnahme des Arbeitskreises Blut vom 16.09.1998 „Filtration von zellulären Blutprodukten“, *Bundesgesundheitsblatt* 42, 1999: 89-91, <http://www.rki.de/>

- 45 Bundesärztekammer; Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) – Zweite Richtlinienanpassung 2010, Deutscher Ärzteverlag, 2010
- 46 Kiefel V; Reactions Induced by Platelet Transfusions, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2008 (35): 354-8
- 47 Popovsky MA, Abel MD, Moore SB; Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies, *The American review of respiratory disease*, 1983 (128):185-9
- 48 Reil A, Bux J; Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz, *Deutsches Ärzteblatt*, 2007 (15): A 1018-23
- 49 Keller-Stanislawski B, Reil A, Günay S, Funk MB; Frequency and severity of Transfusion- related acute lung injury – German haemovigilance data (2006- 2007), *Vox Sanguinis*, 2010 (98): 70-7
- 50 Kopko PM, Popovsky MA, MacKenzie MR, Paglieroni TG, Muto KN, Holland PV; HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury, *Transfusion*, 2001 (41): 1244-8
- 51 Sachs UJH, Wasel W, Behnaz B, et al.; Mechanism of transfusion-related acute lung injury induced by HLA class II antibodies, *Blood*, 2011 (117): 669-77
- 52 Brander L, Reil A, Bux J, Taleghani BM, Regli B, Takala J; Severe Transfusion-related acute lung injury, *Anesthesia & Analgesia*, 2005 (101): 499-501
- 53 Bux J, Becker F, Seeger W, Kilpatrick D, Chapmann J, Waters A; Transfusion related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood, *British Journal of Haematology*, 1996 (93): 707-13
- 54 Engelfriet CP, Reesink HW; Transfusion-related acute lung injury (TRALI) *Vox Sanguinis*, 2001 (81): 269-83

- 55 Robert- Koch- Institut, Arbeitskreis Blut, Votum 39: Maßnahmen zur Vermeidung der transfusionsinduzierten Lungeninsuffizienz (TRALI), Bundesgesundheitsblatt 2009 (52): 572
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Blut/AK__Blut/Voten/Uebersicht/V__39/V39.html
- 56 Hod E, Schwartz J; Platelet transfusion refractoriness, British Journal of Haematology, 2008 (142): 348-60
- 57 Doughty HA; Relative Importance of Immune and Non-Immune Causes of Platelet Refractoriness, Vox Sanguinis, 1994 (66): 200-5
- 58 Legler TJ, Fischer I, Dittmann J, Simson G; Frequency and causes of refractoriness in multiply transfused patients, Annals of Hematology, 1997 (74):185-9
- 59 Kiefel V, König C, Kroll H, Santoso S; Platelet alloantibodies in transfused patients, Transfusion, 2001 (41): 766-70
- 60 Rebullà P; A mini-review on platelet refractoriness, Haematologica, 2005 (90): 247-53
- 61 McKenna RM, Takemoto S, Terasaki P; anti – HLA antibodies after solid organ transplantation, Transplantation, 2000 (69): 319-26
- 62 Kelsch R, Weber D; Immunologische Verträglichkeitsdiagnostik bei der Nierentransplantation: ein Update, Transplantationsmedizin, 2010 (22): 111-6
- 63 Barocci S, Valente U, Nocera, A; Detection and analysis of HLA class I and class II specific alloantibodies in the sera of dialysis recipients waiting for a renal retransplantation, Clinical Transplantation, 2007 (21): 47–56
- 64 Kröger N, Zander A; Allogene Stammzelltherapie- Grundlagen, Indikationen und Perspektiven, Uni-med, 2008 2. Auflage
- 65 Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller- Eckhardt C; Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies, Blood 1987 (70): 1722-26

- 66 Mueller-Eckhardt G, Kiefel V, Schmidt A, Tlusty A, Santoso S, Mueller- Eckhardt C; Discrimination of antibodies against antigens of different MHC loci in human sera by MAILA, *Human Immunology*, 1989 (25): 125-34
- 67 Sack U, Tárnok A, Rothe G; *Zelluläre Diagnostik- Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Karger- Verlag 2007
- 68 R Development Core Team; *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- 69 Lee PP, Garovoy MR; Flow Cytometry Crossmatching: The First 10 Years, *Transplantation Reviews*, 1994 (8): 1-14
- 70 Décarry F, Vermeulen A, Engelfriet CP; A Look at HL-A Antisera in the Indirect Immunofluorescence Technique (IIFT), in Kissmeyer- Nielsen F, ed., *Histocompatibility testing*, Copenhagen: Munksgaard, 1975: 380-90
- 71 Worfolk LA, MacPherson BR; The detection of platelet alloantibodies by flow cytometry, *Transfusion*, 1991 (31): 340-4
- 72 Lubenko A, Rodi KM, Johnson AC; Screening for WBC antibodies by lymphocyte indirect immunofluorescence flow cytometry: superior to cytotoxicity and ELISA?, *Transfusion*, 2001 (41): 1147-53
- 73 Köhler M, Dittmann J, Legler TJ, Lynen R, Humpe A, Riggert J, Neumeyer H, Pies A, Panzer S, Mayr WR; Flow cytometric detection of platelet-reactive antibodies and application in platelet crossmatching, *Transfusion*, 1996 (36): 250-5
- 74 McGrath K, Holdsworth R, Veale M, Bishop J, Wolf M; Detection of HLA antibodies by platelet crossmatching techniques, *Transfusion*, 1988 (28): 214-6
- 75 Liebert M, Aster RH; Expression of HLA-B12 on platelets, on Lymphocytes and in Serum: a Quantitative Study, *Tissue Antigens*, 1977 (9): 199-208
- 76 Szatkowski NS, Aster RH; HLA Antigens of Platelets. IV. Influence of „Private“ HLA-B Locus Specificities on the Expression of Bw4 and Bw6 on Human Platelets, *Tissue Antigens*, 1980 (15): 361-8

- 77 Pereira J, Cretney C, Aster RH; Variation of class I HLA antigen expression among platelet density cohorts: a possible index of platelet age?, *Blood*, 1988 (71): 516-9
- 78 Kurz M, Knöbl P, Kalhs P, Greinix HAT, Höcker P, Panzer S; Platelet-reactive HLA antibodies associated with low posttransfusion platelet increments: a comparison between the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens assay and the lymphocytotoxicity test, *Transfusion*, 2001 (41): 771-4
- 79 Lubenko A, Rodi KM; The detection by enzyme-linked immunosorbent assays of non-complement-fixing HLA antibodies in transfusion medicine, *Transfusion*, 1998 (38): 41-4
- 80 Levin MD, de Veld JC, van der Holt B, van't Veer MB; Screening for alloantibodies in the serum of patients receiving platelet transfusions: a comparison of the ELISA, lymphocytotoxicity, and the indirect immunofluorescence method, *Transfusion*, 2003 (43): 72-7
- 81 Maślanka K, Michur H, Żupańska B, Uhrynowska M, Nowak J; Leucocyte antibodies in blood donors and a look back on recipients of their blood components. *Vox Sanguinis*, 2007 (92): 247–249
- 82 Fuggle SV, Martin S; Tools for Human Leukocyte Antigen Antibody Detection and Their Application to Transplanting Sensitized Patients, *Transplantation*, 2008 (86): 384-90
- 83 Tait BD, Hudson F, Cantwell L, Brewin G, Holdsworth R, Bennett G, Jose M; Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation, *Nephrology*, 2009 (14): 247-54
- 84 Makar RS, Saidman SL, Stowell CP, Lee H, Powers A; Analysis of cutoffs for screening sensitized blood donors for HLA alloantibodies using a cytometric microbead assay, *Transfusion*, 2011 (51): 166-74
- 85 Claas FHJ, Doxiadis IIN; Human leukocyte antigen antibody detection and kidney allocation within Eurotransplant, *Human Immunology*, 2009 (70): 636-9

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	serologisch definierte HLA- Spezifitäten
Tabelle 1.2:	CREG- Antigene aufgestellt von McKenna und Takemoto
Tabelle 3.1 :	Ergebnisse der Untersuchungen der Patientengruppe
Tabelle 3.2 a-c:	Vierfeldertafel und p- Werte für die vergleichende Untersuchung MAIPA/LCT, MAIPA/LIFT, LCT/LIFT(IgG) in der Patientengruppe
Tabelle 3.3:	MAIPA- Assay Ergebnisse der Patientengruppe, HLA- Pool und Einzelansatz
Tabelle 3.4 a-f:	Vierfeldertafel und p- Werte für die vergleichende Untersuchung MAIPA/LCT, MAIPA/LIFT, LCT/LIFT(IgG), ELISA/MAIPA, ELISA/LCT, ELISA/LIFT in der Gruppe 2
Tabelle 3.5	Ergebnisse zusammenfassend der positiv reagierenden Seren in den Verfahren MAIPA- Assay, LCT, LIFT IgG, ELISA
Tabelle 3.6 a-f:	Vierfeldertafel und p- Werte für die vergleichende Untersuchung MAIPA/LCT, MAIPA/LIFT, LCT/LIFT(IgG), ELISA/MAIPA, ELISA/LCT, ELISA/LIFT in der Gruppe 3
Tabelle 3.7:	Ergebnisse der Spenderinnen 1-152
Tabelle 3.8:	Ergebnisse der Seren 31, 36, 37, 84 in den Verfahren MAIPA Pool, MAIPA Einzelansatz, LIFT IgG, LCT, B-Screen (kommerziell)
Tabelle 3.9:	Ergebnisse Spenderinnen „AbScreen HLA class I“ positiv/MAIPA negativ im „Abldent HLA class I“

9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Chromosom 6, Lokalisation der HLA- Genorte (modifiziert nach [10])
- Abbildung 1.2: Struktur des HLA- Klasse- I- Moleküls (modifiziert nach [5])
- Abbildung 1.3: Antigenverarbeitung mittels HLA- Klasse- I- Moleküls (modifiziert nach [14])
- Abbildung 1.4: Struktur des HLA- Klasse- II- Moleküls (modifiziert nach [5])
- Abbildung 1.5: Antigenverarbeitung mittels HLA- Klasse- II- Moleküls (modifiziert nach [14])
- Abbildung 1.6: Nomenklatur der HLA- Allele
- Abbildung 1.7: Beadmoleküle mit Antigen (a), Antikörper (b) und DNA (c) beschichtet (modifiziert nach [67])
- Abbildung 1.8: Antigen- Antikörper- Reaktion auf der Beadoberfläche mit Detektionsantikörper (modifiziert nach [67])
- Abbildung 2.1: MAIPA- Assay- schematische Darstellung der Reaktion in der Mikrotiterplatte
- Abbildung 2.2 a-b: Reaktionsbild unter dem Fluoreszenzmikroskop, a) intakte Zellen, b) geschädigte Zellen
- Abbildung 3.1: relative Häufigkeit mit 95%- Konfidenzintervall in der Untersuchungsgruppe der Patienten für die Verfahren MAIPA- Assay, LCT, LIFT (IgG)
- Abbildung 3.2: Verteilung Spenderinnen nach Alter in der Blutspendeeinrichtung der Abt. für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Rostock
- Abbildung 3.3: Altersverteilung der Spenderinnen der Gruppe 2 mit der dazugehörigen Schwangerschaftsanamnese
- Abbildung 3.4: Altersverteilung der Spenderinnen der Gruppe 3 mit der dazugehörigen Schwangerschaftsanamnese
- Abbildung 3.5: Anzahl der Schwangerschaften der Spenderinnen der Gruppe 3
- Abbildung 3.6: relative Häufigkeit und 95%- Konfidenzintervall in der Untersuchungsgruppe 2 für positive Ergebnisse in den Verfahren MAIPA- Assay, LCT, LIFT (IgG), ELISA
- Abbildung 3.7: relative Häufigkeit und 95%- Konfidenzintervall in der Untersuchungsgruppe 3 für positive Ergebnisse in den Verfahren MAIPA- Assay, LCT, LIFT (IgG), ELISA
- Abbildung 3.8: Reaktionsstärken über dem cut- off von den Seren, die im „AbScreen HLA class I“ positiv und im MAIPA- Assay negativ reagierten mit denen, die in beiden Verfahren positiv erschienen

10. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AG- AK	Antigen- Antikörper (-Reaktion)
BSA	Bovines serum albumin
CREG	Cross reactive epitope groups
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISA+ / ELISA-	ELISA positiv / ELISA negativ
FCP	Flow cytometric platelet crossmatch
FCL	Flow cytometric lymphocyte crossmatch
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FNHTR	febrile nicht- hämolytische- Transfusionsreaktion
GAH	goat- anti- human
GAM	goat- anti- mouse
GvHD	Graft-versus-Host-Reaktion
HLA	Human Leukocyte Antigen
HNA	Human Neutrophil Antigen
HPA	Human Platelet Antigens
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LCT	Lymphozytotoxischer Test
LCT+ / LCT-	LCT positiv / LCT negativ
LIFT	Lymphozytenimmunfluoreszenztest
LIFT+ / LIFT-	LIFT positiv / LIFT negativ
MAK	monoklonaler Antikörper
MAIPA	monoclonal antibody immobilization of platelet antigens
MAIPA+ / MAIPA-	MAIPA positive / MAIPA negativ
MHC	Major Histocompatibility Complex
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PRA	Panel reaktive Antikörper
TBS	Tris- buffered saline
TRALI	transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz

12. Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die hier vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Promotionsordnung der Universität Rostock ist mir bekannt.

Rostock , den

Gundula Löwe

13. Danksagung

Ich danke in erster Linie meinem Doktorvater Prof. Dr. med. V. Kiefel für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Betreuung und Geduld während der gesamten Zeit auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein weiterer herzlicher Dank gilt den Mitarbeiterinnen im Thrombozyten- und HLA- Labor, insbesondere Frau B. Lange, Frau I. Schönberner- Richter und Frau K. Manrau. Sie unterstützten mich allzeit tatkräftig mit ihrem fachlichen Wissen und technischen Beistand und tragen daher einen großen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit bei. Auch bei den Mitarbeiterinnen in der Blutspende möchte ich mich bedanken, ohne sie wäre die Bereitstellung der Spenderinnenproben nicht möglich gewesen.

Ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern für die liebevolle und unermüdliche Unterstützung nicht nur während dieser Arbeit.

Liebevoll bedanken möchte ich mich auch bei Martin Guse für seine warmherzige Unterstützung.