

Aus dem
Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

**Bestimmung optimaler Parameter und
Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von
Schwingquarzen zur Messung einer
blutgruppenspezifischen Ankopplung von Erythrozyten**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard – Karls – Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Sven Cluss

aus

Sindelfingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Schleicher

meinen Eltern
und meiner Frau Tanja
für ihre Liebe, Geduld und Unterstützung

I Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Einführung | 1 |
| 1.2 | Blut – Zusammensetzung und Funktion | 2 |
| 1.3 | Immunhämatologie | 6 |
| 1.3.1 | Antigene | 7 |
| 1.3.2 | Antikörper | 8 |
| 1.3.3 | Antigen–Antikörper–Bindung | 11 |
| 1.3.4 | Monoklonale Antikörper | 14 |
| 1.4 | Blutgruppensysteme | 15 |
| 1.4.1 | Blutgruppengenetik | 15 |
| 1.4.2 | Erythrozytenmembran | 18 |
| 1.4.3 | Blutgruppenantikörper | 19 |
| 1.4.4 | AB0–System | 22 |
| 1.5 | Serologische Methoden | 25 |
| 1.5.1 | Antigenbestimmung | 26 |
| 1.5.2 | Antikörpernachweis | 26 |
| 1.5.3 | Techniken der Laborserologie | 28 |
| 1.6 | Sensoren | 31 |
| 1.6.1 | Funktion und Anwendungsgebiete | 31 |
| 1.6.2 | Biosensoren | 32 |
| 1.6.3 | Massensensitive Sensoren | 32 |
| 1.6.4 | Blutgruppenanalytik mit QCM–Sensoren | 34 |
| 1.7 | Vollautomatisiertes Blutgruppen–Analysegerät | 37 |
| 1.8 | Dummy–System | 39 |
| 1.8.1 | Aufbau und Funktion | 39 |
| 1.8.3 | Verwendung | 40 |
| 1.8.2 | Messung und Auswertung | 41 |
| 1.9 | Ziel der Arbeit | 41 |
| 1.9.1 | Optimierung | 41 |
| 1.9.2 | Neue Schichtarchitektur | 42 |
| 1.9.3 | Antikörpernachweis | 43 |
| 1.9.4 | Regeneration | 44 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2 | Material und Methodik..... | 45 |
| 2.1 | Material | 45 |
| 2.1.1 | Labormaterialien und Geräte..... | 45 |
| 2.1.2 | Chemikalien..... | 46 |
| 2.1.3 | Proteine | 48 |
| 2.1.4 | Immunglobuline | 48 |
| 2.1.5 | Blut und Plasma | 49 |
| 2.1.6 | ID–Micro Typing System | 50 |
| 2.1.7 | QCM–Sensor..... | 50 |
| 2.1.8 | Dummy–Messanlage..... | 50 |
| 2.1.9 | Messung und Auswertung..... | 51 |
| 2.2 | Methodik..... | 51 |
| 2.2.1 | Lösungen..... | 51 |
| 2.2.2 | Proteine und Enzyme | 52 |
| 2.2.3 | Antikörper- und Plasmalösungen | 53 |
| 2.2.4 | Blut | 54 |
| 2.2.5 | Blutgruppenbestimmung mit dem DiaMed–System..... | 57 |
| 2.2.6 | Quarzgrundpräparation | 58 |
| 2.2.7 | Beschichtungen | 59 |
| 2.2.8 | Quarzeinbau | 62 |
| 2.2.9 | Messung im Dummy..... | 62 |
| 2.2.10 | Mikroskopie und Dokumentation | 63 |
| 2.2.11 | Regeneration | 65 |
| 2.2.12 | Recycling des Quarzes | 67 |
| 2.2.13 | Reinigung der Dummy–Systems..... | 68 |
| 3 | Ergebnisse..... | 69 |
| 3.1 | Blutgruppendetektion über einen IgG–Monolayer | 69 |
| 3.1.1 | Detektion der Blutgruppen A ₁ und A ₂ | 69 |
| 3.1.2 | Variation der Lösungs- und Trägermittel..... | 70 |
| 3.1.3 | Variation der Temperatur | 74 |
| 3.1.4 | Variation der Konzentration..... | 77 |
| 3.1.5 | Variation der Flussgeschwindigkeiten..... | 82 |
| 3.1.6 | Zentrifugation des mit Erythrozyten belegten Quarzes..... | 87 |
| 3.2 | Blutgruppendetektion über einen IgM–Monolayer | 88 |
| 3.2.1 | Detektion der Blutgruppe A ₁ und A ₂ | 88 |
| 3.2.2 | Detektion der Blutgruppe B | 90 |
| 3.3 | Blutgruppendetektion über eine Sandwichbeschichtung | 92 |
| 3.3.1 | Sandwichbeschichtung mit Anti–IgG..... | 92 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.3.2 | Sandwichbeschichtung mit Anti-IgM..... | 94 |
| 3.4 | Detektion antikörperbeladener Erythrozyten | 96 |
| 3.4.1 | Immobilisation auf einer Protein A Schicht..... | 96 |
| 3.4.2 | Immobilisation auf einer Anti-Ig-Immunglobulin Schicht..... | 98 |
| 3.5 | Regeneration von gebrauchten Quarzen | 106 |
| 3.5.1 | Regeneration mit Chemikalien | 106 |
| 3.5.2 | Regeneration mit serologischen Elutionsmethoden..... | 113 |
| 3.5.3 | Mechanische Regeneration..... | 115 |
| 3.5.4 | Recycling gebrauchter Quarze..... | 118 |
| 4 | Diskussion | 119 |
| 4.1 | Mit Gold beschichtete Quarze als Immunsensoren..... | 119 |
| 4.2 | Blutgruppenanalytik im Dummy-System..... | 120 |
| 4.3 | Blutgruppenanalytik über einen IgG-Monolayer | 121 |
| 4.3.1 | Detektion der Blutgruppen A ₁ und A ₂ | 121 |
| 4.3.2 | Variation der Lösungs- und Trägermittel..... | 122 |
| 4.3.3 | Variation der Temperatur | 125 |
| 4.3.4 | Variation der Konzentration..... | 126 |
| 4.3.5 | Variation der Flussgeschwindigkeit..... | 130 |
| 4.3.6 | Zentrifugation des mit Erythrozyten belegten Quarzes..... | 133 |
| 4.3.8 | Fazit IgG-Monolayer | 134 |
| 4.4 | Blutgruppenanalytik über einen IgM-Monolayer | 135 |
| 4.5 | Blutgruppenanalytik über eine Sandwichbeschichtung | 137 |
| 4.5.1 | Sandwichbeschichtung mit Anti-IgG..... | 138 |
| 4.5.2 | Sandwichbeschichtung mit Anti-IgM..... | 139 |
| 4.5.3 | Fazit Sandwichbeschichtung..... | 140 |
| 4.6 | Detektion antikörperbeladener Erythrozyten | 141 |
| 4.6.1 | Technik des Antikörpersuchtests im Dummy-System | 141 |
| 4.6.2 | Detektion über eine Protein A Schicht..... | 143 |
| 4.6.3 | Detektion über eine Anti-Immunglobulin-Schicht..... | 145 |
| 4.6.4 | Vergleich mit dem DiaMed-System | 148 |
| 4.6.5 | Fazit Detektion antikörperbeladener Erythrozyten..... | 148 |
| 4.7 | Regeneration gebrauchter Quarze | 149 |
| 4.7.1 | Regeneration mit Chemikalien | 150 |
| 4.7.2 | Regeneration mit serologischen Elutionsmethoden..... | 153 |
| 4.7.3 | Regeneration mit mechanischen Methoden..... | 154 |
| 4.7.4 | Recycling von Quarzen | 156 |
| 4.7.5 | Fazit Regeneration | 157 |

| | | |
|----------|-----------------------------------|------------|
| 5 | Zusammenfassung..... | 158 |
| 5.1 | Fazit | 158 |
| 5.2 | Ausblick..... | 161 |
| 6 | Anhang | 162 |
| 6.1 | Verzeichnis der Tabellen..... | 162 |
| 6.2 | Verzeichnis der Abbildungen..... | 164 |
| 6.3 | Verzeichnis der Abkürzungen | 166 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 168 |
| 8 | Danksagung..... | 175 |
| 9 | Lebenslauf | 176 |

1 Einleitung

1.1 Einführung

Durch die Entdeckung der AB0–Blutgruppen durch Landsteiner und zwei seiner Schüler in den Jahren 1900 und 1901 und durch die Erkenntnisse über den Agglutinationsprozess von Erythrozyten [55, 56], wurde der Grundstein für die heutigen Standards der Serologie und Transfusionsmedizin gelegt. Die Wissenschaft der Serologie, d. h. die Lehre von der Bildung und Wirkung von Antikörpern, stellt heute einen wichtigen Teil der Blutanalytik dar. Insbesondere die Blutgruppen- und Blutgruppenantikörperbestimmungen sind für den alltäglichen klinischen Einsatz von Blutkomponenten in der modernen Medizin unverzichtbar.

Obwohl Blutgruppenbestimmungen seit über 100 Jahren durchgeführt werden und der flächendeckende Aufbau von Blutbanken und transfusionsmedizinischen Instituten seit den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts immer rasanter zugenommen hat, hat sich die Technik der Blutgruppenbestimmung im Prinzip nicht verändert. Die meisten Untersuchungen werden auch heute noch „von Hand“ durchgeführt. Zwar wurden im Laufe der Jahre viele Varianten und Optimierungen der Methodik entwickelt, das Grundprinzip ist jedoch dasselbe geblieben [87]. Dadurch, dass Blut kein einheitliches Substanzgemisch ist, stoßen automatisierte Systeme bei optischer Verifikation der Ergebnisse, d. h. die Kontrolle der Agglutination durch Vergleich mit in einer Datenbank hinterlegten Bildern, schnell an ihre Grenzen.

Es hat bisher nur wenige Ansätze für alternative Verfahren zur Blutgruppenbestimmung gegeben. Ein Beispiel ist die elektrochemische Separation von AB0–Blutgruppen, die 1980 von Aizawa beschrieben wurde [5]. Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz von Biosensoren dar, die die vom Analyten ausgehende Information in ein elektrisches Signal umwandeln. Hier gab es erste Ansätze, bei denen erfolgreich Erythrozyten aus einer Blutprobe mit einem antikörperbeschichteten Schwingquarz separiert werden konnten [51, 52]. Die ersten Blutgruppenbestimmungen mit einem antikörperbeschichteten Quartz–Crystal–

Microbalance–Biosensor konnten 2001 durch Krapf [54], der Ausbau dieser Methode sowie deren Einsatz in einer automatisierten Anlage, 2005 durch Gehring gezeigt werden [38].

Die Schwierigkeiten bei der Verwendung von Biosensoren bestehen darin, dass es sich bei der sensitiven Schicht um biologisches Material handelt, das auf einer künstlichen Oberfläche angekoppelt werden muss, ohne dass dies Folgen für seine biologische Aktivität haben darf.

Die vorliegende Arbeit befasst sich im Schwerpunkt mit der Optimierung und Weiterentwicklung der sensitiven Beschichtung eines QCM–Biosensors zur Blutgruppenanalytik und der Untersuchung, welche weiteren serologischen Fragestellungen mit dieser Art von Messverfahren noch beantwortet werden können.

Zunächst werden die biologischen und technischen Grundlagen der Blutgruppenbestimmung vorgestellt. Im Anschluss werden verschiedene Methoden zur Blutgruppendetektion gezeigt und bewertet, wie sie heute in der modernen Blutgruppenserologie verwendet werden. Darauf folgt die Beschreibung der neu entwickelten Technik zur Blutgruppenanalyse über ein Schwingquarzsystem und die Darstellung der Technik des sog. Dummy–Systems. Mit Hilfe des Dummy–Systems kann die sensitive Schicht des Quarzes, auch ohne den Einsatz der komplexen QCM–Anlage, optimiert und weiterentwickelt werden. Dieses System stellt deshalb die Basis für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche dar.

1.2 Blut – Zusammensetzung und Funktion

Das Blut und ein effizientes Kreislaufsystem machen es erst möglich, ein Leben in einem komplexen Verband aus hoch differenzierten Zellen zu führen. Probleme wie der Transport von Nähr- und Abfallstoffen, die Informationsübermittlung, sowie die Aufrechterhaltung der Wasser- und Elektrolythomöostase, können so gelöst werden (*Abb. 1–1*). Einzeller und wenig differenzierte Vielzeller konnten diese Aufgaben durch einfache Diffusion erfüllen und waren deshalb noch nicht auf ein funktionierendes Blutkreislaufsystem angewiesen.

Das Blutvolumen des Erwachsenen korreliert mit den fettfreien Körpermaßen und beträgt im Durchschnitt bei Frauen 4 bis 4,5 l und bei Männern 4,5 bis 5 l. Blut besitzt einen pH Wert von 7,4 und setzt sich aus festen (korpuskulären) und flüssigen (Plasma) Bestandteilen zusammen. Der feste Bestandteil macht zwischen 45 % und 55 % des Volumens aus und besteht aus verschiedenen Blutzellen. In einem µl Blut befinden sich mehrere Millionen Blutzellen, wovon der größte Anteil, > 90 %, aus Erythrozyten besteht. Thrombozyten machen ca. 6 % aus und die weißen Blutkörperchen weniger als 1 %.

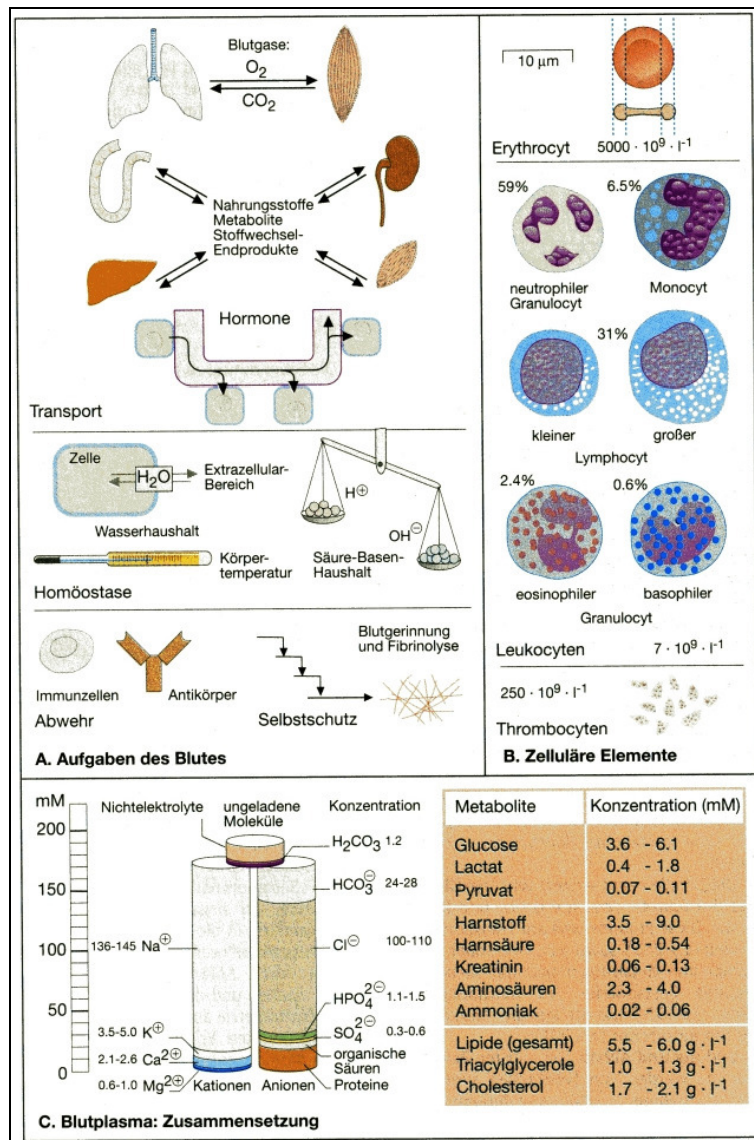


Abbildung 1-1
Zusammensetzung und Funktion humanen Blutes
aus [53]

Die Bildung und Differenzierung der Blutzellen findet beim Erwachsenen im roten Knochenmark statt. Sie entstammen einer gemeinsamen pluripotenten hämatopoietischen Stammzelle, die sich unter der Wirkung von Wachstumsfaktoren in die einzelnen Untergruppen differenziert.

Zu den Aufgaben des Blutes gehört der Transport zahlreicher Stoffe wie O₂, CO₂, Nahrungsstoffe, Stoffwechselprodukte, Vitamine, Elektrolyte, der Transport von Wärme mit Heizung und Kühlung, die Signalübermittlung durch Hormone, die Pufferung des Säure–Basen–Haushaltes und die Abwehr körperfremder Stoffe und Mikroorganismen. Daran sind zum einen die Blutzellen beteiligt, wovon der ganz überwiegende Anteil, die Erythrozyten, für den Sauerstofftransport und die Aufrechterhaltung des pH Wertes sorgen.

Erythrozyten gleichen normalerweise flachen Scheiben. Sie sind kernlos und haben eine bikonkave Form. Der Durchmesser beträgt etwa 7,5 µm, die Randdicke ca. 2 µm und die zentrale Dicke etwa 1 µm. Das mittlere Zellvolumen beträgt ca. 92 µm³, die Masse bewegt sich zwischen 28 und 33 pg. Die Erythrozyten sind ausgesprochen verformbar und können somit die engen Blutkapillaren problemlos passieren. Die Form normaler Erythrozyten bietet ferner den Vorteil kurzer Diffusionsstrecken für Sauerstoff zum Hämoglobin. Die mittlere Lebensdauer der roten Blutkörperchen beträgt etwa 120 Tage.

Von den Leukozyten sind die neutrophilen Granulozyten für die unspezifische und die Mono- und Lymphozyten für die spezifische Immunabwehr zuständig. Die Thrombozyten haben wesentlichen Anteil am System der Blutstillung und Gerinnung. Im Plasma des Blutes, das zu über 90 % aus Wasser besteht, sind Elektrolyte, Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, Vitamine und Gase gelöst. Zu den Aufgaben der Proteine im Plasma zählt die Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes, der für die Konstanz des Blutvolumens sorgt, die humorale Immunabwehr, der Transport wasserunlöslicher Stoffe, sowie der Schutz mancher Substanzen vor vorzeitigem Abbau und Ausscheidung. Schließlich sind viele Plasmaproteine an der Blutgerinnung und Fibrinolyse beteiligt. Sind die Gerinnungsproteine aus dem Plasma entfernt, entsteht Serum.

Für den Einsatz von automatisierten Fließanlagen in der Blutgruppenanalytik spielen die Fließeigenschaften des Blutes eine wichtige Rolle. Sie unterscheiden sich erheblich von denen anderer Flüssigkeiten. Die Viskosität η ($\eta = \text{Scherkraft } \tau / \text{Scherung } \gamma$) des Blutes ist im Vergleich zum Plasma durch den Gehalt an Erythrozyten erhöht. Sie steigt mit wachsendem Hämatokritwert und sinkender Strömungsgeschwindigkeit an. Die kernlosen roten Blutkörperchen sind jedoch sehr leicht verformbar. Die niedrige Viskosität ihres Inhaltes, die Eigenschaften ihrer Membran, die der eines Flüssigkeitsfilms ähneln und ihr hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis bewirken, dass sich Blut, insbesondere wenn es schnell fließt, weniger wie eine Zellsuspension, als vielmehr wie eine Emulsion verhält. Die Viskosität η in kleinen Arterien ist daher etwa nur doppelt so hoch, wie die des Plasmas. Die Passage der Blutkapillaren, deren Durchmesser kleiner als $5 \mu\text{m}$, d. h. kleiner als der der durchschwimmenden Erythrozyten mit $7 \mu\text{m}$ ist, stellt für gesunde Erythrozyten wegen ihrer guten Verformbarkeit kein Problem dar (Abb. 1–2). Durch die in den kleinen Gefäßen langsamere Strömung erhöht sich zwar die Viskosität η , doch schwimmen die roten Blutkörperchen hier zentral im Blutstrom in der typischen „Geldrollenform“ mit. Die Viskosität η des Blutes ist deshalb nur noch wenig größer, als die des Plasmas. Da es hier zu einer scheinbaren Diskrepanz kommt, spricht man bei Blut auch von einer scheinbaren Viskosität η . Dieses Phänomen bezeichnet man auch als Fåhræus–Lindqvist–Effekt. In sehr kleinen Kapillaren ($\varnothing < 4 \mu\text{m}$) steigt die Viskosität η jedoch wieder an, vor allem, wenn sich die Strömung zu sehr verlangsamt.

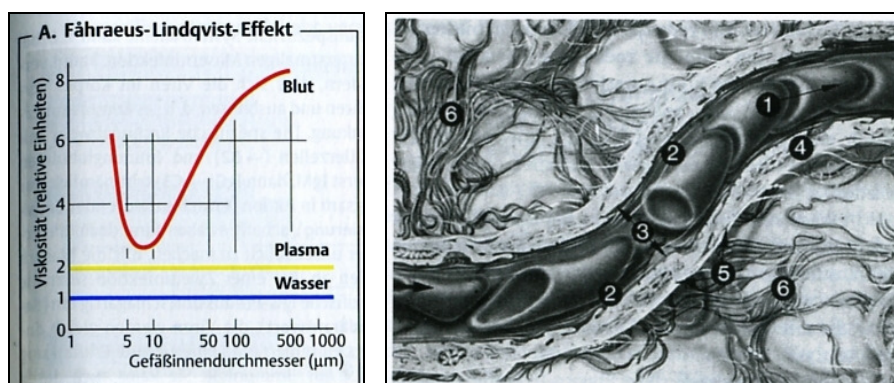


Abbildung 1–2

Viskosität des Blutes (*links*) und Verformung der Erythrozyten im Kapillarbereich (*rechts*)
links aus [93], rechts aus [58]

Das Blut ist zudem das zentrale Organ der unspezifischen, angeborenen und spezifisch, erworbenen Immunabwehr gegen Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) und „fremde“ Makromoleküle. Beide Systeme sind ineinander verzahnt und stimulieren und kontrollieren sich gegenseitig (Abb. 1–3). Alle nicht als eigen erkannten Substanzen können ab einer gewissen Größe als Antigene auftreten, auf die das spezifische Immunsystem mit der Aktivierung und Vermehrung spezifischer T- und B-Lymphozyten reagiert. B-Zellen differenzieren dabei zu sog. Plasmazellen, die antigenspezifische Antikörper (Immunglobuline) produzieren. Aufgabe der Antikörper ist es, Antigene zu neutralisieren, zu opsonieren, sowie das Komplementsystem zu aktivieren. Diese hochspezifischen Mechanismen dienen der Erkennung des jeweiligen Antigens, dagegen erfolgt dessen Eliminierung dann relativ unspezifisch mit Mechanismen des angeborenen Immunsystems. Außerdem wird durch T- und B-Gedächtniszellen eine „immunologische Erinnerung“ gewährleistet [35, 48, 86, 103].

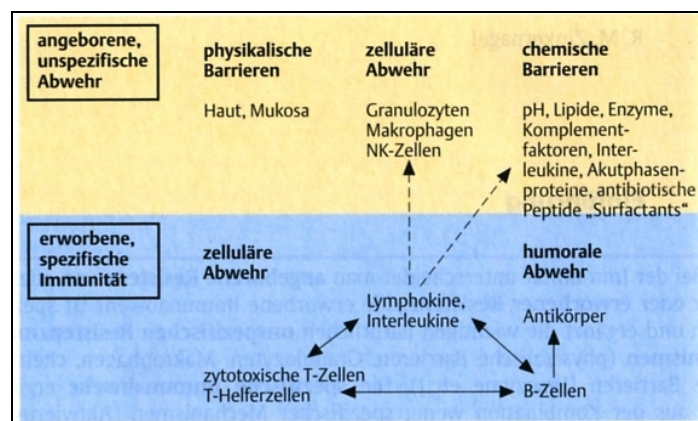


Abbildung 1–3
Übersicht über die Immunantwort
aus [50]

1.3 Immunhämatologie

Die Entdeckung der Blutgruppen bildete die Basis für die moderne Immunologie. Durch die Entdeckung der Agglutination bei nicht kompatiblen Blutgruppen konnte erstmals das Antigen–Antikörper–Prinzip postuliert werden. Es ist die Voraussetzung für die Diskriminierung zwischen eigen und fremd. Auch die weitere

Erforschung der Vielzahl an Oberflächenmolekülen z. B. auf Erythrozyten, konnte nur durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gelingen.

In diesem Abschnitt werden nun die Teile des Immunsystems erklärt, die für die spätere Besprechung der Blutgruppen und der serologischen Methoden der Blutgruppenanalytik wichtig sind. Es werden Antigene und Antikörper und deren Reaktionsweisen, sowie die verschiedenen Besonderheiten der Immunologie in der Blutgruppenanalytik vorgestellt.

1.3.1 Antigene

Die in den Organismus eingedrungenen körperfremden Strukturen, z. B. Bakterien oder Allergene, tragen auf ihrer Oberfläche Moleküle, die bis auf wenige Ausnahmen eine spezifische Abwehrreaktion des Organismus hervorrufen. Diese so genannten Antigene besitzen ein unverwechselbares Profil von Epitopen auf der äußeren Zellmembran, das aus Kohlenhydratketten, Glykoproteinen und Glykolipiden besteht. Auch Nukleinsäuren und andere Oberflächenstrukturen, wie z. B. Staubteilchen können als Antigene wirken. Als Epitope werden spezielle Stellen des Antigens bezeichnet, die von den unten beschriebenen Antikörpern erkannt und gebunden werden. Ein Antigen kann mehrere verschiedene Epitope aufweisen oder sich nur aus vielen gleichartigen Molekülen zusammensetzen. Ferner müssen Antigene eine bestimmte molekulare Zusammensetzung und Molekülgröße von mindestens 2 kDa besitzen, damit sie eine Immunantwort auslösen können. Werden hingegen Epitope aus der Struktur herausgelöst und sind sie nicht mehr an höhermolekulare Substanzen gebunden, so reagieren sie zwar mit spezifischen Antikörpern, lösen aber wegen ihres geringen Molekulargewichtes keine Immunreaktion aus. Diese Moleküle werden Haptene genannt. Erst nach Bindung an z. B. Albumin im Blut, sind sie ein Vollantigen und sind in der Lage, eine Immunantwort auszulösen. Diese Bindung an höhermolekulare Strukturen macht man sich auch bei der aktiven Immunisierung zu Nutze, bei dem Haptene an Albumin gekoppelt werden. Ebenso sind viele allergische Reaktionen darauf zurückzuführen, dass Haptene an Proteine des Blutplasmas gebunden haben.

1.3.2 Antikörper

Immunglobuline oder Antikörper sind eine Familie von Y-förmigen Glycoproteinen, die an beiden Enden Antigene binden können. Immunglobuline kommen als Membranproteine auf der Oberfläche von Lymphozyten und in gelöster Form im Blutplasma vor. Immunglobuline bestehen aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten, haben also die Zusammensetzung $H_2 L_2$. An beiden H-Ketten ist kovalent ein Oligosaccharid gebunden. Die Immunglobuline werden durch die Proteinase Papain in zwei F_{ab} -Fragmente und ein F_c -Fragment gespalten. Die beiden F_{ab} -Fragmente („ab“ für antigen binding) bestehen jeweils aus einer L-Kette und dem N-terminalen Teil einer H-Kette. Sie binden Antigene. Das F_c -Fragment („c“ für crystallizable) setzt sich aus den beiden H-Ketten zusammen. Dieser Abschnitt des Immunglobulins dient der Bindung an die Zelloberflächen und der Interaktion mit dem Komplementsystem. Trotz ihrer großen Vielfalt zeigen Immunglobuline ein gemeinsames Bauprinzip (*Abb. 1–4*). Die beiden schweren Peptidketten setzen sich aus den vier globulären Domänen V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} zusammen, die beiden leichten Ketten aus den zwei globulären Domänen C_L und V_L . Dabei kennzeichnet C den konstanten und V den variablen Bereich. Disulfidbrücken verbinden die beiden schweren Ketten untereinander, sowie die schweren mit den leichten Ketten. Auch innerhalb der Domänen finden sich Disulfidbrücken, die die Tertiärstruktur stabilisieren. Die Domänen bestehen aus etwa 110 Aminosäuren und sind untereinander homolog. In ihrem zentralen Bereich der so genannten „hinge“-Region, die wie ein Scharnier funktioniert, sind die Antikörper sehr beweglich.

Ähnlich der anderen Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie, wie etwa die MHC-Moleküle, gibt es eine nicht zu überschauende Vielzahl von unterschiedlichen Antigenbindungsregionen. Diese extrem große Variabilität der Antikörper kommt durch multiple Gene, somatische Rekombination und durch somatische Mutation zustande.

Die Immunglobuline des Menschen werden nach ihrer schweren Kette in fünf Klassen eingeteilt (*Abb. 1–4* und *1–5*). IgA (zwei Untergruppen), IgD, IgG (vier Untergruppen) IgM und IgE sind definiert durch ihre H-Ketten, die mit den Buchstaben α , δ , γ , μ und ϵ bezeichnet werden. Von den L-Ketten gibt es hingegen nur zwei Arten κ und λ . Die Serumproteine trennen sich in einem elektrischen Feld

auf. Die Immunglobuline, insbesondere IgG sind in der γ -Fraktion zu finden. IgM und IgD sind aufgrund einer geringeren elektrophoretischen Mobilität vor allem in der β -Fraktion zu finden (Abb. 1–5).

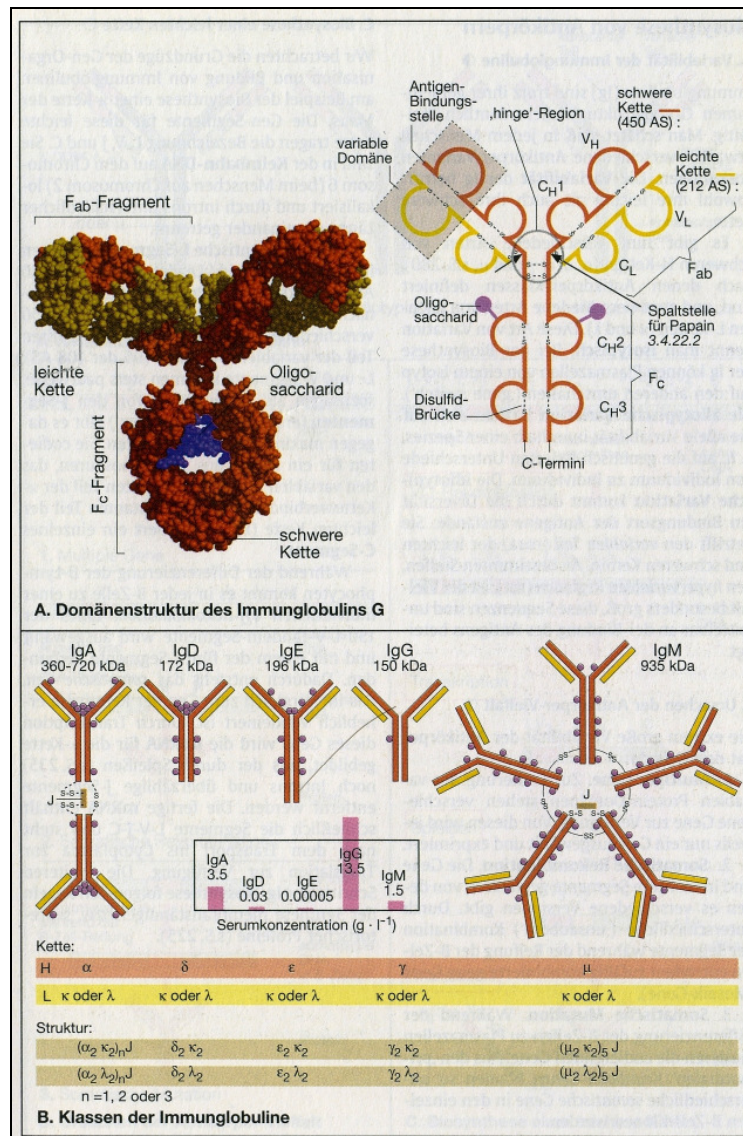


Abbildung 1–4

Struktur und molekularer Aufbau von Immunglobulinen
aus [53]

Die zirkulierenden Antikörper werden von den Plasmazellen im Knochenmark und im Mukosa assoziierten lymphatischen Gewebe produziert und sezerniert. Reife B-Zellen und andere Zellen des Immunsystems exprimieren Immunglobuline über den F_C-Rezeptor auch auf ihrer Zelloberfläche.

IgG-Moleküle machen den größten Anteil an den Serum-Immunglobulinen aus. Es gibt vier Subklassen. Diese unterscheiden sich durch unterschiedliche γ -Ketten (γ_1

bis γ_4). Die Schwereketten bestehen aus einer variablen und drei konstanten Domänen. IgG haben ein Molekulargewicht von ca. 150 000 Da. Dabei fallen von der Gesamtmasse etwa 23 000 Da auf die Leichtketten (ca. 212 Aminosäuren) und etwa 50 000 Da bis 70 000 Da auf die Schwereketten (ca. 450 Aminosäuren). IgG 3 ist das schwerste Immunglobulin der G-Klasse, da es eine lange Serie von Disulfidbrücken in der „hinge“-region aufweist.

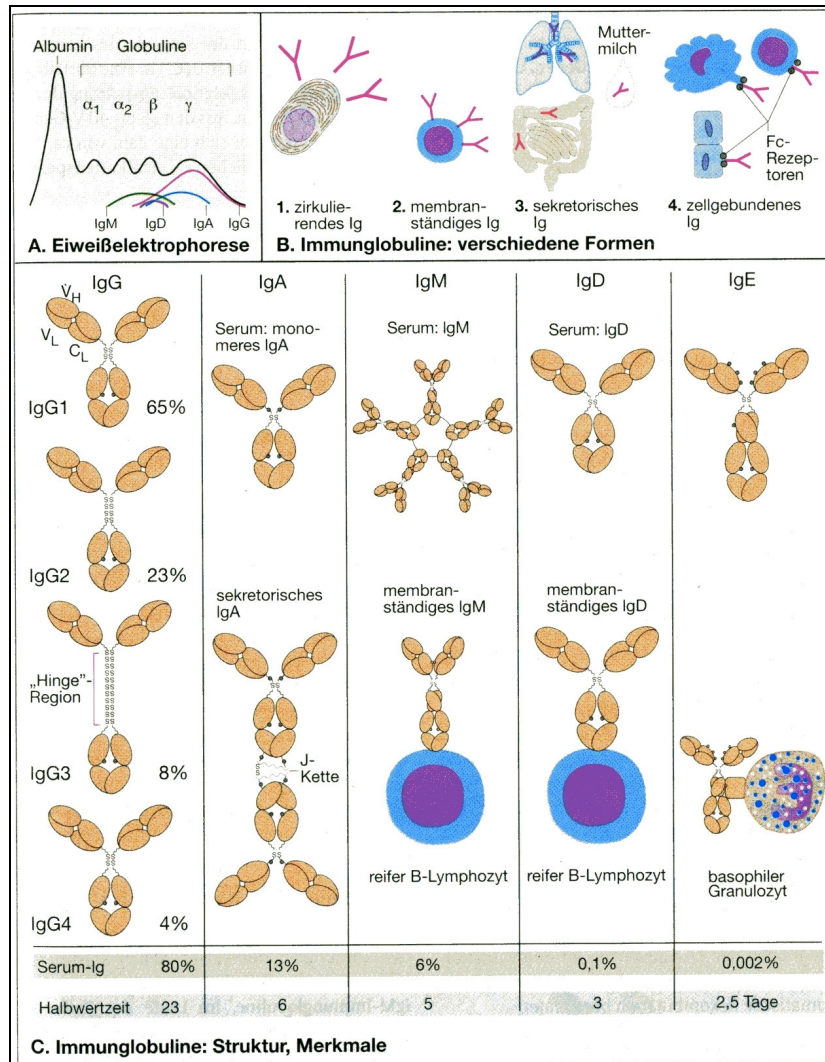


Abbildung 1-5
Klassen und Serumkonzentrationen von Immunglobulinen
aus [14]

Die meisten IgA-Moleküle des Serums sind Monomere. In den Körpersekreten, wo die höchste Konzentration von IgA vorliegt, treten sie überwiegend als Dimere auf, wobei sie durch ein sog. Joining-Peptid zusammengehalten werden.

IgM-Moleküle kommen in der Regel als Pentamere, gelegentlich auch in Form anderer multimerer Komplexe oder als Monomere vor. In der Pentamerform werden sie ebenfalls durch ein „Joining“-Peptid zusammengehalten.

IgD-Moleküle sind die klassischen Oberflächenmoleküle der B-Zellen. Die genaue Funktion im Serum ist nicht bekannt.

IgE-Moleküle sind im Serum in nur sehr geringer Konzentration nachweisbar. Sie sind an basophile Granulozyten und an Mastzellen gebunden. IgE ist wichtig bei der Abwehr von Parasiten und spielt eine entscheidende Rolle bei Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp.

1.3.3 Antigen–Antikörper–Bindung

Antikörper sind mindestens bivalent, d. h. jedes Antikörpermolekül besitzt zwei oder mehr Antigenbindungsstellen. Antigene sind in der Regel polyvalent, d. h. auf einem Antigenmolekül befinden sich mehrere Epitope. Im Idealfall kommt es zur Bildung von Antigen–Antikörper–Komplexen. Jedes Antikörpermolekül kann also mit den Epitopen von mindestens zwei Antigenstellen reagieren. Die Größe des entstehenden Komplexes hängt von der Valenz (Zahl der Epitope pro Molekül) des Antigens und dem Mengenverhältnis von Antigen und Antikörper zusammen (*Abb. 1–6*). Unter einem optimalen Verhältnis kommt es durch maximale Präzipitbildung zur Ausfällung von unlöslichen Komplexen. Dies ist in der sog. Äquivalenzzone der Fall. Der vorhandene Antikörper wird ebenso wie das Antigen vollständig in die Präzipitbildung miteinbezogen. Ein Überschuss an Antikörpern und ein Mangel an Antigen zeigt ebenso wie der Überschuss an Antigen und der Mangel an Antikörpern keine Ausfällung von Präzipiten. Bei Ersteren liegen viele freie Antikörper vor und bei Letzteren viele lösliche Immunkomplexe und freie Antigene, wie es beim Prozoenphänomen vorkommt [32, 62].

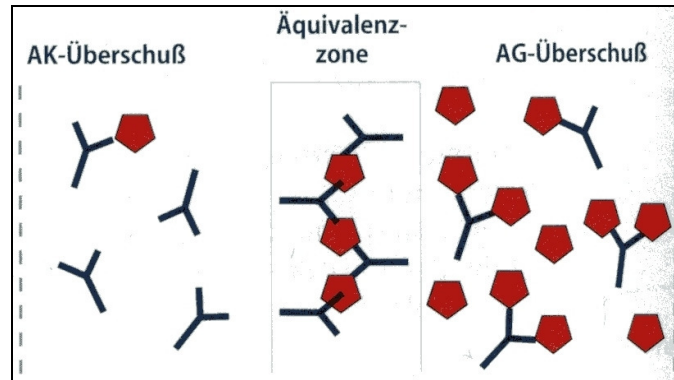


Abbildung 1-6
Konzentrationsverhältnisse von Antigen und Antikörper
aus [43]

Ein Antigen wird von einem Antikörper durch die Ausbildung von nicht kovalenten Bindungen gebunden (Abb. 1-7). Diese sog. affinen Bindungen kommen durch Überlagerung von Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen, Van-der-Waals und hydrophoben Bindungen zu Stande. Dabei spielt der Abstand d zwischen dem Epitop und dem Bindungsort des Antikörpers (Paratop) eine entscheidende Rolle. Den Bindungskräften wirken sterische Abstoßungskräfte entgegen, die proportional zu $1/d^{12}$, also umgekehrt proportional zur Distanz zwischen Antigen und Antikörper, sind. Für die Ausbildung einer Antigen-Antikörper-Bindung müssen sich daher zum einen die passenden Atomgruppen an den entsprechenden Orten gegenüber stehen und zum anderen die Form des Bindungsortes zum Antigen passen. Man spricht hier vom Schlüssel-Schloss-Prinzip. Dabei spielt die dreidimensionale Formation der Elektronenwolke eine größere Rolle, als die spezifische chemische Struktur.

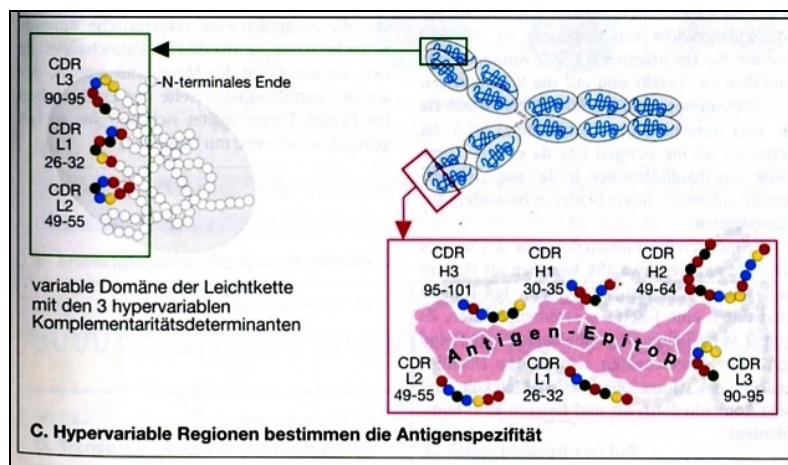


Abbildung 1-7
Molekularer Aufbau der Antigen-Antikörper-Bindung
aus [14]

Die Antigen–Antikörper–Bindung ist keinesfalls eine starre molekulare Verbindung. Sie befindet sich vielmehr in einem permanenten Gleichgewicht zwischen Bindung und Lösung. Die Affinität einer Einzelbindung und die Avidität einer Mehrfachbindung können deshalb über ein System bestimmt werden, in dem sich Antigen und Antikörper in einem Gleichgewicht einstellen. Dieses System lässt sich durch die Affinitätskonstante K beschreiben. Sie begründet sich auf das Massenwirkungsgesetz: $K = (AgAk) / (Ag) * (Ak)$. wobei $(AgAk)$ die Konzentration des gebundenen Antigens, (Ag) die Konzentration des freien Antigens und (Ak) die Konzentration des freien Antikörpers darstellt. Die Affinität und die Spezifität der Antikörper sind als heterogen anzusehen. Dies liegt zum Teil daran, dass das Antigen mehrere unterschiedliche Epitope besitzen kann. Jedoch sind die Affinitäten auch gegen ein einzelnes Epitop heterogen, was an der Sekretion durch unterschiedliche Plasmazellen liegt. Diese Antikörper nennt man polyklonale Antikörper.

Antikörper der Klassen IgG und IgM zeigen ferner eine extreme Flexibilität nach der Bindung mit einem Antigen. Die Gelenkregion („hinge“) des IgG–Moleküls erlaubt eine Rotation der F_{ab} –Fragmente um ca. 30° . Die gelenklosen IgM–Moleküle zeigen ebenfalls eine außerordentliche Verbiegbarkeit nach einer Antigenbindung (Abb. 1–8).

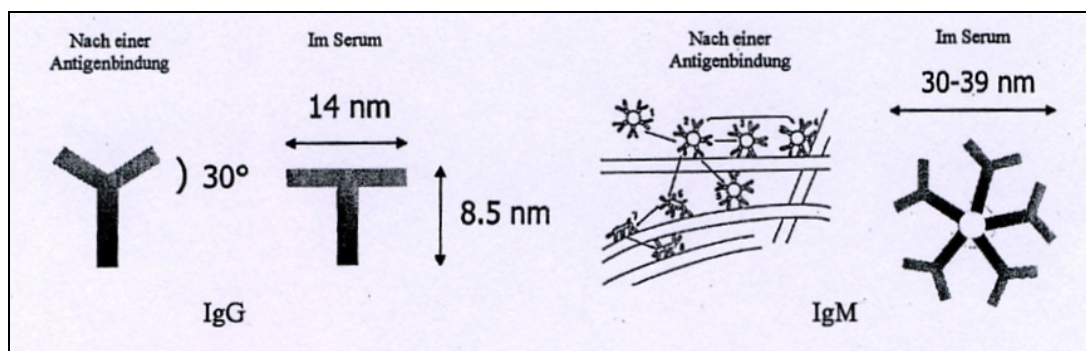


Abbildung 1–8
Flexibilität von Immunglobulinen vor und nach Antigenbindung
aus [38]

1.3.4 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper werden von Immunzellen sezerniert, die von einer einzigen, antikörperbildenden Zelle abstammen. Deshalb sind monoklonale Antikörper jeweils nur gegen ein bestimmtes Epitop einer immunogenen Substanz gerichtet, der sog. antigenen Determinante.

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern werden Lymphozyten aus der Milz einer immunisierten Maus isoliert und mit Mäusetumorzellen (Myelomzellen) fusioniert. Dies ist notwendig, da die Lebensdauer von Lymphozyten in der Kultur nur auf wenige Wochen begrenzt ist. Durch die Fusionierung mit einer Tumorzelle entstehen Zellhybride, sog. Hybridome, die potentiell unsterblich sind. Von den fusionierten Zellen bilden aber nur wenige auch Antikörper. Zum Auffinden dieser Zellen müssen die Hybridome durch klonieren selektiert und vermehrt werden. Nach dem Testen der Klone auf gebildete Antikörper werden die positiven Kulturen ausgewählt und durch weiteres Klonen selektioniert. Das Ergebnis sind Hybridome, die monoklonale Antikörper bilden. Die Produktion der monoklonalen Antikörper erfolgt schließlich *in vitro* mit Hilfe von Bioreaktoren (Abb. 1–9). Diese Verfahren stellt die Grundlage für den heutigen Einsatz künstlicher monoklonaler Antikörperlösungen in der modernen Blutgruppenanalytik dar.

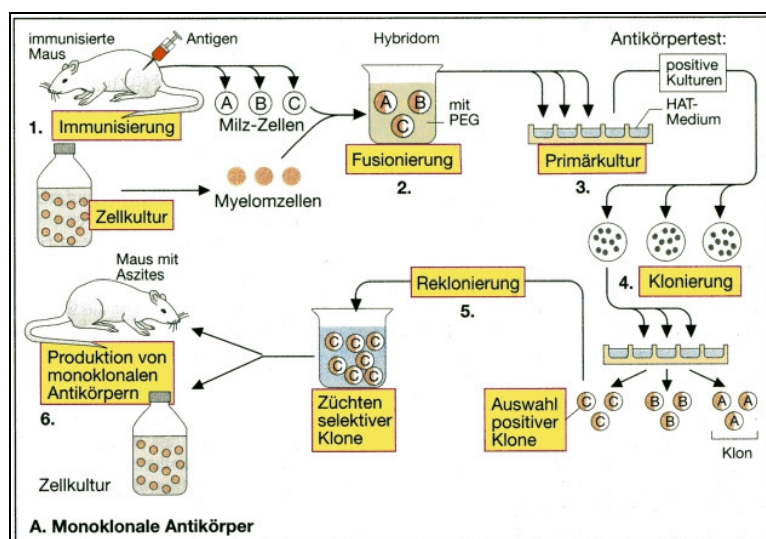


Abbildung 1–9
Gewinnung monoklonaler Antikörper
aus [53]

1.4 Blutgruppensysteme

Unter Blutgruppen im engeren Sinne versteht man alle genetisch determinierten Erythrozyteneigenschaften, die durch das Vorhandensein spezifischer Antigene an der Erythrozytenmembran charakterisiert und mit serologischen Labormethoden nachweisbar sind. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Definition des immunologischen „Selbst“. Die sie determinierenden Blutgruppengene sind „schwache Histokompatibilitätssysteme“, die vermutlich einen großen Anteil an der Modulation zellulärer Abwehrmechanismen haben. So wird z. B. die chronische „graft-versus-host-Reaktion“ nach Knochenmarkstransplantation wesentlich über genetische Differenzen in den Blutgruppensystemen von Spender und Empfänger vermittelt [9, 33]. Die ersten menschlichen Blutgruppenantigene, die des AB0-Systems, wurden 1900 und 1901 von Landsteiner und zwei seiner Schüler entdeckt, die damit gleichzeitig die Grundlagen für die serologisch verträgliche Bluttransfusion schufen [55, 56]. Die Vererbbarkeit von Blutgruppenantigenen erkannte als erster im Jahr 1924 Bernstein anhand von Familienuntersuchungen im AB0-System [10]. Im Jahre 1927 wurde durch Landsteiner und Witt das MN- und P-System entdeckt. Die Rhesusblutgruppen wurden 1940 durch Landsteiner und Wiener beschrieben. Bis heute konnten beim Menschen etwa 20 Blutgruppensysteme, die jeweils aus mehr als hundert Antigenen bestehen, entdeckt werden. Die klinische Relevanz der einzelnen Systeme ist unterschiedlich stark ausgeprägt. Zudem kommen Blutgruppenantigene nicht nur auf Erythrozyten, sondern auch auf sehr vielen anderen Zelloberflächen und in Körperflüssigkeiten vor. Ferner beschränken sie sich nicht nur auf den Menschen. Blutgruppen und blutgruppenähnliche Substanzen kommen auch bei Tieren, Mikroorganismen und Pflanzen vor.

1.4.1 Blutgruppengenetik

Die Blutgruppeneigenschaften sind während des ganzen Lebens konstante Merkmale, welche nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden. Infektionen und bestimmte hämatologische Erkrankungen können jedoch zu einer Veränderung des Phänotyps führen. Ursprünglich gingen die Immungenetiker von der Hypothese aus, jedes Blutgruppenantigen sei ein unmittelbares Produkt eines einzelnen Gens. Heute

ist bekannt, dass nur Proteinantigene oder Blutgruppensubstanzen, deren antigener Abschnitt aus Protein besteht, z. B. das Rhesusantigen, unmittelbar durch die Gene im Zellkern codiert werden. Unmittelbare Genprodukte können also nur Peptide und Proteine sein, was viele Blutgruppenantigene nicht sind [23, 47]. Die bekannten Blutgruppenantigene gehören drei verschiedenen biochemischen Verbindungsklassen an. Sie sind Glykoproteine, wie die mit dem Speichel ausgeschiedenen Antigene des AB₀-Systems, Glykolipide, wie die auf der Erythrozytenmembran lokalisierten Antigene des AB₀-Systems oder Lipoproteine, wie die Antigene des Rhesussystems, die sich zum größten Teil in der Erythrozytenmembran befinden. Glykoproteine und Glykolipide verdanken ihre antigene Spezifität ihrem Kohlenhydratanteil. Bei Lipoproteinen ist der Proteinanteil für die antigene Spezifität verantwortlich [47, 64, 65].

Zur Bildung der Blutgruppenantigene ist ein komplexes Wechselspiel verschiedener Gene auf unterschiedlichen Chromosomen erforderlich [105]. Für die meisten Blutgruppensysteme ist die genaue chromosomale Lokalisation der für ihre Kodierung verantwortlichen Gene bekannt. Neben den klinisch bedeutsamen Blutgruppenantigenen gibt es sog. „high-frequency-antigens“, die bei über 99 % der Bevölkerung auftreten und sog. „low-frequency-antigens“, mit einer Prävalenz von weniger als 1 % .

Alternative Formen eines Gens auf demselben Genort nennt man Allele. So gibt es im AB₀-Blutgruppensystem vier alternative Gene, die Allele A₁, A₂, B und 0. Jede Zelle, in der die Allele auf einem definierten Genort homologer Chromosomen identisch sind, wird homozygot genannt. Im AB₀-System sind entsprechend vier homozygote, allele Genpaare möglich: A₁A₁, A₂A₂, BB und 00. Zellen mit den natürlichen ebenfalls möglichen Genpaarungen A₁A₂, A₁B, A₁0, A₂B, A₂0 und B0 bezeichnet man als heterozygot. Ein Merkmal, das in Erscheinung tritt, wenn die vorhandenen Allele heterozygot sind, nennt man dominant. Ein rezessives Merkmal wird nur bei Homozygotie entdeckt, d. h. das verantwortliche Allel liegt doppelt vor. Im AB₀-System z. B. ist das Antigen A₁ dominant über das Antigen A₂, beide und Antigen B sind dominant über das H-Antigen, das als Merkmal nur in Erscheinung tritt, wenn auf den AB₀-Genorten homozygot die stummen Allele 0 vorliegen. Dagegen sind die Antigene A₁ und A₂ mit dem Antigen B kodominant, das bedeutet, dass die Individuen phänotypisch A₁B, bzw. A₂B sind, wenn auf einem Chromosom

das Allel A_1 bzw. A_2 vorliegt und auf dem anderen am selben Genort B. Anhand dieser Regeln können sich die in der Tabelle gezeigten Phänotypen ergeben (Tab. 1–1).

| Genotyp | Phänotyp (Blutgruppe) |
|--------------------------------|-----------------------|
| A_1A_1 A_1A_2 A_10 | A_1 |
| A_2A_2 A_20 | A_2 |
| BB B0 | B |
| A_1B A_2B | A_1B A_2B |
| 00 | 0 (H) |

Tabelle 1–1
Geno- und Phänotypen des AB0-Systems
aus [32]

Die Gene determinieren eine Gruppe von Enzymen, die Transglykolasen, die den Aufbau von Zuckerketten aus dem Intermediärstoffwechsel steuern und diese Zuckerketten an Proteine oder Lipide anlagern. Mit serologischen Methoden kann nicht zwischen homozygot und heterozygot unterschieden werden. Hierfür sind Stammbaumanalysen über mehrere Generationen notwendig, oder wie heute üblich, molekularbiologische Methoden, wie die PCR, die schnell ein sicheres Ergebnis liefert.

Da die Blutgruppensysteme phylogenetisch sehr alt sind, muss ihre heutige Gen- und Genproduktverteilung bei den verschiedenen Spezies und Stämmen vor dem Hintergrund ihrer immunologischen Bedeutung, durch den über Jahrtausende einwirkenden antigenen Selektionsdruck, entscheidend mitbestimmt worden sein. In der Tat ergeben sich teilweise erhebliche Unterschiede in der Allelfrequenz unterschiedlicher ethnischer Populationen. Da eine Blutgruppe das immunologische „Selbst“ eines Organismus mitbestimmt, muss die Fähigkeit des Immunsystems gegen Erreger mit ähnlichen Antigeneigenschaften Antikörper zu bilden, qualitativ und quantitativ eingeschränkt sein [76]. Dies ist z. B. bei Blutgruppe A der Fall. Pockenviren zeigen eine ähnliche Antigenstruktur, so dass in ehemaligen Pockenzentren die Blutgruppe A nur bei 10 % der Bevölkerung nachzuweisen ist. Das Gleiche gilt für die Blutgruppe 0 und die H-Substanzen. Sie ähneln der

Antigenstruktur des Pesterregers. Folglich ist die Blutgruppe 0 in ehemaligen Pestzentren eher selten. Durch die immer effektivere medizinische Versorgung und die Globalisierung wird die Verteilung der Blutgruppen aber immer homogener.

1.4.2 Erythrozytenmembran

Die Zellmembran der Erythrozyten besteht aus zwei Schichten von Phospholipidmolekülen und anderen Lipiden, wie Cholesterin, Sphingolipide und Glykolipide (*Abb. 1–10*). Der innere Bereich der Doppelschicht, in dem sich die Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren befinden, ist hydrophob, während die Oberfläche, die durch die Köpfe der Phospholipide gebildet wird, hydrophil ist. In die Membran sind integrale Proteine eingebettet, die zum Teil mit ihrem hydrophoben Teil von innen oder außen in der Lipidmembran stecken oder, bei hydrophobem Mittelteil, beidseitig aus dieser herausragen. Ein Teil der Proteine, wie z. B. Spectrine, Actin und Glykophorin, ist kontraktile und bestimmt die Flexibilität mit. Außerdem enthält die Membran, wie auch das Zellinnere, locker und fest gebundene, zum Teil in Membrankrypten verborgene „maskierte“ Enzyme. Die Glykolipide und Glykoproteine ragen aus der äußeren Schicht hervor und bilden die den Erythrozyten umgebende Glycokalix mit einer Ausdehnung von ca. 12,5 nm. Auch die Blutgruppenantigene sind Bestandteile dieser Molekülschicht. Die Oberfläche des Erythrozyten ist durch Neuraminsäurereste der Glycokalix negativ geladen. Durch diese negative Ladung entsteht eine Abstoßungskraft zwischen den Erythrozyten, die pH Wert abhängig einen minimal möglichen Abstand von ca. 10 nm zulässt [22, 23, 47, 80].

Für die Bindung eines Antikörpers an ein Erythrozytenantigen ist die Zugänglichkeit des Antigens entscheidend. Sitzt das Antigen direkt auf der Oberfläche der Erythrozytenmembran, wie z. B. bei den Antigenen des Rhesussystems, muss der Antikörper für eine Bindung die Ausdehnung der Glycokalix überbrücken. Für eine Agglutination muss zudem noch der minimal notwendige Abstand zweier Erythrozyten überwunden werden. Die gleichzeitige Bindung zweier Antigene auf zwei Erythrozyten ist im AB0-System auch durch IgG möglich, da die Oligosaccharidketten des Antigens sehr weit außen sitzen. Im Rhesus-System hingegen sitzt das Antigen direkt in der Zellmembran. Eine Agglutination mit den

kleineren IgG-Molekülen ist nicht möglich. Eine Agglutination ist nur mit IgM-Molekülen mit einer Größe von ca. 30 nm oder durch enzymatische Entfernung der Glycokalix möglich.

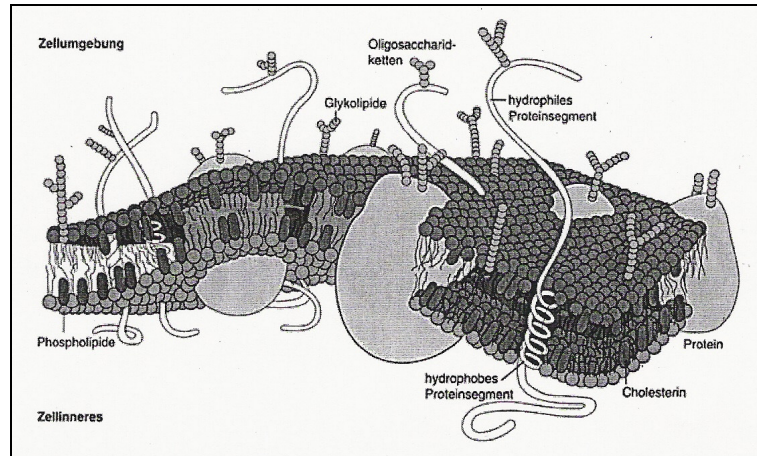


Abbildung 1–10
Aufbau der Erythrozytenmembran
aus [97]

1.4.3 Blutgruppenantikörper

1.4.3.1 Isoagglutinine

Im Gegensatz zu den unten beschriebenen irregulären Antikörpern in anderen Blutgruppensystemen, kommen im ABO-System bei nahezu allen Menschen blutgruppenkonträr natürliche Antikörper vor (*Abb. 1–11*). Diese Antikörper werden Isoagglutinine genannt und werden im Vergleich zu allen anderen Blutgruppenantikörpern als regulär bezeichnet. Ihr regelhaftes Vorkommen ist durch die weite Verbreitung ABH-ähnlicher Substanzen in der Natur bedingt und letztendlich wohl durch Mikroorganismen verursacht, die diese Substanzen besitzen. So weist z. B. das ubiquitär vorkommende Bakterium *Escherichia coli* sowohl A- als auch B-ähnliche Strukturen in seiner Membran auf. Durch Besiedelung der Darmflora durch *Escherichia coli* und die Fähigkeit des Organismus Antikörper mit einer derartigen Spezifität zu bilden, entstehen die Isoagglutinine. Da das eigentliche antigene Stimulans, das bakterielle „Blutgruppenantigen“, mit den menschlichen Erythrozyten nur zufällig eine determinante Gruppe gemeinsam hat, werden die Immunglobuline auch heterophile Antikörper genannt. Das blutgruppen- und antigenkonträre Vorkommen dieser natürlichen Antikörper resultiert aus der

Unfähigkeit des Immunsystems gegen einmal als körpereigen perzipierte antigene Strukturen aktiv zu werden, auch wenn sie den Bestandteilen fremder Mikroorganismen nahezu identisch sind. Träger der Blutgruppe AB besitzen deshalb keine Isoagglutinine [47, 64, 79]. Auch Träger anderer Blutgruppen wie Lewis oder P können natürliche Antikörper gegen konträre Blutgruppen besitzen.

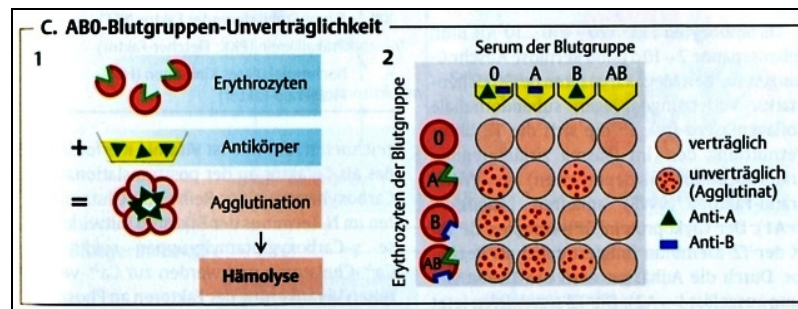


Abbildung 1–11
Isoagglutinine im ABO-System
aus [93]

Die meisten Isoagglutinine sind IgM-Immunglobuline und werden auch als komplette Antikörper bezeichnet [62], da sie in der Lage sind, in saliner Lösung blutgruppenkonträre Erythrozyten zu agglutinieren (Abb. 1–12).

| Blutgruppen-system | Anti-körper | Hämolytische Transfusions-reaktion | Neugeborenen-erythroblastose bei Inkompatibilität |
|--------------------|---|------------------------------------|---|
| ABO | Anti-A | Ja | Ja |
| | Anti-B | Ja | Selten |
| | Anti-A ₁ | Sehr selten | Nein |
| | Anti-H | Nein | Nein |
| Rh | Anti-C | Ja | Wahrscheinlich |
| | Anti-c | Ja | Wahrscheinlich |
| | Anti-C ^w | Ja | Selten |
| | Anti-D | Ja | Ja |
| | Anti-E | Ja | Wahrscheinlich |
| | Anti-e | Ja | Wahrscheinlich |
| MNSs | Anti-M, -N, -S, -s | Sehr selten | Sehr selten |
| P | Anti-P ₁ | Nein | Nein |
| Lutheran | Anti-Lu ^b | Ja | Selten |
| Kell | Anti-K | Ja | Ja |
| Lewis | Anti-Le ^a , -Le ^b | Ja | Nein |
| Duffy | Anti-Fy ^a | Ja | Wahrscheinlich |
| Kidd | Anti-Jk ^a | Ja | Selten |

Tabelle 1–2
häufige Blutgruppenantikörper
aus [91]

1.4.3.2 Irreguläre Antikörper

Im Gegensatz zu den natürlichen Antikörpern entsteht ein irregulärer oder immuner Antikörper erst nach Exposition mit dem korrespondierenden Alloantigen. Zu dieser Exposition kommt es z. B. bei inkompatiblen Bluttransfusionen und Schwangerschaften. Anti-D ist der weitaus häufigste irreguläre Antikörper und kann schwere hämolytische Reaktionen hervorrufen. Irreguläre Antikörper können heute bei weniger als 1 % der Blutspender gefunden werden. Bei bis zu 3 % der transfundierten Patienten werden irreguläre Antikörper gefunden.

Eine Immunisierung gegen das Rhesusmerkmal erfolgt mit mindestens 0,5 ml inkompatiblen Bluts bei 85 % der rhesusnegativen Empfänger [47]. Wegen vieler Transfusionen ohne Berücksichtigung anderer Antigene steigt die Häufigkeit des Auftretens anderer irregulärer Antikörper, wie z. B. Anti-K, Anti-Jk^{a,b} und Anti-Fy^a [64]. Eine weitere Besonderheit ist diejenige, dass Menschen die gegen den Rhesusfaktor immunisiert sind, verstärkt zur Bildung anderer irregulärer Antikörper neigen, wodurch nach häufigen Transfusionen zunehmend Probleme bei der Bereitstellung von kompatiblen Erythrozytenkonzentraten auftreten [47, 64, 79].

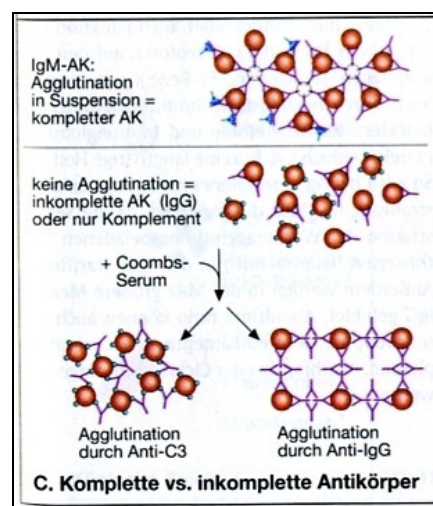


Abbildung 1-12
komplette und inkomplette Antikörper
aus [14]

Beim den irregulären Antikörpern handelt es sich meistens um Immunglobuline der G-Klasse, da sie immunogen sind [62]. Diese Antikörper werden auch als inkomplett bezeichnet, da sie in saliner Lösung blutgruppenkonträre Erythrozyten nicht

agglutinieren können (Abb. 1–12). Erst weiter unten beschriebene serologische Verfahren (z. B. Coombs) können die Agglutination sichtbar machen.

1.4.4 AB0–System

Die vorliegende Arbeit untersucht die Möglichkeiten der Blutgruppenbestimmung im AB0–System. Deshalb wird in der theoretischen Einführung vor allem auf das AB0–System eingegangen. Informationen über weitere Blutgruppensysteme, wie das Rhesus–System oder das Kell–System sind in der Folgearbeit dokumentiert [28].

1.4.4.1 Genetik im AB0–System

Die H–Gene auf Chromosom 19 kodieren eine H–Transferase, die die Bildung der H–Antigene steuert. Sitzen auf den AB0–Genorten der Chromosomen 9 homo- oder heterozygot die Allele A_1 , A_2 und B, werden die H–Antigene über spezifische Transferasen zu den Antigenen A_1 , A_2 und / oder B transformiert, es entstehen dann die Blutgruppen A_1 , A_2 , B, A_1B und A_2B . Sind dagegen die AB0–Genorte homozygot mit dem stummen Allel 0 besetzt, das keine Transferase kodiert, bleiben die H–Antigene unverändert und es entsteht phänotypisch die Blutgruppe 0. Aber auch A– und B–Blutgruppen behalten H–Substanz in aufsteigender Konzentration: $0 > A_2 > A_2B > B > A_1 > A_1B$. Werden auf Chromosom 19 die Gene H homozygot durch ihre stummen Allele h vertreten, die keine Transferasen kodieren, unterbleibt die Bildung der H–Antigene. Die Genträger besitzen dann keine AB0–Blutgruppen (Abb. 1–13). Diese weltweit sehr seltene genetische Konstellation bezeichnet man als „Bombay–Typ“, da sie dort bei Parsen häufiger auftrat [105, 106].

| Phenotype | Number |
|--------------|--|
| A_1 Adult | 810,000 to 1,170,000 |
| A_1 Cord | 250,000 to 370,000 |
| A_2 Adult | 240,000 to 290,000 |
| A_2 Cord | 140,000 |
| A_1B Adult | 460,000 to 850,000 A sites 310,000 to 560,000 B sites |
| A_1B Cord | 220,000 A sites |
| A_2B Adult | 120,000 A sites |
| B Adult | 610,000 to 830,000 |

Tabelle 1–3

Antigenanzahl pro Erythrozyt im AB0–System
aus [47]

1.4.4.2 Blutgruppe A

In Europa haben ca. 80 % der Individuen mit Blutgruppe A die Untergruppe A₁ und etwa 20 % A₂. In der Klinik hat diese Differenzierung nahezu keine praktische Relevanz, da der Unterschied überwiegend quantitativ und weniger qualitativ ist (*Tab. 1–3*). Die Erythrozyten der A₁-Individuen tragen mehr A-Antigene und weniger H-Substanz, bei A₂-Individuen ist es umgekehrt [47, 62]. Selten sind auch die schwächeren A-Varianten A₃, A_x und A_m. Diese können Schwierigkeiten bei der AB0-Blutgruppenbestimmung bereiten. Ebenso können sie wie auch die Blutgruppe A₂ irreguläre Antikörper gegen A₁ bilden. Bei Transfusionsbedürftigkeit erhalten diese Patienten Erythrozytenkonzentrate der Blutgruppe 0.

1.4.4.3 Blutgruppe B

Die Blutgruppe B ist seltener als A und hat eine geringere Immunogenität. Die Anzahl der Antigenstellen pro Erythrozyt ist nur leicht geringer. Aber das Antigen hat eine geringere Affinität zum Antikörper, so dass das B-Antigen nur schwach mit polyklonalen Seren reagiert. Auch gibt es B-Untergruppen die abgeschwächt sind. Sie spielen jedoch eine noch geringere Rolle in der Klinik.

1.4.4.4 Erworbenes B und Antigenabschwächung von A und B

Das „acquired B-like anigen“ bei Blutgruppe A kann irrtümlich als Blutgruppe AB diagnostiziert werden. Als Ursache ist eine Veränderung des A-Merkmals durch bakterielle Enzyme, sog. Deazetylasen, bei Infektionen des Magen-Darm-Trakts anzunehmen [37, 98]. Ebenso kann es bei hämatologischen Erkrankungen zu einer Abschwächung der A- und B-Merkmale kommen, so dass fälschlicherweise die Blutgruppe 0 getestet werden kann [11, 47]

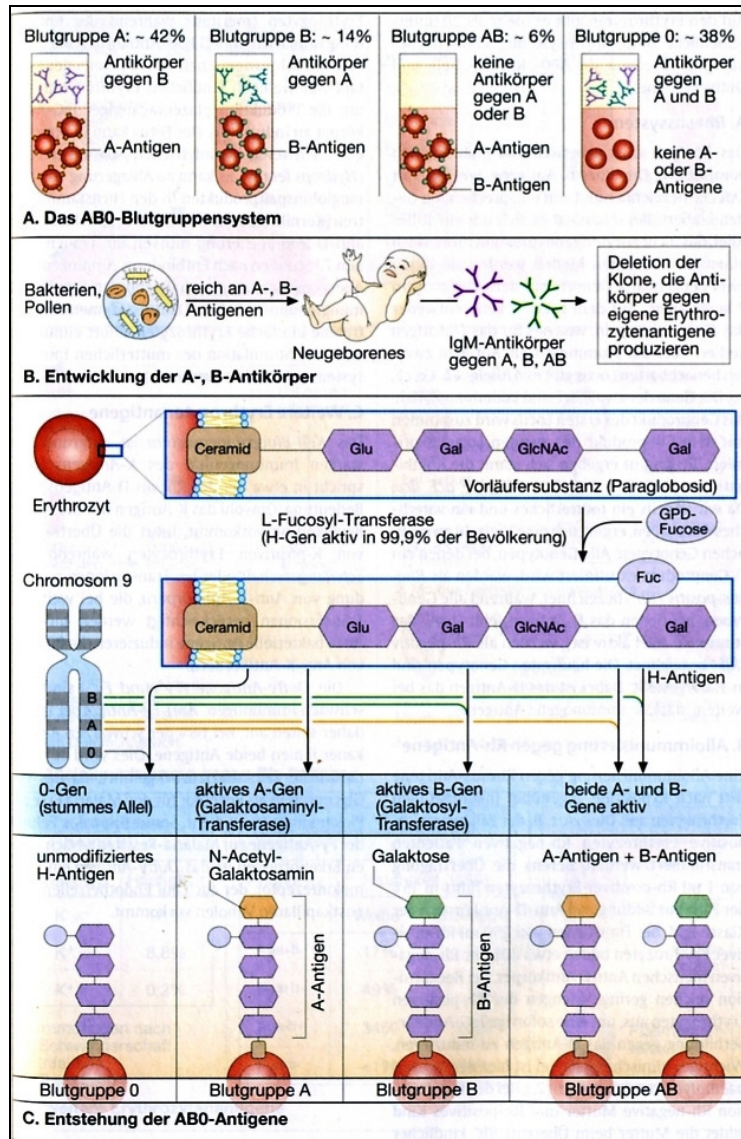


Abbildung 1-13

Verteilung, Entstehung und Aufbau der ABO-Blutgruppen
aus [14]

1.4.4.5 Antikörper im ABO-System

Das ABO-System ist charakterisiert durch nahezu obligat vorkommende natürliche Antikörper gegen die konträren Blutgruppen. Die natürlichen Isoagglutinine sind überwiegend kältewirksame Agglutinine vom IgM-Typ. Jedoch gibt es auch immunogen erworbene Antikörper vom IgG-Typ, die ebenfalls auf Grund der hohen Antigenanzahl auf dem Erythrozyten komplett reagieren. Grundsätzlich haben Träger der Blutgruppe 0 einen höheren Antikörpertiter gegen A und B, als die Träger von A und B gegen ihre konträre Blutgruppe. Dies liegt an der strukturellen Verwandtschaft der A- und B-Antigene. Diese führt, wie oben beschrieben, zu einer verminderten Immunreaktion auf das konträre Antigen. Deshalb kommt es bei Blutgruppe 0 durch

Antigene von z. B. Bakterien des Magen–Darm–Traktes, welche mit den A– und B–Antigenen verwandt sind, immer wieder zu einer immunologischen Boosterung und damit IgG–Produktion. Dies führt dazu, dass Träger der Blutgruppe 0 überwiegend Antikörper vom IgG–Typ gegen die Blutgruppenantigene A und B besitzen [23, 47, 79, 82]. Bei Bombay–Individuen findet sich neben dem Anti–A und Anti–B ebenfalls ein sehr stark agglutinierendes 0.

1.4.4.6 Sekretoreigenschaft

Menschliche Blutgruppenbestandteile können auch im Speichel nachgewiesen werden. Über 80 % der Individuen sind Sekretoren. Diese Eigenschaft wird dominant vererbt. Neben der Lokalisation im Speichel finden sich AB0–Substanzen auch im Blutplasma, in der Muttermilch, in der Tränenflüssigkeit und in Aszites und Ovarialzysten. Bei Sekretoren finden sich praktisch in allen Geweben Blutgruppenmerkmale, außer dem ZNS [47, 80].

1.5 Serologische Methoden

Die Blutgruppenbestimmung hat eine große Bedeutung in der Transfusionsmedizin zur Vermeidung und Klärung von Transfusionszwischenfällen, bei Transplantationen, in der Schwangerschaftsvorsorge, in der Gerichtsmedizin und bei populations- und abstammungsgeschichtlichen Fragestellungen.

Eine Blutgruppenbestimmung und ein Antikörpersuchtest sind in der Transfusionsmedizin unerlässlich, da im AB0–System wegen des Vorkommens natürlicher kompletter Antikörper streng blutgruppenkompatibel transfundiert werden muss. Auch im Rhesus–System und mit gewissen Einschränkungen im Kell–System sollte antigenkompatibel transfundiert werden. Die meisten anderen Blutgruppensysteme erfordern merkmalsidentische Transfusionen nur, wenn beim Empfänger wirksame Antikörper vorliegen [69, 104].

1.5.1 Antigenbestimmung

Die Bestimmung der Blutgruppenantigene wird mit einer standardisierten Palette von mono- oder polyklonalen Testseren durchgeführt. Hierbei wird makroskopisch und in Grenzfällen auch mikroskopisch die Agglutination der untersuchten Erythrozyten beobachtet.

Bei der Verwendung von inkompletten Antikörpern zur Blutgruppenanalytik ist oft das Vorgehen nach Coombs, das weiter unten beschrieben wird, notwendig.

Werden schwache oder nah an bzw. in der Erythrozytenmembran gelegene Antigene untersucht, kann es sein, dass die Antikörper auf Grund der Größe und Abstossungskraft der Glycokalix ihr Antigen nicht erreichen, oder aber zu klein sind, um die Erythrozyten zu agglutinieren. Dies ist z. B. bei Anti-D der Fall, wenn es sich um ein IgG-Immunglobulin handelt. Hier ist entweder das Vorgehen nach Coombs notwendig oder die Erythrozyten werden mit Enzymen, wie z. B. Bromelin, behandelt. Bei den Enzymen handelt es sich um Proteasen, die Polypeptidketten aber auch Glykoproteine und Glykolipide von der Erythrozytenoberfläche abspalten. Dies hat zwei Vorteile. Erstens werden Moleküle von der Glycokalix entfernt, so dass diese erheblich an Durchmesser verliert. Auch kleinere Antikörper gelangen nun problemlos an das Antigen. Zweitens werden auch die negativ geladenen Neuraminsäurereste entfernt, so dass die negative Ladung und damit die Abstossungskraft reduziert werden [57, 62, 90]. Zu beachten ist, dass durch Enzymbehandlung auch Blutgruppenantigene, wie z. B. die Oligosaccharidketten der Blutgruppen A und B, mit entfernt werden können.

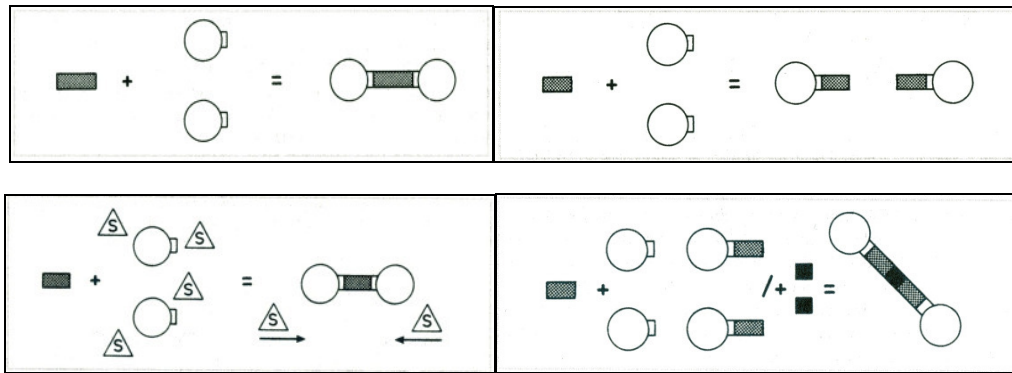
1.5.2 Antikörpernachweis

Antikörpersuchtests sind bei allen Blutgruppenunverträglichkeiten, wie z. B. dem Transfusionszwischenfall oder dem Morbus hämolyticus neonatorum, notwendig. Aber auch in der Routinediagnostik spielt der Antikörpersuchtest eine wichtige Rolle. Blutkonserven sollen keine irregulären Antikörper enthalten. Deshalb muss das Serum jedes Blutspenders mit Testerythrozyten auf irreguläre Antikörper untersucht werden. Auch der Nachweis natürlicher Antikörper spielt eine Rolle, da die

Blutgruppe 0 nur dann definitiv festgelegt werden kann, wenn Anti-A und Anti-B festgestellt wurden [26, 62, 80].

Der Antikörpersuchtest wird in drei Stufen mit speziellen Testerythrozyten, die die passenden Antigene zum gesuchten Antikörper auf ihrer Oberfläche besitzen, durchgeführt (*Abb. 1–14*). In der ersten Stufe, der Kochsalzphase, wird das zu untersuchende Serum mit den Testerythrozyten in einer isotonen salinen Lösung vermischt und zentrifugiert. Kommt es zur Agglutination, so liegen komplette Antikörper vom IgM-Typ im zu untersuchenden Serum vor. Kommt es nicht zur gewünschten Agglutination, handelt es sich also um inkomplette Antikörper vom IgG-Typ, so wird in der zweiten Stufe, der sog. Supplementphase, das Gemisch mit einer eiweißhaltigen Lösung, wie z. B. bovinem Albumin oder makromolekularen Lösungen, wie z. B. LISS (low ionic strength solution), versetzt. Diese Zusätze haben zwar eine physiologische Osmolarität, aber eine niedrigere Ionenstärke. Dadurch kann die negative Ladung der Glycokalix auf der Erythrozytenoberfläche abfließen. Das sog. Zetapotential wird verringert. Dies wiederum fördert die spezifische Bindung von Antikörpern an ihre korrespondierenden Antigene. So wird ein Teil der Antikörper in die Lage versetzt, sich an einer zweiten Antigenstelle auf einem benachbarten Erythrozyten anzulagern. In der dritten Phase, der Coombsphase, erfolgt die Sichtbarmachung der abgelaufenen Antigen-Antikörper-Reaktion, wenn diese in der Supplementphase nicht nachgewiesen werden konnte. Im Coombstest werden mit IgG beladene Erythrozyten mit Lösungen versetzt, welche Antikörper gegen humane IgG-Moleküle enthalten. Diese auch Anti-Human-Immunglobuline genannten Antikörper lagern sich mit einer Antigenbindungsstelle an das F_c -Fragment eines Erythrozytenantikörpers und mit der anderen an ein F_c -Fragment eines an einen zweiten Erythrozyten gebundenen Antikörpers an. Es kommt somit zur Agglutination der roten Blutkörperchen [6, 31]. Wird ein Serum auf Antikörper mit speziellen Testerythrozyten gesucht, wird ein indirekter Coombstest durchgeführt.

Sucht man nach Antikörpern, welche bereits in vivo an den Erythrozyten gebunden haben, führt man einen direkten Coombstest durch. Dieser wird nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Man verwendet nun aber die natürlichen Erythrozyten.

**Abbildung 1–14**

Antikörpernachweis, Prinzip des Coombsstests

oben links: komplette IgM–Antikörper oben rechts: inkomplette IgG–Antikörper

unten links: Supplementphase unten rechts: Coombsphase

aus [32]

1.5.3 Techniken der Laborserologie

1.5.3.1 Manuelle Methoden

Die wichtigen manuellen Methoden, die auch bei Notfällen und bei außerplanmäßigen Blutgruppenanalysen ihre Anwendung finden, sind die Tests im Röhrchen und auf der Tüpfelplatte (Abb. 1–15). Dabei werden die zu untersuchenden Erythrozyten und die Antikörperlösung „von Hand“ pipettiert und vermischt. Das Ergebnis, die Agglutination kann entweder sofort oder nach Inkubation und Zentrifugation abgelesen werden. Auch der Antikörpersuchtest wird „von Hand“ im Röhrchen durchgeführt. Bei entsprechender Routine der Laborkraft dauern diese Tests zwischen 5 und 25 Minuten.

**Abbildung 1–15**

Tüpfelplatte für die manuelle Blutgruppenbestimmung

1.5.3.2 Verbesserte manuelle Methoden

Eine verbesserte manuelle Methode, die mehrere blutgruppenspezifische Fragestellungen in einem Arbeitsgang beantworten kann und so materielle und personelle Ressourcen sparen kann, ist das ID–Micro–Typing–System der Firma

DiaMed [77, 107]. Kernstück des Systems stellen Kärtchen dar, die aus einzelnen Säulen bestehen, die mit einem Gel aus Sepharose-Kügelchen gefüllt sind (Abb. 1–16). Auf diese Gelsäule werden die zu untersuchenden Blutproben oder die Testerythrozyten mit dem zu untersuchenden Serum pipettiert. Im Anschluss werden die Kärtchen zentrifugiert. Dabei wandern die Erythrozyten durch die Gelsäule und treffen dort auf spezifische Antikörper. Findet das Antigen bei der Wanderung durch das Gel den passenden Antikörper, so kommt es zur Antigen–Antikörper–Bindung und die Erythrozyten werden, je nach Reaktionsstärke, abgebremst oder komplett gestoppt. Nach dem Standort der Erythrozyten in der Gelsäule kann die Reaktionsstärke mit dem „Auge“ oder durch spezielle Auslesegeräte abgelesen werden.

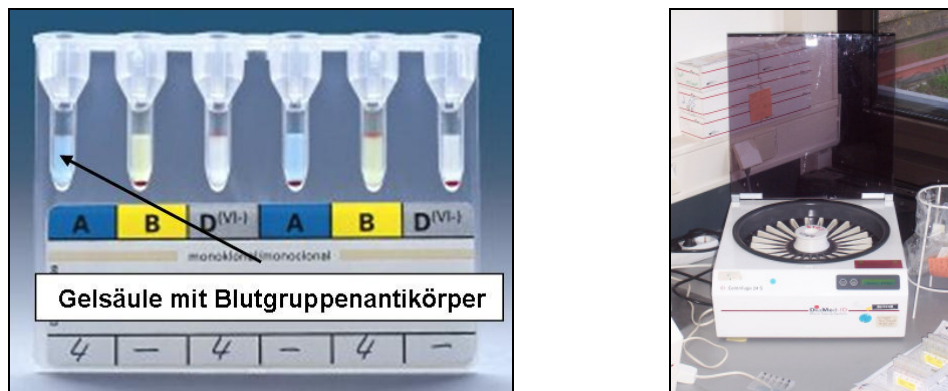


Abbildung 1–16

ID–Micro–Typing–System der Firma DiaMed

links: Gelkarte zur AB0– und Rhesus–Bestimmung rechts: Zentrifuge

1.5.3.3 Automatisierte Methoden

Auch vollautomatisierte Blutgruppenanalyse–Systeme kommen in der modernen Blutgruppenserologie zum Einsatz. Ein Beispiel ist das Auto–Typer–System „Tango“ der Firma Biotest [61]. Hier wird durch einen Pipettier–Roboter das Probenhandling durchgeführt. Die Blutproben werden zusammen mit der Antikörperlösung in einer Mikrotiterplatte pipettiert und miteinander vermischt. Auch Inkubationsschritte sind in dem automatisierten Gerät möglich. Das Ergebnis wird über eine integrierte Optik ausgelesen und über ein Computersystem verarbeitet. Die automatisierten Systeme sind für einen hohen Durchsatz ausgelegt und können innerhalb kurzer Zeit viele Bestimmungen gleichzeitig durchführen. Für Notfälle und außerplanmäßige Blutgruppenbestimmungen sind sie aber zu unflexibel und daher weniger geeignet.



Abbildung 1-17
Auto-Typer-System „Tango“ der Firma Biotest

1.5.3.4 Neue Techniken in der Blutgruppenanalytik

Bei allen bisher verwendeten Techniken, ganz gleich ob „von Hand“ oder automatisiert, erfolgt die Auswertung der Ergebnisse über eine optische Verifikation. Das Ergebnis, also die Agglutination, wird abgelesen und bei automatisierten Systemen mit in einer Datenbank hinterlegten Bildern verglichen (*Abb. 1-17*). Da es viele Gründe geben kann, wann es zu einer Agglutination kommt und wann nicht, kommen automatisierte optische Systeme oft in Grenzbereiche, in denen der Mensch wieder eingreifen muss. Dies wiederum garantiert nicht die notwendige Objektivität, so dass Fehler auftreten können.

Auch die Anforderungen in Bezug auf Flexibilität und Miniaturisierbarkeit erfüllen die automatisierten Systeme nur zum Teil. Des Weiteren sind niedrige Kosten bei der Blutgruppenbestimmung nur bei hohen Durchlaufzahlen möglich. Für Notfälle und außerplanmäßige Blutgruppenbestimmungen werden deshalb immer noch manuelle Blutgruppenbestimmungen bevorzugt. Diese wiederum sind zwar sehr flexibel und schnell, beanspruchen aber die ganze Aufmerksamkeit des Fachpersonals.

Die Anforderungen an ein neues Verfahren sind also hohe Flexibilität, einfache Handhabbarkeit, schnelle Einsatzmöglichkeit, geringe Kosten und geringer Personaleinsatz. Außerdem sollte die Auswertung der Ergebnisse möglichst objektiv erfolgen können.

Die weiter unten gezeigte Technik auf der Basis eines Immunsensors ist in der Lage, die Voraussetzung einer optimierten Blutgruppenanalytik zu erfüllen.

1.6 Sensoren

1.6.1 Funktion und Anwendungsgebiete

Der Einsatz von Sensoren erfolgt in vielen Bereichen der Naturwissenschaft und Technik. Sie dienen zur Erfassung von physikalischen, chemischen und biologischen Messwerten. Für nahezu alle Messanforderungen, bei denen es auf eine robuste, einfache, schnelle und präzise Erfassung von Messwerten ankommt, wird heutzutage eine Vielzahl verschiedenster Sensoren eingesetzt.

Unter einem Sensor versteht man einen meist miniaturisierten Messwertaufnehmer, der aus dem so genannten Transducer (Signalwandler) und bei Chemo- und Biosensoren aus einer zusätzlichen selektiven Erkennungskomponente, einer chemischen oder biologischen Schicht, besteht. Diese Schicht befindet sich in unmittelbarer Nähe des Transducers. Zwischen ihr und dem Analyt treten selektive Wechselwirkungen auf. Diese werden durch den Transducer in ein elektrisches Signal umgewandelt [40].

Den Anfang bildeten physikalische Sensoren, die direkte elektrische Signale lieferten. Aufbauend auf dieser Technik wurden chemische Sensoren entwickelt, die eine sensitive Schicht besitzen, die die chemischen Informationen in elektrische Signale umwandelt [16, 70] An diese sensitive Beschichtung werden die Anforderungen der Selektivität, Sensitivität und Stabilität gestellt.

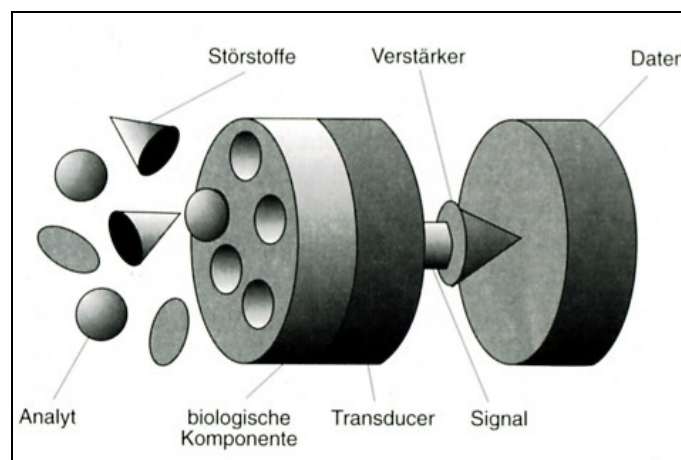


Abbildung 1–18
schematischer Aufbau eines Biosensors
aus [15]

1.6.2 Biosensoren

Die Biosensoren stellen wiederum eine Weiterentwicklung der Chemosensoren dar. Die biologische Schicht ermöglicht eine selektive Stofferkennung. Diese Analyterkennung geht mit einer physikalischen oder chemischen Änderung der Eigenschaften eines Reaktionspartners einher, so dass es möglich ist, aus Proben mit einer Vielzahl unterschiedlicher Moleküle, selektiv das gesuchte Molekül nachzuweisen (*Abb. 1–18*). So kann bei einem Biosensor, der als Immunsensor eingesetzt wird, die Bindung zwischen Antigen und Antikörper als physikalische Eigenschaft durch ein elektrisches Signal gemessen werden [15].

Bei der Weiterentwicklung zum Biosensor ergibt sich das Problem, dass die sensitive Schicht biologischer Art ist und an eine künstliche Oberfläche gebunden werden muss. Dies hat meist Folgen für die biologische Aktivität und die sterischen Verhältnisse. Zudem sind biologische Beschichtungen oft nicht lange stabil und darüber hinaus nicht immer reversibel verwendbar [88, 89].

1.6.3 Massensensitive Sensoren

Massensensitive Sensoren können überall dort eingesetzt werden, wo die Detektion von Analyten mit einer Massenänderung auf der Oberfläche einhergeht. Dies ist z. B. bei dem oben erwähnten Immunsensor der Fall, bei dem die Antikörper auf der Oberfläche mit dem korrespondierenden Antigen reagieren und es somit zu einer Massenzunahme kommt.

1.6.3.1 Quartz–Crystal–Microbalance

Messwertumsetzer auf Basis akustischer Sensoren bestehen aus einem piezoelektrischen Substrat, dem eigentlichen Schwinquarz, auf das Metallelektroden aufgebracht sind. Legt man ein elektrisches Wechselfeld an, so kann der Quarz zu Schwingungen im Ultraschallbereich angeregt werden. Dies ist durch den 1880 von Pierre und Jacques Curie entdeckten piezoelektrischen Effekt möglich. Dieser zeigt, dass Kristalle mit einer Gitterstruktur bei Ausübung von Druck in bestimmte Richtungen elektrische Ladungen entwickeln. Diese Ladungen kann man mit einem Elektrometer, das an der Kristalloberfläche angebracht ist, messen. Da der Effekt

reversibel ist, kann man durch Anlegen einer Wechselspannung den Quarz auch zum Schwingen bringen.

Eine Quartz–Crystal–Microbalance (QCM) ist eine als Schwingquarz bezeichnete Quarzkristallscheibe, die eine bestimmte Geometrie und einen speziellen Kristallschnitt besitzt. An die aufgedampfte Goldelektrode wird eine Spannung angelegt. Es entstehen transversale Scherwellen, die sich auch im Volumen auf der Quarzoberfläche ausbreiten. Die QCM besitzt eine hohe Frequenzkonstante, d.h. die Störanfälligkeit ist minimiert. Die sensorischen Eigenschaften kommen durch die Wechselwirkung der akustischen Wellen an der Grenzfläche zwischen Kristalloberfläche und dem anliegenden Medium zu Stande. Kommt es nun zu einer Massenänderung auf der Quarzoberfläche, so wird der Quarz „träger“ und proportional zur Massenbelegung fällt die Resonanzfrequenz ab. Dadurch wird es möglich Massen im ng–Bereich zu „wiegen“ [8, 41, 42, 71, 74, 84, 92].

1.6.3.2 QCM als Immunsensor

Die Einsatzgebiete für Schwingquarze als Immunsensoren sind vielfältig. Die Sensitivitätsgrenze liegt bei wenigen $\mu\text{l} / \text{ml}$ [46]. Der Detektionsbereich erstreckt sich deshalb vom Nachweis sehr geringer Massen, wie kleine Moleküle, bis hin zu großen Massen, die sich durch Bindung von ganzen Zellen ergeben [7, 46, 59]. Ebenso kann durch die permanente Beobachtung der Resonanzfrequenz, nicht nur die abgeschlossene Immunreaktion, sondern auch die Antigen–Antikörper–Bindung in Echtzeit beobachtet werden [49]. Viele Arbeiten haben sich schon mit der Verwendung eines Schwingquarzes als Immunsensor befasst. Es konnten die Adhäsionen von großen Substanzen wie Endothelzellen, Osteoblasten oder Zellen des Immunsystems detektiert werden. Auch war eine Separierung und Identifizierung bestimmter Antikörperklassen oder der Nachweis von Toxinen mit Hilfe einer QCM möglich [17, 18, 24, 36, 66-68, 72, 81, 85, 101, 108]. Ebenso kann nicht nur die Bindung einer Substanz detektiert werden, sondern auch das Loslösen des Antigens aus der Bindung. Durch Erhöhung der Amplitude des Schwingquarzes kann die Antigen–Antikörper–Bindung „aufgebrochen“ werden. Die dabei entstehenden Ultraschallwellen können gemessen werden. Mit diesem Prinzip können kleinste Biopartikel und Viren nachgewiesen werden [21, 30, 73].

1.6.4 Blutgruppenanalytik mit QCM-Sensoren

Die Blutgruppenanalyse mit einem QCM-System stützt sich auf einen modifizierten Schwingquarz (*Abb. 1–19*), auf dessen Oberfläche Blutgruppenantikörper immobilisiert sind. Die sehr dünne Quarzscheibe ist mit einer Goldschicht überzogen, die als Elektrode und als Reaktionspartner für die Beschichtung dient. Der Quarz wird zum Schwingen angeregt, wobei dessen Frequenz bei etwa 10 MHz liegt. Die Blutgruppenantikörper können mit den entsprechenden Epitopen der Erythrozyten reagieren und sind dadurch in der Lage, die Erythrozyten spezifisch einzufangen. Durch die absorbierte Masse fällt die Resonanzfrequenz ab. Die Blutgruppe kann somit nachgewiesen werden.

Anders als bei der Selektion von Erythrozyten aus Vollblut [51, 52] bleiben bei diesem Verfahren nur solche Erythrozyten auf der QCM-Oberfläche haften, die die entsprechenden Blutgruppenantigene besitzen [54]. Eine Blutgruppendetektion ist so ohne eine vorherige Behandlung der Blutprobe möglich. Auch die Menge des Analyts kann man auf wenige μl beschränken. Durch die geringe Menge und die schnelle Bindung der Erythrozyten, liegt schon nach kürzester Zeit ein Ergebnis vor.

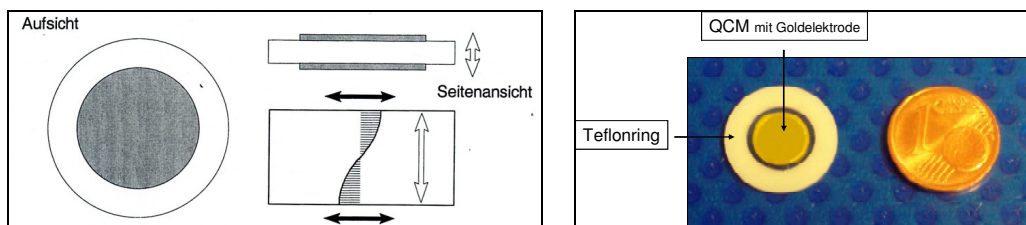
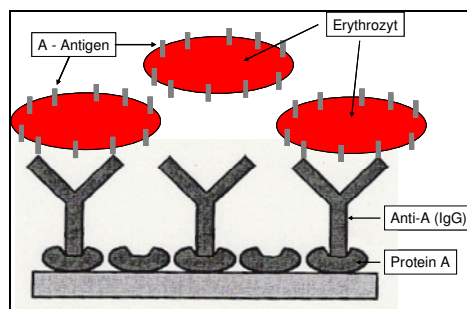


Abbildung 1–19

links: Schwingquarz schematisch mit Scherwellenausbreitung
rechts: Schwingquarz in Halterung (zum Größenvergleich 1 Cent-Stück (rechts))
unten: Detektion der Blutgruppe A mit einer sensitiven Beschichtung des Quarzes
schematische Darstellung, nicht maßstabsgetreu



1.6.4.1 Beschichtung

Der wichtigste Faktor für eine erfolgreiche Biosensorik ist die Beschichtung. Sie muss einige Voraussetzungen erfüllen. Sie muss die Goldoberfläche des Quarzes vollständig und in hoher Dichte belegen, damit eine hohe Sensitivität und Selektivität entsteht und unspezifische Wechselwirkungen vermieden werden. Die Beschichtung muss langzeitstabil und gut zu regenerieren sein, ohne dass sie dabei beschädigt wird. Ferner muss sie universell sein, so dass auch andere immunhämatologische Fragestellungen beantwortet werden können. Nicht zuletzt muss eine Beschichtung kostengünstig und einfach zu realisieren sein. Das kann z. B. dadurch erreicht werden, dass Antikörperlösungen und andere Verbrauchsmaterialien aus der serologischen Routinediagnostik verwendet werden.

Die Entwicklung einer sensitiven Schicht für einen Biosensor zur Blutgruppenanalytik zeigte, dass die Anbindung von Blutgruppenantikörpern an die Goldoberfläche des Quarzes über eine Schicht aus Protein A (*Abb. 1–20*) die beste Lösung darstellt. Sie ermöglicht die Bildung eines geordneten so genannten IgG-Monolayers. Auch andere Arbeitsgruppen konnten bei der Entwicklung von Immunsensoren erfolgreich diese Beschichtung einsetzen [51, 52, 66]. Andere Methoden wie sie frühere Arbeitsgruppen verwendeten, um Immunsensoren für andere Fragestellungen zu entwickeln, zeigten sich als weniger geeignet. Die Anbindung von Antikörpern direkt auf die Goldoberfläche zeigte eine ungeordnete Beschichtung, so dass keine Erythrozyten gebunden werden konnten. Ferner war diese Schicht nicht sehr stabil [4, 102]. Die Anbindung von Protein A über eine Thiolschicht [25, 27, 78] zeigte zwar eine hohe Stabilität, es entstand jedoch durch die Thiolbeschichtung eine „grobmaschigere“ Oberfläche, so dass weniger Protein A gepackt werden konnte und dadurch letzten Endes weniger Erythrozyten gebunden werden konnten.

Protein A wird extrazellulär an der Außenseite der Zellmembran von *Staphylokokkus aureus* gebildet. Ein Polypeptidstrang hat ein Molekulargewicht von 42 000 Da und besitzt zwei freie Bindungsregionen für das F_c-Fragment von Antikörpern verschiedener Spezies. Dadurch kann sich das Bakterium vor dem Immunsystem des Wirtes schützen, in dem es Antikörper am „falschen“ Ende bindet. Die Bindungsaffinität ist von der Spezies und der Antikörperklasse abhängig. Alle humanen IgG Antikörper, außer IgG₃, können mit hoher Affinität gebunden werden.

IgG–Antikörper der Maus werden ebenfalls mit unterschiedlicher Affinität gebunden, das IgG_{2a} sehr gut, das IgG₁ weniger. Andere Antikörperklassen wie z. B. IgM werden mit geringerer Affinität gebunden [12, 29, 99]. Zur Sättigung der Protein A Bindungsstellen reichen schon Antikörperkonzentrationen von ca. 100 µg / ml aus. Nach ca. 30 Minuten liegt ein Gleichgewicht vor. Höhere Antikörperkonzentrationen können nur die Bindungszeit verkürzen, nicht die Dichte der gebundenen Antikörper [13, 20, 34, 63, 83]. Durch die spezifische Bindung an Protein A werden alle Immunglobuline so ausgerichtet, dass die F_{ab}–Fragmente senkrecht aus der Oberfläche herausragen und damit sehr gut das gesuchte Antigen erreichen können. Das Protein A wird durch Di–Sulfid–Brücken und van–der–Waals–Kräfte an die Goldoberfläche des Quarzes gebunden. Die Affinitätskonstante des Protein A zu Gold liegt bei 10⁸ / M. Das Gleichgewicht der Bindung wird nach ca. 60 Minuten erreicht. Die Sättigung liegt bei etwa 2 mg / ml [45, 60, 94].

Nach der Beschichtung mit Protein A und Antikörpern wird die Oberfläche noch mit humanem AB–Plasma (enthält keine AB–Antikörper) oder bovinem Albumin gesättigt, damit es zwischen freien Protein A Stellen und Immunglobulinen und anderen Proteinen der Vollblutprobe zu keinen Wechselwirkungen kommt.

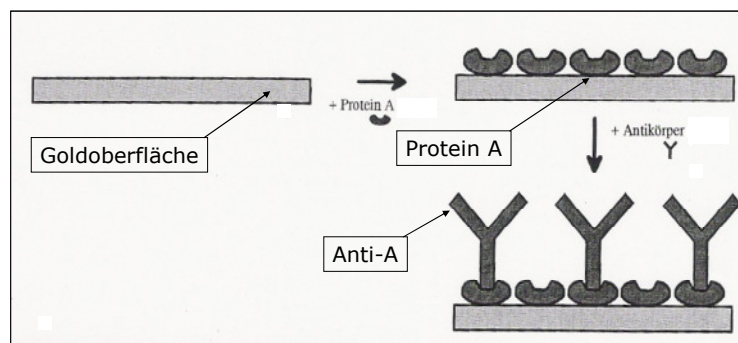


Abbildung 1–20

schematischer Aufbau der IgG–Monolayer Beschichtung zur Blutgruppenanalytik auf der Quarzoberfläche
schematische Darstellung, keine maßstabsgetreue Abbildung

1.6.4.2 Regeneration

Eine weitere Voraussetzung für den Einsatz eines beschichteten Schwingquarzes zur Blutgruppenanalytik ist, dass sich die sensible Oberfläche einfach, schnell und ohne dabei in ihrer Integrität beschädigt zu werden, regenerieren lässt. Bisher gab es nur zwei mögliche Verfahren. Bei beiden kamen saure bzw. alkalische Lösungen zum Einsatz (Abb. 1–21).

NaOH in 0,1 molarer Lösung spaltet als basisches Reagenz die Bindung zwischen Protein A und dem gebundenen Immunglobulin. Dabei werden zwar die gebundenen Erythrozyten entfernt, jedoch auch die Antikörper von der Protein A Schicht. Das bedeutet, dass vor einer weiteren Messung erneut mit Immunglobulinen beschichtet werden muss.

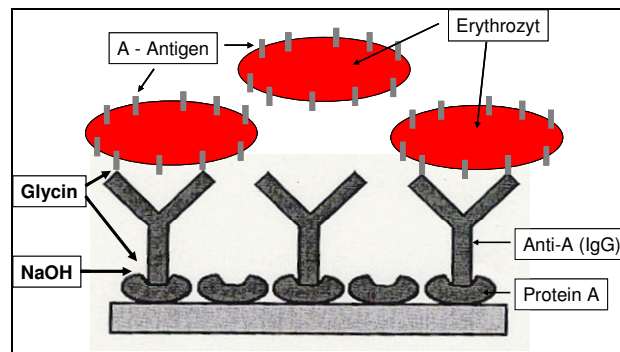


Abbildung 1-21

Regeneration der sensitiven Beschichtung nach Detektion der Blutgruppe A
schematische Darstellung, nicht maßstabsgetreu

Glycin mit einem pH Wert von 2,9 spaltet als saures Reagenz die Bindung zwischen Erythrozyt und Antikörper, im geringeren Maße jedoch auch die Bindung zwischen Protein A und dem Immunglobulin. Dadurch kann in den ersten Zyklen eine erneute Blutgruppendetektion direkt im Anschluss an die Regeneration stattfinden. Nach einigen Wiederholungen müssen aber erneut Immunglobuline immobilisiert werden.

1.7 Vollautomatisiertes Blutgruppen-Analysegerät

Das von Gehring entwickelte vollautomatisierte Blutgruppen-Analysegerät Fidget-Type Fg T1 (Abb. 1-22) arbeitet nach dem Prinzip der QCM-Technik. Es besteht aus einer Messstation mit zwei Messzellen, die eine parallele Bestimmung von zwei Analyten ermöglicht. Diese Messzellen beinhalten die Quarze, die über eine Elektronik zum Schwingen angeregt werden. Die Quarze werden mit dem sensitiven Protein A und Anti-A IgG-Monolayer beschichtet und können ohne großen Aufwand in der speziellen Halterung der Messzelle fixiert werden. An die Messstation sind ein Steuergerät und ein PC angeschlossen. Ein speziell entwickeltes Computerprogramm registriert die Frequenzänderungen des Schwingquarzes und

stellt diese graphisch dar. Die Fluidik des Systems ist so aufgebaut, dass minimale Analytmengen ausreichen. Alle verwendeten Materialien sind biokompatibel, so dass es zu keinen Wechselwirkungen mit den Analyten kommen kann. Sämtliche Einstellungen der Pumpen und Ventile, sowie die Ansteuerung und Temperierung des Schwingquarzes in der Messzelle, werden automatisch durch das Computerprogramm gesteuert [38].

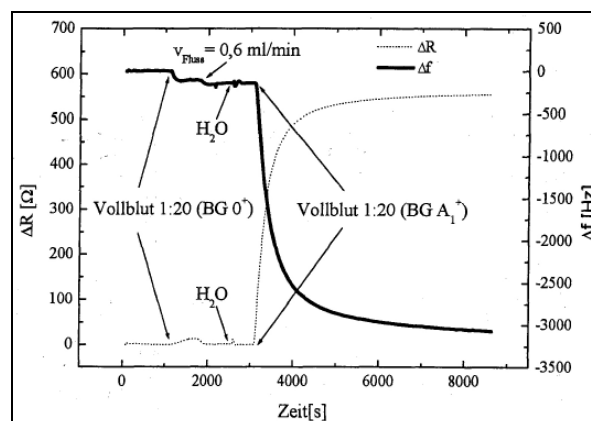
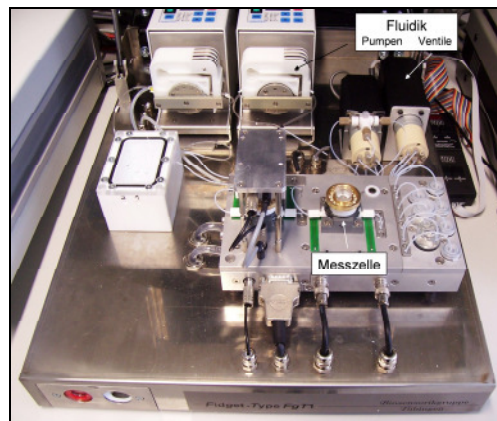
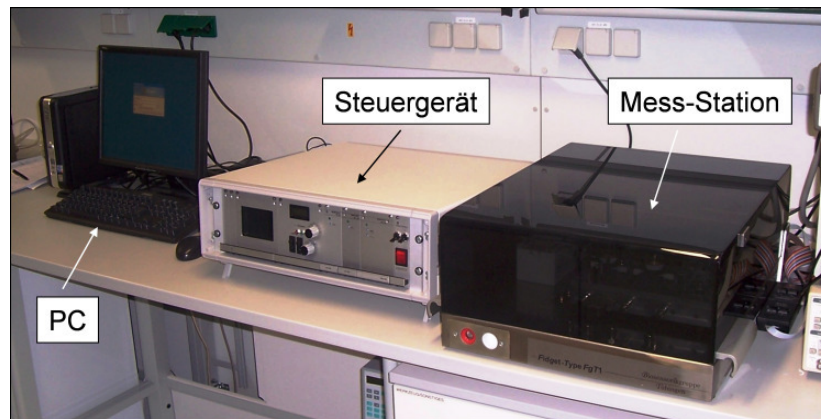


Abbildung 1-22

oben und Mitte: vollautomatisiertes Blutgruppenanalysegerät Fidget-Type Fg T1
 unten: graphische Darstellung des Frequenzabfalls bei Detektion der Blutgruppe A_1

Die automatisierte Blutgruppenbestimmung nach dem Prinzip der QCM-Technik erfüllt die oben beschriebenen Anforderungen, die an neue Techniken zur Blutgruppenanalytik zu stellen sind. Das gemessene Frequenzsignal ist ein eindeutiges, objektives Ergebnis, das schon nach kürzester Zeit detektiert werden kann. Die Kompaktheit der Anlage und die schnelle Einsatzmöglichkeit stellen eine hohe Flexibilität sicher, ebenso wie die Verwendung von unbehandelten Vollblutproben als Analyt. Gegenüber herkömmlichen optischen Geräten hat die automatisierte QCM-Anlage den Vorteil, dass sie keine aufwendige und teure Optik zur Auswertung der Ergebnisse benötigt. Das System selbst ist, verglichen mit den heute verfügbaren automatisierten Blutgruppenanalysesystemen, kostengünstig und gut zu handhaben.

Für die Optimierung und Weiterentwicklung der sensitiven Beschichtung des Schwingquarzes ist es erforderlich, dass variierte Beschichtungstechniken und neu entwickelte Schichtarchitekturen, schnell und ohne großen Aufwand getestet werden können. Die automatisierte QCM-Anlage ist für diese Tests zwar einsetzbar, aber auf Grund ihres Aufbaus und ihrer Komponenten komplex. Für die schnelle Beantwortung der Frage, ob eine optimierte oder neu entwickelte Beschichtungstechnik möglicherweise zur Blutgruppendetektion eingesetzt werden kann, wurde deshalb ein System entwickelt, aufgebaut und eingesetzt, das nur aus den für diese Fragestellung notwendigen Komponenten besteht. Dieses so genannte Dummy-System ist nachfolgend beschrieben.

1.8 Dummy-System

1.8.1 Aufbau und Funktion

Der Dummy besteht aus einer Messzelle in die ein Schwingquarz eingebaut wird (*Abb. 1–23*). Die Konstruktion und die Maße dieser Zelle sind identisch mit denen der „großen“ automatisierten Anlage. Es können dieselben Quarze verwendet werden. Sie werden jedoch nicht zum Schwingen angeregt, so dass auf eine Elektronik verzichtet werden kann. Auch die Fluidik ist identisch mit derjenigen der „großen“ Anlage. Sie besteht ebenfalls nur aus biokompatiblen Materialien, wie z. B. Teflon.

Ein Schlauchsystem fördert das durch eine Pumpe angetriebene Analyt in die Messzelle. Der Durchmesser des Schlauchsystems ist der Viskosität des Blutes angepasst, so dass ein störungsfreier Fluss möglich ist. Der Unterschied im Aufbau des Leitungssystems besteht darin, dass es im Gegensatz zur „großen“ Anlage nur eine Flussrichtung gibt und keine Schleifensysteme existieren. Auf den Einsatz von komplexen und teuren Ventilen kann somit verzichtet werden. Durch den Verzicht auf diese Komponenten, sind Steuergerät und PC, wie sie bei der automatisierten QCM-Anlage eingesetzt werden, ebenfalls nicht erforderlich.

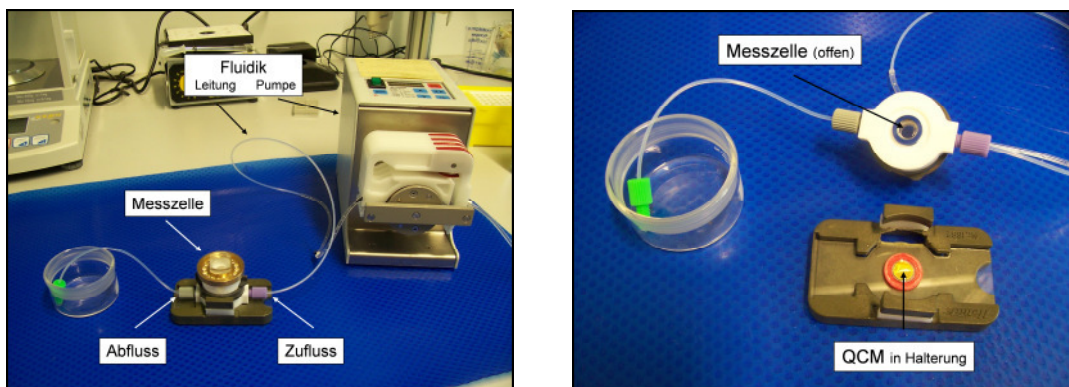
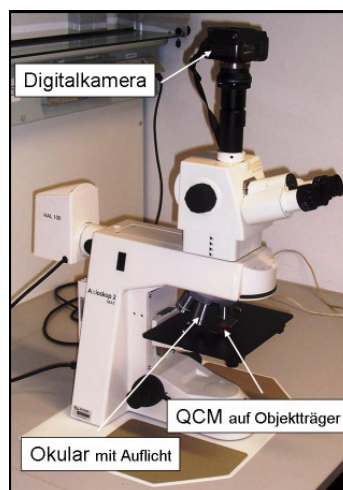


Abbildung 1-23

links und rechts: Aufbau des Dummy-Systems
unten: Mikroskop mit Digitalkamera



1.8.3 Verwendung

Durch den Verzicht auf wesentliche Teile der „großen“ schwingenden Anlage, ist das weit weniger komplexe Dummy-System entstanden. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich, durch optische Auswertung anstatt durch Frequenzabfall, schnell, flexibel und kostengünstig das Ankoppeln von Erythrozyten an die Quarzoberfläche zu

beobachten. Für die Versuche zur Optimierung und Weiterentwicklung sensitiver Beschichtungen bietet das Dummy–System damit optimale Voraussetzungen.

1.8.2 Messung und Auswertung

Die Auswertung der Blutgruppenbestimmungen erfolgt im Dummy–System mit optischen Methoden. Der zur Blutgruppendetektion verwendete Quarz wird unter einem Auflichtmikroskop untersucht und digital fotografiert. Die digitale Abbildung wird auf einen PC übertragen und die Dichte der spezifisch auf der Quarzoberfläche gebundenen Erythrozyten bestimmt. Dies geschieht mit Hilfe der hierfür entwickelten Auswertungssoftware.

1.9 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist es, mit Hilfe des Dummy–Systems die bisherige Schichtarchitektur des Quarzes und die Messtechnik zu optimieren und Beschichtungen für neue serologische Fragestellungen zu entwickeln. In Bezug auf einen späteren Einsatz in der Routinediagnostik muss zudem auf Ökonomie und einfache Handhabung der zu entwickelnden Techniken geachtet werden.

1.9.1 Optimierung

Nach der Etablierung des Dummy–Systems stellt sich die Frage der Sensitivität und Spezifität der bisher eingesetzten Beschichtung. Kann neben der Blutgruppe A_1 auch die immunologisch schwächere Blutgruppe A_2 detektiert werden? Wie wirkt sich der Unterschied auf die Dichte der spezifisch gebundenen Erythrozyten aus?

Ferner werden Versuche durchgeführt, die zeigen sollen, ob es möglich ist, durch Veränderung der Bedingungen und Materialien bei Beschichtung und Messung, eine Verbesserung der bisher erreichten Dichte der spezifisch gebundenen Erythrozyten zu erreichen. Durch weitere Veränderungen der Bedingungen und Konzentrationen der verwendeten Materialien und Analyten, soll gezeigt werden, bis in welche Bereiche die IgG–Monolayer–Beschichtung eine selektive Detektion von

Erythrozyten der Blutgruppe A gewährleisten kann. Diese Ergebnisse sollen dann mit den mittels etablierter Methoden gewonnenen Ergebnissen der Blutgruppenanalytik verglichen werden. Hierzu wird das in der serologischen Routinediagnostik eingesetzte DiaMed-System verwendet.

1.9.2 Neue Schichtarchitektur

Neben der Optimierung der herkömmlichen IgG-Monolayer-Beschichtung werden neue Beschichtungen entwickelt, mit denen man schnell und flexibel neue serologische Fragestellungen, die eine andere Schichtarchitektur erfordern, beantworten kann. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist, dass möglichst mit Materialien gearbeitet werden kann, die bereits in der herkömmlichen serologischen Routinediagnostik eingesetzt werden. Dies trägt zur Vereinfachung und zu einem kostengünstigen Einsatz des QCM-Systems bei. So liegen z. B. viele Testseren mit monoklonalen Blutgruppenantikörpern als IgM-Moleküle vor. Es soll deshalb geprüft werden, ob auch eine Monolayer-Beschichtung mit Blutgruppenantikörpern vom IgM-Typ möglich ist. Ferner soll die auch aus anderen immunologischen Methoden bekannte Sandwichbeschichtung, bei der mehrere Antikörperlagen entstehen, auf dem Quarz aufgebaut werden (Abb. 1–24). Eine Sandwichbeschichtung ist für viele serologische Fragestellungen Voraussetzung, wie z .B. für den Nachweis des Rhesusantigens [28].

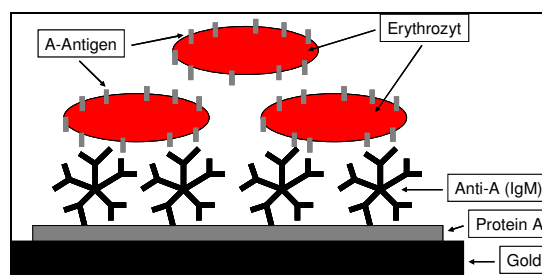
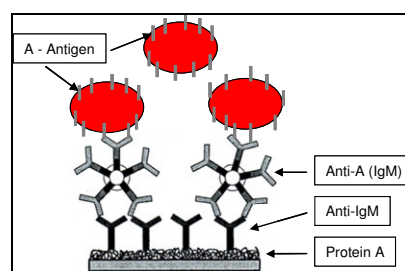
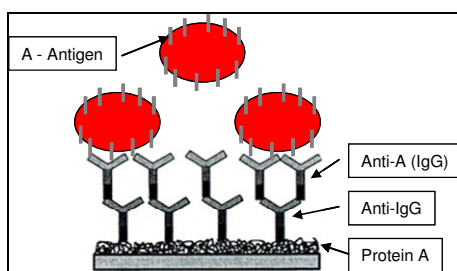


Abbildung 1–24

oben: Aufbau der Beschichtung eines IgM-Monolayers

unten-links: Sandwichbeschichtung mit Anti-A (IgG) unten-rechts: Sandwichbeschichtung mit Anti-A (IgM)
schematische Darstellung, nicht maßstabsgetreu



1.9.3 Antikörpernachweis

Als abschließende serologische Fragestellung soll geprüft werden, ob ein Antikörpernachweis mit dieser Art von Beschichtung möglich ist. Es sollen mit Antikörpern beladene Erythrozyten spezifisch auf der Schwingquarzoberfläche gebunden werden, d. h. es wird das Äquivalent eines so genannten direkten Coombstests durchgeführt.

Zwei Ansätze sollen dabei überprüft werden. Es soll getestet werden, ob sich die mit Antikörper inkubierten roten Blutkörperchen auf einer Protein A Schicht spezifisch binden lassen. Falls dies nicht gelingt, wird versucht, mit auf Protein A immobilisierten Anti-Ig-Immunglobulinen, die an den Erythrozyten gebundenen Blutgruppenantikörper, spezifisch am F_c-Teil zu binden (Abb. 1–25). Zum Test der Sensitivität und der Grenzen des Systems, sollen die Erythrozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen der Antikörperlösung inkubiert werden. Zudem sollen Versuchsreihen mit monoklonalen Seren aus der serologischen Routinediagnostik und mit natürlichem humanem Plasma durchgeführt werden.

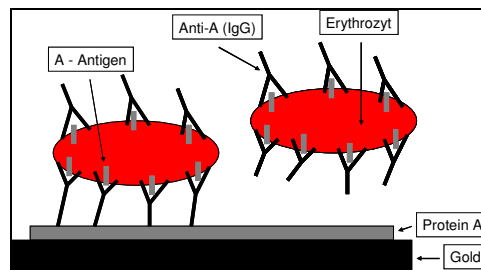
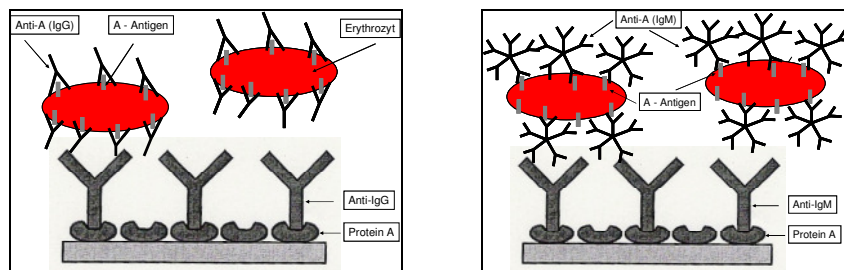


Abbildung 1–25

Aufbau der Beschichtung für einen direkten Coombstest

oben: „Einfangen“ über eine Protein A Schicht

unten-links: „Einfangen“ mit Anti-IgG unten-rechts: „Einfangen“ mit Anti-IgM
schematische Darstellung, nicht maßstabsgetreu



1.9.4 Regeneration

Der letzte Abschnitt beschäftigt sich mit der Frage der Regeneration des beschichteten Schwingquarzes. Wie oben beschrieben konnte noch keine Methode gefunden werden, die die selektive Ablösung der gebundenen Erythrozyten garantiert, ohne dass dabei die Beschichtung „mit verletzt“ wird. Hier sollen die bisher bekannten Methoden optimiert und neue Verfahren (chemisch, immunologisch und mechanisch) getestet und bewertet werden.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Labormaterialien und Geräte

2.1.1.1 Analysebehältnisse

- Analyseröhrchen 15 ml, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
- Regenerationsröhrchen Cryo S, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
- Analysatreservoir, Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg

2.1.1.2 Behälter

- Messkolben 100 ml und 250 ml, Schott Duran GmbH, Mainz
- Glasschale 100 ml, Schott Duran GmbH, Mainz
- Enghalsflasche mit Spritzverschluss 500 ml und 1000 ml, Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg

2.1.1.3 Pipetten

- Eppendorf research 0,5–10 µl, 5–100 µl und 50–1000 µl, Eppendorf AG, Hamburg

2.1.1.4 Pinzetten

- Dumont # 5, World Precision Instruments Inc., Sarasota (USA)

2.1.1.5 Blutbildbestimmung

- Cell-Dyn 3500, Abbott GmbH, Ludwigshafen

2.1.1.6 LötKolben

- WS 80, Weller GmbH, Besigheim

2.1.1.7 Mischschüttler

- Relax top, Heidolph GmbH, Kelheim

2.1.1.8 pH-Meter

- pH 111, Hanna Instruments GmbH, Kehl am Rhein

2.1.1.9 Wärmeschrank

- Galaxy S, RS Biotech Laboratory Equipment Ltd., Ayrshire (UK)

2.1.1.10 Wasserbad

- Inkubations- und Inaktivierungsbad,
GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

2.1.1.11 Zentrifugation

- Rotina 46 R, Hettich GmbH, Tuttlingen
- ID–Centrifuge 24 S, DiaMed AG, Cressier / Schweiz
- Waschzentrifuge, Dade Serocent, Baxter, Unterschleißheim

2.1.2 Chemikalien

2.1.2.1 Aceton

- HPLC grade, 99,9 %, Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Steinheim

2.1.2.2 Aqua bidest.

- 18,2 Mega–Ohm x cm Leitfähigkeit, stationäre Laborversorgung

2.1.2.3 Diethyläther

- Diethyläther zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt

2.1.2.4 EDTA–TRIS–Lösung

- Aqua bidest, stationäre Laborversorgung
- Ethylendinitrioltetraessigsäure (EDTA) 99,0 %, Merck KGaA, Darmstadt
- Natriumchlorid (NaCl) 99,5%, Merck KGaA, Darmstadt
- Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) 99,8 %, Merck KGaA, Darmstadt
- Tween, Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
- Standard pH bei 8,5

2.1.2.5 Glycin

- Glycin zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt

2.1.2.6 HCl

- 1 molare Chlorwasserstofflösung, Merck KGaA, Darmstadt

2.1.2.7 Low Ionic Strength Solution (LISS)

- ID Diluent 2, DiaMed AG, Cressier (Schweiz)

2.1.2.8 NaOH

- Natriumhydrogencarbonat, rein, in Aqua bidest., 0,1 molar, Plättchen, Merck KGaA, Darmstadt

2.1.2.9 N₂–Gas

- Stickstoff (N₂), 4.0, stationäre Laborversorgung

2.1.2.10 Natriumchloridlösung

- Natriumchloridlösung 0,9 %, pH 5,0 bis 7,0, Fresenius AG, Bad Homburg

2.1.2.11 Natriumhypochlorit

- NaOCl, 4 %, wässrige Lösung, Sigma–Aldrich GmbH, Steinheim

2.1.2.12 PBS-Lösung

- phosphatgepufferte saline Lösung, pH 7,4, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.2.13 Piranha

- Schwefelsäure (H₂SO₄) 98 %, Merck KGaA, Darmstadt
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %, Merck GmbH, Darmstadt

2.1.3 Proteine

2.1.3.1 Albumin

- bovines Albumin (BSA), 22%, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim

2.1.3.2 Protein A

- lyophilisiert, salzfrei, in Aqua bidest., Konzentration: 2 mg / ml,
ICN Biomedicals GmbH, Eschwege

2.1.4 Immunglobuline

2.1.4.1 Immunglobulin-Antikörper

- Anti-IgG, monoklonal, IgG / Kaninchen, spezifische Affinität zum Fc-Fragment, 2,4 mg / ml, Titer 1 : 1024,
Jackson Immuno Research Lab. und Dianova Immundiagnostik GmbH, Hamburg
- Anti-IgM, monoklonal, IgG / Kaninchen, spezifische Affinität zum Fc-Fragment, 1,8 mg / ml, Titer 1 : 1024,
Jackson Immuno Research Lab. und Dianova Immundiagnostik GmbH, Hamburg
- Anti-Human-Globulin Solidscreen II, Biotest AG, Dreieich

2.1.4.2 Anti-A

- Anti-A BS 66, monoklonal, IgG / Maus, 3,3 mg / ml, Titer 1 : 256,
Biotest AG, Dreieich

- ImmuClone Anti-A Birma I, monoklonal, IgM / Maus, 1,2 mg / ml, Titer 1: 256

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Rödermark

2.1.4.3 Anti-B

- ImmuClone Anti-B LB 2, monoklonal, IgM / Maus, 1,4 mg / ml, Titer 1: 256

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Rödermark

2.1.5 Blut und Plasma

2.1.5.1 ungewaschene mit EDTA versetzte Probe

- EDTA versetzte Vollblutsuspension (kein Verdünnungseffekt), verdünnt mit EDTA-TRIS-Lösung im Verhältnis 1 : 10 (Konzentration ca. 500 000 / μ l), Blutgruppen: A, B und 0, jeweils rh neg, gelagert im Pilotröhrchen

unten als „unbehandeltes Vollblut“ bezeichnet

aus anonymisierten Blutspenden des ZKT Tübingen

2.1.5.2 gewaschene und mit EDTA versetzte Probe

- EDTA versetzte Vollblutsuspension (kein Verdünnungseffekt), dreimal gewaschen mit EDTA-TRIS-Lösung, verdünnt mit EDTA-TRIS-Lösung im Verhältnis 1 : 10 (Konzentration ca. 500 000 / μ l), Blutgruppen: A, B und 0, jeweils rh neg, gelagert im Pilotröhrchen

unten als „gewaschene Erythrozytensuspension“ bezeichnet

aus anonymisierten Blutspenden des ZKT Tübingen

2.1.5.3 Humanes Plasma

- unbehandeltes, unverdünntes Pool-Plasma (aus acht mit EDTA versetzten Vollblutproben) der jeweils benötigten Blutgruppe, zentrifugiert, gelagert im Pilotröhrchen

aus anonymisierten Blutspenden des ZKT Tübingen

2.1.6 ID–Micro Typing System

2.1.6.1 Chemikalien

- Diluent–Lösung 1 und 2, DiaMed AG, Cressier (Schweiz)

2.1.6.2 Karten

- Blutgruppenbestimmung: DiaClon ABD–Bestätigung, DiaMed AG, Cressier (Schweiz)
- direkter Coombstest: Liss / Coombs, DiaMed AG, Cressier (Schweiz)

2.1.7 QCM–Sensor

2.1.7.1 Quarz

- polierte Quarzscheibe, AT–Schnitt, Durchmesser 8,5 mm, Goldelektrode über ganze Scheibe, Frequenz 10 MHz,

Konstruktion: Dipl.-Phys. Dr. Frank Gehring, Tübingen,
Herstellung: Vectron International KVG, Neckarbischofsheim

2.1.7.2 Quarzhalterung

- Haltering aus Teflon, Innendurchmesser: 9 mm, Außendurchmesser: 16 mm
Konstruktion und Herstellung: Dipl.-Phys. Dr. Frank Gehring, Tübingen
- selbstklebende Kunststoffolie aus Polypropylen, Innendurchmesser: 6 mm, Außendurchmesser: 13 mm
Konstruktion und Herstellung: Dipl.-Phys. Dr. Frank Gehring, Tübingen

2.1.8 Dummy–Messanlage

2.1.8.1 Flusszelle

- Kunststoffummantelung mit Dichtring, Volumen: 14 µl
Konstruktion und Herstellung: Dipl.-Phys. Dr. Frank Gehring, Tübingen

2.1.8.2 Flussleitungen

- aus Teflon, Durchmesser 1 mm, 1/16“, Volumen 16 µl, Ismatec, Wertheim

2.1.8.3 Peristaltikpumpe

- Reglo–Digital MS–4/8–100, Pumpenschläuche TYGON, Ismatec, Wertheim

2.1.9 Messung und Auswertung

2.1.9.1 Mikroskop

- Auflichtmikroskop Axiostar 2 MAT, mit 50-, 100- und 500-facher Vergrößerung, Aufsatz für Digitalkamera

Carl Zeiss AG, Jena

2.1.9.2 Digitalkamera

- Casio QV 5700, 5.0 Mega–Pixel, vierfach optischer und dreifach digitaler Zoom,

Casio Europe GmbH, Hamburg

2.1.9.3 Auswertungssoftware

- Microsoft Office Picture Manager 2003,
Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
- Micrografx Designer 9, Corel Corporation, Unterschleißheim

2.2 Methodik

2.2.1 Lösungen

2.2.1.1 Piranha

Die Lösung kann nicht gebrauchsfertig bezogen werden. Die Herstellung von „Piranha“-Lösung erfolgte durch drei Teile Schwefelsäure H_2SO_4 , 98 % und einen Teil Wasserstoffperoxid H_2O_2 , 30 %. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur, die Haltbarkeit betrug ca. 24 Stunden.

2.2.1.2 EDTA–TRIS–Lösung

Die Lösung kann nicht gebrauchsfertig bezogen werden. Die Grundlage des Puffers sind 1000 ml Aqua bidest., darin wurden zur Lösung gebracht: 1 g Trishydroxymethylaminomethan (TRIS), 9 g Natriumchlorid (NaCl), 1 g Ethylendinitroltetraessigsäure (EDTA) und 0,1 ml Tween 20. Der optimale pH–Wert lag bei 8 bis 8,5. Die fertige Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Die Haltbarkeit betrug ca. eine Woche. Die Herstellung von EDTA–TRIS–Lösung für die Versuchsreihe mit unterschiedlichen pH Werten wurde durch Titrierung mit EDTA und TRIS erreicht. Es wurden Lösungen mit pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 und 9,5 hergestellt.

2.2.1.3 PBS–Puffer

Das kommerziell erworbene PBS–Konzentrat wurde im Verhältnis 1 : 10 mit Aqua bidest. verdünnt. Es entstand die fertige phosphatgepufferte saline Lösung mit einem pH Wert von 7,4. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Die Haltbarkeit betrug ca. eine Woche.

2.2.1.4 Natriumhydrogencarbonat

Die fertigen NaOH–Plättchen wurden in Aqua bidest. gelöst, so dass eine NaOH–Lösung mit einer 0,1 molaren Konzentration entstand. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Die Haltbarkeit betrug ca. einen Monat.

2.2.2 Proteine und Enzyme

2.2.2.1 Protein A

Das lyophilisierte Pulver wurde mit Aqua bidest. in Lösung gebracht, so dass eine Konzentration 2 mg / ml entstand. Die Lagerung erfolgte bei 7 °C. Die Haltbarkeit betrug ca. einen Monat.

2.2.2.2 Verdünnungsreihe einer Protein A Lösung

Die gebrauchsfertige Protein A Lösung wurde der Kühleinheit entnommen und 250 µl davon in ein Kunststoffreagenzröhrchen abpipettiert. Dieses wurde mit 250 µl Aqua

bidest. versetzt, um ein Verhältnis 1 : 1 zu erreichen. Aus diesem wurden wieder 250 µl in ein Kunststoffreagenzröhrchen herauspipettiert und mit 250 µl Aqua bidest. verdünnt. Auf diese Weise wurde das Verhältnis 1 : 2 hergestellt. Dieser Vorgang konnte so oft wiederholt werden, bis die im Versuch erforderliche Verdünnung erreicht wurde.

2.2.3 Antikörper- und Plasmalösungen

2.2.3.1 Plasma aus Pool

Acht Pilotröhrchen mit EDTA versetztem Vollblut wurden der Kühleinheit entnommen. Anhand der Spendernummer wurde festgestellt, dass es sich nicht um den gleichen Spender handelte. Die Pilotröhrchen wurden bei 2220 U / min. für 10 Minuten zentrifugiert, 500 µl eines jeden Überstandes wurden in ein Kunststoffreagenzröhrchen abpipettiert. Es entstand ein Plasmapool aus acht verschiedenen Spenden. Im Anschluss wurde der Titer bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von 7 °C. Die Haltbarkeit betrug ca. eine Woche. Es erfolgte eine detaillierte Dokumentation der Blutgruppe, aber keine Dokumentation von Identifikationsnummern.

2.2.3.2 Verdünnungsreihe mit einer Antikörperlösung

Es wurden Pilotröhrchen mit EDTA versetztem Vollblut der gewünschten Blutgruppe der Kühleinheit entnommen und diese bei 2200 U / min für 3 Minuten zentrifugiert, so dass sich alle festen Bestandteile im unteren Teil des Röhrchens befanden. Im Anschluss wurden 500 µl des Überstandes (Plasma) abpipettiert und in ein Kunststoffreagenzröhrchen gefüllt. Dieses wurde mit 500 µl NaCl-Lösung versetzt. Damit wurde das 1 : 1 Verhältnis erreicht. Aus diesem wurden wieder 500 µl in ein Kunststoffreagenzröhrchen herauspipettiert und mit 500 µl NaCl-Lösung verdünnt, so dass das gewünschte Verhältnis von 1 : 2 entstand. Dieser Vorgang konnte so oft wiederholt werden, bis die im Versuch erforderliche Verdünnung erreicht wurde.

2.2.3.3 Titerbestimmung bei Antikörperlösungen

Es wurden Vollblutproben und gewaschene Erythrozytensuspensionen, die mit EDTA-TRIS-Lösung versetzt wurden und in einer Konzentration von ca. 500 000

Zellen / μl vorlagen, verwendet. Die zu untersuchende Antikörperlösung wurde nach der oben beschriebenen Methode bis zu einem Verhältnis von 1 : 1024 verdünnt. Im Anschluss wurden jeweils 500 μl Blut und 500 μl der Antikörperlösung zusammengemischt und die Agglutination makroskopisch und unter dem Auflichtmikroskop untersucht. Konnte keine Agglutination gesehen werden, wurde zur Kontrolle ein direkter Coombstest im Röhrchen durchgeführt, welcher unten beschrieben ist.

2.2.4 Blut

2.2.4.1 Unbehandeltes Vollblut

Die Pilotröhrchen mit EDTA versetztem Vollblut von anonymisierten Blutspendern der gewünschten Gruppe, wurden der Kühleinheit entnommen und die festen Blutbestandteile wieder mit dem Plasma vermischt. Davon wurde 1 ml in ein Kunststoffreagenzröhrchen abpipettiert und mit 10 ml EDTA-TRIS-Lösung im Verhältnis 1:10 verdünnt. Anschließend erfolgte die Messung der Erythrozytenkonzentration im Cell-Dyn-Blutbildanalysator (Abb. 2-1). Die gewünschte Konzentration an roten Blutkörperchen lag bei ca. 500 000 Zellen / μl . Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von ca. 7 °C. Die Haltbarkeit betrug ca. eine Woche. Es erfolgte eine detaillierte Dokumentation der Blutgruppe und der Konzentration, aber keine Dokumentation von Identifikationsnummern.

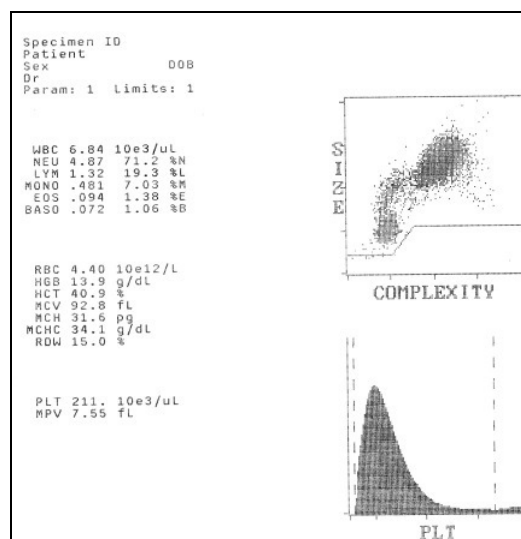


Abbildung 2-1
„großes Blutbild“ mit Cell-Dyn-Blutbildanalysator

2.2.4.2 Unbehandelte und gewaschene Erythrozytensuspension

Die Pilotröhrchen mit EDTA versetztem Vollblut von anonymisierten Blutspendern der gewünschten Blutgruppe wurden der Kühleinheit entnommen, und die festen Blutbestandteile wieder mit dem Plasma vermischt. Davon wurde 1 ml in ein Kunststoffreagenzröhrchen abpipettiert und mit 10 ml EDTA-TRIS-Lösung im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 2220 U / min für zehn Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und das Röhrchen mit 10 ml EDTA-TRIS-Lösung befüllt. Dieser Vorgang wiederholte sich zweimal. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die festen Bestandteile wieder mit 10 ml EDTA-TRIS-Lösung vermischt. Die Messung der Erythrozytenkonzentration erfolgte im Cell-Dyn-Blutbildanalysator. Die gewünschte Konzentration der roten Blutkörperchen lag bei ca. 500 000 Zellen / μl . Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von 7 °C. Die Haltbarkeit betrug ca. eine Woche. Es erfolgte eine detaillierte Dokumentation der Blutgruppe und der Konzentration, aber keine Dokumentation von Identifikationsnummern.

2.2.4.3 Konzentrationsvariationen mit Vollblut bzw. gewaschenen Erythrozyten

Für die Herstellung der konzentrierten Probe wurde das Pilotröhrchen mit unbehandeltem EDTA versetztem Vollblut, bzw. der gewaschenen Erythrozytensuspension, der Kühleinheit entnommen und in der Zentrifuge bei 2220 U / min für zehn Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde 1 ml des Absatzes abpipettiert und in ein Kunststoffreagenzröhrchen gefüllt. Die Messung der Erythrozytenkonzentration erfolgte im Cell-Dyn-Blutbildanalysator. Es wurden Konzentrationen von ca. 1×10^7 Zellen / μl erreicht.

Für die Herstellung der nicht verdünnten Vollblutprobe wurde das Pilotröhrchen der Kühleinheit entnommen und die festen Blutbestandteile wurden wieder mit dem Plasma, bzw. der EDTA-TRIS-Lösung, vermischt. Davon wurde 1 ml in ein Kunststoffreagenzröhrchen abpipettiert. Es erfolgte keine Verdünnung mit EDTA-TRIS-Lösung. Die Messung der Erythrozytenkonzentration erfolgte im Cell-Dyn-Blutbildanalysator. Es wurden Konzentrationen von ca. 5×10^6 Zellen / μl erreicht.

Die Herstellung der Verdünnungsreihe erfolgte nach folgendem Schema: Das Pilotröhrchen wurde der Kühleinheit entnommen und die festen Blutbestandteile

wieder mit dem Plasma, bzw. mit EDTA–TRIS–Lösung vermischt. Davon wurden 1 ml in ein Kunststoffreagenzröhrchen abpipettiert und im Verhältnis 1 : 10 mit EDTA–TRIS–Lösung gemischt. Aus dieser Mischung wurde wieder 1 ml entnommen und in ein Kunststoffreagenzröhrchen abpipettiert und im Verhältnis 1 : 10 mit EDTA–TRIS–Lösung vermischt. Es entstand die Verdünnung 1 : 100. Dieser Vorgang wiederholte sich bis zur Verdünnung 1 : 100 000. Für jede Verdünnung wurde eine Messung der Erythrozytenkonzentration im Cell–Dyn–Blutbildanalysator durchgeführt. Es entstanden Konzentrationen von ca. 500 000 bis ca. 500 Zellen / μl . Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von 7 °C. Die Haltbarkeit betrug ca. eine Woche. Es erfolgte eine detaillierte Dokumentation der Blutgruppe und der Konzentration aber keine Dokumentation von Identifikationsnummern.

2.2.4.4 Inkubationen von Erythrozyten mit Antikörpern

Die Pilotröhrchen von anonymisierten Blutspendern der gewünschten Gruppe wurden der Kühleinheit entnommen und die festen Blutbestandteile wieder mit dem Plasma vermischt. Davon wurde 1 ml in ein Kunststoffreagenzröhrchen abpipettiert und dieses dann mit 10 ml EDTA–TRIS–Lösung befüllt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 2220 U / min für fünf Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und das Röhrchen wieder mit 10 ml EDTA–TRIS–Lösung befüllt. Dieser Vorgang wiederholte sich zweimal. Im Anschluss wurde mit dem Cell–Dyn Blutbildanalysator die Konzentration der Probe gemessen. Es wurden Konzentrationen von ca. 500 000 Zellen / μl gemessen. Es wurde 1 ml der Antikörperlösung, bzw. der verdünnten Antikörperlösung in ein Kunststoffreagenzröhrchen pipettiert und 500 μl ml der gewaschenen Erythrozyten hinzugefügt. Das Röhrchen wurde ab einer Verdünnung der Antikörperlösung von 1 : 16 vorsichtig durchmischt. Geringere Verdünnungen der Antikörperlösung wurden nicht durchmischt.

Das Röhrchen wurde bei Temperaturen von 3 °C bei Inkubation mit IgM–Antikörpern wie Anti–A Birma I und bei Plasma der Blutgruppe B, bzw. bei 37 °C bei Inkubation mit Antikörpern der Gruppe IgG und Plasma der Blutgruppe 0, für 90 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Analyt bei 2220 U / min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Röhrchen wieder mit 10 ml EDTA–TRIS–Lösung befüllt. Dieser Vorgang wiederholte sich zweimal. Nach dem letzten Abpipettieren des Überstandes wurde die Suspension mit 10 ml EDTA–TRIS–

Lösung vermischt, so dass die optimale Erythrozytenkonzentration von ca. 500 000 / μl Verhältnis 1 : 10 entstand. Zur Kontrolle der erfolgreichen Belegung wurde die Agglutination beobachtet bzw. bei nicht vorhandener Agglutination ein direkter Coombstest im Röhrchen durchgeführt. Ebenfalls wurden die Konzentration und das MCV der belegten Erythrozyten im Cell-Dyn gemessen. Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von 7 °C. Die Haltbarkeit betrug ca. zwei Tage. Es erfolgte eine detaillierte Dokumentation der Blutgruppe und der Konzentration aber keine Dokumentation von Identifikationsnummern. Vor Verwendung des Analyts musste das Röhrchen aufgeschüttelt werden.

2.2.4.5 Antikörpersuchtest im Röhrchen

Es wurden 1 ml einer 5% NaCl-Lösung mit 100 μl der Erythrozytensuspension vermischt und anschließend dreimal in der Waschzentrifuge gewaschen. Im Anschluss wurden 100 μl einer Anti-Human-Globulin-Lösung dazugegeben. Das Ganze wurde vermischt und zentrifugiert. Das Ergebnis wurde über einer Lichtquelle, bzw. unter einem Auflichtmikroskop ermittelt. Eine erfolgreiche Belegung ließ sich an der Agglutination ablesen.

2.2.5 Blutgruppenbestimmung mit dem DiaMed-System

2.2.5.1 Bestimmungen von A, B und 0

Zur Bestimmung der AB0 Blutgruppen wurde eine monoklonale Karte verwendet. Es wurden jeweils 25 μl zu testendes Blut mit 500 μl Diluent 2 Lösung (LISS-Lösung) vermischt. Im Anschluss wurden jeweils 10 μl der fertigen Suspension in die Säulen mit den korrespondierenden Antikörpern pipettiert und die Karte in der DiaMed-Zentrifuge zentrifugiert. Danach konnte das Ergebnis an der Säule abgelesen werden. Waren die Erythrozyten auf den Säulenboden gewandert und war die Begrenzung zur Gelsäule glatt, so war das Ergebnis negativ. Zogen sich die roten Blutkörperchen in der Säule hoch, so war das Ergebnis schwach positiv. Blieben die Erythrozyten auf der Gelsäule haften, so handelte es sich um eine stark positive Reaktion (*Abb. 2-2*).

2.2.5.2 Direkter Coombstest

Es wurde untersucht, ob Antikörper an den Erythrozyten gebunden hatten. Dazu wurde eine DiaMed-Karte LISS/Coombs verwendet. In ein Röhrchen wurden 1 ml Diluent 2 Lösung (LISS-Lösung) pipettiert und 10 µl Blut hinzugegeben. Im Anschluss wurden 10 µl der fertigen Lösung in die Säulen der DiaMed-Karte pipettiert und die Karte in der DiaMed-Zentrifuge zentrifugiert. Danach konnte das Ergebnis an der Säule abgelesen werden. Waren die Erythrozyten auf den Säulenboden gewandert und war die Begrenzung zur Gelsäule glatt, so war das Ergebnis negativ. Zogen sich die roten Blutkörperchen in der Säule hoch, so war das Ergebnis schwach positiv. Blieben die Erythrozyten auf der Gelsäule haften, so handelte es sich um eine stark positive Reaktion (Abb. 2-2).

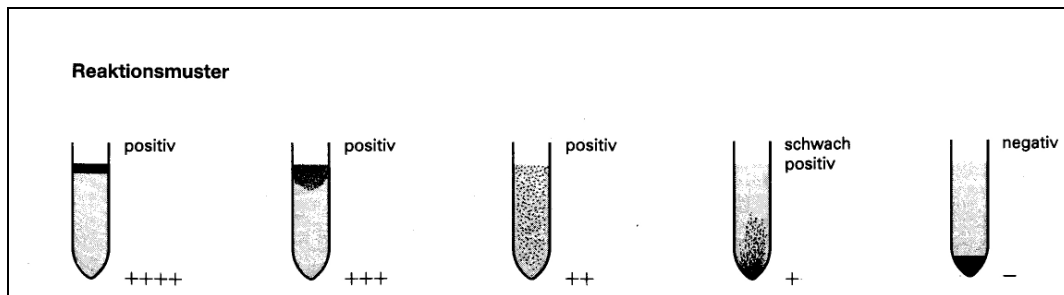


Abbildung 2-2

Auswertung der DiaMed-Karte

++++ => Erythrozyten bleiben vollständig auf der Säule

+++ => Erythrozyten bleiben auf der Säule, Schlieren in der Säule

++ => Erythrozyten in der Säule

+ => Erythrozyten auf Säulenboden mit Schlieren in der Säule

- => Erythrozyten komplett auf dem Säulenboden

2.2.6 Quarzgrundpräparation

2.2.6.1 Reinigung und Neuaufbereitung

Vor der Beschichtung wurde der Quarz für 30 Sekunden in ein Acetonbad eingetaucht, vorsichtig mit Aqua bidest. abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Danach wurde der Quarz für eine Minute in das Piranhabad getaucht, vorsichtig mit Aqua bidest. abgespült und mit Stickstoff getrocknet.

2.2.6.2 Präparation

Der Quarz wurde mit der Goldoberfläche nach oben auf eine Kunststoffunterlage, die einen kleineren Durchmesser als der Quarz hat, befestigt, so dass der Rand des Quarzes die Unterlage nicht berührte. Die ringförmige Klebefolie, die einen größeren Durchmesser als der Quarz hatte, wurde von oben symmetrisch auf den äußeren Rand des Quarzes geklebt und anschließend durch Erhitzen mittels eines Lötkolbens auf 170 °C wasserdicht fixiert. Im nächsten Schritt wurde der Quarz symmetrisch mit Klebefolie auf den im Durchmesser größeren Teflonring aufgebracht. Im Anschluss wurde die Klebefolie auf dem Teflonring mittels Lötkolben auf 170 °C erhitzt und wasserdicht fixiert.

2.2.7 Beschichtungen

2.2.7.1 Protein A

Der präparierte Quarz wurde auf einer Kunststoffunterlage fixiert. Die Protein A – Lösung wurde der Kühleinheit entnommen und 40 µl abpipettiert. Es wurde abgewartet, bis sich die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt hatte. Von der Lösung wurden 40 µl auf die Goldoberfläche des Quarzes pipettiert, so dass dessen Oberfläche vollständig mit einer ca. 0,5 mm dicken Schicht überzogen war. Die Lagerung des Quarzes erfolgte bei Raumtemperatur, die Immobilisationszeit betrug eine Stunde. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Protein A–Lösung nicht antrocknete. Anschließend wurde der Quarz vorsichtig mit Aqua bidest. abgespült und mit Stickstoff getrocknet.

2.2.7.2 Blutgruppenantikörper direkt auf Protein A

Der mit Protein A belegte Quarz wurde auf einer Kunststoffunterlage fixiert. Die Antikörperlösung wurde der Kühleinheit entnommen und 40 µl abpipettiert. Es wurde abgewartet bis sich die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt hatte. Dann wurde die Lösung auf die immobilisierte Protein A–Schicht des Quarzes pipettiert, so dass dessen Oberfläche vollständig mit einer ca. 0,5 mm dicken Schicht überzogen war. Die Lagerung des Quarzes erfolgte bei Raumtemperatur, die Immobilisationszeit betrug 60 Minuten. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Antikörperlösung

nicht antrocknete. Anschließend wurde der Quarz vorsichtig mit Aqua bidest. abgespült und mit Stickstoff getrocknet.

2.2.7.3 Anti-Ig-Antikörper auf Protein A

Der mit Protein A belegte Quarz wurde auf einer Kunststoffunterlage fixiert. Die Antikörperlösung wurde der Kühleinheit entnommen und 40 µl abpipettiert. Es wurde abgewartet bis sich die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt hatte. Dann wurden die 40 µl Anti-Ig-IgG bzw. -IgM auf die immobilisierte Protein A-Schicht pipettiert, so dass die Oberfläche vollständig mit einer ca. 0,5 mm dicken Schicht überzogen war. Die Lagerung des Quarzes erfolgte bei Raumtemperatur, die Immobilisationszeit betrug 60 Minuten. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Antikörperlösung nicht antrocknete. Anschließend wurde der Quarz vorsichtig mit Aqua bidest. abgespült und mit Stickstoff getrocknet.

2.2.7.4 Blutgruppenantikörper auf Sandwichmittelschicht

Der mit Protein A und Anti-Ig-IgG bzw. -IgM belegte Quarz wurde auf einer Kunststoffunterlage fixiert. Die Antikörperlösung wurde der Kühleinheit entnommen und 40 µl abpipettiert. Es wurde abgewartet bis sich die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt hatte. Die Lösung wurde auf die immobilisierte Anti-Ig-Immunglobulin Beschichtung des Quarzes pipettiert, so dass dessen Oberfläche vollständig mit einer ca. 0,5 mm dicken Schicht überzogen war. Die Lagerung des Quarzes erfolgte bei Raumtemperatur, die Immobilisationszeit betrug 60 Minuten. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Antikörperlösung nicht antrocknete. Anschließend wurde der Quarz vorsichtig mit Aqua bidest. abgespült und mit Stickstoff getrocknet.

2.2.7.5 Sättigung der freien Protein A-Stellen

Die noch freien Bindungsstellen des Protein A wurden nach vollständiger Antikörperbeschichtung mit humanem AB-Serum gesättigt. Die Sättigungslösung wurde der Kühleinheit entnommen und 50 µl abpipettiert. Es wurde abgewartet bis sich die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt hatte. Die Lösung wurde auf die vollständig immobilisierten Schichten des Quarzes pipettiert, so dass dessen Oberfläche vollständig mit einer ca. 0,5 mm dicken Schicht überzogen war. Die Lagerung des Quarzes erfolgte bei Raumtemperatur, die Immobilisationszeit betrug

10 Minuten. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Plasmalösung nicht antrocknete. Anschließend wurde der Quarz vorsichtig mit Aqua bidest. abgespült und in die Messzelle des Dummys eingebaut. Bei der Detektion von mit Antikörpern beladenen Erythrozyten auf einer Protein A Schicht, entfiel dieser Schritt.

2.2.7.6 Beschichtung im Dummy–System

Der präparierte Quarz wurde in die angepasste Halterung des Dummys eingelegt und das Gehäuse mit den Dichtringen auf die Halterung geschraubt. In das Analytreservoir des zuführenden Schenkels wurden 250 µl Protein A–Lösung gefüllt, die auf Raumtemperatur erwärmt wurden. Die Pumpe wurde auf einen Fluss von 0,16 ml / min eingestellt und gestartet. Hatten 50 % der Beschichtungslösung die Messzelle erreicht, wurde der Fluss gestoppt und die Immobilisationszeit von 60 Minuten abgewartet, bzw. je nach Versuch eine andere oder keine immobilisationszeit abgewartet. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Protein A–Lösung nicht eintrocknete. Im Anschluss wurde der zuführende Schenkel auf Aqua bidest. umgeschaltet und die Zelle mit 1 ml, bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,16 ml / min, gespült. Nach der Spülung wurde das System leer gepumpt.

Die zweite Schicht bildete der Antikörper, von dessen auf Raumtemperatur erwärmte Lösung, 250 µl in das Analytreservoir pipettiert wurden. Der Zufluss wurde auf die Antikörperlösung umgeschaltet und die Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 0,16 ml / min gestartet. Hatten 50 % der Beschichtungslösung die Messzelle erreicht, wurde der Fluss gestoppt und die Immobilisationszeit von 60 Minuten abgewartet. Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Antikörper–Lösung nicht eintrocknete. Im Anschluss wurde der zuführende Schenkel auf Aqua bidest. umgeschaltet und die Zelle mit 1 ml, bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,16 ml / min, gespült. Nach der Spülung wurde das System leer gepumpt.

Die noch freien Bindungsstellen des Protein A wurden mit humanem AB–Plasma gesättigt. Dazu wurden 250 µl AB–Plasma in ein Analytreservoir pipettiert und der zuführende Schenkel darauf umgeschaltet. Die Pumpe wurde mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,16 ml / min gestartet. Hatte die Sättigungslösung die Zelle gefüllt, wurde die Pumpe gestoppt und die Immobilisationszeit von 10 Minuten abgewartet. Im Anschluss wurde der zuführende Schenkel auf Aqua bidest.

umgeschaltet und die Zelle mit 1 ml, bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,16 ml / min, gespült. Nach der Spülung wurde das System leer gepumpt. Im Anschluss wurde die Zelle mit EDTA–TRIS–Lösung befüllt. Dafür wurde EDTA–TRIS–Lösung im konstanten Fluss von 0,16 ml / min durch die Messzelle gepumpt.

2.2.8 Quarzeinbau

Der beschichtete Quarz wurde in die angepasste Halterung des Dummys eingelegt und anschließend das Gehäuse mit den Dichtringen auf die Halterung geschraubt, so dass eine wasserdichte Messzelle entstand. Das System wurde nun mit EDTA–TRIS–Lösung entlüftet, in dem der zuführende Schenkel auf ein mit Puffer gefülltes Analysatreservoir geschaltet und die Rollenpumpe auf eine Fließgeschwindigkeit von 0,64 ml / min eingestellt wurde. Es wurde so lange entlüftet, bis sich die Zelle ganz mit Pufferlösung gefüllt hatte und keine Luftblasen mehr durch das Kontrollfenster zu erkennen waren. Nach der Entlüftung des Systems wurde die Pumpengeschwindigkeit auf 0,16 ml / min reduziert und das System für mindestens drei Minuten gespült.

2.2.9 Messung im Dummy

Die Messung erfolgte unter Standardbedingungen bei 22 °C und auf einer vibrationsgedämpften Unterlage. Nach dem Quarzeinbau und der Entlüftung wurde die Rollenpumpe angehalten und der zuführende Schenkel auf das zu analysierende Blut umgestellt. Anschließend wurde die Rollenpumpe mit gleicher Geschwindigkeit 0,13 ml / min angeschaltet und das Analyt mit einem Volumen von 250 µl aufgezogen. Hatte das Analyt die Messzelle erreicht, wurde der Fluss gestoppt und eine Immobilisationszeit von 120 Sekunden abgewartet. Nach dieser Zeit wurde der zuführende Schenkel wieder auf EDTA–TRIS–Lösung umgeschaltet. Die Pumpe wurde wieder mit einer Geschwindigkeit von 0,16 ml / min angefahren. Nach 120 Sekunden wurde die Geschwindigkeit auf 0,64 ml / min erhöht. Der Pufferfluss blieb so lange erhalten, bis im Sichtfenster der Messzelle keine freien Erythrozyten mehr sichtbar waren. Der Quarz wurde ausgebaut und die Messzelle mit Aqua bidest. sorgfältig gereinigt.

Druckpulse

Die Messung wurde nach den gleichen Methoden wie oben durchgeführt. Jedoch wurde der Fluss des Analyts nach jeder Sekunde Fluss für eine Sekunde unterbrochen und dann erneut gestartet. Dieser Vorgang wurde so lange durchgeführt, bis die Blutprobe vollständig durchgeflossen war. Im Anschluss wurde der zuführende Schenkel auf EDTA–TRIS–Lösung umgestellt und die Zelle mit einer Geschwindigkeit von 0,16 ml / min gespült, bis sich keine freien Erythrozyten mehr auf dem Quarz befanden.

Zentrifugation des belegten Quarzes

Nach Erreichen der Messzelle durch das Analyt wurde der Quarz aus dem Dummy ausgebaut. Die Quarzoberfläche musste mit Analyt belegt sein und durfte nicht eintrocknen. Der Quarz wurde in die Zentrifugenhalterung eingebaut, so dass die mit Erythrozyten belegte Oberfläche nach oben zeigte. Im Anschluss wurde der Quarz bei 2200 U / min für 2, 5 und 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Quarz wieder in den Dummy eingebaut und der Messprozess fortgesetzt.

2.2.10 Mikroskopie und Dokumentation

2.2.10.1 Mikroskopie

Der ausgebaute, mit Puffer benetzte Quarz wurde auf die angepasste Mikroskopiehalterung gelegt und sofort unter dem Auflichtmikroskop bei 100 und 500facher Vergrößerung untersucht. Dabei wurde die gesamte Oberfläche bewertet. Im Anschluss wurde ein so genannter Mobilisationsversuch durchgeführt, bei dem nicht spezifisch auf der Quarzoberfläche gebundene Erythrozyten erkannt werden konnten. Dabei wurde der Quarz mit der Mikroskopiehalterung bewegt, wobei Strömungen der Pufferflüssigkeit zu sehen waren. Hierbei wurde auf die Beweglichkeit der Erythrozyten geachtet.

2.2.10.2 Dokumentation

Mit der an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera wurden bei 100 und bei 500facher Vergrößerung an Referenzstellen der Oberfläche Aufnahmen gemacht. Die Bilder wurden mit einem USB-Kabel auf den PC übertragen.

2.2.10.3 Dichtemessung

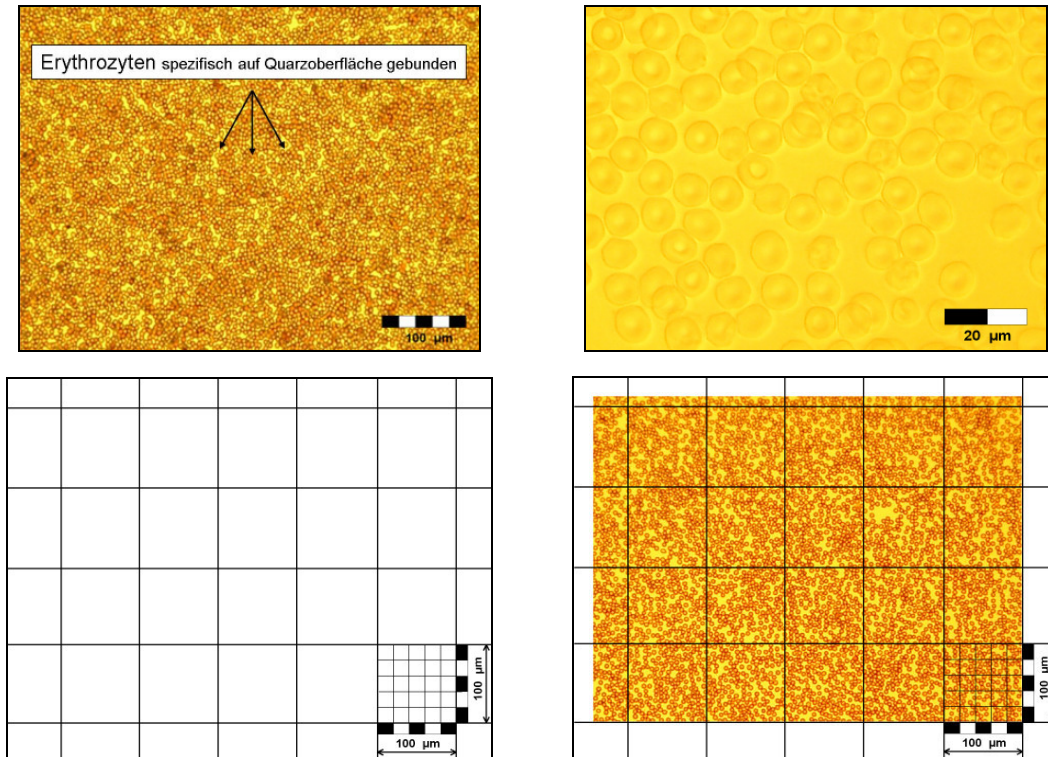
Auf der Oberfläche des gesamten Quarzes wurden vier repräsentative Stellen digital fotografiert. Diese Bilder wurden in jeweils 20 Quadranten eingeteilt. In jedem Quadranten wurden mit einem speziellen Raster im Bildbearbeitungsprogramm (*Abb. 2–3*) die Dichte der spezifisch gebundenen Erythrozyten auf der Quarzoberfläche bestimmt. Aus den Ergebnissen der Auszählungen wurde der Mittelwert gebildet und dieser in Zellen / mm² angegeben. Das Ergebnis wurde dokumentiert und zusammen mit der digitalen Abbildung gespeichert. Zeigten sich in den einzelnen Bildausschnitten Dichteunterschiede über 20 %, wurde die Messung wiederholt.

Die Ergebnisse der Versuche mit antikörperbeladenen Erythrozyten wurden nicht in Zellen / mm² angegeben (*Tab. 2–1*). Die Dichte der spezifisch gebundenen Agglutinate wurde qualitativ beschrieben:

| Angabe | relative Dichte |
|--------|---------------------------------|
| +++ | hohe Dichte an Agglutinaten |
| ++ | mittlere Dichte an Agglutinaten |
| + | geringe Dichte an Agglutinaten |
| ∅ | keine Agglutinate gebunden |

Tabelle 2–1

Auswertung der relativen Erythrozyten bzw. Agglutinatebindung auf der Quarzoberfläche

**Abbildung 2-3**

Auswertungssoftware

oben-links: digitale Abbildung, 100fache Vergrößerung **oben-rechts:** digitale Abbildung, 500fache Vergrößerung
unten-links: Raster zur Bestimmung der Erythrozytendichte **unten-rechts:** Raster über digitaler Abbildung

2.2.11 Regeneration

2.2.11.1 Chemische Regeneration

Im Anschluss an die Messung wurde der ausgebaute Quarz wieder in den Dummy eingebaut und mit EDTA-TRIS-Lösung im Fluss von 0,6 ml / min behandelt. Danach wurde die Zelle leer gepumpt. Im Anschluss wurden 100 µl der Regenerationslösung mit einer Geschwindigkeit von 0,6 ml / min über den Quarz gepumpt. Danach wurde die Zelle mit 250 µl Aqua bidest gespült und leer gepumpt.

2.2.11.2 Regeneration durch Elution

Ätherextraktion nach Rubin

Der mit roten Blutkörperchen belegte Quarz wurde aus dem Dummy ausgebaut und die Dichte der Belegung bestimmt. Im Anschluss wurde der Quarz in ein spezielles Reagenzröhrchen mit Quarzhalterung eingebaut. Die belegte Oberfläche des Quarzes zeigte nach unten. Das Röhrchen wurde mit 1 ml NaCl 0,9 % und mit 2 ml

Diethyläther befüllt und für 3 Minuten bei 2200 U / min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Quarz mit Aqua bidest. abgespült und unter dem Auflichtmikroskop untersucht.

Wärmeelution nach Landsteiner

Der mit Erythrozyten beladene Quarz wurde nach Ausbau und Dichtemessung in ein spezielles Reagenzröhrchen mit Quarzhalterung eingebaut. Die belegte Oberfläche des Quarzes zeigte nach unten. Dieses Röhrchen wurde mit NaCl 0,9 % befüllt und für 10 Minuten in ein Warmwasserbad bei 56 °C gestellt, in dem es kontinuierlich geschwenkt wurde. Nach dieser Zeit wurde das Röhrchen für 3 Minuten bei 2200 U / min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Quarz mit Aqua bidest. abgespült und unter dem Auflichtmikroskop untersucht.

2.2.11.3 Mechanische Regenerationen

Zentrifuge

Das Regenerationsröhrchen wurde mit EDTA–TRIS–Lösung gefüllt und der mit Erythrozyten belegte Quarz mit der belegten Seite nach unten in das Behältnis gelegt. Er wurde so fixiert, dass er leicht beweglich blieb, aber seine Position nicht verändern konnte. Das Regenerationsröhrchen wurde in der Zentrifuge bei einer Geschwindigkeit von 2200 U / min für 2 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Quarz wieder dem Regenerationsröhrchen entnommen und unter dem Mikroskop untersucht. Konnte keine Ablösung der Erythrozyten erkannt werden, so wurde der Vorgang wiederholt. Insgesamt wurden fünf Zyklen durchgeführt. Konnte bis dahin keine Ablösung beobachtet werden, wurde die Drehzahl auf 4400 U / min erhöht und der Vorgang wiederholte sich in der oben gezeigten Weise.

Mischschüttler

Das Regenerationsröhrchen wurde mit EDTA–TRIS–Lösung bis zur Markierung gefüllt und der mit Erythrozyten belegte Quarz mit der belegten Seite nach unten in das Behältnis eingelegt. Er wurde so fixiert, dass er leicht beweglich blieb aber seine Position nicht verändern konnte. Das Regenerationsröhrchen wurde auf dem Mischschüttler fixiert, so dass die Schwingungen direkt auf das Röhrchen und den Quarz übertragen wurden. Der Mischschüttler wurde auf kleine Stärke eingestellt und das Röhrchen für zwei Minuten den Schwingungen ausgesetzt. Alle 20 Sekunden

wurde der Vorgang unterbrochen und die EDTA–TRIS–Lösung ausgetauscht. Im Anschluss wurde der Quarz wieder dem Regenerationsröhrchen entnommen und makroskopisch sowie unter dem Auflichtmikroskop untersucht. Konnte keine Ablösung der Erythrozyten erkannt werden, so wurde der Vorgang wiederholt. Insgesamt wurden fünf Zyklen durchgeführt. Konnte bis dahin keine Ablösung beobachtet werden, wurde die Geschwindigkeit erhöht und der Vorgang wiederholte sich in der oben dargestellten Weise.

2.2.11.4 Wiederverwertbarkeitsversuch

Der Quarz wurde nach der Regeneration wieder ohne weitere Beschichtung zur Blutgruppendetektion der Gruppe A₁ bzw. A₂ (Konzentration von 500 000 Zellen / µl) herangezogen. Der Versuch verlief ebenfalls nach Standardmethoden und mit einer Kontrollprobe, mit Blut der Gruppe B. Trat bei dieser Messung kein positives Ergebnis auf, so wurde der Quarz erneut mit der obersten Antikörperschicht beschichtet, also entweder Anti–A BS 66 oder Anti–A Birma I. Anschließend erfolgte eine erneute Messung und Auswertung. Konnte wieder keine positive Detektion verzeichnet werden, so wurde der Quarz mit der nächst tieferen Schicht und der obersten Antikörperschicht beschichtet und erneut eine Detektion versucht. Dieser Vorgang wiederholte sich solange, bis die gesamte Schichtarchitektur erneut aufgebaut war oder eine positive Blutgruppendetektion stattgefunden hatte.

War die Messung erfolgreich bevor die gesamte Architektur erneut aufgebaut wurde, so wurden im Wechsel Regeneration und Messung so lange wiederholt, bis eine deutliche Abnahme der Erythrozytendichte bei der Messung zu erkennen war.

2.2.12 Recycling des Quarzes

Gebrauchte Quarze mit gebundenen Erythrozyten auf der Immunglobulinschicht wurden nach der Messung mit Aqua bidest. im harten Strahl abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Anschließend erfolgte die vollständige Entfernung von organischem Material von der Oberfläche durch eine Minute Aufenthalt im Piranhabad. Es folgte das vorsichtige Abspülen mit Aqua bidest. und die Trocknung mit Stickstoff.

2.2.13 Reinigung der Dummy-Systems

Die Reinigung des Dummy-Systems erfolgte mit Natriumhypochlorit 4 % in wässriger Lösung. Der zuführende Schenkel des Flusssystems wurde auf Aqua bidest. umgeschaltet und die Pumpe wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,6 ml / min gestartet. Nach 120 Sekunden wurde die Pumpe gestoppt und der zuführende Schenkel auf das Natriumhypochloritbehältnis, das mit ca. 1 ml gefüllt war, umgeschaltet. Dann wurde die Pumpe wieder mit gleicher Geschwindigkeit gestartet. War alles Natriumhypochlorit in das System eingesaugt, wurde die Pumpe wieder gestoppt und auf Aqua bidest. umgestellt. Die Pumpe wurde mit einer Arbeitsgeschwindigkeit von 0,6 ml / min wieder eingeschaltet. Um das Natriumhypochlorit vollständig zu entfernen, war ein Fluss mit Aqua bidest. für mindestens fünf Minuten erforderlich.

3 Ergebnisse

3.1 Blutgruppendetektion über einen IgG-Monolayer

3.1.1 Detektion der Blutgruppen A₁ und A₂

Die Bestimmung der Blutgruppen A₁ und A₂ wurde unter Standardbedingungen, wie im Abschnitt Methodik beschrieben, durchgeführt. Der Schwinquarz war nach Standardschema präpariert und mit Protein A und Anti-A BS 66, einem monoklonalen IgG₃ der Maus, beschichtet worden. Es wurden die Blutgruppe A₁ und A₂ bestimmt. Vor der eigentlichen Messung wurde eine Kontrollprobe mit Blut der Gruppe B durchgeführt. Es wurde unbehandeltes Vollblut, in Suspension mit EDTA-TRIS-Lösung im Verhältnis 1 : 10, Konzentration ca. 500 000 Zellen / µl verwendet.

| Versuch | Kontrollprobe B | Positivprobe A ₁ | Positivprobe A ₂ |
|--------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Zellen / mm ² | ∅ | 20 000 | 20 000 |

Tabelle 3-1

Messung Blutgruppe A₁ und A₂ über IgG-Monolayer unter Standardbedingungen

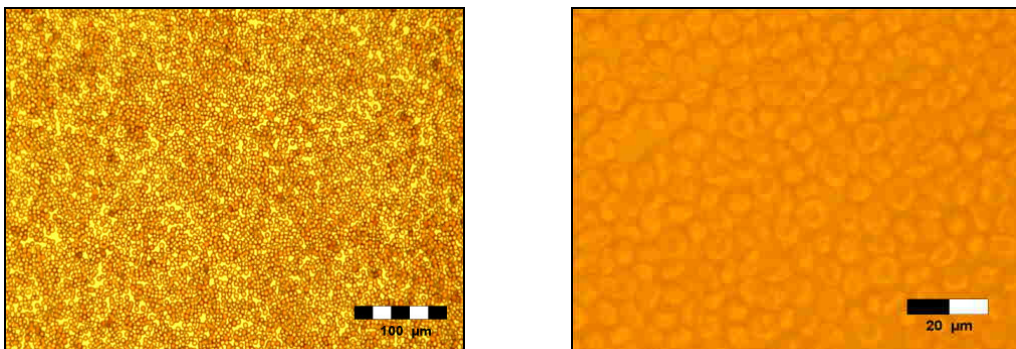
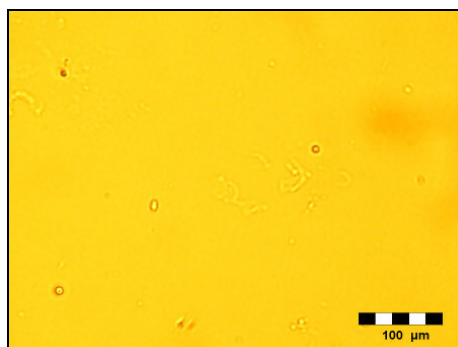


Abbildung 3-1

Detektion der Blutgruppe A₁ über einen IgG-Monolayer

oben-links: 100fache Vergrößerung **oben-rechts:** 500fache Vergrößerung

unten: Kontrollprobe mit Blut der Gruppe B, 100fache Vergrößerung



Die Auswertung (*Tab. 3–1* und *Abb. 3–1*) der Kontrollprobe zeigte keine Bindung von roten Blutkörperchen auf der Quarzoberfläche.

Die Messung der Blutgruppen A₁ und A₂ zeigten auf der Quarzoberfläche eine Erythrozytendichte von ca. 20 000 spezifisch gebundenen Zellen pro mm² (*Tab. 3–1* und *Abb. 3–1*)

3.1.2 Variation der Lösungs- und Trägermittel

3.1.2.1 Variationen bei Beschichtung des Quarzes

Die Beschichtung des Quarzes mit Protein A und Anti-A BS 66 wurde nach den im Abschnitt Methodik beschriebenen Standards durchgeführt. Die dort gezeigte Verwendung von Aqua bidest. wurde durch die jeweils genannten Lösungs- und Trägermittel ersetzt. Als Analyt diente unbehandeltes Vollblut der Gruppe A₁, das mit der EDTA–TRIS–Lösung bei pH 8,5 im Verhältnis 1 : 10 verdünnt wurde, so dass eine Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl entstand. Die Messung erfolgte nach Standardmethoden. Es wurde jeweils eine Kontrollprobe mit Blut der Gruppe B durchgeführt.

NaCl 0,9 %– und PBS– Lösung

Es wurde NaCl 0,9 % Lösung mit einem pH–Wert von 6,8 bzw. PBS Lösung mit einem pH–Wert von 7,4 für den Beschichtungsprozess verwendet.

Ergebnis

| Versuch | Negativprobe | Detektion |
|--------------|--------------|------------|
| Aqua bidest. | ∅ | ca. 20 000 |
| NaCl 0,9 % | ∅ | ca. 20 000 |
| PBS | ∅ | ca. 20 000 |

Tabelle 3–2

Messung Blutgruppe A₁ über IgG–Monolayer mit Lösungsmittelvariation bei der Beschichtung des Quarzes
Ergebnis in Zellen / mm²

Bei beiden salinen Lösungen kam es während des Beschichtungsprozesses, nach den Trockenvorgängen mit Stickstoff, zur Kristallbildung auf dem Quarz. Diese verschwand nach erneuter Benetzung mit NaCl 0,9 %– bzw. PBS–Lösung und im Spülvorgang mit EDTA–TRIS–Lösung in der Messzelle wieder.

Die Kontrollprobe zeigte bei beiden Beschichtungsvorgängen keine Bindung von Erythrozyten der Gruppe B auf der Quarzoberfläche.

Die Auswertung des Versuches mit Blut der Gruppe A₁ zeigte bei allen Versuchen eine Dichte von ca. 20 000 spezifisch gebundenen Zellen pro mm² (Tab. 3–2).

pH Wert Variationen mit EDTA–TRIS

In der folgenden Versuchsreihe wurde EDTA–TRIS–Lösung mit verschiedenen pH Werten als Lösungsmittel zur Quarzbeschichtung verwendet.

Ergebnis

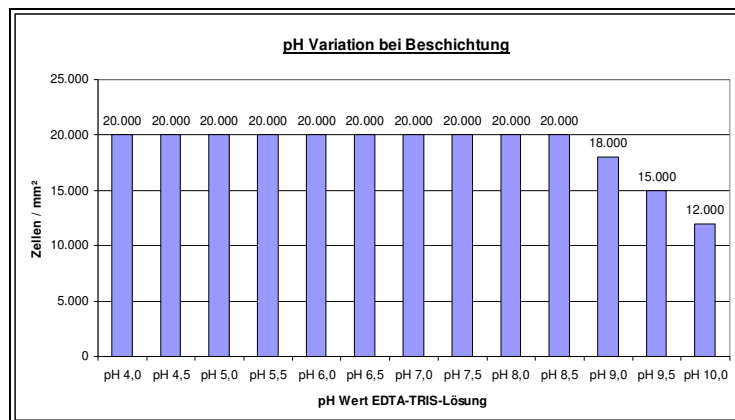


Abbildung 3–2
Messung Blutgruppe A₁ über IgG–Monolayer
mit pH Wert Variationen der EDTA–TRIS–Lösung bei der Beschichtung des Quarzes
Ergebnis ins Zellen / mm²

Bei der Verwendung von EDTA–TRIS–Lösung zeigte sich nach den Trockenvorgängen bei Beschichtung des Quarzes eine Kristallbildung auf der Oberfläche (Abb. 3–3). Die Kristallisation verschwand nach erneuter Benetzung mit EDTA–TRIS–Lösung oder nach Spülung in der Messzelle wieder.

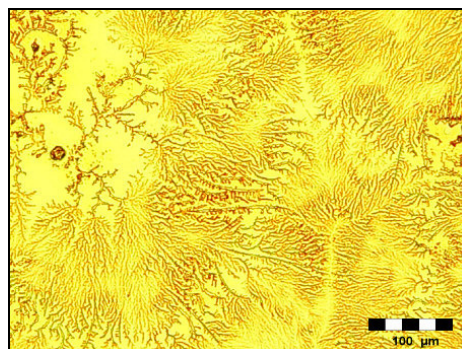


Abbildung 3–3
Beschichtungsvorgang mit EDTA–TRIS–Lösung, Versalzung der Oberfläche nach dem Trocknen mit Stickstoff
100fache Vergrößerung

Die Auswertung der Kontrollproben mit Blut der Gruppe B zeigte keine Anheftung von Erythrozyten auf der Quarzoberfläche.

Die Auswertung der Detektion von A₁ zeigte eine spezifische Bindung von ca. 20 000 Zellen / mm² bei herkömmlichem pH Wert von 8,5. Verschieben in Richtung saures Milieu kam es zu keiner Änderung der Konzentration von roten Blutkörperchen. Die Verschiebung in Richtung alkalischem Bereich zeigte einen Rückgang der Dichte spezifisch gebundener Erythrozyten auf 12 000 Zellen / mm² bei pH 10,0 der EDTA–TRIS–Lösung (*Abb. 3–2*).

3.1.2.2 Variationen bei der Blutgruppendetektion

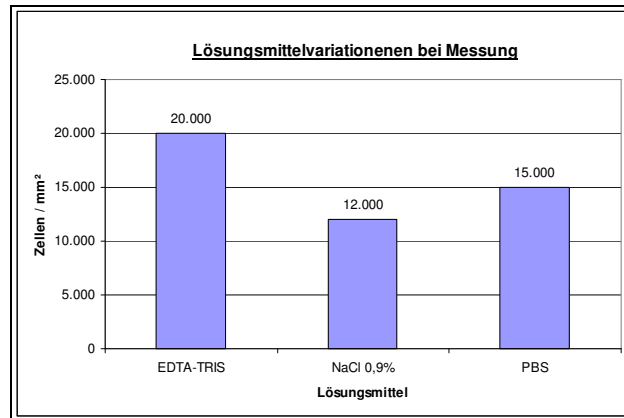
Die Quarze wurden mit Protein A und Anti–A BS 66 nach Standardmethoden beschichtet. Die Detektion der Blutgruppe A₁ wurde nach Standardmethoden durchgeführt. Die einzelnen Messungen wurden mit unterschiedlichen Lösungs- und Trägermitteln durchgeführt. Als Analyt diente unbehandeltes Vollblut, welches mit dem jeweils zu testenden Lösungsmittel im Verhältnis 1 : 10 verdünnt wurde, so dass eine Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl entstand. Vor den Versuchen wurde jeweils eine Kontrollprobe mit Blut der Gruppe B durchgeführt.

NaCl 0,9 %– und PBS–Lösung

Es wurde NaCl 0,9 %–Lösung mit einem pH–Wert von 6,8 bzw. PBS–Lösung mit einem pH Wert von 7,4 als Lösungs- und Trägersubstanz für die Messung verwendet.

Ergebnis

Die Auswertung der Messungen mit Blut der Gruppe A₁ zeigte, dass es zu einer spezifischen Bindung der Erythrozyten an die Quarzoberfläche gekommen war. Es wurden ca. 12 000 Zellen / mm² bei Verwendung NaCl 0,9 %–Lösung und ca. 15 000 Zellen / mm² bei Verwendung von PBS–Lösung gezählt (*Abb. 3–4*).

**Abbildung 3-4**

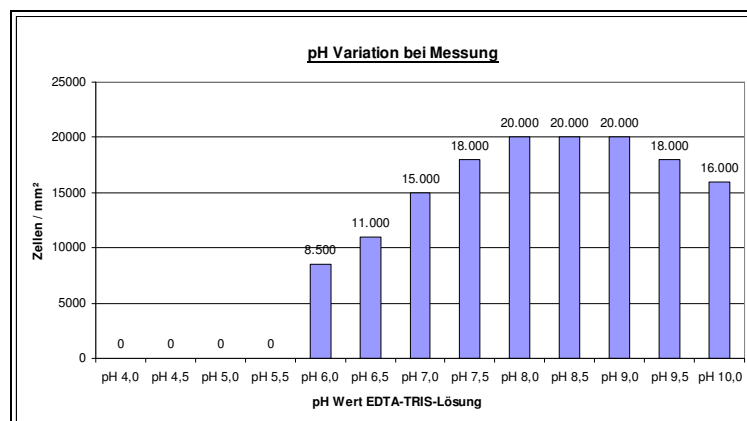
Messung Blutgruppe A₁ über IgG-Monolayer mit Lösungsmittelvariation bei der Blutgruppendetektion
Ergebnis in Zellen / mm²

Die Auswertung der Kontrollproben zeigten keine Bindung von Erythrozyten der Gruppe B auf der Quarzoberfläche.

pH Wert Variation mit EDTA-TRIS-Lösung

In der folgenden Versuchsreihe wurde EDTA-TRIS-Lösung mit verschiedenen pH Werten verwendet um den optimalen pH Wert für Blutgruppendetektion zu finden.

Ergebnis

**Abbildung 3-5**

Messung Blutgruppe A₁ über IgG-Monolayer mit pH Wert Variationen der EDTA-TRIS-Lösung bei der Blutgruppendetektion
Ergebnis ins Zellen / mm²

Bei allen Negativproben hatten keine Erythrozyten spezifisch an die Antikörperschicht auf dem Quarz gebunden.

Die Bestimmung der Blutgruppe A₁ zeigte je nach pH Wert der EDTA-TRIS-Lösung unterschiedliche (Abb. 3-5) Ergebnisse. Bei pH Wert von 8,0 und 8,5 wurden etwa 20 000 Zellen / mm² gezählt. Die Verwendung eines Puffers mit einem pH Wert von

6,5 bis 7,5 zeigte eine Konzentrationen von ca. 11 000 bis 18 000 Zellen / mm². Ab einem pH Wert von 5,5 kam es zur Hämolyse. Die Verwendung von mehr alkalischen Puffern brachte ab einem pH Wert von 9,5 eine Reduktion der Belegungsdichte auf der Quarzoberfläche.

3.1.2.3 Zugabe von ladungsreduzierenden Lösungen

Es wurden zum Analyt ladungsreduzierende Lösungen hinzugefügt, bzw. die EDTA–TRIS–Lösung durch diese ersetzt. Im ersten Versuch wurde LISS–Lösung als Lösungs- und Trägersubstanz verwendet. Im zweiten Versuch wurde bovines Albumin 22 % zur Blutprobe hinzugefügt.

Ergebnis

| Versuch | LISS– Lösung | bovines Albumin 22 % |
|--------------------------|--------------|----------------------|
| Zellen / mm ² | 20 000 | 20 000 |

Tab. 3–3

Messung Blutgruppe A₁ über IgG–Monolayer unter Austausch bzw. Zugabe von LISS–Lösung bzw. bovinem Albumin 22 %

Die Auswertung der Kontrollproben zeigte keine spezifische Bindung von Erythrozyten auf die Immunglobulinschicht des Quarzes.

Die Detektion der Blutgruppe A₁ zeigte bei beiden Versuchen mit Zusatz von LISS–Lösung bzw. bovinem Albumin 22 % (Tab. 3–3) eine Dichte von spezifisch gebundenen Erythrozyten von ca. 20 000 Zellen / mm².

3.1.3 Variation der Temperatur

3.1.3.1 Beschichtungen unter verschiedenen Temperaturen

Die Beschichtung des Quarzes mit Protein A und Anti–A BS 66 wurde nach dem in Methoden beschriebenen Standardprotokoll durchgeführt. Die Temperatur beim Beschichtungsprozess wurde variiert. Es wurden Beschichtungen bei 3 °C und 37 °C durchgeführt. Im Anschluss fand die eigentliche Bestimmung der Blutgruppe nach Standardmethoden bei 22 °C statt. Es wurde unbehandeltes Vollblut, in Lösung mit EDTA–TRIS–Lösung im Verhältnis 1 : 10, Konzentration 500 000 Zellen / µl verwendet. Jeder Detektion ging eine Kontrollprobe mit Blut der Gruppe B voraus.

Beschichtung bei 3 °C

Der gereinigte und präparierte Quarz und die zur Beschichtung benötigten Chemikalien wurden zur Aklimatisierung für 24 Stunden in der Kühlkammer gelagert. Direkt im Anschluss wurde der Quarz mit Protein A und Anti-A bei 3 °C beschichtet. Die Messung selbst erfolgte nach Aklimatisierung auf 22 °C.

Beschichtung bei 37 °C

Der gereinigte und präparierte Quarz und die zur Beschichtung benötigten Chemikalien wurden zur Aklimatisierung für 24 Stunden im Wärmeschrank gelagert. Direkt im Anschluss wurde der Quarz mit Protein A und Anti-A bei 37 °C beschichtet. Die Messung selbst erfolgte nach Aklimatisierung bei 22 °C.

Ergebnis

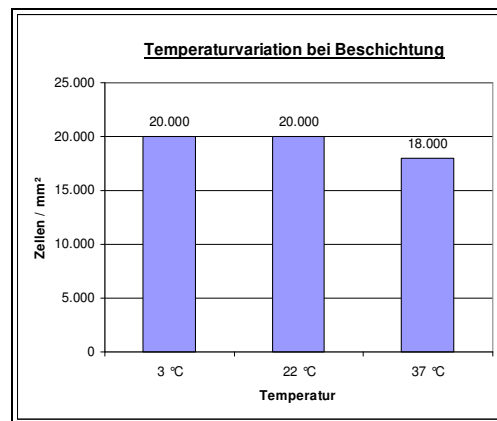


Abbildung 3–6

Messung Blutgruppe A₁ über IgG-Monolayer mit Temperaturvariationen bei der Beschichtung des Quarzes
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Negativproben zeigten keine spezifische Bindung von roten Blutkörperchen auf der Quarzoberfläche (Abb. 3–6). Die Auswertung der Detektion der Blutgruppe A₁ ergab eine Erythrozytendichte bei Beschichtung bei 3 °C von 20 000 Zellen / mm² und bei 37 °C eine Belegungsdichte von 18 000 Zellen / mm².

3.1.3.2 Blutgruppendetektion unter verschiedenen Temperaturen

Die Bestimmung der Blutgruppe A₁ wurde in der folgenden Versuchsreihe unter verschiedenen Temperaturbedingungen getestet. Es wurden Messungen bei Temperaturen von 3 °C und bei 37°C durchgeführt. Der Quarz war nach Standardmethoden mit Protein A und Anti-A BS 66 beschichtet worden. Es wurde

unbehandeltes Vollblut, in Lösung mit EDTA–TRIS–Lösung im Verhältnis 1 : 10, Konzentration ca. 500 000 Zellen / μl verwendet. Jeder Blutgruppendetektion ging eine Negativprobe mit Blut der Gruppe B voraus.

Messung bei 3 °C

Die gesamte Dummy–Anlage und alle verwendeten Lösungs- und Trägermittel wurden in der Kühleinheit aufgebaut bzw. gelagert. Nach einer Aklimatisierungszeit von 24 Stunden konnte der beschichtete Quarz in die Messzelle eingebaut werden. Die Messung wurde nach einer weiteren Aklimatisierungszeit von 30 Minuten durchgeführt.

Messung bei 37 °C

Die gesamte Dummy–Anlage und alle verwendeten Lösungs- und Trägermittel wurden in der Wärmeeinheit aufgebaut bzw. gelagert. Nach einer Aklimatisierungszeit von 24 Stunden konnte der beschichtete Quarz in die Messzelle eingebaut werden. Die Messung wurde nach einer weiteren Aklimatisierungszeit von 30 Minuten durchgeführt.

Ergebnis

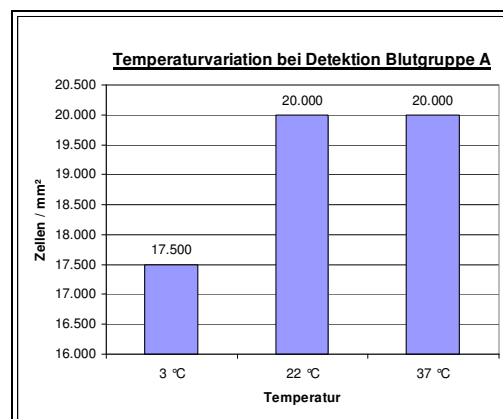


Abbildung 3–7

Messung Blutgruppe A1 über IgG–Monolayer mit Temperaturvariation bei der Blutgruppendetektion
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Negativproben zeigten keine spezifische Bindung von roten Blutkörperchen auf der Quarzoberfläche (Abb. 3–7). Die Auswertung der Detektion der Blutgruppe A₁ ergab bei 3 °C eine Erythrozytendichte von ca. 17 500 Zellen / mm². Die Auswertung der Versuche bei 37 °C zeigten eine Belegungsdichte von ca. 20 000 Zellen / mm².

Temperaturtests des Anti-A BS 66 im DiaMed-System

Der Antikörper BS 66 wurde im DiaMed-System bei 3 °C, 22 °C und 37 °C getestet. Es wurden Erythrozyten der Blutgruppe A₁, welche mit NaCl-Lösung gewaschen und darin im Verhältnis 1 : 10 verdünnt waren, mit dem Anti-A BS 66 nach Standardmethoden inkubiert. Im Anschluss wurde ein direkter Coombstest in der DiaMed-Karte durchgeführt.

Ergebnis

| Versuch | Temperatur 3 °C | Temperatur 22 °C | Temperatur 37 °C |
|----------|-----------------|------------------|------------------|
| Ergebnis | +++ | ++++ | ++++ |

Tabelle 3-4

Temperaturvariation bei der Blutgruppenbestimmung im DiaMed-System
 +++++ => Erythrozyten bleiben vollständig auf der Säule
 +++ => Erythrozyten bleiben auf der Säule, Schlieren in der Säule
 ++ => Erythrozyten in der Säule
 + => Erythrozyten auf Säulenboden mit Schlieren in der Säule
 - => Erythrozyten komplett auf dem Säulenboden

Die Auswertung der DiaMed-Karten zeigte bei 22 °C und 37 °C identische Ergebnisse mit einer starken Antikörperaktivität. Bei 3 °C zeigten die Ergebnisse eine geringere Aktivität des Antikörpers (Tab. 3-4).

3.1.4 Variation der Konzentration

3.1.4.1 Variation der Konzentration von Protein A und Anti-A

Die Beschichtungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Protein A und Anti-A BS 66 wurden nach Standardmethoden durchgeführt. Es wurden die Konzentration und Moleküldichte der Lösungen und deren Verdünnungen berechnet und der Titer des Anti-A BS 66 bestimmt. Die Protein A und die Antikörperlösung war bis zu einem Verhältnis von 1 : 512 mit Aqua bidest. verdünnt worden.

Die Messung wurde nach dem im Abschnitt Methoden beschriebenen Standard durchgeführt. Bestimmt wurde die Blutgruppe A₁, vor der jeweils eine Negativprobe mit Blut der Gruppe B durchgeführt wurde.

Die höchste funktionsfähige Verdünnung von Protein A und die größtmögliche Verdünnung des Antikörpers wurden in einer anschließenden Messung kombiniert und die Dichte der spezifischen Erythrozytenbelegung bestimmt.

| Verdünnung | Konzentration | Masse bei 40 µl | Moleküle | Moleküle bei 40 µl |
|------------|---------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| ∅ | 2 mg / ml | 0,08 mg | $3,0 \cdot 10^{16}$ / ml | $1,2 \cdot 10^{15}$ / ml |
| 1 : 1 | 1 mg / ml | 0,04 mg | $1,5 \cdot 10^{16}$ / ml | $5,6 \cdot 10^{14}$ / ml |
| 1 : 2 | 0,5 mg / ml | 0,02 mg | $7,2 \cdot 10^{15}$ / ml | $2,8 \cdot 10^{14}$ / ml |
| 1 : 4 | 0,25 mg / ml | 0,01 mg | $3,6 \cdot 10^{15}$ / ml | $1,4 \cdot 10^{14}$ / ml |
| 1 : 8 | 0,13 mg / ml | 5 µg | $1,8 \cdot 10^{15}$ / ml | $7,0 \cdot 10^{13}$ / ml |
| 1 : 16 | 65 µg / ml | 3 µg | $9,0 \cdot 10^{14}$ / ml | $3,5 \cdot 10^{13}$ / ml |
| 1 : 32 | 33 µg / ml | 1 µg | $4,5 \cdot 10^{14}$ / ml | $1,8 \cdot 10^{13}$ / ml |
| 1 : 64 | 17 µg / ml | 0,6 µg | $2,3 \cdot 10^{14}$ / ml | $9,0 \cdot 10^{12}$ / ml |
| 1 : 128 | 8,5 µg / ml | 0,3 µg | $1,2 \cdot 10^{14}$ / ml | $4,5 \cdot 10^{12}$ / ml |
| 1 : 256 | 4,3 µg / ml | 0,15 µg | $5,6 \cdot 10^{13}$ / ml | $2,3 \cdot 10^{12}$ / ml |
| 1 : 512 | 2,1 µg / ml | 0,08 µg | $2,8 \cdot 10^{13}$ / ml | $1,2 \cdot 10^{12}$ / ml |

Tabelle 3-5

Verdünnungsreihe mit Massen- und Moleküldichte von Protein A

| Verdünnung | Konzentration | Masse bei 40 µl | Moleküle | Moleküle bei 40 µl | Titer |
|------------|---------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|---------|
| ∅ | 3,3 mg / ml | 132 µg | $1,2 \cdot 10^{16}$ / ml | $4,8 \cdot 10^{14}$ / ml | 1 : 256 |
| 1 : 1 | 1,7 mg / ml | 66 µg | $6 \cdot 10^{15}$ / ml | $2,4 \cdot 10^{14}$ / ml | |
| 1 : 2 | 0,8 mg / ml | 33 µg | $3 \cdot 10^{15}$ / ml | $1,2 \cdot 10^{14}$ / ml | |
| 1 : 4 | 0,4 mg / ml | 16,5 µg | $1,5 \cdot 10^{15}$ / ml | $6 \cdot 10^{13}$ / ml | |
| 1 : 8 | 0,2 mg / ml | 8,3 µg | $7,3 \cdot 10^{14}$ / ml | $3 \cdot 10^{13}$ / ml | |
| 1 : 16 | 0,1 mg / ml | 4,2 µg | $3,7 \cdot 10^{14}$ / ml | $1,5 \cdot 10^{13}$ / ml | |
| 1 : 32 | 55 µg / ml | 2,1 µg | $1,9 \cdot 10^{14}$ / ml | $7,5 \cdot 10^{12}$ / ml | |
| 1 : 64 | 28 µg / ml | 1,1 µg | $1 \cdot 10^{14}$ / ml | $3,8 \cdot 10^{12}$ / ml | |
| 1 : 128 | 14 µg / ml | 0,6 µg | $5 \cdot 10^{13}$ / ml | $1,9 \cdot 10^{12}$ / ml | |
| 1 : 256 | 7 µg / ml | 0,3 µg | $2,5 \cdot 10^{13}$ / ml | $1 \cdot 10^{12}$ / ml | |
| 1 : 512 | 3,5 µg / ml | 0,2 µg | $1,3 \cdot 10^{13}$ / ml | $5 \cdot 10^{11}$ / ml | |

Tabelle 3-6

Verdünnungsreihe mit Massen-, Moleküldichte und Titer von Anti-A BS 66

Ergebnis

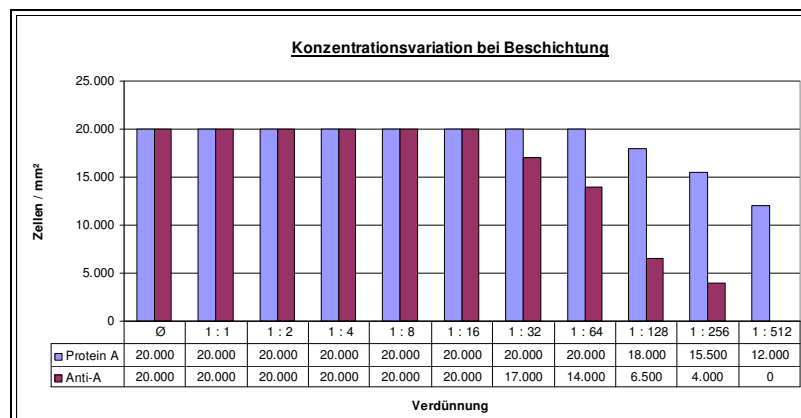
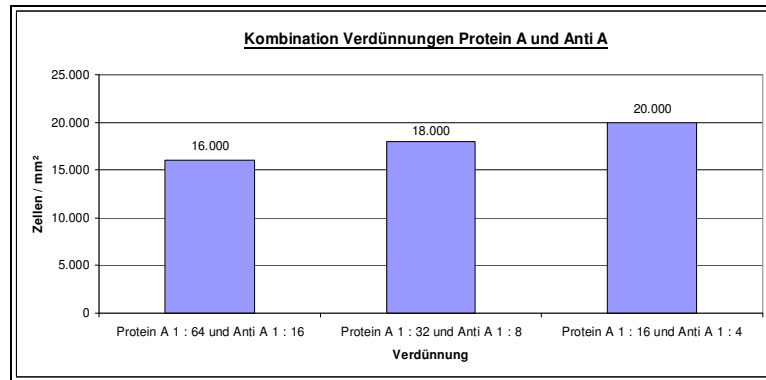


Abbildung 3-8

Messung Blutgruppe A₁ über IgG-Monolayer
mit Konzentrationsvariationen von Protein A bzw. Anti-A BS 66 bei der Beschichtung des Quarzes
Ergebnis in Zellen / mm²

**Abbildung 3–9**

Messung Blutgruppe A₁ über IgG–Monolayer
mit der Kombination von Konzentrationsvariationen von Protein A und Anti–A BS 66 bei der Beschichtung des Quarzes
Ergebnis in Zellen / mm²

Die Konzentrationen der einzelnen Lösungen und deren Verdünnungen sind den Tabellen zu entnehmen (Tab. 3–5 und 3–6).

Die Beschichtung des Quarzes mit verschiedenen Konzentrationen von Protein A und Antikörper zeigte, dass bei Protein A bis zu einer Verdünnung von 1 : 64 die Zelldichte ca. 20 000 Zellen / mm² betrug (Abb. 3–8). Ab einer Verdünnung der Proteinlösung auf 1 : 128 nahm die Zelldichte ab, bis bei 1 : 512 keine Zellen mehr detektiert werden konnten.

Die Ergebnisse der Verdünnung der Antikörperlösung zeigten, dass bis zu einer Verdünnung von 1 : 16 ca. 20 000 Zellen / mm² gezählt werden konnten (Tab. 3–8). Eine weitere Verdünnung führte zu einer geringeren Dichte der Zellbelegung auf der Goldoberfläche. Bei einer Verdünnung von 1 : 512 konnten keine spezifisch gebundenen Erythrozyten mehr nachgewiesen werden.

Die Kombination der Verdünnungen der Einzelmessungen zeigte bei einer Verdünnung von 1 : 16 bei der Protein A Lösung und 1 : 4 bei der Antikörperlösung, ca. 20 000 spezifisch gebundene Erythrozyten pro mm² (Tab. 3–9). Höhere Verdünnungen führten zu geringeren Dichten spezifisch gebundener Erythrozyten bei der anschließenden Blutgruppendetektion.

3.1.4.2 Konzentrationsvariationen der Vollblutprobe bzw. Erythrozytensuspension

Es wurden Versuche mit verdünnten Vollblutproben bzw. mit verdünnten und gewaschenen Erythrozytensuspensionen der Blutgruppe A₁ durchgeführt. Die Proben wurden nach dem im Abschnitt Methodik beschriebenen Verfahren

hergestellt. Die Konzentrationsspanne reichte von einer zweifachen Konzentrierung mit ca. $1 \cdot 10^7$ Zellen / μl , bis zu einer Verdünnung von 1 : 10 000, mit einer Dichte von etwa 500 Zellen / μl (Tab. 3–7). Die Messung erfolgte auf einem nach Standardmethoden präparierten Quarz mit einer Protein A und Anti-A BS 66 Beschichtung. Jeder Detektion ging eine Kontrollprobe mit Blut der Gruppe B voraus.

| Verdünnung | Zellkonzentration | Zellen bei 250 μl |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 2-fach konz. | $1 \cdot 10^7 / \mu\text{l}$ | $25 \cdot 10^8 / \mu\text{l}$ |
| Ø | $5 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$ | $12,5 \cdot 10^8 / \mu\text{l}$ |
| 1 : 1 | $2,5 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$ | $6,25 \cdot 10^8 / \mu\text{l}$ |
| 1 : 10 | $5 \cdot 10^5 / \mu\text{l}$ | $1,25 \cdot 10^8 / \mu\text{l}$ |
| 1 : 100 | 50 000 / μl | $1,25 \cdot 10^7 / \mu\text{l}$ |
| 1 : 1000 | 5 000 / μl | $1,25 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$ |
| 1 : 10 000 | 500 / μl | 125 000 / μl |
| 1 : 100 000 | 50 / μl | 12 500 / μl |

Tabelle 3–7

Verdünnungsreihe mit Zellkonzentrationen von Vollblutproben bzw. gewaschenen Erythrozytensuspensionen der Blutgruppe A₁

Ergebnis

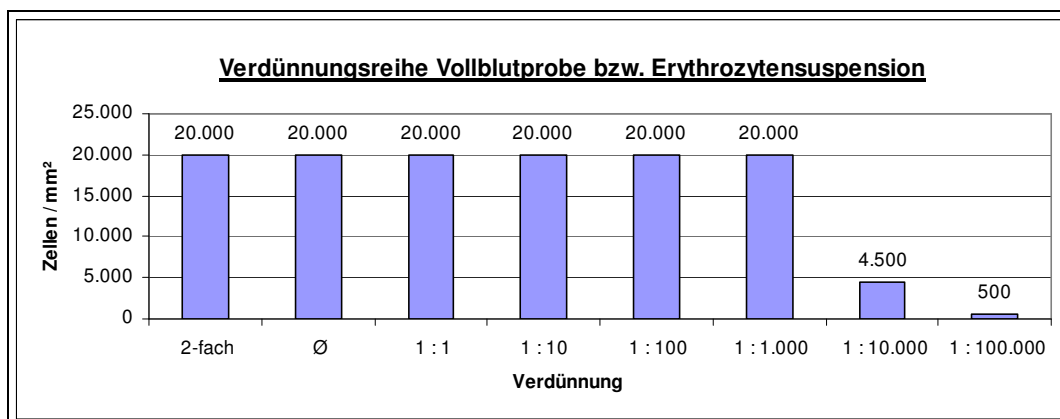


Abbildung 3–10

Messung Blutgruppe A₁ über IgG–Monolayer mit Konzentrationsvariation der Vollblutprobe bzw. Erythrozytensuspension
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Die Auswertung der Versuche (Abb. 3–10 und Abb. 3–11) zeigte, dass es keinen Unterschied zwischen der Vollblutprobe und einer gewaschenen Erythrozytensuspension in der Dichte spezifisch gebundener Erythrozyten gab. Die Detektion der Blutgruppe A₁ war mit einer gleich bleibenden Dichte von ca. 20 000 Zellen / mm², bis zu einer Verdünnung von 1 : 1 000 möglich. Bei einer Verdünnung von 1 : 10 000 nahm die Dichte der spezifisch gebundenen Zellen auf 4 500 Zellen / mm² ab.

Eine Verdoppelung der Konzentration auf ca. 10^7 Zellen / μl zeigte bei beiden Versuchsreihen ein gleiches Ergebnis. Es konnten ca. 20 000 Zellen / mm^2 gezählt werden.

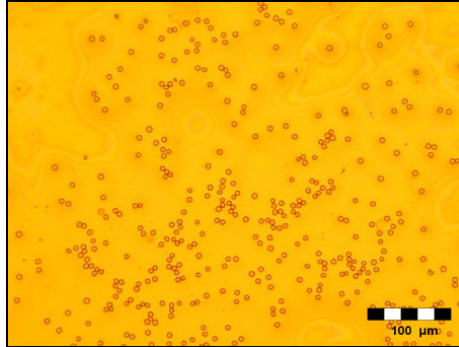


Abbildung 3–11

Messung Blutgruppe A₁ über IgG–Monolayer mit Verdünnung der Vollblutprobe auf 1 : 100 000
100fache Vergrößerung

Test im DiaMed–System

Zum Vergleich mit einem etablierten Blutgruppenbestimmungssystem wurde eine Testreihe mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen im ID–Micro–Typing–System der Firma DiaMed durchgeführt. Die Bestimmung der Blutgruppe mit dem DiaMed–System erfolgte wie im Abschnitt Methodik dargestellt. Es wurde eine Versuchsreihe mit Vollblut und eine mit gewaschenen Erythrozyten der Gruppe A₁ durchgeführt.

Ergebnis

| Konzentration | Vollblut | Suspension |
|---------------|----------|------------|
| 1 : 10 | +++ | +++ |
| 1 : 100 | ++ | ++ |
| 1 : 1 000 | + | + |
| 1 : 10 000 | ∅ | ∅ |
| 1 : 100 000 | ∅ | ∅ |

Tabelle 3–8

Detektion der Blutgruppe A₁ im DiaMed–System mit Konzentrationsvariationen der Vollblutprobe bzw. Erythrozytensuspension
+++ => *sehr gut sichtbar*
++ => *gut sichtbar*
+ => *mit Durchlicht sichtbar*
∅ => *nicht sichtbar*

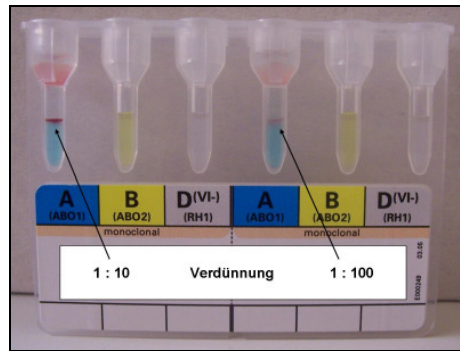


Abbildung 3–12

Detektion der Blutgruppe A₁ im DiaMed-System mit Konzentrationsvariationen der Vollblutprobe

Die Auswertung der DiaMed Versuche zeigte, dass eine Blutgruppenbestimmung bis zu einer Verdünnung von 1 : 1 000 möglich war (*Tab. 3–8* und *Abb. 3–12*). Bei Verdünnungen von 1 : 10 000 und mehr, konnte keine erfolgreiche Blutgruppendetektion mehr durchgeführt werden.

Die Ankopplung von Erythrozyten an die sensitive Quarzoberfläche zeigte eine um den Faktor zehn höhere Toleranz für Verdünnungseffekte, als das DiaMed-System.

3.1.5 Variation der Flussgeschwindigkeiten

3.1.5.1 Variation der Flussgeschwindigkeit bei Beschichtung

Bei den Tests mit unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten im Dummy wurden Messungen mit sieben verschiedenen Geschwindigkeitsstufen durchgeführt. Verschieden lange Immobilisationszeiten wurden abgewartet bzw. Beschichtungen mit der im Abschnitt Methodik erklärten Druckpulsmethode durchgeführt. Mithilfe der Lösungsmenge, Masse und Flussgeschwindigkeit wurden die entsprechenden Immobilisationszeiten und Massengeschwindigkeiten ausgerechnet (*Tab. 3–9* und *3–10*). Es wurden jeweils getrennt voneinander Protein A und Anti-A getestet. Der jeweils andere Beschichtungsteil wurde dann nach Standardmethoden präpariert. Die anschließende Messung verlief nach Standardprotokoll, wie bei Methoden beschrieben. Es wurde unbehandeltes Vollblut, in Lösung mit EDTA-TRIS im Verhältnis 1 : 10, Konzentration ca. 500 000 Zellen / µl, verwendet. Zum Vergleich wurden Beschichtungen mit Pipette und unterschiedlichen Immobilisationszeiten durchgeführt. Jeder Blutgruppendetektion ging eine Kontrollprobe mit B voraus.

| Lösung | Volumen | Masse |
|--------------|---------|---------|
| Protein A | 250 µl | 500 µg |
| Anti-A BS 66 | 250 µl | 8,25 µg |

Tabelle 3-9

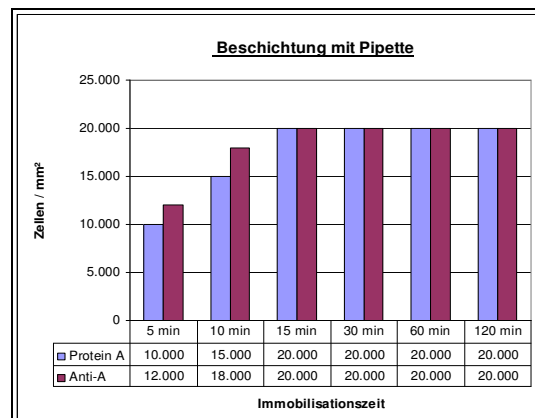
Volumen und Masse der Protein A bzw. Anti-A Lösungen

| Flussgeschwindigkeit | Immobilisationszeit im Fluss | Massengeschwindigkeit Protein A | Massengeschwindigkeit Anti-A BS 66 |
|----------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 0,08 ml / min | 188 s. | 16 µg / min | 2,6 µg / min |
| 0,16 ml / min | 94 s | 32 µg / min | 5,3 µg / min |
| 0,32 ml / min | 47 s | 64 µg / min | 10,6 µg / min |
| 0,64 ml / min | 23 s | 128 µg / min | 21,1 µg / min |
| 1,28 ml / min | 12 s | 256 µg / min | 42,2 µg / min |
| 2,56 ml / min | 6 s | 512 µg / min | 84,5 µg / min |
| 5,12 ml / min | 3 s | 1024 µg / min | 169 µg / min |

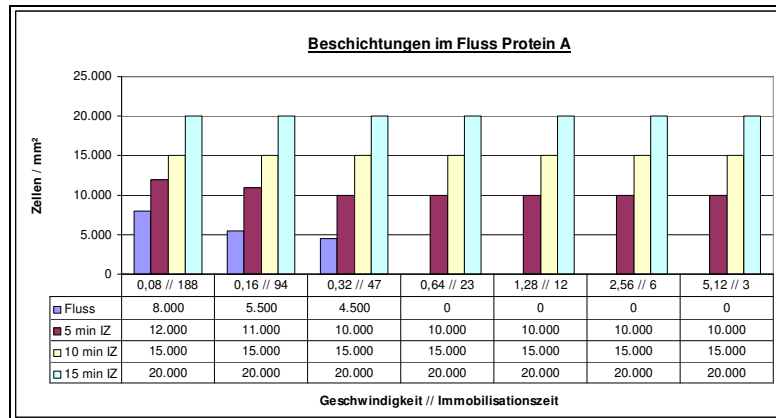
Tabelle 3-10

Bestimmung der Immobilisationszeit und Massengeschwindigkeit der Beschichtungslösungen

Ergebnis

**Abbildung 3-13**

Messung Blutgruppe A₁ über IgG-Monolayer mit Beschichtung über Pipette und unterschiedlichen Immobilisationszeiten von Protein A und Anti-A
Ergebnis in Zellen / mm²

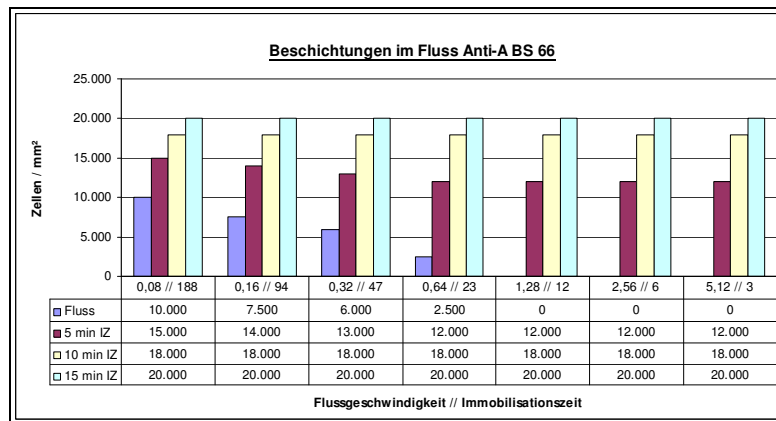
**Abbildung 3–14**

Messung Blutgruppe A₁ über IgG–Monolayer mit Beschichtung im Fluss und unterschiedlicher Geschwindigkeit der Protein A Lösung

Flussgeschwindigkeit in ml / min

Immobilisationszeit in s

Ergebnis in Zellen / mm²

**Abbildung 3–15**

Messung Blutgruppe A₁ über IgG–Monolayer mit Beschichtung im Fluss und unterschiedlicher Geschwindigkeit der Anti–A Lösung

Flussgeschwindigkeit in ml / min

Immobilisationszeit in s

Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Die Beschichtung des Quarzes mit der Pipette zeigte sowohl bei Protein A, als auch bei Anti–A bis zu einer Zeit von 15 Minuten eine zunehmende Dichte der spezifisch gebundenen Erythrozyten (*Abb. 3–13*). Die Verlängerung der Immobilisationszeit auf bis zu 120 Minuten führte bei beiden Versuchen zu keiner weiteren Erhöhung der spezifisch gebundenen Erythrozyten.

Die Positivproben zeigten bei den Versuchen mit Protein A bzw. Anti–A, bei einer Geschwindigkeit von 0,08 ml / min, eine Belegungsdichte von ca. 8 000 Zellen / mm² bzw. 10 000 Zellen / mm² (*Abb. 3–14* und *3–15*). Ab einer Flussrate von 0,64 ml / min bzw. 1,28 ml / min konnten keine roten Blutkörperchen mehr in der anschließenden

Messung nachgewiesen werden. Flusspausen führten hingegen wieder zu positiven Ergebnissen, die mit Zunahme der Immobilisationszeit stiegen.

3.1.5.2 Variation der Flussgeschwindigkeit bei Messung

Die Quarze wurden nach Standardmethoden beschichtet. Die anschließenden Messungen wurden mit Flussgeschwindigkeiten von 0,08 ml / min bis 5,12 ml / min durchgeführt. Es wurden keine, bzw. unterschiedlich lange Pausen nach Erreichen der Messzelle durch das Analyt eingehalten. Zudem wurden Versuche mit der im Abschnitt Methodik erklärten Druckpuls Methode durchgeführt. Zum Vergleich wurde eine Belegung außerhalb der Messzelle mit der Pipette bei unterschiedlich langen Immobilisationszeiten durchgeführt. Detektiert wurde die Blutgruppe A₁. Es wurde unbehandeltes Vollblut, in Suspension mit EDTA-TRIS-Lösung im Verhältnis 1 : 10, Konzentration ca. 500 000 Zellen / µl, verwendet. Mithilfe der Analytmenge, Masse und Flussgeschwindigkeit wurden die entsprechenden Immobilisationszeiten und Massengeschwindigkeiten ausgerechnet (Tab. 3-11 und 3-12). Jeder Blutgruppendetektion ging eine Kontrollprobe mit Blut der Gruppe B voraus.

| Blut | Volumen | Anzahl Erythrozyten |
|----------------|---------|---------------------|
| A ₁ | 250 µl | 1,5*10 ⁹ |

Tabelle 3-11

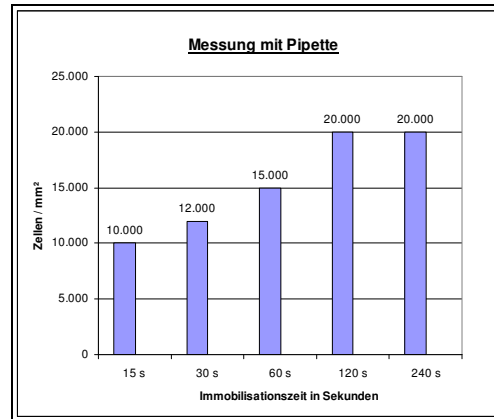
Volumen der Vollblutprobe und Erythrozytenanzahl

| Flussgeschwindigkeit | Immobilisationszeit im Fluss | Zellgeschwindigkeit A ₁ |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| 0,08 ml / min | 188 s. | 48 000 / s |
| 0,16 ml / min | 94 s | 96 000 / s |
| 0,32 ml / min | 47 s | 192 000 / s |
| 0,64 ml / min | 23 s | 384 000 / s |
| 1,28 ml / min | 12 s | 786 000 / s |
| 2,56 ml / min | 6 s | 1,5*10 ⁶ / s |
| 5,12 ml / min | 3 s | 3*10 ⁶ / s |

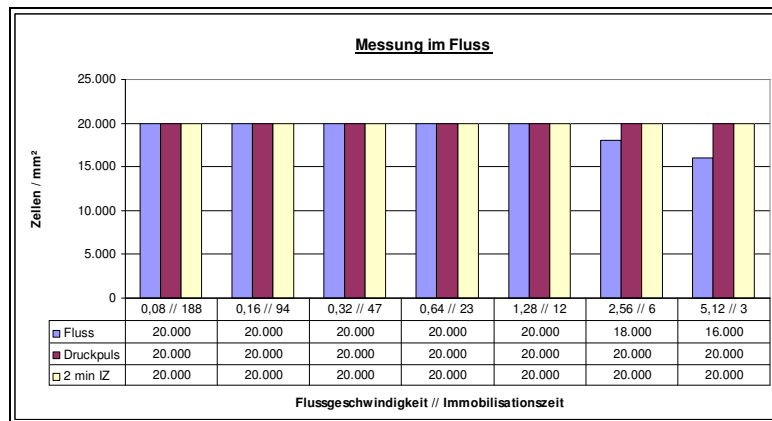
Tabelle 3-12

Flussgeschwindigkeit, Immobilisationszeit und Zellgeschwindigkeit

Ergebnis

**Abbildung 3–16**

Messung Blutgruppe A₁ über IgG–Monolayer mit Erythrozytenbelegung über Pipette und unterschiedlicher Immobilisationszeit
Ergebnis in Zellen / mm²

**Abbildung 3–17**

Messung Blutgruppe A₁ über IgG–Monolayer
mit Messung bei unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten, Druckpulsmethode und zusätzlicher Immobilisationszeit
Flussgeschwindigkeit in ml / min
Immobilisationszeit in s
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Die Belegung des beschichteten Quarzes mit Erythrozyten per Pipette zeigte bei 15 Sekunden Immobilisationszeit eine Dichte von ca. 10 000 Zellen / mm² die mit zunehmender Zeit anstieg (Abb. 3–16). Bei 120 Sekunden wurde eine Dichte von ca. 20 000 Zellen / mm² gemessen.

Die Auswertung der unterschiedlichen Geschwindigkeitsstufen zeigte, dass eine Messung bei 0,08 ml / min, bei Standardgeschwindigkeit 0,16 ml / min und bei schnellem Fluss bis 1,28 ml / min., ohne eine Immobilisationszeit, in der der Fluss gestoppt wird, möglich ist (Abb. 3–17). Ab einer Geschwindigkeit von 2,56 ml / min nimmt die Dichte der gebundenen Erythrozyten ab. Die Messung mit

unterschiedlicher Flussgeschwindigkeit und einer Immobilisationszeit von 120 Sekunden, zeigte bei allen Geschwindigkeitsstufen keine Unterschiede in der Dichte spezifisch gebundener Zellen. Die Messung unter Druckpulsen zeigte eine Dichte von ca. 20 000 Zellen / mm² bei einer Geschwindigkeit von 2,56 ml / min und 5,12 ml / min.

3.1.6 Zentrifugation des mit Erythrozyten belegten Quarzes

Der Quarz wurde nach der Beschichtung mit Protein A und Anti-A BS 66 nach Standardmethoden, zur Blutgruppendetektion herangezogen. Detektiert wurde nach Standardmethoden die Blutgruppe A₁. Es wurde unbehandeltes Vollblut, im Verhältnis 1 : 10 (verdünnt mit EDTA-TRIS-Lösung, Konzentration ca. 500 000 Zellen / µl), bzw. eine Probe aus dem Abschnitt Variation der Konzentration bei Blutgruppendetektion verwendet, welche im Verhältnis 1 : 10 000 mit EDTA-TRIS-Lösung verdünnt worden war und eine Konzentration von ca. 500 Zellen / µl besaß. Im Anschluss an die Blutgruppendetektion wurde der Quarz wie im Abschnitt Methodik beschrieben für 2, 5 und 10 Minuten zentrifugiert. Allen Versuchen ging eine Kontrollprobe mit Blut der Gruppe B voraus.

Ergebnis

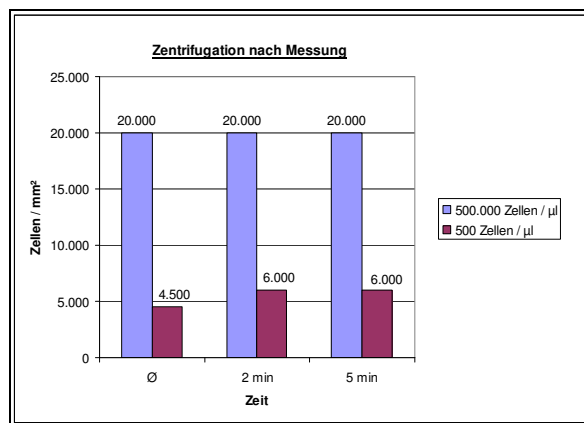


Abbildung 3-19

Messung Blutgruppe A₁ über IgG-Monolayer mit Zentrifugation bei 2200 U / min bei der Blutgruppendetektion
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Die Zentrifugation für 2 Minuten des mit Erythrozyten der Blutgruppe A₁ belegten Quarzes zeigte bei einer Erythrozytenkonzentration von ca. 20 000 Zellen / mm²

keine zusätzliche Erhöhung der Dichte. Eine Zentrifugation des Quarzes bei Messung von 1 : 10 000 verdünntem Blut erhöhte die Dichte der spezifisch gebundenen roten Blutkörperchen von ca. 4 500 auf 6 000 Zellen / mm² (Abb. 3–19). Eine Verlängerung der Zentrifugationszeit auf 5 oder 10 Minuten erbrachte keine zusätzliche Erhöhung der Dichte.

3.2 Blutgruppendetektion über einen IgM–Monolayer

3.2.1 Detektion der Blutgruppe A₁ und A₂

Der Quarz wurde nach Standardmethoden mit Protein A und Anti–A Birma I, ein monoklonales IgM der Maus, beschichtet (Tab. 3–13). Die Beschichtungen wurden bei 22 °C bzw. bei 3 °C durchgeführt. Die Detektion der Blutgruppe A erfolgte mit Blut der Gruppe A₁ bzw. A₂, das in einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl in EDTA–TRIS–Lösung vorlag. Die Blutgruppendetektionen bei den Versuchen mit Variation der Beschichtungstechnik wurden nach Standardmethoden durchgeführt.

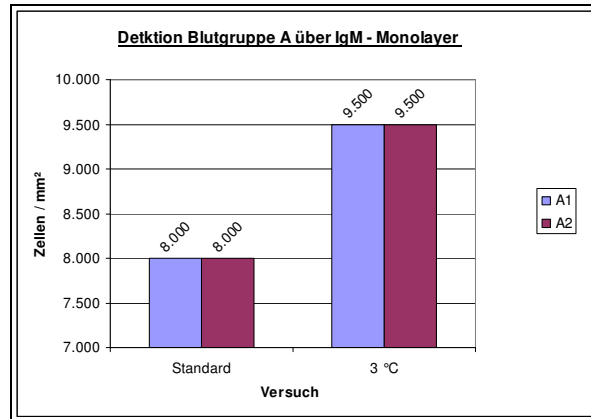
Variationen in der Blutgruppendetektion wurden mit nach Standardmethoden präparierten Quarzen durchgeführt. Die Quarze waren mit Protein A und Anti–A Birma I beschichtet. Es wurden Messungen bei 3 °C und bei 37 °C durchgeführt. Zur Blutprobe wurde bovines Albumin 22 % hinzu gegeben, bzw. EDTA–TRIS–Lösung durch LISS–Lösung ersetzt. Die Immobilisationszeit wurde auf 10 Minuten verlängert. Die Zentrifugation des mit Erythrozyten belegten Quarzes wurde bei 22 °C mit 2200 U / min für 2, 5 und 10 Minuten durchgeführt. Die Detektion der Blutgruppe A wurde mit Blut der Gruppe A₁ bzw. A₂, das in einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl in EDTA–TRIS–Lösung vorlag, durchgeführt.

Allen Blutgruppendetektionen gingen Kontrollproben mit Blut der Gruppe B voraus.

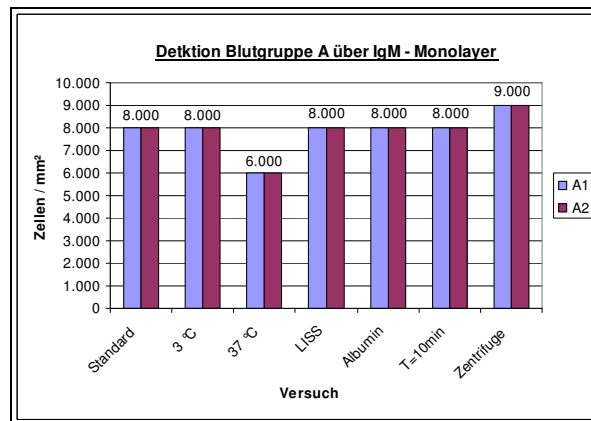
| Antikörper | Konzentration | Masse bei 40 µl | Moleküle | Moleküle bei 40 µl | Titer |
|----------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------------|---------|
| Anti–A Birma I | 1,2 mg / ml | 48 µg | $8 \cdot 10^{14}$ / ml | $3,2 \cdot 10^{13}$ | 1 : 256 |

Tabelle 3–13
Konzentration, Masse und Titer des Antikörpers Anti–A Birma I

Ergebnis

**Abbildung 3-19**

Messung Blutgruppe A₁ und A₂ über einen IgM-Monolayer mit Variationen bei der Beschichtung des Quarzes
Ergebnis in Zellen / mm²

**Abbildung 3-20**

Messung Blutgruppe A₁ und A₂ über einen IgM-Monolayer mit Variationen bei Blutgruppendetektion
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Es zeigten sich keine Unterschiede in den Ergebnissen zwischen Blut der Gruppe A₁ und A₂.

Die Blutgruppendetektionen, bei Beschichtung und Messung unter Standardbedingungen, zeigten eine Dichte von ca. 8 000 spezifisch gebundenen Erythrozyten pro mm² (Abb. 3-19 und 3-20).

Eine Beschichtung bei 3 °C führte zu einer um ca. 1 500 Zellen / mm² höheren Dichte.

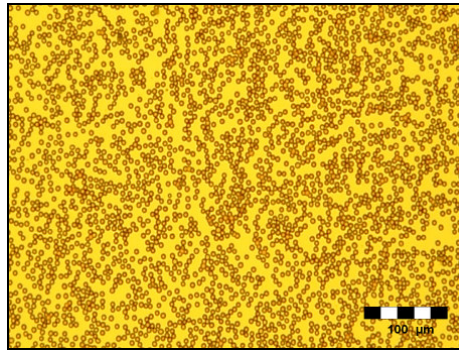


Abbildung 3-21

Detektion der Blutgruppe A₁ über einen IgM-Monolayer nach Zentrifugation des Quarzes bei der Beschichtung 100fache Vergrößerung

Die Messung bei 3 °C zeigte keine Veränderung der Dichte verglichen mit der Standardmethode. Bei 37 °C waren ca. 6 000 Zellen / mm² spezifisch auf den Quarz gebunden. Die Zugabe von LISS-Lösung oder bovinem Albumin 22 % führte zu keiner Veränderung der Erythrozytendichte. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 10 Minuten führte ebenfalls zu keiner Veränderung. Eine Zentrifugation des mit Erythrozyten belegten Quarzes für zwei Minuten brachte eine Erhöhung der Zelldichte auf ca. 9 000 Zellen / mm². Die Zelldichte erhöhte sich jedoch nach weiterer Zentrifugation nicht mehr (Abb. 3-20).

3.2.2 Detektion der Blutgruppe B

Der Quarz wurde nach Standardmethoden mit Protein A und Anti-B LB 2, ein monoklonales IgM der Maus, beschichtet (Tab. 3-14). Die Beschichtungen wurden bei 22 °C bzw. bei 3 °C durchgeführt. Die Blutgruppendetektion wurde nach Standardmethoden mit Blut der Gruppe B durchgeführt, das in einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl, in EDTA-TRIS-Lösung vorlag.

Es wurden verschiedene Varianten der Blutgruppendetektion erprobt. Dabei wurden nach Standardmethoden präparierte Quarze verwendet, die mit Protein A und Anti-A Birma I beschichtet waren. Es wurden Messungen bei 3 °C und bei 37 °C durchgeführt. Zur Blutprobe wurde bovines Albumin 22 % hinzu gegeben, bzw. EDTA-TRIS-Lösung durch LISS-Lösung ersetzt. Die Immobilisationszeit wurde auf 10 Minuten verlängert. Die Zentrifugation des mit Erythrozyten belegten Quarzes wurde bei 22 °C mit 2200 U / min für 2, 5 und 10 Minuten durchgeführt. Die

Blutgruppendetektion erfolgte mit Blut der Gruppe B, das in einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / μl in EDTA–TRIS–Lösung vorlag.

Allen Blutgruppendetektionen gingen Kontrollproben mit Blut der Gruppe A₁ voraus.

| Antikörper | Konzentration | Masse bei 40 μl | Moleküle | Moleküle bei 40 μl | Titer |
|-------------|---------------|----------------------------|---------------------|-------------------------------|---------|
| Anti-B LB 2 | 1,4 mg / ml | 56 μg | $9,3 \cdot 10^{14}$ | $3,7 \cdot 10^{13}$ | 1 : 256 |

Tabelle 3–14

Konzentration, Masse und Titer des Antikörpers Anti-B LB 2

Ergebnis

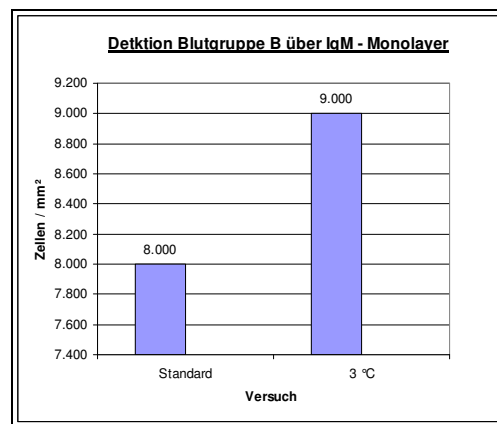


Abbildung 3–22

Detektion der Blutgruppe B über einen IgM–Monolayer mit Variationen bei der Beschichtung des Quarzes
Ergebnis in Zellen / mm²

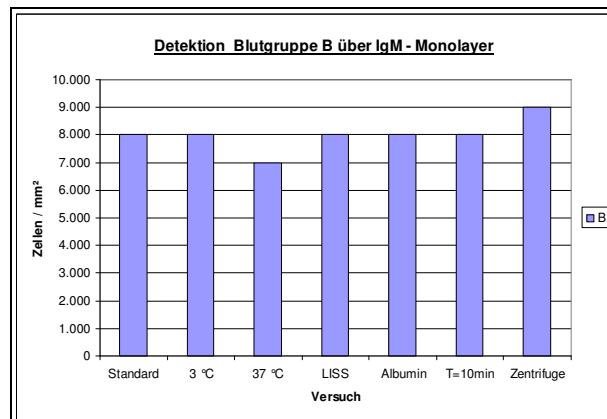


Abbildung 3–23

Detektion der Blutgruppe B über einen IgM–Monolayer mit Variation bei der Blutgruppenbestimmung
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Die Blutgruppendetektionen, bei Beschichtung und Messung unter Standardbedingungen, zeigten eine Dichte von ca. 8 000 spezifisch gebundenen Erythrozyten pro mm² (Abb. 3–22 und 3–23).

Eine Beschichtung bei 3 °C führte zu einer um ca. 1 000 Zellen / mm² höheren Dichte (Abb. 3–22).

Die Messung bei 3°C zeigte keine Veränderung der Dichte verglichen mit der Standardmethode. Bei 37 °C waren ca. 7 000 Zellen / mm² spezifisch auf den Quarz gebunden. Die Zugabe von LISS-Lösung oder bovinem Albumin 22 % führte zu keiner Veränderung der Erythrozytendichte. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 10 Minuten führte ebenfalls zu keiner Veränderung. Die Zentrifugation des belegten Quarzes für zwei Minuten brachte eine Erhöhung der Zelldichte auf ca. 9 000 Zellen / mm². Die Zelldichte erhöhte sich nach weiterer Zentrifugation nicht mehr (Abb. 3–23).

3.3 Blutgruppendetektion über eine Sandwichbeschichtung

3.3.1 Sandwichbeschichtung mit Anti-IgG

Der Quarz wurde mit Protein A, Anti-IgG und Anti-A BS 66 (Tab. 3–15) nach Standardmethoden beschichtet. Eine Variation war die Beschichtung bei 3 °C. Die Detektion der Blutgruppe A wurde mit Blut der Gruppe A₁ bzw. A₂, mit einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl in EDTA-TRIS-Lösung, nach Standardmethoden durchgeführt.

Für die Variation der Messtechnik bei der Blutgruppendetektion wurden mit Protein A, Anti-IgG und Anti-A BS 66 beschichtete Quarze verwendet. Die Beschichtung fand nach Standardmethoden statt. Es wurden Messungen bei 3 °C und bei 37 °C durchgeführt. Es wurde zur Blutprobe bovines Albumin 22 % hinzu gegeben, bzw. EDTA-TRIS durch LISS-Lösung ersetzt. Die Immobilisationszeit wurde auf 10 Minuten verlängert und eine Zentrifugation des belegten Quarzes bei 22 °C mit 2200 U / min für 2, 5 und 10 Minuten durchgeführt. Die Detektion der Blutgruppe A wurde mit Blut der Gruppe A₁ bzw. A₂, mit einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl in EDTA-TRIS-Lösung, nach Standardmethoden durchgeführt.

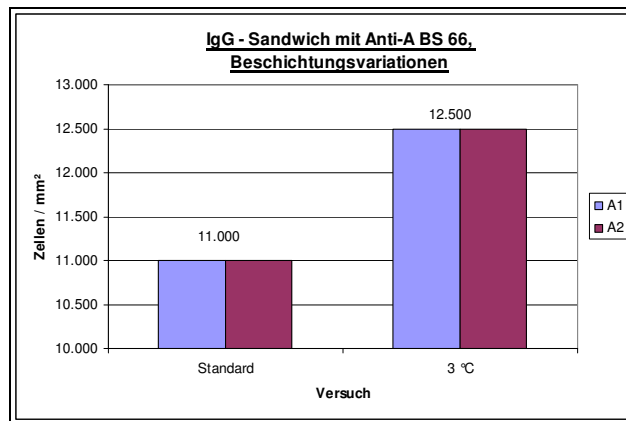
Allen Versuchen gingen Kontrollproben mit Blut der Gruppe B voraus.

| Antikörper | Konzentration | Masse bei 40 µl | Moleküle | Moleküle bei 40 µl | Titer |
|--------------|---------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| Anti-IgG | 2,4 mg / ml | 96 µg | $1,6 \cdot 10^{15}$ / ml | $6,4 \cdot 10^{13}$ | 1 : 1024 |
| Anti-A BS 66 | 3,3 mg / ml | 132 µg | $1,2 \cdot 10^{16}$ / ml | $4,8 \cdot 10^{14}$ / ml | 1 : 256 |

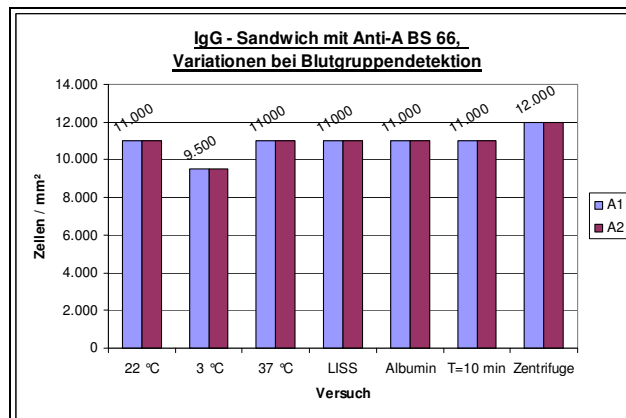
Tabelle 3-15

Konzentration, Masse und Titer der Antikörper Anti-IgG und Anti-A BS 66

Ergebnis

**Abbildung 3-24**

Detektion der Blutgruppe A₁ und A₂ über einen IgG-Sandwich mit Variationen bei der Beschichtung des Quarzes
Ergebnis in Zellen / mm²

**Abbildung 3-25**

Detektion der Blutgruppe A₁ und A₂ über IgG-Sandwich mit Variationen bei der Blutgruppenbestimmung
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den Blutgruppen A₁ und A₂ traten nicht auf.

Die Blutgruppendetektionen, bei Beschichtung und Messung unter Standardbedingungen, zeigten eine Dichte von ca. 11 000 spezifisch gebundenen Erythrozyten pro mm².

Die Beschichtung bei 3 °C zeigte in der anschließenden Messung eine Belegung mit ca. 12 500 Zellen / mm² (Abb. 3–24).

Die Messung bei 3 °C zeigte ca. 9 500 Zellen / mm², bei 37 °C waren ca. 11 000 Zellen / mm² auf der Quarzoberfläche spezifisch gebunden (Abb. 3–25). Die Zugabe von LISS-Lösung oder bovinem Albumin 22 % führt ebenso wie die Verlängerung der Inkubationszeit auf 10 Minuten, zu keiner Veränderung der Belegungsdichte. Die Zentrifugation des belegten Quarzes für zwei Minuten ergab eine Erhöhung der spezifisch gebundenen roten Blutkörperchen auf ca. 12 000 Zellen / mm². Weitere Zentrifugationen führten zu keiner weiteren Veränderung der Erythrozytendichte.

3.3.2 Sandwichbeschichtung mit Anti-IgM

Der Quarz wurde mit Protein A, Anti-IgM und Anti-A Birma I bzw. Anti-B LB 2 (Tab. 3–16) beschichtet. Die Beschichtung fand nach Standardmethoden statt. Es wurden Messungen nach Standardbedingungen und Variationen der Messtechnik durchgeführt. Messungen mit Temperaturvariationen bei 3 °C und 37 °C. Messungen mit Zugabe von bovinem Albumin 22 %, bzw. Austausch des EDTA-TRIS durch LISS-Lösung. Die Immobilisationszeit wurde auf 10 Minuten verlängert und eine Zentrifugation des belegten Quarzes bei 22 °C mit 2200 U / min für 2, 5 und 10 Minuten durchgeführt. Die Blutgruppendetektionen wurden mit Blut der Gruppe A₁ und A₂, bzw. mit Blut der Gruppe B, mit einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl in EDTA-TRIS-Lösung, nach Standardmethoden durchgeführt.

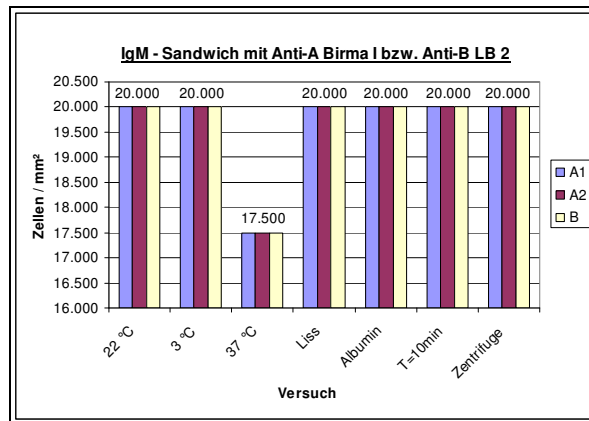
Allen Versuchen gingen Kontrollproben mit Blut der Gruppe B, bzw. A₁ voraus.

| Antikörper | Konzentration | Masse bei 40 µl | Moleküle | Moleküle bei 40 µl | Titer |
|----------------|---------------|-----------------|--------------------------|---------------------|----------|
| Anti-IgM | 1,8 mg / ml | 72 µg | $1,2 \cdot 10^{15}$ / ml | $4,8 \cdot 10^{13}$ | 1 : 1024 |
| Anti-A Birma I | 1,2 mg / ml | 48 µg | $8 \cdot 10^{14}$ / ml | $3,2 \cdot 10^{13}$ | 1 : 256 |
| Anti-B LB 2 | 1,4 mg / ml | 56 µg | $9,3 \cdot 10^{14}$ | $3,7 \cdot 10^{13}$ | 1 : 256 |

Tabelle 3–16

Konzentration, Masse und Titer der Antikörper Anti-IgM, Anti-A Birma I und Anti-B LB 2

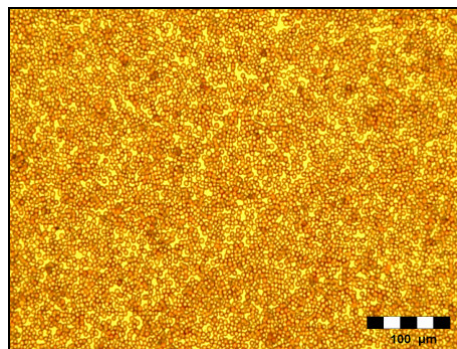
Ergebnis

**Abbildung 3-26**

Detektion der Blutgruppe A₁, A₂ bzw. B über einen IgM-Sandwich mit Variationen bei der Blutgruppendetektion
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Unterschiede in den Ergebnissen zwischen A₁, A₂ und B traten nicht auf.

**Abbildung 3-27**

Detektion der Blutgruppe A₁ über einen IgM-Sandwich unter Standardbedingungen
100fache Vergrößerung

Die Blutgruppendetektionen, bei Messung unter Standardbedingungen, zeigten eine Dichte von ca. 20 000 spezifisch gebundenen Erythrozyten pro mm² (Abb. 3-27). Die Messung bei 3 °C zeigte keine Veränderungen gegenüber den Standardmessungen. Bei einer Temperatur von 37 °C waren ca. 17 500 Zellen / mm² auf der Quarzoberfläche spezifisch gebunden (Abb. 3-26). Die Zugabe von LISS-Lösung oder bovinem Albumin 22 % führte ebenso wie die Verlängerung der Inkubationszeit auf 10 Minuten und die Zentrifugation des mit Erythrozyten belegten Quarzes zu keiner Veränderung der Belegungsdichte.

3.4 Detektion antikörperbeladener Erythrozyten

3.4.1 Immobilisation auf einer Protein A Schicht

3.4.1.1 Monoklonale Antikörper

Es wurden Erythrozyten der Blutgruppe A₁ mit Antikörpern Anti-A BS 66 nach Standardmethoden inkubiert und im Anschluss gewaschen. Die Konzentration betrug ca. 500 000 Zellen / μl verdünnt in EDTA-TRIS-Lösung (Tab. 3-17 und 3-18). Der Quarz wurde nach Standardmethoden präpariert und mit Protein A beschichtet (Tab. 3-19).

Die Messung im Dummy erfolgte nach Standardmethoden. Als Variationen wurde die Messung bei 3 °C und 37 °C durchgeführt, sowie mit Zusätzen von LISS-Lösung und bovinem Albumin. Ferner wurde die Immobilisationszeit der Blutprobe auf 10 Minuten verlängert und ein belegter Quarz bei 2200 U / min für 2, 5 und 10 Minuten zentrifugiert.

Allen Versuchen ging eine Kontrollprobe mit gewaschenem Blut der Gruppe A₁, das nicht mit Antikörpern inkubiert wurde und eine Kontrollprobe mit Blut der Gruppe A₁ das mit monoklonalen Anti-A Birma I Immunglobulinen vom IgM Typ, inkubiert wurde, voraus. Die Kontrollproben lagen in einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / μl in EDTA-TRIS-Lösung vor.

| Verdünnung | Zellkonzentration | Zellen / 500 μl | A-Antigenkonz. | A-Antigen / 500 μl |
|------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| 1 : 10 | $5 \cdot 10^5 / \mu\text{l}$ | $2,5 \cdot 10^8 / \mu\text{l}$ | 800 000 / Zelle | $2 \cdot 10^{14}$ |

Tabelle 3-17

Zell- und Antigenkonzentration von Blut der Gruppe A₁

| Antikörper | Konzentration | Masse / 500 μl | Moleküle | Moleküle / 500 μl | Titer | theor. Sättigung |
|--------------|---------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------|------------------|
| Anti-A BS 66 | 3,3 mg / ml | 1,7 mg / ml | $1,2 \cdot 10^{16} / \text{ml}$ | $6 \cdot 10^{15}$ | 1 : 256 | 3 000 % |

Tabelle 3-18

Konzentration, Masse und Titer des Antikörpers Anti-A BS 66 (IgG)

| Schicht | Konzentration | Masse bei 40 μl | Moleküle | Moleküle bei 40 μl |
|-----------|---------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Protein A | 2 mg / ml | 0,08 mg | $2,87 \cdot 10^{16} / \text{ml}$ | $1,15 \cdot 10^{15} / \text{ml}$ |

Tabelle 3-19

Konzentration, Masse und Molekülanzahl von Protein A

Ergebnis

| Verdünnung | Standard | 3 °C | 37 °C | LISS | Albumin | T=10 min | Zentrifugation |
|------------|----------|------|-------|------|---------|----------|----------------|
| ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |

Tabelle 3-20

Detektion antikörperbeladener Erythrozyten der Blutgruppe A₁, inkubiert mit Anti-A BS 66 (IgG), über einen Protein A Monolayer
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Die Detektion von mit Anti-A BS 66 belegten Erythrozyten zeigte unter Standardmethoden und unter Variation der Bedingungen keine spezifische Bindung von roten Blutkörperchen auf der Protein A Schicht (Tab. 3-20).

Antikörper aus Plasma

Es wurden Erythrozyten der Blutgruppe A₁ mit unverdünntem Plasma der Blutgruppe 0 nach Standardmethoden inkubiert und im Anschluss gewaschen. Die Konzentration betrug ca. 500 000 Zellen / µl verdünnt in EDTA-TRIS-Lösung (Tab. 3-21 und 3-22). Der Quarz wurde nach Standardmethoden präpariert und mit einer Protein A Schicht beschichtet (Tab. 3-23).

Die Messung im Dummy erfolgte nach Standardmethoden. Als Variationen der Messung wurde die Messung bei 3 °C und bei 37 °C durchgeführt, sowie mit Zusätzen von LISS-Lösung und bovinem Albumin. Ferner wurde die Immobilisationszeit der Blutprobe auf 10 Minuten verlängert und ein belegter Quarz bei 2200 U / min für 2, 5 und 10 Minuten zentrifugiert.

Allen Versuchen ging eine Kontrollprobe mit gewaschenem Blut der Gruppe A₁, das nicht mit Antikörpern inkubiert wurde, voraus. Die Kontrollproben lagen in einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl in EDTA-TRIS-Lösung vor.

| Verdünnung | Zellkonzentration | Zellen / 500 µl | A-Antigenkonz. | A-Antigen / 500 µl |
|------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------|
| 1 : 10 | $5 \cdot 10^5 / \mu\text{l}$ | $2,5 \cdot 10^8 / \mu\text{l}$ | 800 000 / Zelle | $2 \cdot 10^{14}$ |

Tabelle 3-21

Zell- und Antigenkonzentration von Blut der Gruppe A₁

| Antikörper | Konzentration | Masse / 500 µl | Moleküle | Moleküle / 500 µl | Titer | theor. Sättigung |
|------------------------|---------------|----------------|----------|-------------------|----------|------------------|
| Plasma 0 Anti-A IgG | k. A. | k. A. | k. A. | k. A. | 1 : 1024 | k. A. |

Tabelle 3-22

Konzentration, Masse und Titer der natürlichen Antikörper Anti-A (IgG) aus Plasma der Blutgruppe 0

| Schicht | Konzentration | Masse bei 40 μ l | Moleküle | Moleküle bei 40 μ l |
|-----------|---------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|
| Protein A | 2 mg / ml | 0,08 mg | $2,87 \cdot 10^{16}$ / ml | $1,15 \cdot 10^{15}$ / ml |

Tabelle 3–23
Konzentration, Masse und Molekülanzahl von Protein A

Ergebnis

| Verdünnung | Standard | 3 °C | 37 °C | Liss | Albumin | T=10 min | Zentrifugation |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| \emptyset | \emptyset | \emptyset | \emptyset | \emptyset | \emptyset | \emptyset | \emptyset |

Tabelle 3–24
Detektion antikörperbeladener Erythrozyten der Blutgruppe A₁, inkubiert mit natürlichem Anti-A (IgG), über einen Protein A Monolayer
Ergebnis in Zellen / mm²

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Die Detektion von Erythrozyten, die mit natürlichen Plasmaantikörpern des IgG–Typs der Blutgruppe 0 inkubiert wurden, zeigte bei allen Versuchen keine spezifische Bindung von roten Blutkörperchen auf der Protein A Schicht (Tab. 3–24).

3.4.2 Immobilisation auf einer Anti–Ig–Immunglobulin Schicht

3.4.2.1 Monoklonale Antikörper

Der Quarz wurde mit einer Protein A Schicht und einer Anti–Ig–Immunglobulin Schicht gegen IgG bzw. IgM beschichtet (Tab. 3–25). Bei dem zu detektierenden Analyt handelte es sich um Blut der Gruppe A₁, das mit monoklonalen Antikörpern Anti–A BS 66, ein IgG, bzw. Anti–A Birma I, eine IgM, inkubiert und im Anschluss gewaschen worden war. Die Konzentration betrug ca. 500 000 Zellen / μ l verdünnt in EDTA–TRIS–Lösung (Tab. 3–26). Die Verdünnungen der Antikörperlösungen reichten von der Ausgangskonzentration bis zu einer Verdünnung von 1 : 512 (Tab. 3–27 und 3–28).

Die Messungen wurden unter Standardmethoden und bei Temperaturen von 3 °C und 37 °C durchgeführt, sowie mit Zusätzen von LISS–Lösung und bovinem Albumin. Als Variation der Messung wurde die Immobilisationszeit auf 10 Minuten verlängert und ein mit Erythrozyten belegter Quarz, für 2, 5 und 10 Minuten bei 2200 U / min zentrifugiert.

Allen Versuchen ging eine Kontrollprobe mit gewaschenem Blut der Gruppe A₁, das nicht mit Antikörpern inkubiert wurde und eine Kontrollprobe mit Blut der Gruppe A₁ das mit monoklonalen Anti-A Birma I Immunglobulinen vom IgM-Typ, bzw. mit monoklonalen Anti-A BS 66 Immunglobulinen vom IgG-Typ inkubiert wurde, voraus. Die Kontrollproben lagen in einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl in EDTA-TRIS-Lösung vor.

| Antikörper | Konzentration | Masse bei 40 µl | Moleküle | Moleküle bei 40 µl | Titer |
|------------|---------------|-----------------|--------------------------|---------------------|----------|
| Anti-IgG | 2,4 mg / ml | 96 µg | $1,6 \cdot 10^{15}$ / ml | $6,4 \cdot 10^{13}$ | 1 : 1024 |
| Anti-IgM | 1,8 mg / ml | 72 µg | $1,2 \cdot 10^{15}$ / ml | $4,8 \cdot 10^{13}$ | 1 : 1024 |

Tabelle 3-25

Konzentration, Masse und Titer der Antikörper Anti-Ig

| Verdünnung | Zellkonzentration | Zellen bei 500 µl | A-Antigenkonz. | A-Antigene bei 500 µl |
|------------|---------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| 1 : 10 | $5 \cdot 10^5$ / µl | $2,5 \cdot 10^8$ / µl | 800 000 / Zelle | $2 \cdot 10^{14}$ |

Tabelle 3-26Zell- und Antigenkonzentration von Blut der Gruppe A₁

| Verdünnung | Konzentration | Masse / 500 µl | Moleküle | Moleküle / 500 µl | theor. Sättigung | Titer |
|------------|---------------|----------------|--------------------------|--------------------------|------------------|---------|
| ∅ | 3,3 mg / ml | 1,7 mg / ml | $1,2 \cdot 10^{16}$ / ml | $6 \cdot 10^{15}$ / ml | 3 000 % | 1 : 256 |
| 1 : 1 | 1,7 mg / ml | 0,8 mg / ml | $6 \cdot 10^{15}$ / ml | $3 \cdot 10^{15}$ / ml | 1 500 % | |
| 1 : 2 | 0,8 mg / ml | 0,4 mg / ml | $3 \cdot 10^{15}$ / ml | $1,5 \cdot 10^{15}$ / ml | 750 % | |
| 1 : 4 | 0,4 mg / ml | 0,2 mg / ml | $1,5 \cdot 10^{15}$ / ml | $7,3 \cdot 10^{14}$ / ml | 375 % | |
| 1 : 8 | 0,2 mg / ml | 0,1 mg / ml | $7,3 \cdot 10^{14}$ / ml | $3,7 \cdot 10^{14}$ / ml | 188 % | |
| 1 : 16 | 0,1 mg / ml | 55 µg / ml | $3,7 \cdot 10^{14}$ / ml | $1,9 \cdot 10^{14}$ / ml | 94 % | |
| 1 : 32 | 55 µg / ml | 28 µg / ml | $1,9 \cdot 10^{14}$ / ml | $1 \cdot 10^{14}$ / ml | 47 % | |
| 1 : 64 | 28 µg / ml | 14 µg / ml | $1 \cdot 10^{14}$ / ml | $5 \cdot 10^{13}$ / ml | 24 % | |
| 1 : 128 | 14 µg / ml | 7 µg / ml | $5 \cdot 10^{13}$ / ml | $2,5 \cdot 10^{13}$ / ml | 12 % | |
| 1 : 256 | 7 µg / ml | 3,5 µg / ml | $2,5 \cdot 10^{13}$ / ml | $1,3 \cdot 10^{13}$ / ml | 6 % | |
| 1 : 512 | 3,5 µg / ml | 1,8 µg / ml | $1,3 \cdot 10^{13}$ / ml | $6,5 \cdot 10^{12}$ / ml | 3 % | |

Tabelle 3-27

Konzentration, Masse und Titer des Antikörpers Anti-A BS 66 (IgG)

| Verdünnung | Konzentration | Masse / 500 µl | Moleküle | Moleküle / 500 µl | theor. Sättigung | Titer |
|------------|---------------|----------------|--------------------------|---------------------|------------------|---------|
| ∅ | 1,2 mg / ml | 0,6 mg / ml | $8 \cdot 10^{14}$ / ml | $4 \cdot 10^{14}$ | 200 % | 1 : 256 |
| 1 : 1 | 0,6 mg / ml | 0,3 mg / ml | $4 \cdot 10^{14}$ / ml | $2 \cdot 10^{14}$ | 100 % | |
| 1 : 2 | 0,3 mg / ml | 0,15 mg / ml | $2 \cdot 10^{14}$ / ml | $1 \cdot 10^{14}$ | 50 % | |
| 1 : 4 | 0,15 mg / ml | 75 µg / ml | $1 \cdot 10^{14}$ / ml | $5 \cdot 10^{13}$ | 25 % | |
| 1 : 8 | 75 µg / ml | 38 µg / ml | $5 \cdot 10^{13}$ / ml | $2,5 \cdot 10^{13}$ | 13 % | |
| 1 : 16 | 38 µg / ml | 19 µg / ml | $2,5 \cdot 10^{13}$ / ml | $1,3 \cdot 10^{13}$ | 6 % | |
| 1 : 32 | 19 µg / ml | 9,5 µg / ml | $1,3 \cdot 10^{13}$ / ml | $6,5 \cdot 10^{12}$ | 3 % | |
| 1 : 64 | 9,5 µg / ml | 5 µg / ml | $6,5 \cdot 10^{12}$ / ml | $3,3 \cdot 10^{12}$ | 1,5 % | |
| 1 : 128 | 5 µg / ml | 2,5 µg / ml | $3,3 \cdot 10^{12}$ / ml | $1,7 \cdot 10^{12}$ | 0,75 % | |
| 1 : 256 | 2,5 µg / ml | 1,3 µg / ml | $1,7 \cdot 10^{12}$ / ml | $8,5 \cdot 10^{11}$ | 0,32 % | |
| 1 : 512 | 1,3 µg / ml | 0,7 µg / ml | $8,5 \cdot 10^{11}$ / ml | $4,3 \cdot 10^{11}$ | 0,16 % | |

Tabelle 3-28

Konzentration, Masse und Titer des Antikörpers Anti-A Birma I (IgM)

Ergebnis IgG

| Verdünnung | Standard | 3 °C | 37 °C | LISS | Albumin | T=10 min | Zentrifugation |
|------------|----------|------|-------|------|---------|----------|----------------|
| ∅ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 2 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 4 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 8 | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 16 | ++ | + | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ |
| 1 : 32 | ++ | + | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ |
| 1 : 64 | + | ∅ | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| 1 : 128 | ∅ | ∅ | + | ++ | + | ∅ | ++ |
| 1 : 256 | ∅ | ∅ | ∅ | + | ∅ | ∅ | + |
| 1 : 512 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |

Tabelle 3-29

Detektion antikörperbeladener Erythrozyten der Blutgruppe A₁, inkubiert mit Anti-A BS 66 (IgG), über eine Anti-IgG-Beschichtung
 +++ => hohe Dichte an Agglutinaten
 ++ => mittlere Dichte an Agglutinaten
 + => geringe Dichte an Agglutinaten
 ∅ => keine Agglutinate gebunden

Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

Die Messung unter Standardbedingungen zeigte eine hohe Dichte an gebundenen Agglutinaten bei unverdünnter Antikörperlösung, bei einer Verdünnung von 1 : 64 noch eine geringe Dichte (Tab. 3-29). Die Messung bei 37 °C zeigte noch eine geringe Dichte an Agglutinaten bei einer Verdünnung von 1 : 128. Die Messung bei einer Temperatur von 3 °C zeigte insgesamt eine geringere Dichte der gebundenen Agglutinate. Agglutinate aus Erythrozyten, welche mit einer verdünnten Antikörperlösung im Verhältnis 1 : 64 inkubiert waren, konnten nicht mehr nachgewiesen werden. Die Zugabe von LISS-Lösung und bovinem Albumin 22 % führte insgesamt zu einer höheren Belegungsdichte. Bei LISS-Lösung war eine Detektion bis zur Verdünnung von 1 : 256 möglich. Die Verlängerung der Immobilisationszeit auf 10 Minuten führte zu keiner Erhöhung der Belegungsdichte. Die Zentrifugation eines Quarzes führte insgesamt zu einer höheren Belegungsdichte und einer positiven Reaktion bis zu einer Verdünnung von 1 : 256.

Ergebnis IgM

| Verdünnung | Standard | 3 °C | 37 °C | LISS | Albumin | T=10 min | Zentrifugation |
|------------|----------|------|-------|------|---------|----------|----------------|
| unverdünnt | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 2 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 4 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 8 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 16 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 32 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 64 | ++ | +++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 1 : 128 | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 1 : 256 | + | + | ∅ | + | + | + | + |
| 1 : 512 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | + |

Tabelle 3-30

Detektion antikörperbeladener Erythrozyten der Blutgruppe A₁, inkubiert mit Anti-A Birma I (IgM), über eine Anti-IgM-Beschichtung
 +++ => hohe Dichte an Agglutinen
 ++ => mittlere Dichte an Agglutinen
 + => geringe Dichte an Agglutinen
 ∅ => keine Agglutinate gebunden

Alle Kontrollproben zeigten keine Bindung von Agglutinen auf der Quarzoberfläche.

Die Blutgruppendetektion unter Standardbedingungen zeigte eine hohe spezifische Belegung mit Agglutinen bei unverdünnter Antikörperlösung und bei einer Verdünnung 1 : 256 noch eine geringe Dichte (Tab. 3-30 und Abb. 3-28). Die Detektion bei 3 °C zeigte eine etwas dichtere Belegung als bei Standardbedingungen. Die Messung bei 37 °C zeigte eine geringere Belegungsdichte. Eine Detektion war bis zu einer Verdünnung der Antikörperlösung von 1 : 128 möglich. Die Zugabe von LISS-Lösung bzw. bovinem Albumin 22 % zur Messung führte zu einer größeren Dichte an gebundenen Agglutinen. Die Verlängerung der Immobilisationszeit auf 10 Minuten zeigte keine Veränderung der Dichte verglichen mit der Messung nach Standardmethoden. Die Zentrifugation eines Quarzes führte insgesamt zu einer höheren Belegungsdichte und einer positiven Reaktion bis zu einer Verdünnung von 1 : 512.

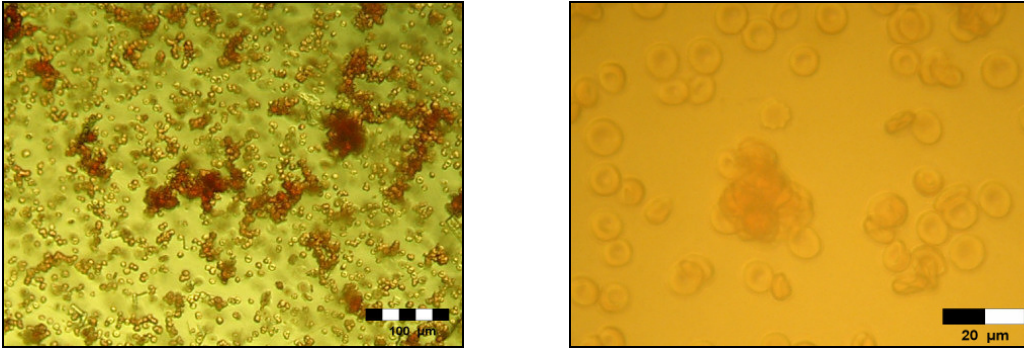
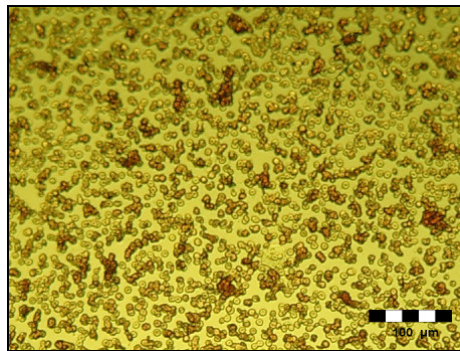


Abbildung 3–28

Detektion von mit Anti–A Birma I (IgM) inkubierten Erythrozyten der Blutgruppe A₁
oben–links: hohe Antikörperkonzentration, viele und größerer Agglutinate, 100fache Vergrößerung
oben–rechts: hohe Antikörperkonzentration, viele und größerer Agglutinate, 500fache Vergrößerung
unten: niedrige Antikörperkonzentration, weniger und kleinere Agglutinate, 100fache Vergrößerung



Coombstest mit DiaMed–System

Mit Erythrozyten, die mit IgG, Anti–A BS 66 bzw. IgM, Anti–A Birma I inkubiert worden waren und in einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / mm² in Diluent 1 Lösung vorlagen, wurde ein direkter Coombstest mit dem DiaMed–System durchgeführt.

Ergebnis

Unterschiede zwischen mit IgM und IgG inkubierten Erythrozyten ließen sich nicht feststellen.

Die Versuche mit Erythrozyten, die mit unverdünnter Antikörperlösung inkubiert worden waren, zeigten eine sehr stark positive Reaktion. Eine schwach positive Reaktion konnte bei Verdünnung der Antikörperlösung auf 1 : 256 beobachtet werden. Eine Detektion bei im Verhältnis 1 : 512 verdünnter Antikörperlösung war nicht mehr möglich (Tab. 3–31).

| Verdünnung | Anti-IgG | Anti-IgM |
|------------|----------|----------|
| ∅ | ++++ | ++++ |
| 1 : 1 | ++++ | ++++ |
| 1 : 2 | ++++ | ++++ |
| 1 : 4 | ++++ | ++++ |
| 1 : 8 | +++ | +++ |
| 1 : 16 | +++ | +++ |
| 1 : 32 | +++ | +++ |
| 1 : 64 | ++ | ++ |
| 1 : 128 | ++ | ++ |
| 1 : 256 | + | + |
| 1 : 512 | - | - |

Tabelle 3-31

Detektion antikörperbeladener Erythrozyten der Blutgruppe A₁ im DiaMed-System, inkubiert mit Anti-A BS 66 (IgG) bzw. Anti-A Birma I (IgM)

++++ => Erythrozyten bleiben vollständig auf der Säule

+++ => Erythrozyten bleiben auf der Säule, Schlieren in der Säule

++ => Erythrozyten in der Säule

+ => Erythrozyten auf Säulenboden mit Schlieren in der Säule

- => Erythrozyten komplett auf dem Säulenboden

3.4.2.2 Antikörper aus Plasma

Der Quarz wurde mit einer Protein A Schicht und einer Anti-Ig-Immunglobulin Schicht gegen IgG bzw. IgM nach Standardmethoden beschichtet (Tab. 3-32). Bei dem zu detektierenden Analyt handelte es sich um Blut der Gruppe A₁, das überwiegend mit immunogenen Antikörpern des Typs IgG aus einem Plasmapool der Blutgruppe 0, bzw. mit überwiegend natürlichen Antikörpern des Typs IgM aus einem Plasmapool der Blutgruppe B, nach Standardmethoden inkubiert wurde. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörperlösungen reichten von der Ausgangskonzentration bis zu einer Verdünnung von 1 : 512 (Tab. 3-34). Die Konzentration der Blutproben betrug ca. 500 000 Zellen / µl verdünnt in EDTA-TRIS-Lösung (Tab. 3-33).

Die Messungen wurden unter Standardmethoden und bei Temperaturen von 3 °C und 37 °C durchgeführt, sowie mit Zusätzen von LISS-Lösung und bovinem Albumin. Die Immobilisationszeit wurde auf 10 Minuten verlängert und ein mit Erythrozyten belegter Quarz, für 2, 5 und 10 Minuten bei 2200 U / min, zentrifugiert.

Allen Versuchen gingen Kontrollproben mit gewaschenem Blut der Gruppe A₁, das nicht mit Antikörpern inkubiert wurde, voraus. Die Kontrollproben lagen in einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / µl in EDTA-TRIS-Lösung vor.

| Antikörper | Konzentration | Masse bei 40 µl | Moleküle | Moleküle bei 40 µl | Titer |
|------------|---------------|-----------------|--------------------------|---------------------|----------|
| Anti-IgG | 2,4 mg / ml | 96 µg | $1,6 \cdot 10^{15}$ / ml | $6,4 \cdot 10^{13}$ | 1 : 1024 |
| Anti-IgM | 1,8 mg / ml | 72 µg | $1,2 \cdot 10^{15}$ / ml | $4,8 \cdot 10^{13}$ | 1 : 1024 |

Tabelle 3-32

Konzentration, Masse und Titer der Antikörper Anti-Ig

| Verdünnung | Zellkonzentration | Zellen bei 500 µl | A-Antigenkonz. | A-Antigen bei 500 µl |
|------------|---------------------|-----------------------|-----------------|----------------------|
| 1 : 10 | $5 \cdot 10^5$ / µl | $2,5 \cdot 10^8$ / µl | 800 000 / Zelle | $2 \cdot 10^{14}$ |

Tabelle 3-33Zell- und Antigenkonzentration von Blut der Gruppe A₁

| Antikörper | Konzentration | Masse / 500 µl | Moleküle | Moleküle / 500 µl | Titer | theor. Sättigung |
|------------------------|---------------|----------------|----------|-------------------|---------|------------------|
| Plasma 0 Anti-A IgG | k. A. | k. A. | k. A. | k. A. | 1 : 512 | k. A. |
| Plasma B Anti-A IgM | k. A. | k. A. | k. A. | k. A. | 1 : 256 | k. A. |

Tabelle 3-34

Konzentration, Masse und Titer des natürlichen Antikörpers Anti-A (IgG) aus Plasma der Blutgruppe 0, bzw. Anti-A (IgM) aus Plasma der Blutgruppe B

Ergebnis IgG

| Verdünnung | Standard | 3 °C | 37 °C | LISS | Albumin | T=10 min | Zentrifugation |
|------------|----------|------|-------|------|---------|----------|----------------|
| ∅ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 2 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 4 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 8 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 16 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 32 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 64 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 128 | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 256 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| 1 : 512 | + | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ |

Tabelle 3-35

Detektion antikörperbeladener Erythrozyten der Blutgruppe A₁ inkubiert mit Plasma der Blutgruppe 0 (IgG), über eine Anti-IgG-Beschichtung
 +++ => hohe Dichte an Agglutinaten
 ++ => mittlere Dichte an Agglutinaten
 + => geringe Dichte an Agglutinaten
 ∅ => keine Agglutinate gebunden

Alle Kontrollproben zeigten keine Bindung von Erythrozyten auf der Quarzoberfläche.

Die Messung unter Standardbedingungen und bei unverdünnter Antikörperlösung, zeigte eine hohe Dichte an spezifisch gebundenen Agglutinaten. Eine Verdünnung auf 1 : 512 zeigte eine geringere Dichte. Die Detektion bei 3 °C zeigte eine etwas geringere Belegungsichte als unter Standardbedingungen. Die Messung bei 37 °C eine etwas dichtere Belegung. Die Zugabe von LISS-Lösung und bovinem Albumin

22 % führte zu einer höheren Belegungsdichte und einer mittleren Dichte von Agglutinat bei einer Verdünnung der Plasmalösung von 1 : 512. Die Verlängerung der Immobilisationszeit auf 10 Minuten führt zu keiner Erhöhung der Belegungsdichte. Die Zentrifugation eines Quarzes führte zu einer etwas höheren Belegungsdichte. Der Nachweis von gebundenen Agglutinaten war unter Zentrifugation bis zu einer Verdünnung der Plasmalösung von 1 : 512 (Tab. 3–35) möglich.

Ergebnis IgM

| Verdünnung | Standard | 3 °C | 37 °C | LISS | Albumin | T=10 min | Zentrifugation |
|------------|----------|------|-------|------|---------|----------|----------------|
| ∅ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 2 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 4 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 8 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 16 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 32 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 64 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 1 : 128 | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | +++ |
| 1 : 256 | + | ++ | + | ++ | ++ | + | ++ |
| 1 : 512 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | + |

Tabelle 3–36

Detektion antikörperbeladener Erythrozyten der Blutgruppe A₁ inkubiert mit Plasma der Blutgruppe B (IgM), über eine Anti-IgM-Beschichtung
 +++ => hohe Dichte an Agglutinaten
 ++ => mittlere Dichte an Agglutinaten
 + => geringe Dichte an Agglutinaten
 ∅ => keine Agglutinate gebunden

Alle Kontrollproben zeigten keine spezifische Bindung von Erythrozyten auf der Quarzoberfläche.

Die Messung unter Standardbedingungen und bei unverdünnter Antikörperlösung zeigte eine hohe Dichte an spezifisch gebundenen Agglutinaten. Eine Detektion war bis zur Verdünnung von 1 : 256 möglich. Die Messung zeigte bei 3 °C insgesamt eine höhere, bei 37 °C eine geringere Dichte an spezifisch gebundenen Agglutinaten. Die Zugabe von LISS-Lösung anstatt EDTA-TRIS-Lösung bzw. die Zugabe von bovinem Albumin zur EDTA-TRIS-Lösung, führte zu einer insgesamt höheren Belegungsdichte. Die Verlängerung der Immobilisationszeit auf 10 Minuten führte zu keiner Veränderung der Belegungsdichte. Die Zentrifugation eines Quarzes führte zu einer etwas höheren Belegungsdichte. Der Nachweis von gebundenen Agglutinaten war bis zu einer Verdünnung der Plasmalösung von 1 : 512 (Tab. 3–36) möglich.

Coombstest mit dem DiaMed System

Mit Erythrozyten, die mit Plasma der Blutgruppe 0, bzw. B inkubiert worden waren und in einer Konzentration von ca. 500 000 Zellen / mm² in Diluent 1 Lösung vorlagen, wurde ein direkter Coombstest mit dem DiaMed-System durchgeführt.

Ergebnis

| Verdünnung | Anti-IgG | Anti-IgM |
|------------|----------|----------|
| ∅ | ++++ | ++++ |
| 1 : 1 | ++++ | ++++ |
| 1 : 2 | ++++ | ++++ |
| 1 : 4 | ++++ | ++++ |
| 1 : 8 | +++ | +++ |
| 1 : 16 | +++ | +++ |
| 1 : 32 | +++ | +++ |
| 1 : 64 | ++ | +++ |
| 1 : 128 | ++ | ++ |
| 1 : 256 | ++ | ++ |
| 1 : 512 | ++ | - |

Tabelle 3-37

Detektion antikörperbeladener Erythrozyten der Blutgruppe A₁, inkubiert mit natürlichem Anti-A aus Plasma der Blutgruppe 0 (IgG) bzw. Anti-A aus Plasma der Blutgruppe B (IgM)

++++ => Erythrozyten bleiben vollständig auf der Säule

+++ => Erythrozyten bleiben auf der Säule, Schlieren in der Säule

++ => Erythrozyten in der Säule

+ => Erythrozyten auf Säulenboden mit Schlieren in der Säule

- => Erythrozyten komplett auf dem Säulenboden

Die Auswertung des DiaMed Versuches (Tab. 3-37) zeigte eine sehr stark positive Reaktion bei unverdünnter Antikörperlösung sowohl bei Anti-IgG, als auch bei Anti-IgM und eine positive Reaktion bis zu einer Verdünnung von 1 : 256 bei Anti-IgM und bis zu 1 : 512 bei Anti-IgG.

3.5 Regeneration von gebrauchten Quarzen

3.5.1 Regeneration mit Chemikalien

Die Regeneration des Quarzes mit Chemikalien wurde mit Aqua bidest, Salzsäure (HCl), Glycin, EDTA-TRIS-Lösung mit pH Werten von 6,5 und 9,5 und mit NaOH in unterschiedlicher Molarität, nach dem im Abschnitt Methodik beschriebenen Verfahren, durchgeführt. Es wurden Quarze regeneriert, die mit Anti-A BS 66 als

Monolayer, bzw. Anti-A Birma I als Sandwichbeschichtung beschichtet waren. Die Quarze waren zu einer Detektion von Blut der Gruppe A₁ bzw. A₂ herangezogen worden. Die Dichte der spezifisch gebundenen Erythrozyten betrug etwa 20 000 Zellen / mm². Nach erfolgreicher Regeneration wurden so genannte Wiederverwertbarkeitsversuche, die im Abschnitt Methoden beschrieben sind, mit Blut der Gruppe A₁, durchgeführt.

3.5.1.1 Regeneration mit Aqua bidest.

Die Regeneration des belegten Quarzes wurde mit zweifach destilliertem Wasser durchgeführt.

Ergebnis

| Versuch | Regeneration | Regeneration |
|-----------|----------------|----------------|
| | A ₁ | A ₂ |
| Monolayer | Hämolyse | Hämolyse |
| Sandwich | Hämolyse | Hämolyse |

Tabelle 3-38

Regeneration des Quarzes mit Aqua bidest., bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂, auf einem IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I

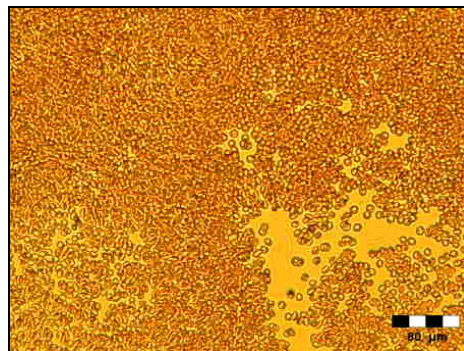


Abbildung 3-29

hämolytische Erythrozyten nach Regeneration mit Aqua bidest.

Die makroskopische und mikroskopische Untersuchung des Quarzes zeigte keine Ablösung von roten Blutkörperchen von der Quarzoberfläche. Dies gilt sowohl für beide Beschichtungen, als auch für beiden A-Untergruppen. Ein Großteil der Zellen hatte hämolysiert (Tab. 3-38 und Abb. 3-29).

3.5.1.2 Regeneration mit Salzsäure (HCl)

Die Regeneration des belegten Quarzes wurde mit HCl bei einem pH Wert von 1,5 durchgeführt.

Ergebnis

| Versuch | Regeneration | Regeneration |
|-----------|----------------|----------------|
| | A ₁ | A ₂ |
| Monolayer | +++ | +++ |
| Sandwich | +++ | +++ |

Tabelle 3–39

Regeneration des Quarzes mit HCl pH Wert 1,5, bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂, auf einem IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
+++ => alle Erythrozyten entfernt

| Versuch | direkt | + Anti-A | + Anti-IgM | + Protein A |
|-----------------------------|--------|-------------|---------------|----------------|
| Monolayer A ₁ | ∅ | ∅ | | 20 000 |
| Monolayer A ₂ | ∅ | ∅ | | 20 000 |
| Sandwich A ₁ | ∅ | ∅ | ∅ | 20 000 |
| Sandwich A ₂ | ∅ | ∅ | ∅ | 20 000 |

Tabelle 3–40

Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit HCl, spezifisch gebundene Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂ auf IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
Ergebnis in Zellen / mm²

Die Regeneration mit Salzsäure zeigte bei beiden Beschichtungs- und Belegungsmodellen ein positives Ergebnis (Tab. 3–39). Es hatten keine Erythrozyten mehr auf der Oberfläche gebunden. Der Wiederverwertbarkeitsversuch brachte im ersten Schritt kein positives Ergebnis, unabhängig von der Beschichtungsart. Nach der gesamten Rekonstruktion der Schichtarchitektur zeigte der Test bei beiden Beschichtungen und Belegungen eine spezifische Bindung von roten Blutkörperchen (Tab.3–40). Es wurden jeweils ca. 20 00 Zellen / mm² detektiert. Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

3.5.1.3 Regeneration mit Glycin

Die Regeneration des Quarzes wurde mit Glycin mit einem pH Wert von 2,9 durchgeführt.

Ergebnis

| Versuch | Regeneration | |
|-----------|----------------|----------------|
| | A ₁ | A ₂ |
| Monolayer | +++ | +++ |
| Sandwich | +++ | +++ |

Tabelle 3-41

Regeneration des Quarzes mit Glycin pH Wert 2,9, bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂, auf einem IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
+++ => alle Erythrozyten entfernt

| Versuch | direkte Blutgruppendetektion |
|--------------------------|------------------------------|
| Monolayer A ₁ | 16 000 |
| Monolayer A ₂ | 16 000 |
| Sandwich A ₁ | 17 000 |
| Sandwich A ₂ | 17 000 |

Tabelle 3-42

Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit Glycin, spezifisch gebundene Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂ auf IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
Ergebnis in Zellen / mm²

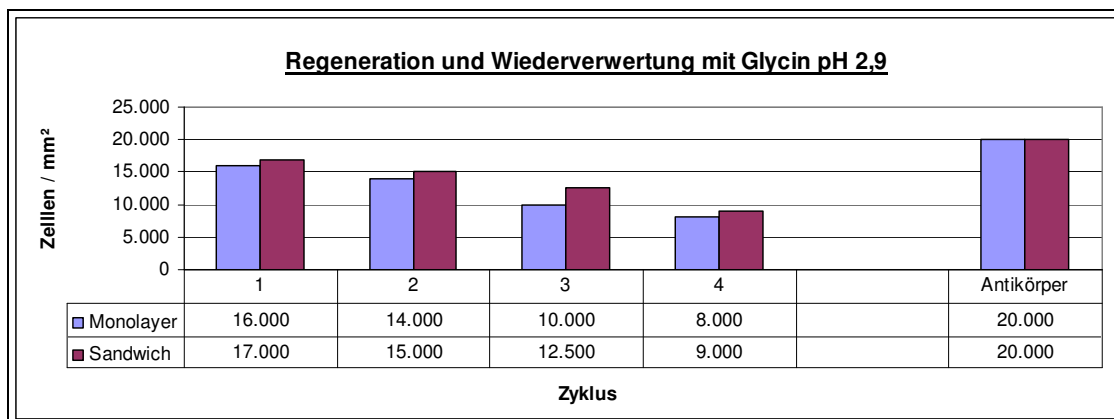


Abbildung 3-30

Regenerations- und Wiederverwertbarkeitszyklen nach Regeneration mit Glycin
Ergebnis in Zellen / mm²

Die Regeneration mit Glycin zeigte bei beiden Beschichtungs- und Belegungsmodellen ein positives Ergebnis (Tab. 3-41). Es hatten keine Erythrozyten mehr auf der Oberfläche gebunden.

Der Wiederverwertbarkeitsversuch zeigte im ersten Schritt bei beiden Beschichtungen ein positives Ergebnis. Die Dichte der Belegung mit spezifisch gebundenen Erythrozyten lag bei 16 000 Zellen / mm² bei der einfachen und ca. 17 000 Zellen / mm² bei der Sandwichbeschichtung (Tab. 3–42). Es fand sich weiterhin kein Unterschied zwischen den A Untergruppen. Die Wiederholung von Mess- und Regenerationszyklen zeigte eine stetige Abnahme der Belegungsdichte mit roten Blutkörperchen (Tab. 3–43). Nach dem vierten Zyklus wurde der Versuch abgebrochen. Eine erneute Beschichtung mit Anti–A BS 66, bzw. mit Anti–IgM und Anti–A Birma I, zeigte eine Erythrozytendichte von ca. 20 000 Zellen / mm². Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

3.5.1.4 Regeneration mit saurer und basischer EDTA–TRIS–Lösung

Die Regeneration mit saurer bzw. basischer EDTA–TRIS–Lösung wurde bei pH Werten von 4,0 bzw. 12,0 durchgeführt.

Ergebnis

| Versuch | Regeneration A ₁ | Regeneration A ₂ |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Monolayer pH 4,0 | Hämolyse | Hämolyse |
| Sandwich pH 4,0 | Hämolyse | Hämolyse |
| Monolayer pH 12,0 | Hämolyse | Hämolyse |
| Sandwich pH 12,0 | Hämolyse | Hämolyse |

Tabelle 3–43

Regeneration des Quarzes mit EDTA–TRIS pH 4 bzw. 12, bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂, auf einem IgG–Monolayer mit Anti–A BS 66 bzw. IgM–Sandwich mit Anti–A Birma I

Die Regeneration mit EDTA–TRIS Puffer zeigte im sauren und im alkalischen Bereich keine Ablösung von Erythrozyten von der Antikörperschicht (Tab. 3–43). Es fand sich ein großer Teil hämolytischer Erythrozyten.

3.5.1.5 Regeneration mit NaOH unterschiedlicher Molarität

0,1 molare NaOH Lösung

Es wurde 0,1 molare Natriumhydroxid Lösung zur Regeneration verwendet.

Ergebnis

| Versuch | Regeneration A ₁ | Regeneration A ₂ |
|-----------|--------------------------------|--------------------------------|
| Monolayer | +++ | +++ |
| Sandwich | +++ | +++ |

Tabelle 3-44

Regeneration des Quarzes mit NaOH 0,1 molar, bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂, auf einem IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
+++ => alle Erythrozyten entfernt

| Versuch | direkt | + Anti-A | + Anti-IgM | + Protein A |
|-----------------------------|--------|-------------|---------------|----------------|
| Monolayer A ₁ | ∅ | 20 000 | | XXXX |
| Monolayer A ₂ | ∅ | 20 000 | | XXXX |
| Sandwich A ₁ | ∅ | ∅ | 20 000 | XXXX |
| Sandwich A ₂ | ∅ | ∅ | 20 000 | XXXX |

Tabelle 3-45

Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit NaOH 0,1 molar, spezifisch gebundene Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂ auf IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
Ergebnis in Zellen / mm²

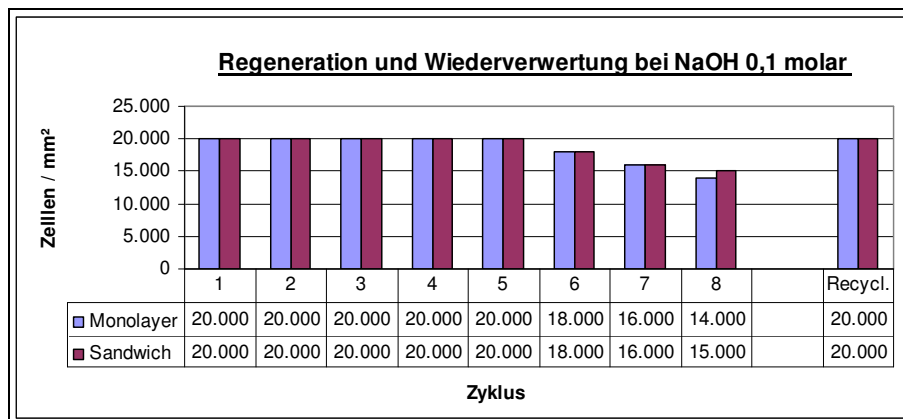


Abbildung 3-31

Regenerations- und Wiederverwertbarkeitszyklen nach Regeneration mit NaOH 0,1 molar
Ergebnis in Zellen / mm²

Die Regeneration war bei beiden Schichtsystemen und A-Untergruppen erfolgreich. Die Erythrozyten wurden vollständig von der Oberfläche entfernt (Tab. 3-44). Der Wiederverwertbarkeitstest war im ersten Schritt ohne erneute Beschichtung negativ. Bei zusätzlicher Antikörperbelegung mit BS 66, bzw. Anti-IgM und Anti-A Birma I, konnte eine Belegung der Oberfläche mit Erythrozyten in einer Dichte von ca. 20 000

Zellen / mm² erreicht werden (Tab. 3–45). Insgesamt ließ sich diese Prozedur fünfmal wiederholen, bis die Dichte der gebundenen Erythrozyten abfiel. Bei achtmaliger Regeneration betrug die Dichte der detektierten Erythrozyten immer noch ca. 14 000 Zellen / mm² bei einfacher Beschichtung und ca. 15 000 Zellen / mm² bei Sandwichbeschichtung. Ein anschließendes Recycling mit Piranha, eine erneute Beschichtung nach Standardmethoden und eine weitere Blutgruppenbestimmung zeigte eine Erythrozytendichte von ca. 20 000 Zellen / mm² (Abb. 3–31). Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

3 molare NaOH Lösung

Es wurde 3 molare Natriumhydroxid Lösung zur Regeneration verwendet

Ergebnis

| Versuch | Regeneration A ₁ | Regeneration A ₂ |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|
| Monolayer | +++ | +++ |
| Sandwich | +++ | +++ |

Tabelle 3–46

Regeneration des Quarzes mit NaOH 3 molar, bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂, auf einem IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
+++ => alle Erythrozyten entfernt

| Versuch | direkt | + Anti-A | + Anti-IgM | + Protein A |
|--------------------------|--------|----------|------------|-------------|
| Monolayer A ₁ | ∅ | ∅ | | 20 000 |
| Monolayer A ₂ | ∅ | ∅ | | 20 000 |
| Sandwich A ₁ | ∅ | ∅ | ∅ | 20 000 |
| Sandwich A ₂ | ∅ | ∅ | ∅ | 20 000 |

Tabelle 3–47

Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit NaOH 3 molar, spezifisch gebundene Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂ auf IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
Ergebnis in Zellen / mm²

Die Regeneration war bei beiden Schichtsystemen und A Untergruppen erfolgreich. Die Erythrozyten wurden vollständig von der Oberfläche entfernt (Tab. 3–46). Der Wiederverwertbarkeitsversuch war im ersten Schritt ohne erneute Beschichtung negativ. Bei zusätzlicher Antikörperbelegung mit BS 66, bzw. Anti-IgM und Anti-A Birma I konnten ebenfalls keine roten Blutkörperchen detektiert werden. Nach vollständiger Rekonstruktion der Beschichtung mit Protein A und Anti-A BS 66, bzw. Anti-IgM und Anti-A Birma I, konnten spezifisch gebundene Erythrozyten in einer

Dichte von 20 000 Zellen / mm² gezählt werden. Alle Kontrollproben fielen negativ aus (Tab. 3–47).

3.5.2 Regeneration mit serologischen Elutionsmethoden

Zur Regeneration mit etablierten serologischen Elutionsmethoden wurden Quarze verwendet, die vorher zu einer positiven Detektion von Blut der Gruppe A₁ bzw. A₂ mit ca. 500 000 Zellen / µl herangezogen worden waren. Sie waren mit Protein A und Anti-A BS 66, bzw. mit Protein A, Anti-IgM und Anti-A Birma I beschichtet. Die Dichte der spezifisch gebundenen Erythrozyten betrug ca. 20 000 Zellen / mm². Die Regeneration erfolgte nach den, im Abschnitt Methodik beschriebenen, Standardmethoden. Nach erfolgreicher Regeneration wurden so genannte Wiederverwertbarkeitsversuche, die ebenfalls im Abschnitt Methoden beschrieben sind, mit Blut der Gruppe A₁, durchgeführt.

3.5.2.1 Elution mit Diethyläther

Der Quarz wurde im Anschluss an die Blutgruppendetektion aus dem Dummy ausgebaut und nach der Diethylätherelution nach Rubin behandelt.

Ergebnis

| Versuch | Regeneration A ₁ | Regeneration A ₂ |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Monolayer | +++ | +++ |
| Sandwich I | +++ | +++ |

Tabelle 3–48

Regeneration des Quarzes mit Diethyläther, bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂, auf einem IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
+++ => alle Erythrozyten entfernt

| Versuch | direkt | + Anti-A | + Anti-IgM | + Protein A |
|---------------------------|--------|----------|------------|-------------|
| Monolayer A ₁ | ∅ | ∅ | | 20 000 |
| Monolayer A ₂ | ∅ | ∅ | | 20 000 |
| Sandwich I A ₁ | ∅ | ∅ | ∅ | 20 000 |
| Sandwich I A ₂ | ∅ | ∅ | ∅ | 20 000 |

Tabelle 3–49

Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit NaOH 3 molar, spezifisch gebundene Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂ auf IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
Ergebnis in Zellen / mm²

Auf der Quarzoberfläche beider Quarze waren keine Erythrozyten mehr zu erkennen (Tab. 3–48). Der Wiederverwertbarkeitsversuch zeigte bei beiden Schichtsystemen keine direkte Bindung von roten Blutkörperchen auf die Quarzoberfläche. Bei zusätzlicher Antikörperbelegung mit BS 66, bzw. Anti-IgM und Anti-A Birma I konnten ebenfalls keine Erythrozyten detektiert werden. Nach vollständiger Rekonstruktion der Beschichtung mit Protein A und Anti-A BS 66, bzw. Anti-IgM und Anti-A Birma I, konnten spezifisch auf der Oberfläche gebundene Erythrozyten in einer Dichte von ca. 20 000 Zellen / mm² gezählt werden (Tab. 3–49). Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

3.5.2.2 Wärmeelution

Der Quarz wurde im Anschluss an die Blutgruppendetektion aus dem Dummy ausgebaut und nach der Wärmeelutionsmethode mit 56 °C nach Landsteiner behandelt.

Ergebnis

| Versuch | Regeneration A ₁ | Regeneration A ₂ |
|-----------|--------------------------------|--------------------------------|
| Monolayer | +++ | +++ |
| Sandwich | +++ | +++ |

Tabelle 3–50

Regeneration des Quarzes mit Wärmeelution bei 56 °C, bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂, auf einem IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
+++ => alle Erythrozyten entfernt

| Versuch | direkt | + Anti-A | + Anti-IgM | + Protein A |
|------------------------------------|--------|-------------|---------------|----------------|
| einfach BS 66 A ₁ | ∅ | ∅ | ∅ | 20 000 |
| einfach BS 66 A ₂ | ∅ | ∅ | ∅ | 20 000 |
| Sandwich Birma I A ₁ | ∅ | ∅ | ∅ | 20 000 |
| Sandwich Birma I A ₂ | ∅ | ∅ | ∅ | 20 000 |

Tabelle 3–51

Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration Wärmeelution bei 56 °C, spezifisch gebundene Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂ auf IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
Ergebnis in Zellen / mm²

Bei den Auswertungen der Wärmeelutionsversuche waren auf den Quarzoberflächen keine Erythrozyten mehr gebunden (Tab. 3–50). Der Wiederverwertbarkeitstest zeigte, nach einer Rekonstruktion der gesamten serologischen Schichtarchitektur, bei beiden Beschichtungssystemen und A-Untergruppen, eine Erythrozytenbindung mit

einer Dichte von ca. 20 000 Zellen / mm² (Tab. 3–51). Alle Kontrollproben fielen negativ aus.

3.5.3 Mechanische Regeneration

Zur mechanischen Regeneration wurden Quarze verwendet, die mit Anti–A BS 66 (Monolayer), bzw. Anti–A Birma I (Sandwich) beschichtet waren. Die Quarze waren zu einer Detektion von Blut der Gruppe A₁ bzw. A₂ herangezogen worden. Die Dichte der spezifisch gebundenen Erythrozyten betrug in etwa 20 000 Zellen / mm². Die Regeneration erfolgte nach den im Abschnitt Methodik dargestellten Techniken. Nach erfolgreicher Regeneration wurden so genannte Wiederverwertbarkeitsversuche, die im Abschnitt Methoden beschrieben sind, mit Blut der Gruppe A₁, durchgeführt.

3.5.3.1 Regeneration mit Zentrifugation

Die Regeneration in der Zentrifuge fand nach dem im Abschnitt Methodik beschriebenen Standardprotokoll statt.

Ergebnis

| Versuch | 2200 U / min | | | | | 4400 U / min | | | | |
|------------------------------|--------------|---|---|---|----|--------------|---|---|---|----|
| | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| einfach BS 66 A ₁ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| einfach BS 66 A ₂ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| Sandwich LB 2 A ₁ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| Sandwich LB 2 A ₂ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |

Tabelle 3–52

Regeneration des Quarzes mit Zentrifugation, bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂, auf einem IgG–Monolayer mit Anti–A BS 66 bzw. IgM–Sandwich mit Anti–A Birma I

Sowohl bei einfacher Beschichtung als auch bei Sandwichbeschichtung führte die Regeneration mit 2200 U / min und die Erhöhung der Drehzahl auf 4400 U / min zu keiner Ablösung von roten Blutkörperchen. Dies galt auch für beide A–Untergruppen (Tab. 3–52).

3.5.3.2 Regeneration mit dem Mischschüttler

Die Regeneration im Mischschüttler fand nach dem in Methoden beschriebenen Standardprotokoll statt.

Ergebnis

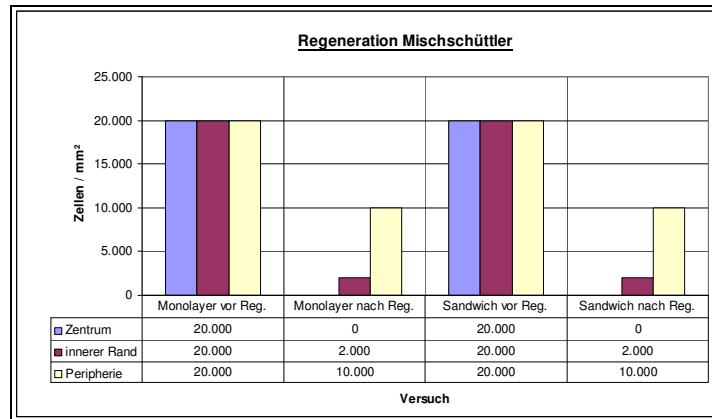


Abbildung 3–32

Regeneration des Quarzes mit dem Mischschüttler, bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂, auf einem IgG–Monolayer mit Anti–A BS 66 bzw. IgM–Sandwich mit Anti–A Birma I
Ergebnis in Zellen / mm²

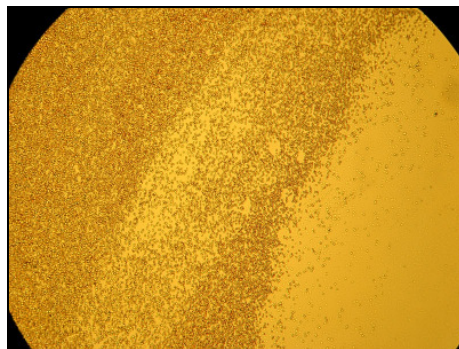


Abbildung 3–33

Regeneration mit dem Mischschüttler, mit von rechts nach links zunehmender Dichte noch spezifisch gebundener Erythrozyten
Übersichtsbild: Quarzmitte (rechts) und Außenseite (links), in den Ecken sichtbare Okularränder

Nach zwei Minuten auf kleiner Stufe zeigte sich eine Ablösung von Erythrozyten. Ein Unterschied zwischen den A–Untergruppen oder den Beschichtungen ließ sich nicht feststellen. Im Zentrum des Quarzes befanden sich keine roten Blutkörperchen mehr. Mit wachsendem Abstand von der Mitte des Quarzes nahm die Dichte der noch gebundenen Erythrozyten kontinuierlich zu. Direkt um den freien Bereich betrug die Dichte ca. 2 000 Zellen / mm², in der Randzone des Quarzes ca. 10 000 Zellen / mm². Die weitere Behandlung auf mittlerer Stufe erbrachte keine zusätzlichen Ablösungen. Auch die Erhöhung der Schwingkraft brachte keine weitere Lösung von Zellen (*Abb. 3–32 und 3–33*).

Der Wiederverwertbarkeitsversuch zeigte, dass eine sofortige erneute Blutgruppendetektion mit Blut der Gruppe A₁ bzw. A₂ möglich war. Es wurden Dichtewerte von 20 000 Zellen / mm² erreicht. Eine Kontrollprobe mit Blut der Gruppe B zeigte keine zusätzliche Bindung von Erythrozyten (Tab. 3–53). Diese Prozedur ließ sich dreimal wiederholen, ohne dass es zu einer Verringerung der Dichte kam. Nach dem sechsten Zyklus erfolgte eine erneute Beschichtung mit Anti–A BS 66, bzw. Anti–IgM und Anti–A Birma I. Die anschließende Blutgruppendetektion zeigte eine Dichte mit spezifisch gebundenen Erythrozyten von ca. 20 000 Zellen / mm². Alle Kontrollproben fielen negativ aus (Abb. 3–34).

| Versuch | Bereich | Kontrolle B | Detektion A ₁ | Detektion A ₂ |
|-----------|--------------|-------------|--------------------------|--------------------------|
| Monolayer | Zentrum | ∅ | 20 000 | 20 000 |
| | innerer Rand | 2 000 | 20 000 | 20 000 |
| | Peripherie | 10 000 | 20 000 | 20 000 |
| Sandwich | Zentrum | ∅ | 20 000 | 20 000 |
| | innerer Rand | 2 000 | 20 000 | 20 000 |
| | Peripherie | 10 000 | 20 000 | 20 000 |

Tabelle 3–53

Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit dem Mischschüttler, spezifisch gebundene Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂ auf IgG–Monolayer mit Anti–A BS 66 bzw. IgM–Sandwich mit Anti–A Birma I
Ergebnis in Zellen / mm²
Ergebnis in Zellen / mm²

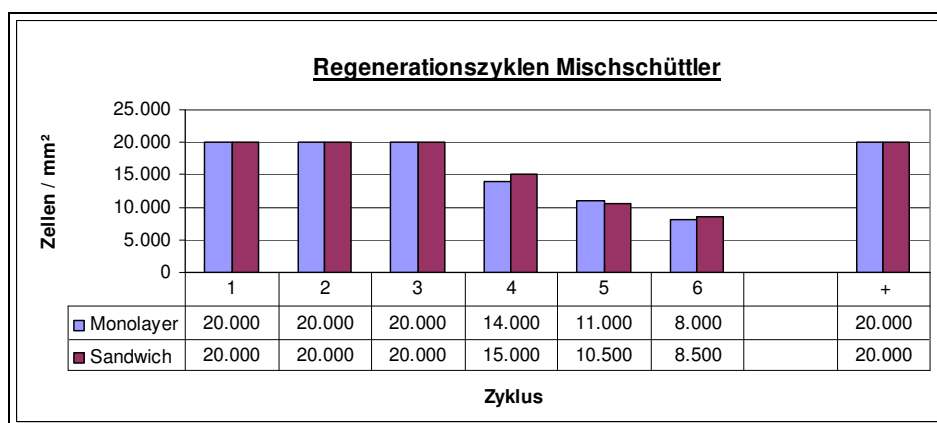


Abbildung 3–34

Regenerations- und Wiederverwertbarkeitszyklen nach Regeneration mit dem Mischschüttler
Ergebnis in Zellen / mm²

3.5.4 Recycling gebrauchter Quarze

Es wurden Quarze mit einfacher Beschichtung Protein A und Anti-A BS 66 sowie Quarze mit Sandwichbeschichtung mit Protein A, Anti-IgM und Anti-A Birma I zur Blutgruppendetektion der Blutgruppen A₁ und A₂ herangezogen. Im Anschluss wurden die Quarze nach Standardmethoden recycelt. Direkt danach erfolgte die erneute Beschichtung und Blutgruppenbestimmung. Im Anschluss wurde der Quarz wieder recycelt. Dieser Vorgang wiederholte sich so lange, bis eine verminderte Dichte der zu detektierenden Erythrozyten zu erkennen war.

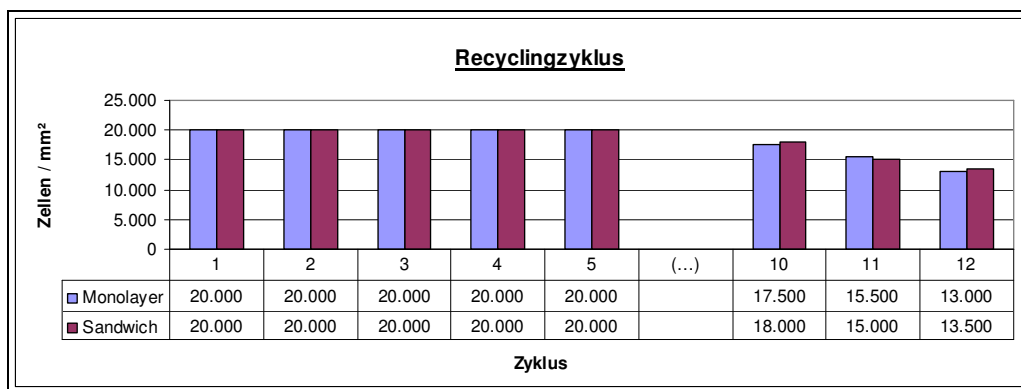


Tabelle 3-35

Recyclingzyklus mit Piranha bei spezifisch gebundenen Erythrozyten der Blutgruppe A₁ bzw. A₂,
IgG-Monolayer mit Anti-A BS 66 bzw. IgM-Sandwich mit Anti-A Birma I
Ergebnis in Zellen / mm²

Ergebnis

Der Vorgang des Recyclens konnte zehnmal bei einer Dichte der gebundenen Erythrozyten von ca. 20 000 Zellen / mm² durchgeführt werden. Dann reduzierte sich die Dichte. Nach dem zwölften Recyclingvorgang wurde der Versuch abgebrochen (*Abb. 3-35*). Sowohl makro- als auch mikroskopisch zeigten sich Abnutzungserscheinungen der Goldoberfläche.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, das Prinzip der objektiven Blutgruppendetektion auf einem Schwingquarz, der mit Gold, Protein A und Blutgruppenantikörpern beschichtet ist, zu optimieren und weiter zu entwickeln. Dadurch sollte es möglich sein, auch komplexere Fragestellungen der Blutgruppenserologie beantworten zu können. Ein Teilziel war, dies unter möglichst einfachen und ökonomischen Gesichtspunkten durchzuführen, d.h. es sollte möglichst viel Material aus der bisherigen Routinediagnostik verwendet werden und die einzelnen Messschritte sollten standardisiert durchgeführt werden. Ebenso sollte das System für die Versuche so einfach aufgebaut sein, dass ein Wechsel der serologischen Fragestellung keine größeren Um- oder Neubauten der Anlage erfordert.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Messungen in der Dummyanlage bewertet und daraus die entsprechenden Schlussfolgerungen gezogen.

4.1 Mit Gold beschichtete Quarze als Immunsensoren

Immunsensoren auf Schwingquarzbasis müssen mit Antikörpern beschichtet werden, um spezielle Fragestellungen, wie z. B. die Blutgruppenbestimmung, beantworten zu können. Eine elegante Methode ist, die Antikörper über eine Protein A Schicht auf mit Gold beschichtete Schwingquarze zu binden. Diese Technik hat sich in den letzten Arbeiten [4, 25, 27, 51, 52, 54, 100] im Vergleich mit anderen Beschichtungsverfahren ohne Protein A [4, 102] oder mit Thiol und Protein A [4, 24, 25, 75, 102] durchgesetzt.

Die Bindung von Protein A an Gold, es handelt sich überwiegend um Di-Sulfid-Brücken und Bindungen durch van-der-Waals-Kräfte, ist durch die hohe Affinitätskonstante von 10^8 M^{-1} [24, 78] sehr fest. Dies ist der entscheidende Faktor für die Messung unter Flussbedingungen, da nur durch diese Stabilität ein Abreißen des Protein A vermieden werden kann.

Die Ausrichtung der auf Protein A gebundenen Antikörper (ein Protein A Molekül bindet zwei IgG Moleküle spezifisch am F_c-Fragment [4, 28]) und die hohe Affinität des Protein A zum F_c-Fragment des Immunglobulins ermöglichen erst die Ankopplung von Antigenen an die F_{ab}-Fragmente unter Flussbedingungen.

4.2 Blutgruppenanalytik im Dummy-System

Die Übernahme der Beschichtungstechnik und der Messprotokolle von früheren Arbeiten [54] in die Dummy-Anlage gelang ohne Einschränkungen. Durch die weitgehende Übereinstimmung des Dummys mit den für die Serologie wichtigen Teilen des automatisierten Blutgruppenanalysegerätes, konnten reale Bedingungen für die Versuche geschaffen werden. Durch den Einsatz hochwertiger und biokompatibler Materialien, wie z. B. Teflon, konnten unspezifische Wechselwirkungen zwischen den biologischen Komponenten und den Materialien des Dummy-Systems minimiert bzw. funktionell eliminiert werden.

Die Beschichtung des Quarzes mit Protein A auf der Goldoberfläche und darauf gebundenem Anti-A BS 66, ein monoklonales IgG₃ der Maus, konnten aus den vorherigen Arbeiten übernommen werden. Offene Bindungen des Protein A wurden mit humanem AB-Plasma gesättigt, so dass unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Vollblutprobe und der Beschichtung minimiert werden konnten. Die Dichte der gebundenen roten Blutkörperchen von ca. 20 000 Zellen / mm² bei der Detektion der Blutgruppe A₁ entsprach dem Ergebnis von 19 600 Zellen / mm² bei vorherigen Arbeiten [54]. Die Validität der Messungen wurde, wie auch bei anderen Untersuchungen, durch eine Kontrollprobe mit einer konträren Blutgruppe bestätigt. Die Auswertung unter dem Auflichtmikroskop und die anschließende Bestimmung der Belegungsdichte mit dem Bildbearbeitungsprogramm am PC funktionierten einwandfrei und konnten mit der Messung des Frequenzabfalls im „schwingenden“ System verglichen werden. Das Erkennen von Dichteunterschieden spezifisch gebundener Erythrozyten, war bis zu Unterschieden von ca. 500 Zellen / mm², sicher und zuverlässig möglich. Komplikationen, wie z. B. eine doppelte Lage spezifisch gebundener Erythrozyten, die eine optische Bestimmung der Dichte unmöglich machen würde, traten nicht auf. Da es sich nicht um eine so genannte Inline-

Messung handelte, d. h. dass schon während des Blutflusses ein Ergebnis zu sehen ist, sondern der Quarz zur Dichtebestimmung jedes Mal ausgebaut werden musste, dauerte die eigentliche Detektion der Blutgruppe länger als im „schwingenden“ System. Durch die Kompaktheit des Dummys, im Gegensatz zum aufwendigeren und automatisierten Blutgruppenanalyse-Gerät, war die Gesamtdauer einer Messung aber deutlich geringer. Der Dummy ließ sich deshalb in kurzer Zeit für eine Vielzahl von immunologischen Untersuchungen einsetzen.

4.3 Blutgruppenanalytik über einen IgG-Monolayer

4.3.1 Detektion der Blutgruppen A₁ und A₂

Die Detektion der Blutgruppen A₁ und A₂ wurde auf einem IgG-Monolayer durchgeführt. Dieser bestand aus Protein A, das auf Gold fixiert war und daran gebundenem IgG₃ der Maus, dem monoklonalen Anti-A BS 66. Es sollte untersucht werden, ob sich ein Unterschied zwischen den einzelnen Blutgruppen mit diesem Beschichtungsaufbau und speziell diesem Antikörper finden lässt, da die A₂ Untergruppe deutlich weniger Antigenstellen auf der Erythrozytenoberfläche besitzt, als die Untergruppe A₁. A₁ besitzt im Durchschnitt zwischen 800 000 und 1 000 000 Antigenstellen auf der Membran eines Erythrozyten und A₂ im Durchschnitt zwischen 160 000 und 444 000 [47, 62].

Die Auswertung der Versuche zeigte (*Tab. 3-1* und *Abb. 3-1*) keinen Unterschied in der Dichte der spezifischen Erythrozytenbindung auf dem Schwingquarz. Das bedeutet, dass das Anti-A BS 66 eine hohe Sensitivität besitzt und deshalb auch der Nachweis der schwächeren A₂ Blutgruppe mit dem Dummysystem problemlos möglich ist.

Ein weiterer Aspekt ist, dass weniger die Antigenanzahl und -Dichte pro Erythrozyt eine Rolle für die Dichte an spezifisch gebundenen Zellen spielt. Vielmehr ist die Lage und die Zugänglichkeit des Antigens durch den Blutgruppenantikörper wichtig. Dies konnte in Arbeiten gezeigt werden, die Blutgruppen geringerer Antigendichte

und schlechterer Zugänglichkeit des Antigens mit dem Quarzsystem getestet haben [28, 54].

Ob eine Erhöhung der Dichte von spezifisch gebundenen Erythrozyten über die bisherige Grenze von ca. 20 000 Zellen / mm² möglich ist, sollte die Variation der einzelnen Parameter in den durchgeführten Versuchen zeigen.

4.3.2 Variation der Lösungs- und Trägermittel

Die Lösungs- und Trägermittel sind aus den Protokollen von vorherigen Arbeiten [24, 54, 66] übernommen worden. In dieser Versuchsreihe sollte gezeigt werden, ob die Variation dieser Lösungs- und Trägermittel bei Beschichtung, bzw. Messung zu einer höheren oder geringeren Belegungsdichte mit Erythrozyten führt.

4.3.2.1 Variation bei Beschichtung des Quarzes

In den Standardprotokollen wird zur Vermeidung von unspezifischen Wechselwirkungen Aqua bidest. als Lösungs- und Trägermittel zur Beschichtung der Goldoberfläche des Quarzes verwendet. Die Versuche in diesem Abschnitt sollten zeigen, ob es möglich ist durch Veränderung der Lösungen oder deren pH Wert eine höhere Konzentration an spezifisch gebundenen Zellen bei der Blutgruppendetektion zu erreichen. Die Verwendung von NaCl 0,9 %- und PBS-Lösung als Lösungsmittel bei Beschichtung des Quarzes zeigt keine Veränderung der spezifisch gebundenen Erythrozyten. Die bei Beschichtung erkannte Versalzung, die auch bei Verwendung von EDTA-TRIS-Lösung nach dem Trocknen mit Stickstoff auftrat, hatte keinen Einfluss auf die Funktion der Oberfläche. Sie ging nach erneuter Benetzung mit Flüssigkeit wieder in Lösung.

Die Variation der pH Werte bei EDTA-TRIS-Lösung zeigte einen Rückgang der Oberflächenfunktion ab einem pH Wert von 9,0 (*Abb. 3-2*). Die größte Proteinabsorbtion an die Goldoberfläche fand bei einem pH Wert am isoelektrischen Punkt des Proteins und geringen Veränderungen darüber und darunter statt [39, 75]. Das bedeutet bei Protein A einen pH Wert von ca. 5,5 [20]. Ebenso wurde in vorherigen Arbeiten mit Absorptionsmessungen gezeigt, dass eine in den leicht sauren Bereich hinein verschobene Trägerlösung die Ankopplung von Antikörpern an

das Protein A fördert [54]. Dies war in den hier gezeigten Versuchen nicht zu erkennen, weder in den Ergebnissen mit absteigenden pH Werten der EDTA–TRIS–Lösung, noch bei Verwendung der leicht sauren NaCl 0,9 % –Lösung mit einem pH Wert von 6,8. Wohl aber war eine schlechtere Beschichtung bei höheren pH Werten der EDTA–TRIS–Lösung zu sehen.

Mit der optischen Auswertung der Ergebnisse können immer nur die Auswirkungen auf die Erythrozytenbindung auf der Quarzoberfläche festgestellt werden. Es können deshalb nur indirekt Aussagen über die Dichte der Oberflächenbeschichtung gemacht werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die zukünftigen Beschichtungen mit Aqua bidest. durchgeführt, da ein niedrigerer pH Wert keine Vorteile bei der Erythrozytendichte zeigte und es bei Aqua bidest nicht zur Versalzung kam und weniger unspezifische Wechselwirkungen auftraten.

4.3.2.2 Variationen bei der Blutgruppendetektion

Der Austausch der Lösungs- und Trägermittel bei der Bestimmung der Blutgruppe hat gezeigt, dass sowohl bei NaCl 0,9 %–Lösung, als auch bei PBS–Lösungen die Fähigkeit zur spezifischen Bindung von Erythrozyten herabgesetzt war (*Abb. 4–2*). Das kann bei PBS–Lösung am hohen Schwefelbrückenanteil liegen, der zur vermehrten Wechselwirkung mit der Antigen–Antikörper–Bindung führt. Der wichtigste Faktor für eine erfolgreiche und dichte Bindung von roten Blutkörperchen scheint aber der pH Wert der verwendeten Lösung darzustellen. Dies erklärt auch die schlechte Bindung von roten Blutkörperchen bei der Verwendung von NaCl 0,9 %–Lösung. Sowohl die PBS–Lösung (pH Wert 7,4), als auch die NaCl 0,9 %–Lösung (pH Wert von ca. 6,5) haben einen niedrigeren pH Wert, als die verwendete EDTA–TRIS–Lösung.

Wie in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte [54], führt eine leichte Erhöhung des pH Wertes zu einer Verminderung der negativen Ladung der Erythrozyten und damit zu weniger unspezifischen Wechselwirkungen. Die Reduzierung der negativen Ladungen der Erythrozytenmembran durch leicht alkalische Lösungen, führte zu einer verbesserten Bindung an die Antikörperschicht und dichterem Aneinanderlagerung der roten Blutkörperchen. Die Auswertung der pH

Variationen der EDTA–TRIS–Lösung (*Abb. 4–3*) zeigte eine schlechtere Bindung von roten Blutkörperchen bei saurem pH. Diese Reihe ließ sich nicht weiter fortsetzen, da es ab einem pH Wert von 5,5 zur Hämolyse kam. Auch ein zu stark alkalisches Milieu verändert die Oberfläche des Erythrozyten [90], so dass ab einem pH Wert von 10,0 eine geringere Dichte an gebundenen Erythrozyten vorlag.

Die Zugabe von Lösungen zur Herabsetzung der negativen Ladung der Erythrozytenmembran ist in der herkömmlichen Routinediagnostik ein gängiges Mittel zur Verbesserung der Agglutination. Durch Ladungsreduktion stoßen sich die Zellen nicht mehr so stark ab und die Länge der Arme des Antikörpers reicht aus, um zwei Zellen zu binden. Jetzt sind auch inkomplette Antikörper, z. B. Immunglobuline des Typs IgG, in der Lage, Erythrozyten zu agglutinieren [62].

Die Zugabe von bovinem Albumin 22 % führte zu einer verbesserten elektrischen Leitfähigkeit der Lösung, so dass Ladung von den Erythrozyten abfließen kann [79]. Bei LISS–Lösung ist mehr als 75 % des NaCl, unter Beibehaltung der Isotonie, durch eine nicht ionisierende Substanz, z. B. Glucose ersetzt. Die Verwendung von LISS–Lösung als Trägermittel führt somit zu einer Herabsetzung der negativen Ladung auf den roten Blutkörperchen. Unspezifische Wechselwirkungen werden dadurch unterdrückt und die Bindung von Antikörpern verbessert.

Die Verwendung solcher Zusätze und Lösungen brachten beim IgG–Monolayer und der Bestimmung der Blutgruppe A₁, keine zusätzlichen Vorteile gegenüber der Verwendung von leicht basischer EDTA–TRIS–Lösung. Insgesamt ist festzustellen, dass eine optimale Bestimmung der Blutgruppe mit einer EDTA–TRIS–Lösung bei einem pH Wert von 8,0 oder höher am besten möglich war. Zudem bietet die EDTA–TRIS–Lösung den Vorteil, dass durch den Zusatz von EDTA Kalziumionen gebunden werden, und damit die Gerinnung der Blutprobe blockiert wird. Zudem wird das Komplementsystem gehemmt, was sonst nach Antikörperbindung eine Hämolyse auslösen kann. Die Verwendung von Tween in der EDTA–TRIS–Lösung erlaubt zudem einen besseren Fluss durch die gesamte Fluidik der Anlage und trägt zur Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen bei.

Leider haben die käuflich und kostengünstig zu erwerbenden Lösungen NaCl 0,9 % und PBS nicht das optimale Ergebnis gezeigt. Der Nachteil der EDTA–TRIS–Lösung ist, dass sie unter großem Aufwand und permanenter pH Wert Kontrolle hergestellt

werden muss. Der Austausch der EDTA–TRIS–Lösung durch LISS–Lösung, die die gleichen Ergebnisse möglich machte, brächte einen Kostennachteil.

4.3.3 Variation der Temperatur

Die Standardbedingungen bei Beschichtung und Messung sehen 22 °C als Temperatur vor. Das entspricht den Bedingungen in dem klimatisierten Labor des Dummys. Durch die Versuchsreihe sollte gezeigt werden, ob eine Absenkung oder Erhöhung der Temperatur die Anbindung von Protein A an Gold und die Anbindung des Antikörper an Protein A bzw. die Bindung von Erythrozyten auf die Antikörperschicht, verbessern kann. Dazu wurden die Dummyanlage und alle Chemikalien, sowie die Blutproben in der Kühlkammer bei 3 °C bzw. in der Inkubationskammer bei 37 °C gelagert. Diese Temperaturvariation ist deshalb für spätere Fragestellungen interessant, da eine Reihe von natürlichen aber auch monoklonalen Antikörpern ihre optimale Bindungskapazität bei ca. 3 °C (Kälteantikörper) bzw. 37 °C (Wärmeantikörper) haben.

4.3.3.1 Beschichtung unter verschiedenen Temperaturen

Vorherige Arbeiten, die sich mit einer Protein–A Schicht auf Gold und daran gebundene Antikörper befasst haben, haben gezeigt, dass eine optimale Beschichtung des Quarzes bei niedrigen Temperaturen unter 10 °C durchgeführt werden sollte [24, 54, 66]. Niedrige Temperaturen führen sowohl zu einer verbesserten Bindung von Protein A an Gold, als auch zur vermehrten Ankopplung von Antikörpern an Protein A. Höhere Temperaturen können hingegen zur Ablösung der bereits gebundenen Proteine führen.

In den Versuchen ließ sich feststellen, dass die Beschichtung des Quarzes bei 37 °C tatsächlich zu einer geringeren Bindungsfähigkeit führt (*Abb. 3–6*). Die Beschichtung bei 3 °C brachte keine Vorteile gegenüber einer Beschichtung bei 22 °C. Daraus lässt sich schließen, dass das Temperaturoptimum zwischen 3 °C und 10 °C liegen muss. Aus technischen Gründen war es aber nicht möglich den Beschichtungsprozess im Dummy–System zwischen diesen beiden Temperaturen durchzuführen. Zudem stellt sich die Frage, ob es überhaupt gelingt, durch die Optimierung der Beschichtungstemperatur eine höhere Dichte an spezifisch

gebundenen Erythrozyten ($> 20\ 000$ Zellen / mm^2) in der anschließenden Blutgruppendetektion zu erreichen. Deshalb wurde, auch aus Aufwandsgründen, weiterhin die Beschichtung bei 22 °C als Standard verwendet.

4.3.3.2 Blutgruppendetektion unter verschiedenen Temperaturen

Blutgruppenantikörper können ihre maximale Bindungsstärke bei verschiedenen Temperaturen erreichen (siehe Einleitung). Der Antikörper Anti-A BS 66, ein monoklonales IgG₃ der Maus, wurde deshalb unter verschiedenen Temperaturbedingungen getestet. Die Auswertungen ergaben, dass eine Abkühlung auf 3 °C zu einer Absenkung der Bindungsfähigkeit führte. Eine Steigerung der Temperatur auf 37 °C brachte keine dichtere Bindung von roten Blutkörperchen, verglichen mit der Dichte bei 22 °C (*Abb. 3–7*). Zur Kontrolle, ob es sich um ein reines Phänomen der Antigen–Antikörper–Bindung handelt, oder ob die Temperaturen auch einen Einfluss auf die sich immer in Bewegung befindende Gold \leftrightarrow ProteinA \leftrightarrow Anti–A Beschichtung haben, wurde der Antikörper bei unterschiedlichen Temperaturen im DiaMed–System getestet. Dabei trat eine verstärkte Agglutination bei 22 °C und bei 37 °C auf, eine geringere bei 3 °C. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei dem Anti–A BS 66 um einen Antikörper vom Typ IgG handelt, der sein Temperaturoptimum bei ca. 37 °C besitzt. Hier unterscheidet sich der Maus IgG–Antikörper von humanen Isoagglutininen. Humane Isoagglutinine zeigen nicht diese Charakteristik auf Temperaturunterschiede [95, 109]

4.3.4 Variation der Konzentration

Mit den Versuchen wurde die Sensitivität des Quarzes getestet. Im ersten Teil wurde ermittelt, welche Konzentration von Protein A und Anti–A nötig ist, um eine zuverlässige Blutgruppendetektion durchführen zu können. Im zweiten Teil wurden Messungen mit nicht gewaschenem und gewaschenem Blut, sowie mit dessen Verdünnungsreihen durchgeführt. Zum Vergleich wurden Blutgruppendetektionen mit denselben Analyten im DiaMed–System durchgeführt.

4.3.4.1 Variation der Konzentration der Beschichtungslösungen

Verdünnungen der Protein A und Anti-A Lösungen führen zu einer geringeren Dichte gebundener Moleküle auf der Quarzoberfläche. Die Versuche sollten klären, bis zu welcher Verdünnung eine Detektion von Erythrozyten möglich ist.

Um einen möglichst genauen Vergleich zwischen Protein A und Anti-A zu erzielen, müssen die Konzentrationen der Lösungen in die Absolutwerte von Masse und Molekülanzahl umgerechnet werden (*Tab. 3–5* und *3–6*). Mit der Einheit Dalton, die die Masse bzw. die Größe biologischer Moleküle angibt und dem Umrechnungsfaktor $1 \text{ Dalton} = 1,6605 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ [44, 110], lässt sich aus der Molekülgröße von Protein A, ca. 42 000 Dalton und Anti-A, ca. 160 000 Dalton die relative und absolute Molekülanzahl errechnen. Anti-A BS 66 besitzt eine etwas höhere Molekülmasse als „normales IgG, da es sich um ein IgG vom Untertyp 3 handelt, dessen Molekülmasse durch eine vermehrte Anzahl von Di-Sulfidbrücken auf ca. 160 000 Dalton [14] erhöht ist.

Die Auswertung der Messergebnisse zeigt, dass die Protein A Lösung sehr viel höhere Verdünnungen zuließ, als die der Antikörperlösung. Dies liegt an der hohen Bindungsfähigkeit des Protein A an Gold. Die Bindung von Protein A an Gold ist bei einer Konzentration von ca. 2 mg / ml bereits gesättigt, höhere Konzentrationen führen zu keiner Erhöhung der Moleküldichte auf der Oberfläche. Lediglich die Geschwindigkeit der Bindung kann dadurch noch erhöht werden. Dies erklärt, warum auch höhere Verdünnungen der Protein A Lösung noch eine erfolgreiche Blutgruppendetektion zulassen [54, 66]. Ein weiterer Grund ist die hohe Antikörperbindungsfähigkeit des Protein A. Ein Molekül Protein A bindet zwei Moleküle IgG. Das entspricht in etwa der Massenbindungskapazität von ca. 12 mg IgG / mg Protein A [13, 83]. Das bedeutet, dass sehr viel weniger Protein A benötigt wird, um eine bestimmte Menge an IgG binden zu können.

Die Bindung von IgG₃ der Maus durch Protein A weist, verglichen mit anderen IgG Unterklassen der Maus, eine höhere Affinität auf [34, 83], so dass in diesem Fall von einer ausreichenden Massenbindungskapazität durch das Protein A ausgegangen werden kann. Die Bindung des Anti-A BS 66 an Protein A ist bei einer Konzentration von ca. 100 µg / ml gesättigt, auch hier führen höhere Konzentrationen zu keiner erhöhten Antikörperdichte. Nur die Bindungsgeschwindigkeit lässt sich dadurch

erhöhen. Bei Verdünnung der Antikörperlösung war zu erkennen, dass bis zu einer Verdünnungsstufe von 1 : 256 eine Detektion von Erythrozyten möglich ist, jedoch mit deutlich reduzierter Dichte der gebundenen Zellen (*Abb. 3–8*).

Kombinierte man die Verdünnungen von Protein A und Anti–A, bei denen noch eine Dichte von ca. 20 000 Zellen / mm² gemessen wurde, miteinander, so zeigte sich insgesamt eine geringere Dichte, als bei den Messungen mit den verdünnten Einzelsubstanzen. Nur bis zu einer Verdünnung bei Protein A von 1 : 16 und bei Anti–A von 1 : 4, wurde die Ausgangsdichte von ca. 20 000 Zellen / mm² erreicht (*Abb. 3–9*).

Die alleinige Verdünnung eines Schichtteils wirkt sich also erst ab einer höheren Verdünnung aus. Bei der Verdünnung beider Beschichtungslösungen führen schon geringere Verdünnungen zur Reduktion der Erythrozytendichte bei der anschließenden Blutgruppendetektion. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass trotz gleich bleibender Erythrozytendichte, eine Verdünnung der Beschichtungslösungen zu einer Reduktion der immobilisierten Moleküle führt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zwar berechnet werden kann, wie viele Moleküle in welcher Konzentration auf den Quarz gebracht wurden, es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, wie viele tatsächlich gebunden haben. Es können lediglich indirekt Aussagen anhand der anschließenden Blutgruppendetektion und Dichtebestimmung spezifisch gebundener Erythrozyten getroffen werden. Eine Antwort auf diese Frage lässt sich nur in der direkten Beobachtung des Beschichtungsvorgangs im schwingenden System finden. Hinsichtlich dieser Fragestellung hat es bereits Versuche anderer Autoren gegeben. [24, 54, 66].

4.3.4.2 Variation der Konzentration der Vollblut und Erythrozytensuspensionen

Die Auswertung der Versuche mit Vollblut und gewaschenen Erythrozytenproben zeigte, dass sich kein Unterschied in der Dichte spezifisch gebundener Erythrozyten feststellen ließ. Es lässt sich also uneingeschränkt unbehandeltes Vollblut zur Blutgruppendetektion auf dem Quarz verwenden. Lediglich ein geringer EDTA–Zusatz, bzw. die Verwendung von EDTA–TRIS–Lösung ist notwendig, um eine Gerinnung des Analyts zu verhindern.

Die Versuche mit Verdünnungsreihen haben gezeigt, dass es bis zu einer Verdünnung von 1 : 100 000, das entspricht einer Konzentration von ca. 50 Zellen / μl , möglich ist, eine Blutgruppenbestimmung durchzuführen. Absolut standen etwa 12 500 Zellen zur Detektion bereit. Detektiert wurden noch ca. 500 Zellen / mm^2 . Rechnet man das auf die Goldoberfläche von 20 mm^2 hoch, so erhält man ca. 10 000 Zellen auf dem Quarz. Das bedeutet, dass ca. 83 % der Zellen gebunden hatten. Ebenso zeigte sich das Ergebnis bei einer Verdünnung von 1 : 10 000. Die Dichte der Erythrozytenbelegung betrug ca. 4 500 Zellen / mm^2 , was in etwa 90 000 Zellen auf 20 mm^2 entspricht. Insgesamt standen 125 000 Zellen zur Detektion zur Verfügung. Es wurden also ca. 72 % der Zellen auf der Quarzoberfläche spezifisch gebunden. Ab einer Verdünnung von 1 : 1 000 war die Oberfläche mit einer Dichte von 20 000 Zellen / mm^2 belegt. Der Anteil der gebundenen Zellen an der Gesamtzahl der Erythrozyten stieg bei höheren Konzentrationen der Blutprobe nicht weiter an. Dies war auf die Sättigung der Oberfläche mit Erythrozyten zurückzuführen, die keine doppelte Lage an Blutzellen zuließ (*Abb. 3–10*).

Der Versuch mit zweifach konzentriertem Blut wurde durchgeführt, um die Grenzen der optischen Auswertung zu ermitteln. Es sollte geprüft werden, ob auch hohe Konzentrationen von Erythrozyten sich noch in einer einzigen Lage auf dem Quarz befinden, oder ob sie sich in mehreren Schichten darstellen. Eine optische Auswertung wäre in diesem Fall extrem erschwert worden. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass Erythrozyten auch bei hohen Konzentrationen nur in einer einlagigen Schicht auftreten. Auch die Fließeigenschaften des konzentrierten Blutes stellten für die Mikrofluidik des Dummy-Systems kein Problem dar.

Die Versuche der Blutgruppenbestimmungen mit verdünnten Vollblutproben, bzw. Erythrozytensuspensionen im DiaMed-System zeigten, dass mit dem DiaMed-System eine Verdünnung von bis zu 1 : 1 000 detektiert werden konnte. Eine Verdünnung von 1 : 10 000 konnte mit dem DiaMed-System nicht mehr als positives Ergebnis erkannt werden. Beachten muss man bei Versuchen mit dem DiaMed-System, dass eine Detektion von konzentrierten oder nicht verdünnten Blutproben nicht möglich ist, da der notwendige Zusatz von Diluent 1 Lösung nur eine Mindestverdünnung im Verhältnis 1 : 10 zulässt, höhere Konzentrationen sind nicht möglich.

4.3.5 Variation der Flussgeschwindigkeit

Es sollte untersucht werden, ob eine Belegung im Fluss in der Dummyanlage gleiche Ergebnisse erzielen kann, wie eine Belegung außerhalb mit der Pipette. Ebenso sollte geprüft werden, bis zu welcher Geschwindigkeit eine Detektion von Erythrozyten möglich ist und ob auch hier Techniken genutzt werden können, die zu einer Vergrößerung der Dichte führen.

4.3.5.1 Variation der Flussgeschwindigkeit bei Beschichtung

Die Beschichtung des Quarzes innerhalb der Messzelle würde eine wichtige Alternative zur Beschichtung außerhalb des Dummy-Systems darstellen. Das zeitraubende Aus- und wieder Einbauen des Quarzes ließe sich dadurch vermeiden. Eine Zeitersparnis und mehr Sicherheit für die sensible Beschichtung wären die Folge. Dazu wurden Versuchsreihen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit des Pufferflusses durchgeführt und mit der Beschichtung über Pipette verglichen.

Es wird ersichtlich, dass bei Protein A (*Abb. 3-13*) und Anti-A BS 66 Immobilisationszeiten von 15 Minuten ausreichen, um eine effiziente Beschichtung zu erhalten, die eine maximale Dichte der Erythrozytenbindung ermöglicht. Sowohl bei Protein A (*Abb. 3-14*), als auch bei Anti-A (*Abb. 3-15*) sieht man, dass Beschichtungen im Fluss bei langsamen Geschwindigkeiten und Immobilisationszeiten, also Kontaktzeiten von einer bis zu drei Minuten, durchaus möglich sind. Schnellere Geschwindigkeiten führen hingegen bei beiden Stoffen zu keiner Bindung mehr. Erst die Einhaltung von Immobilisationszeiten ohne Fluss, führte in der anschließenden Blutgruppendetektion wieder zu einem positiven Ergebnis. Vergleicht man die Beschichtung per Pipette mit der im Dummy, so erkennt man, dass es keinen Unterschied hinsichtlich der Dichte bei einer Einhaltung von Zeiten mit Flussstopp gibt.

Es spielt also weniger die Flussgeschwindigkeit, als vielmehr die Kontaktzeit der Lösung und damit von Molekülen mit der Oberfläche eine Rolle. Das erkennt man daran, dass bei niedrigen Geschwindigkeiten und der Einhaltung von kurzen Flusspausen, die Kontaktzeit während des Flusses in die Gesamtimmobilisationszeit mit eingerechnet wird. So liegt bei Protein A, das mit der Pipette aufgetragen und für 10 Minuten immobilisiert wird, die anschließende Erythrozytendichte bei ca. 10 000

Zellen / mm². Die Beschichtungen bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,08 ml / min und einer Flusspause von 10 Minuten, lassen eine anschließende Erythrozytendichte von ca. 12 000 Zellen / mm² erkennen. Hier muss die Kontaktzeit von ca. 3 Minuten dazuaddiert werden. Sieht man sich in dieser Versuchsreihe die Ergebnisse höherer Geschwindigkeiten an, so wird die Kontaktzeit während des Flusses äußerst gering. Man erhält nur noch einen Wert von ca. 10 000 Zellen / mm². Dies entspricht dem Wert bei Beschichtung mit Pipette.

Vergleicht man Protein A mit Anti-A BS 66 so kann man feststellen, dass die Immobilisationszeit für Anti-A kürzer sein darf, als für Protein A. Dies hängt mit der Art der Bindung zusammen und lässt sich anhand der im Abschnitt Konzentrationsvariationen erhaltenen Ergebnisse erklären. Durch die hohe Affinität von Protein A zu IgG kann dieses schneller immobilisiert [108] werden. Protein A benötigt für seine Bindung über Di-Sulfid-Brücken mit der Goldoberfläche mehr Zeit.

Festzustellen bleibt, dass auch in dieser Versuchsreihe keine direkten Angaben über die Dichte und Kinetik der Beschichtung gemacht werden konnten. Es ließ sich zwar sehr gut nachvollziehen wie viel Protein A und Anti-A über den Quarz in welcher Zeit gelaufen ist, doch konnten keine Angaben dazu gemacht werden, wie viel tatsächlich gebunden hatte. Lediglich indirekt, anhand der Dichte der gebundenen Erythrozyten, konnte festgestellt werden, wie sensitiv die Quarzoberfläche war. Man weiß, dass große Reserven bezüglich der notwendigen Protein A und Anti-A Konzentration, vorhanden sind. Deshalb muss die Beschichtung erst sehr viel von ihrer Dichte verlieren, bis es zu einer sichtbaren Verringerung der Erythrozytendichte kommt.

4.3.5.2 Variation der Flussgeschwindigkeit bei Messung

Die Auswertung der Versuche zeigte eine Differenz der Erythrozytendichte bei Belegung des Quarzes im Fluss und mit Pipette. Die Belegung im Fluss erbrachte bei gleicher Kontaktzeit des Blutes mit der Oberfläche eine deutliche höhere Dichte, als die Belegung mit Pipette.

Sieht man sich die Dichten der roten Blutkörperchen an, so erkennt man, dass eine Immobilisationszeit im Fluss von nur 12 Sekunden ausreichte, um eine vollständige Belegung des Quarzes mit ca. 20 000 Zellen / mm² zu erreichen (*Abb. 3–17*). Die vergleichbare Zeit von 15 Sekunden bei Belegung mit Pipette, erbrachte nur eine

Dichte von ca. 10 000 Zellen / mm² (*Abb. 3–16*). Wurde bei Messung im Fluss schon ein Maximum der Dichte nach 12 Sekunden Kontaktzeit erreicht, benötigte man bei Belegung mit Pipette eine Immobilisationszeit von 120 Sekunden. Selbst bei höchster Flussgeschwindigkeit mit 5,12 ml / min und einer Kontaktzeit von nur 3 Sekunden, konnten immer noch 16 000 Zellen / mm² detektiert werden. Die Messung im Fluss mit einer zusätzlichen Immobilisationszeit von 120 Sekunden zeigte bei allen Geschwindigkeitsstufen eine vollständige Belegung mit roten Blutkörperchen. Hier zeigten sich keine Unterschiede zur Belegung mit Pipette.

Die Verwendung der Druckpulsmethode zeigte eine erhöhte Dichte der gebundenen Erythrozyten, auch ohne zusätzliche Kontaktzeit durch einen Flusstopp. Es kam durch einen erhöhten Druck in der Flüssigkeitssäule der Zelle zu einer besseren Bindung von Molekülen an die Oberfläche. Dies geschah über eine vermehrte Rekrutierung von Antigen–Antikörper–Bindungen, indem die Erythrozyten durch den erhöhten Druck auf die Oberfläche gepresst worden sind. Wie schon im Kapitel „Beschichtung im Fluss“ beschrieben, muss bei dieser Technik aber beachtet werden, dass das Erzeugen von Druckpulsen, durch Ein- und Ausschalten der Pumpe, auch automatisch zu einer Verdoppelung der Kontaktzeit führt. So lässt sich nicht sicher sagen, ob der Vorteil durch den erhöhten Druck und oder die verlängerte Immobilisationszeit entsteht. Zur Unterscheidung wäre eine Inlinemessung unter Beobachtung des Frequenzverhaltens notwendig. Es hat aber auch hinsichtlich dieser Versuche keine früheren Arbeiten gegeben.

Der Grund für die höhere Dichte in kürzerer Zeit bei Messung im Dummy kann verschiedene Ursachen haben. Die Belegung des Quarzes per Pipette führte dazu, dass sich die Erythrozyten erst langsam durch die Blutsäule nach unten bewegen müssen. Dieser Vorgang nimmt Zeit in Anspruch. Auch die Rekrutierung von Bindungen zwischen Antigen und der Antikörperschicht ist allein durch die langsame Sinkbewegung nicht sehr effizient. Außerdem dreht sich die Zelle beim Sinkvorgang nicht permanent, so dass nur ein Teil der Oberfläche und damit der Antigenstellen zur potentiellen Bindung zur Verfügung steht.

Bei Messung unter langsamer Strömung können durch die Rollbewegungen der Erythrozyten mehr Antigen–Antikörper–Bindungen rekrutiert werden, da ein großer Teil der Oberfläche der Zelle mit der Antikörperschicht Kontakt bekommt und so die

Wahrscheinlichkeit einer Bindung erhöht wird. Eine weitere Rolle spielt die Tatsache, dass der über die Antikörperschicht rollende Erythrozyt eine größere Chance hat, von Blutgruppenantikörpern „festgehalten“ zu werden, als ein Erythrozyt, der von oben auf die Antikörperschicht (per Pipette) aufgebracht wird und dem nur eine kleine Anzahl Antikörpern zu Verfügung steht. Bei der Belegung im Fluss entstehen zudem durch Staudruck und Verwirbelungen in der Messzelle Kräfte, die die Antigen–Antikörper–Bindungen durch Anpressen der Zellen auf die Oberfläche fördern.

4.3.6 Zentrifugation des mit Erythrozyten belegten Quarzes

Durch die Zentrifugation eines mit Blut belegten Quarzes erwartet man, dass durch die Kräfte die während der Zentrifugation entstehen, vermehrt Erythrozyten auf die Antikörperoberfläche gedrückt werden und so mehr Antigen–Antikörper–Bindungen entstehen. Außerdem wird durch die Zentrifugation das Zetapotential der negativen Ladung, die den Erythrozyten umgibt, überwunden und so die gegenseitige Abstoßung vermindert [62]. Dadurch könnte sich die Dichte der Erythrozyten auf der Quarzoberfläche erhöhen.

Die Auswertung der Versuche zeigte (*Abb. 3–18*), dass bei normaler Konzentration der Blutprobe von 500 000 Zellen / μl , keine zusätzliche Bindung von Erythrozyten möglich war. Die maximale Dichte von ca. 20 000 Zellen / mm^2 konnte nicht weiter gesteigert werden. Ein anderes Ergebnis brachte der Versuch mit einer verdünnten Blutprobe. Es wurde Blut einer Verdünnung von 1 : 10 000 mit 500 Zellen / μl verwendet. Hier zeigte sich eine Steigerung der Dichte nach einer Zentrifugation von zwei Minuten um ca. 4 500 Zellen / mm^2 . Eine längere Zentrifugation brachte keine weitere Erhöhung der Dichte spezifisch gebundener Zellen, da vermutlich die aufgebrauchten Erythrozyten qualitativ in Kontakt und damit zur Bindung gebracht wurden.

Bei einer Zellkonzentration von 500 Zellen / μl wurden pro Versuch 125 000 Zellen auf die Quarzoberfläche aufgebracht (s. o.). Bei der anschließenden Dichtebestimmung konnten ca. 4 500 spezifisch gebundene Zellen pro mm^2 detektiert werden. Dies sind ca. 90 000 Zellen auf 20 mm^2 , was der gesamten Quarzoberfläche entspricht. Daraus folgt, dass etwa 70 % der auf den Quarz aufgebrauchten Erythrozyten spezifisch gebunden haben. Die Zentrifugation des

Quarzes erhöhte die Dichte spezifisch gebundener Zellen auf ca. 6 000 Zellen / mm². Dies bedeutet etwa 120 000 gebundene Zellen auf der gesamten Quarzoberfläche. Es haben also ca. 95 % der auf den Quarz aufgebrachten Erythrozyten spezifisch gebunden. Die Zentrifugation führte bei dieser verdünnten Erythrozytensuspension also zu einer Erhöhung der spezifisch gebundenen Zellen um ca. 25%.

Die Zentrifugation von Quarzen, die zur Blutgruppendetektion geringer Erythrozytenkonzentrationen eingesetzt werden, macht also durchaus Sinn und ist auch im Routineeinsatz praktikabel, um ein deutlicheres Ergebnis zu erreichen.

4.3.8 Fazit IgG–Monolayer

Die Messung der Blutgruppe A₁ über einen IgG Monolayer mit Anti–A BS 66 als Blutgruppenantikörper funktionierte zuverlässig. Auch war die Detektion von Blut der Gruppe A₂, das eine deutlich geringere Antigendichte pro Zelle besitzt, mit einer hohen Dichte an spezifisch gebundenen Erythrozyten möglich. Dies spricht für die hohe Sensitivität der Beschichtung, insbesondere für den Blutgruppenantikörper.

Die Versuche bei verschiedenen Beschichtungs- und Messabläufen zeigten die optimalen Temperaturbereiche für Beschichtung und Messung, sowie Aqua bidest. als geeignetes Lösungsmittel bei der Beschichtung und EDTA–TRIS–Lösung als geeignetes Lösungs- und Trägermittel bei der Blutgruppendetektion. Sein leicht alkalischer pH Wert ermöglichte die Reduktion des Zetapotentials der Erythrozytenmembran durch Ableitung der negativen Ladungen der Neuraminsäuren. Dadurch konnte ein minimaler Abstand von ca. 10 nm zwischen den Erythrozyten gewährleistet werden, was die hohe Dichte spezifisch gebundener Zellen möglich machte.

Mit niedrigen Konzentrationen der Beschichtungslösungen und des Analyts konnte die hohe Sensibilität des Systems gezeigt werden. Auch eine Beschichtung im laufenden System erwies sich als möglich. Eine Erhöhung der Dichte gebundener Erythrozyten über 20 000 Zellen / mm² für unverdünnte Analyte durch Zugabe von ionenarmen Lösungen oder durch Zentrifugation, gelang nicht. Was sich bei verdünnten Lösungen und Blutproben als Vorteil erwies, war bei unverdünnten Lösungen und Analyten nicht erfolgreich. Es ist davon auszugehen, dass trotz

weiterer Reduktion des Zetapotentials und damit der gegenseitigen Abstoßung, nicht mehr als 20 000 Zellen / mm² auf der Quarzoberfläche Platz finden. Diese Annahme wird durch die digitalen Aufnahmen (*Abb. 3–1*) der Messung bestätigt, die zeigen, dass alle Zellen dicht aneinander liegen und praktisch einen kompletten Monolayer bilden.

Durch die Berechnung der Fläche, die ein Erythrozyt benötigt (ca. 22 µm²), erkennt man, dass nicht mehr als 20 000 Zellen auf einem Quadratmillimeter Platz finden können, um einen geschlossenen Monolayer zu bilden.

4.4 Blutgruppenanalytik über einen IgM–Monolayer

Die Beschichtung des Quarzes mit einer Protein A Schicht und mit darauf gebundenen Anti–A IgG Molekülen, wurde im letzten Abschnitt vorgestellt. Der dazu verwendete Antikörper BS 66 (IgG₃ der Maus) ist ein speziell für das Quarzsystem ausgewähltes Produkt, das keine Verwendung in der herkömmlichen Routinediagnostik findet. In der serologischen Routinediagnostik werden heute fast ausschließlich monoklonale Antikörper der Klasse IgM verwendet. Es sollte deshalb auch die Möglichkeit der Blutgruppendetektion mittels IgM–Antikörpern auf einer Protein A Schicht untersucht werden. Die Bindung von IgM–Antikörpern auf einen Quarz über eine Protein A Schicht ist in den bisherigen Arbeiten [24, 54, 66, 108] nicht untersucht worden. Man weiß, dass Protein A IgM binden kann, wenn auch weniger affin als IgG. Die Affinität zu humanem IgM ist aber um ein Vielfaches höher, als die Affinität zum IgM der Maus [13, 20, 83].

Die Versuche unter Standardmethoden zeigten, dass eine Bindung von IgM Antikörpern aus der Routinediagnostik auf der Protein A Schicht des Quarzes funktionierte, allerdings mit deutlich reduzierter Dichte der später gebundenen Erythrozyten (*Abb. 3–19* und *3–20*). Der Versuch der Beschichtung bei einer Temperatur von 3 °C brachte bei beiden Beschichtungen mit Anti–A Birma I und Anti–B LB 2 einen Zugewinn von ca. 1 000 bis 1 500 Zellen / mm².

Die Variation der Bedingungen bei der Blutgruppendetektion führte nur zu geringen Veränderungen der anschließenden Erythrozytendichte. Die Messung bei 37 °C zeigte eine geringere Dichte der gebundenen Erythrozyten, was darauf zurückzuführen ist, dass es sich um ein IgM Molekül handelt, das seinen optimalen Temperaturbereich bei kälteren Temperaturen besitzt [47]. Eine Zentrifugation der noch losen Erythrozyten auf dem Quarz brachte lediglich einen Vorteil von ca. 1 000 Zellen / mm².

Wie schon in den Versuchen mit dem IgG-Monolayer, lassen sich keine direkten Aussagen über die Dichte der gebundenen IgM-Moleküle machen. Da es keine Arbeiten mit einer Inline-Messung bei Beschichtung gegeben hat, bleibt die Frage bis auf weiteres nicht hinreichend geklärt. Vergleicht man die Konzentrationen der verwendeten IgM und IgG Antikörper miteinander (*Tab. 3-6, 3-13 und 3-14*), so ist davon auszugehen, dass bei gleicher Protein A ⇔ Antikörper Bindung, die Dichte der immobilisierten IgM-Antikörper nahezu dem IgG entsprechen müssten. Durch die fünf Arme des IgM-Antikörpers müsste die Bindungsfähigkeit des IgM-Moleküls an Protein A und an das Erythrozytenantigen eigentlich dem IgG-Molekül überlegen sein. Das einzelne IgM Molekül besitzt, verglichen mit einem IgG-Molekül, häufig eine geringere Affinität zum Antigen. Da das IgM-Molekül aber fünf potentielle Antigenbindungsstellen besitzt kann es demnach eine höhere Avidität zum Antigen besitzen. Folglich müsste mindestens die gleiche Dichte an gebundenen Erythrozyten erreicht werden, wie bei Verwendung eines IgG-Antikörpers. Dies ist nicht der Fall.

Das Ergebnis, dass eine Temperatur um die 3 °C die optimale Beschichtungstemperatur für eine Bindung von Antikörpern an Protein A darstellt [54], spricht für ein Problem in der Beschichtung und nicht für ein Problem zwischen Antikörper und Blutgruppenantigen auf dem Erythrozyt. Zumal die Variation der Bedingungen für die Blutgruppenbestimmung zu keinen zusätzlichen Bindungen von Zellen führte und der Antikörper in der herkömmlichen serologischen Routinediagnostik einwandfrei funktionierte. Das wiederum zeigt auch, dass eine schlechte Beschichtung nicht durch eine Optimierung der Messbedingungen ausgeglichen werden kann. Ebenfalls ein Beweis dafür, dass die wenigen gebundenen Antikörper durchaus eine hohe Affinität zum Blutgruppenantigen besitzen und funktionieren. Dies zeigt sich ebenfalls in dem geringen

Dichteunterschied der gebundenen Zellen zwischen der Blutgruppe A₁ mit relativ vielen Antigenen auf der Oberfläche und A₂ sowie B mit weniger Antigenen [96].

Dieses Ergebnis kommt letztlich nicht ganz unerwartet und bestätigt, dass eine direkte Bindung von IgM Molekülen der Maus auf eine Protein A Schicht nicht befriedigend funktioniert. Da ein Gelingen aber von organisatorischem und finanziellem Vorteil wäre, sollte dieses Problem weiter untersucht werden. Lösungsansätze könnten die Verwendung von humanen IgM Antikörpern sein [28], die eine bessere Affinität zu Protein A besitzen und oft bei der Untersuchung des Rhesussystems eingesetzt werden. Ein weiterer Lösungsansatz könnte auch die Bindung des monoklonalen IgM der Maus über eine Sandwichbeschichtung sein.

4.5 Blutgruppenanalytik über eine Sandwichbeschichtung

Die Messung über eine Sandwichbeschichtung ist für viele serologische Fragestellungen unverzichtbar. Wenn ein Antikörper nur schlecht an die Protein A Oberfläche gebunden werden kann, so ist es notwendig, ihn über eine Anti-Immunglobulin Beschichtung zu binden. Dies ist z. B. bei Verwendung eines monoklonalen IgM der Maus der Fall, wie sich im letzten Kapitel gezeigt hat. Bei der Anti-Immunglobulin Schicht handelt es sich um ein monoklonales IgG der Maus, das mit besonders hoher Affinität durch die Moleküle des Protein A gebunden wird, vergleichbar der Bindung von Anti-A BS 66.

Auch spezielle serologische Fragestellungen können eine Sandwichbeschichtung erforderlich machen. Die Detektion des Rhesusfaktors erfordert für das Quarzsystem besondere Techniken, da das Antigen in der Membran des Erythrozyten lokalisiert ist und durch die Glycokalix mit einer Höhe von 12,5 nm umgeben wird. Die Messung über einen IgG-Monolayer ist für einen IgG-Antikörper mit einer Größe von 8,5 nm nicht möglich, da die Antigenstelle, durch die zu hohe Glycokalix, nicht zugänglich ist [28, 54]. Hier schafft die Sandwichschicht Abhilfe, da durch sie eine doppelte IgG Schicht entsteht, was einer Höhe von 17 nm entspricht. Dadurch kann die Antigenstelle mühelos erreicht werden.

In den Versuchen zur Sandwichbeschichtung sollte das Prinzip für spätere Einsätze der Beschichtung getestet werden. Es wurde versucht, einen IgG–Blutgruppenantikörper gegen die Blutgruppe A und zwei IgM–Antikörper gegen die Blutgruppen A und B zu immobilisieren. Versuche zur Immobilisation von anderen Blutgruppenantikörpern, z. B. gegen den Rhesusfaktor sind in der Folgearbeit dargestellt [28].

4.5.1 Sandwichbeschichtung mit Anti–IgG

Die Auswertung der Messung der Blutgruppe A über eine Anti–IgG und Anti–A BS 66 Beschichtung zeigt im ersten Augenblick ein nicht befriedigendes Ergebnis (*Abb. 3–25*). Bei Messung unter Standardbedingungen banden lediglich ca. 11 000 Zellen / mm² spezifisch an die Oberfläche. Verglichen mit der Messung bei einem IgG Monolayer mit demselben Antikörper, detektierte man bei Sandwichbeschichtung ca. 9 000 Zellen / mm² weniger. Rechnerisch müsste mindestens die gleiche Dichte an Zellen / mm² erreicht werden, eher mehr. Da ein Anti–IgG zwei Anti–A Moleküle binden kann, müsste die doppelte Anzahl an Blutgruppenantikörpern vorhanden sein.

Die Variation der Messung bei verschiedenen Temperaturen und der Zusatz von ionenarmen Lösungen, führten zu keinen großen Veränderungen der Dichte spezifisch gebundener Erythrozyten. Lediglich die Zentrifugation des mit Erythrozyten belegten Quarzes brachte eine Erhöhung der Dichte von ca. 1 000 Zellen / mm². Die Messung bei 3 °C verdeutlichte die geringere Aktivität des Blutgruppenantikörpers BS 66 bei Kälte.

Diese Ergebnisse und die Feststellung, dass kein Unterschied zwischen der A–Untergruppe 1 und 2 auftrat, sprechen für ein Problem der Beschichtung und nicht für ein Problem der Fähigkeit des Antikörpers Erythrozytenantigene zu binden. Dies wird vor allem ersichtlich, wenn man diese Ergebnisse mit Messungen mit Monolayer–Beschichtungen vergleicht. Die Probleme bei der Bindung von Antigenen an Antikörper konnten durch Temperaturoptimierung, Zugabe ionenarmer Lösungen und Zentrifugation deutlich gemindert werden.

Auch in diesen Versuchen zeigte sich wieder das Problem, dass zwar exakt berechnet werden konnte, wie viele Moleküle in welcher Konzentration auf den Quarz

gebracht wurden, dass jedoch keine Aussage darüber getroffen werden konnte, wie viele tatsächlich auf der Oberfläche gebunden hatten. Es ist nur eine indirekte Aussage über die Qualität der Beschichtung durch anschließende Bestimmung der Dichte gebundener Erythrozyten möglich.

Bei dem Blutgruppenantikörper handelt es sich um ein IgG₃ der Maus. Die Affinität des Anti-IgG ist für humanes IgG sehr hoch, jedoch eingeschränkt für das IgG₃ der Maus [2]. Spätere Messungen mit anderen, humanen IgG-Antikörpern in der Sandwichbeschichtung konnten die Funktion des Anti-IgG beweisen [28]. Diese Ergebnisse sprechen am ehesten für eine unzureichende Kopplung des Anti-A BS 66, ein IgG-Molekül, an das Anti-IgG. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde die Beschichtung unter der optimierten Temperatur von 3 °C durchgeführt (*Abb. 3–24*). Hier zeigte sich eine verbesserte Bindung der Erythrozyten auf der Oberfläche, was auf eine höhere Dichte der gebundenen Anti-A BS 66 Immunglobuline schließen lässt.

Es besteht die Chance, dass die bestehende Architektur mit einem besser aufeinander abgestimmten Antikörper, z. B. Anti-A einer anderen Klasse, eine Maximalbelegung zulassen würde. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt werden.

Neben diesen Erkenntnissen ist zu berücksichtigen, dass die Möglichkeit besteht, dass einige Anti-A BS 66 Antikörper auch direkt an noch freie Protein A Stellen, die nicht mit Anti-Ig-Antikörpern belegt waren, gebunden haben. Dieser Artefakt kann in der anschließenden Blutgruppendetektion durchaus zu einer erfolgreichen Belegung mit Erythrozyten führen, wenn auch in geringerer Dichte.

4.5.2 Sandwichbeschichtung mit Anti-IgM

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass eine Beschichtung der Oberfläche mit Protein A, Anti-IgM und daran gebundenes monoklonales IgM der Maus ohne Einschränkung funktioniert. Die Messungen der Blutgruppe A₁, A₂ und B waren trotz großer Dichteunterschiede der Antigenstellen (A₁ ca. 800 000 / Zelle, A₂ ca. 250 000 / Zelle und B ca. 625 000 / Zelle [47]) mit einer Dichte des gebundenen Erythrozyten von 20 000 Zellen / mm² erfolgreich (*Abb. 3–26*)

Die Variation der Versuchsbedingungen führte zu keiner Erhöhung der Dichte. Lediglich die Messung bei einer Temperatur von 37 °C zeigte bei allen Blutgruppen eine verminderte Aktivität des IgM–Blutgruppenantikörpers mit einer um ca. 2 500 Zellen / mm² reduzierten Dichte.

Vergleicht man die Ergebnisse mit denen der Monolayerbeschichtung, so stellt man fest, dass die IgM–Antikörper Birma I und LB 2 durchaus in der Lage sind Erythrozyten mit einer Dichte von 20 000 Zellen / mm² zu binden, sofern sie optimal auf die Oberfläche gekoppelt werden. Betrachtet man die Affinität des Anti–IgM, so zeigt sich, dass dieses eine hohe Affinität gegenüber IgM der Maus besitzt [3]. Das bedeutet, dass das Anti–IgM mit hoher Potenz die Blutgruppenantikörper Anti–A Birma I und Anti–B LB 2 bindet. Bei diesen Versuchen ist davon auszugehen, dass die Blutgruppenantikörper alle möglichen Bindungsstellen der Anti–IgM Immunglobuline besetzt haben. Dadurch erhält man, verglichen mit der Monolayer–Beschichtung, eine doppelte Anzahl an Blutgruppenantikörpern auf der Oberfläche. Hier hätten eigentlich deutlich mehr als ca. 20 000 Zellen / mm² binden müssen. Wie bereits oben erklärt, liegt bei einer Dichte von ca. 20 000 Zellen / mm² ein geschlossener Monolayer vor. Diese Dichte stellt somit aus Platzgründen das Maximum an spezifisch gebundenen Erythrozyten dar.

4.5.3 Fazit Sandwichbeschichtung

Grundsätzlich zeigten sich keine Unterschiede in der Fähigkeit zur Blutgruppendetektion zwischen den Monolayer–Beschichtungen und der Sandwichschicht, sofern die Kompatibilitäten zwischen den einzelnen Molekülgruppen der Beschichtung beachtet wurden (*Abb. 4–1*). Es zeigte sich, dass mit einer Sandwichbeschichtung auch IgM–Antikörper eine maximale Belegung der Quarzoberfläche mit Erythrozyten erreichen können. Somit scheinen beide Arten der Schichtarchitektur prinzipiell gleichwertig für den Einsatz in der Blutgruppendetektion zu sein. Dies muss jedoch letztendlich durch Messungen im „schwingenden“ System bestätigt werden.

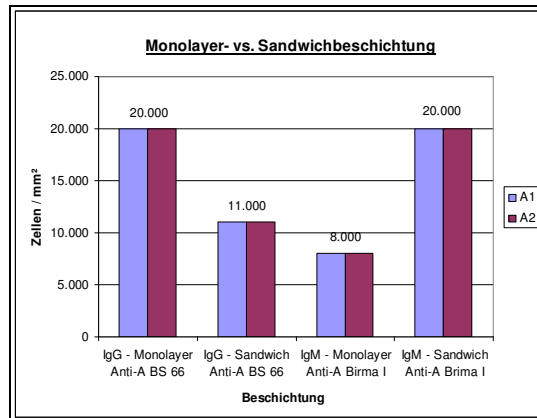


Abbildung 4-1

Vergleich zwischen der Blutgruppendetektion über Monolayer- bzw. Sandwichbeschichtung

4.6 Detektion antikörperbeladener Erythrozyten

Der Nachweis von antikörperbeladenen Erythrozyten stellt einen wichtigen klinischen Test in der serologischen Diagnostik dar, z. B. zum Nachweis eines Transfusionszwischenfalls oder eines Morbus hämolyticus neonatorum. Auch das Auftreten irregulärer Antikörper muss durch solche Tests detektiert werden. Wie schon in der Einleitung erwähnt, existieren verschiedene Techniken zum Nachweis der schon beladenen roten Blutkörperchen oder der im Plasma befindlichen Antikörper. Im Quarzsystem wurde ein so genannter direkter Coombstest durchgeführt, bei dem bereits an Erythrozyten gebundene Antikörper nachgewiesen wurden. In dieser Arbeit wurden Erythrozyten der Blutgruppe A₁ detektiert, die mit monoklonalen Antikörpern bzw. mit natürlichem Serum inkubiert wurden. Der Nachweis der inkubierten roten Blutkörperchen wurde entweder über eine Protein A Schicht oder über Protein A ↔ Anti-Ig-Immunglobulin Schicht getestet.

Nachweise anderer Blutgruppenantikörper durch das Dummy-System, wie z. B. Rhesusantikörper, finden sich in der Nachfolgearbeit [28].

4.6.1 Technik des Antikörpersuchtests im Dummy-System

Die Detektion antikörperbeladener Erythrozyten des AB0-System stellte die Quarzbeschichtung und die Technik des Dummy-System vor neue

Herausforderungen. Da fast alle Blutproben Agglutinationen zeigten, war nicht sicher, wie sie sich in der Fluidik der Dummy-Anlage verhalten würden. Vor der Messung wurden die Proben nochmals aufgeschüttelt, um möglichst kleine Agglutinate zu erhalten. Es zeigte sich, dass es durch die Agglutinate nicht zu Verlegungen im Flusssystem kam. Auch wurden keine unspezifischen Bindungen der Agglutinate auf der Quarzoberfläche beobachtet. Die Auswertung der Messungen stellte sich jedoch als Problem dar.

Wie man auf den digitalen Aufnahmen (*Abb. 3–28*) sehen kann, kam es auf der Quarzoberfläche zu spezifischen Bindungen von Agglutinaten, die teils aus mehreren Lagen bestanden. Es fanden keine einzelnen Zellen, wie in den vorherigen Versuchen. Erythrozyten, die mit Antikörperlösungen hoher Konzentration inkubiert waren, zeigten hohe Dichten an spezifisch gebundenen Agglutinaten. Auch waren die Agglutinate im Durchschnitt größer, als bei niedrigeren Konzentrationen der Antikörperlösungen. Je kleiner die Konzentration der Antikörperlösung wurde, desto geringer wurde die Dichte der gebundenen Agglutinate. Auch bei sehr hohen Verdünnungen wurden in sehr viel geringeren Dichten sehr kleine Agglutinate gebunden.

Die Verteilung der Agglutinate auf dem Quarz war ungeordnet. Dadurch war eine Auswertung nach dem im Abschnitt Methodik beschriebenen Standard mit der Angabe von spezifisch gebundenen Zellen pro mm^2 nicht möglich. Es konnten nicht mehr einzelne Quadranten untersucht und ausgezählt werden, sondern die Quarzoberfläche musste insgesamt ausgewertet werden. Die Ergebnisse wurden durch ein vierstufiges Modell mit einer qualitativen Bewertung der Dichte spezifisch gebundener Agglutinate dargestellt. Diese Form der Auswertung ist vom Untersuchenden abhängig. Eine absolute Objektivität ist damit nicht gegeben. Da die Versuche im Dummy-System eine Basis für die spätere Messung im „schwingenden“ System darstellen, wird sich zeigen, wie sich die spezifische Bindung von Agglutinaten auf das Frequenzverhalten auswirkt. Versuche mit nicht agglutinierenden Antikörpern, wie z. B. im Rhesussystem, zeigten, dass hier die Auswertung in Zellen / mm^2 möglich ist [28].

Ein Vorteil der hier getesteten Technik gegenüber herkömmlichen serologischen Methoden, wie z. B. dem direkten Coombstest im Röhrchen, war die Vermeidung des

so genannten Prozonenphänomens [32, 47]. Beim direkten Coombstest im Röhrchen werden zu den mit Antikörpern belegten Erythrozyten Anti-Ig-Immunglobuline dazugegeben. Ist deren Konzentration zu hoch, so werden alle Bindungsstellen durch jeweils ein Molekül abgedeckt. Es kann zu keiner Bindung von zwei Antigenen an zwei verschiedene Erythrozyten durch ein Molekül kommen. Dadurch ist es den Erythrozyten nicht möglich, zu agglutinieren. Der Test wird als falsch negativ erkannt. Da das Quarz-System beim direkten Coombstest nicht auf eine Agglutination der Probe angewiesen ist, sondern auch einzelne, mit Antikörpern beladene Zellen detektiert, stellt dieses Phänomen kein Problem dar.

4.6.2 Detektion über eine Protein A Schicht

Die Detektion von antikörperbeladenen Erythrozyten über eine Protein A Schicht stellt theoretisch die einfachste Methode zur Bindung dar. Die an das rote Blutkörperchen gebundenen Antikörper sollten von der Protein A Bindung spezifisch am F_c -Teil gebunden und so der Erythrozyt auf der Oberfläche fixiert werden. Untersucht wurden Erythrozyten der Blutgruppe A_1 , die mit dem monoklonalen Anti-A BS 66, ein IgG der Maus, bzw. mit Serum der Blutgruppe 0 mit überwiegend immunogenem IgG, inkubiert wurden. Da die Affinität von Protein A zum IgG₃ der Maus sehr hoch, aber zum IgM der Maus sehr niedrig ist, wurde, nach den Erkenntnissen aus den Versuchen mit einem IgM-Monolayer, auf eine Detektion von Erythrozyten, die mit einem monoklonalen IgM inkubiert worden waren, verzichtet. Es wurden auch keine Kontrollproben mit IgM inkubiertem Blut durchgeführt, da Protein A IgM, wenn auch nur mit geringer Affinität, bindet. Als Kontrollprobe wurde nicht inkubiertes Blut der Gruppe A_1 verwendet. Alle Proben mussten gewaschen sein, da Plasmaresste dazu führten, dass freie Protein A Stellen besetzt wurden und die Schicht ihre Sensibilität verlor. Ebenso durfte die Schicht nicht wie bei der Blutgruppendetektion mit Plasma gesättigt werden.

Die Ergebnisse der Messung zeigten, dass es nicht möglich war über diese Schichtarchitektur belegte Erythrozyten spezifisch zu binden. Weder Erythrozyten, die mit monoklonalen Antikörpern inkubiert worden waren, noch Zellen, die mit natürlichem Serum inkubiert worden waren, konnten spezifisch an die Protein A Oberfläche gebunden werden. Auch Messungen bei verschiedenen Temperaturen

oder unter Zugabe von ionenarmen Lösungen, sowie eine Verlängerung der Messzeit ohne Fluss und die Zentrifugation führten nicht zu besseren Ergebnissen.

Wie vorangegangene Versuche gezeigt haben, bindet das verwendete Protein A den Antikörper BS 66 mit sehr hoher Affinität. Bis zum 15fachen der eigenen Masse können gebunden werden. In diesem Versuch schaffte es das Protein A nicht den Antikörper zu binden. Die Technik der Beschichtung in der Blutgruppendetektion immobilisiert den freien Antikörper auf Protein A. Die Konzentration der angebotenen Antikörper bei Beschichtung liegt um ein Vielfaches höher, als die an einen Erythrozyten gebundenen Antikörper. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit mit der eine Bindung zwischen Protein A und Anti-A zustande kommt deutlich geringer ist. Zudem beträgt die Masse eines Antikörpers ca. $2,5 \cdot 10^{-10}$ pg. Die Masse eines Erythrozyten beträgt etwa 100 pg. Vergleicht man die Massen miteinander und berücksichtigt man, dass der Erythrozyt in Bewegung ist und dass ganze „Ballen“ an roten Blutkörperchen entstehen, im Gegensatz zum alleinigen Antikörper bei Beschichtung des Quarzes, wird deutlich, dass es für Protein A, trotz des hohen Bindungspotenzials schwierig ist, eine Bindung mit dem an den Erythrozyten gebundenen Antikörper einzugehen.

Eine weitere Erklärung für die Ergebnisse ist, dass zwar Bindungen zwischen dem Protein A und dem an den Erythrozyten gebundenen Antikörper zustande kommen, aber dass diese durch die Masse des Erythrozyten und durch die turbulenten Flussverhältnisse in der Zelle wieder auseinander gerissen werden. Die Dichte des Netzes an Bindungen zwischen Protein A \leftrightarrow Anti-A \leftrightarrow Erythrozyt ist bei der Blutgruppendetektion sehr viel dichter, als beim „Einfangen“ inkubierter Erythrozyten. Selbst bei der Zentrifugation, bei der die Bindungen quasi aneinander gedrückt wurden, konnte keine Bindung von mit Antikörpern beladenen Erythrozyten erreicht werden. Auch die Zeit, die das Protein A hat um den Erythrozyt einzufangen, spielt eine wichtige Rolle. Normalerweise benötigt Protein A ca. 15 Minuten, um genügend Antikörper zu binden. In diesen Versuchen lagen die Zeiten bei 2 Minuten und verlängert bei 10 Minuten. Die Kontaktzeit scheint unter diesen schwierigen Bedingungen zu kurz zu sein. Eine Verlängerung der Kontaktzeit brächte aber keinen praktischen Vorteil, da andere serologische Methoden dann deutlich überlegen wären.

Auch muss in Erwägung gezogen werden, dass durch die Bindung des Blutgruppenantikörpers an das Antigen des Erythrozyten der F_c -Teil des Antikörpers so verändert wird, dass er nicht mehr spezifisch von Protein A gebunden werden kann.

4.6.3 Detektion über eine Anti-Immunglobulin-Schicht

Da eine Detektion antikörperbeladener Erythrozyten über eine Protein A Beschichtung des Quarzes nicht gelang, wurden Versuche unternommen, diese über eine Anti-Ig-Immunglobulinschicht spezifisch zu binden. Auch konnten nun Versuche zur Detektion IgM beladener roter Blutkörperchen durchgeführt werden. Die Quarze wurden mit Protein A beschichtet. Darauf wurde eine Anti-IgG bzw. Anti-IgM Schicht immobilisiert. Bei den Anti-Ig-Immunglobulinen handelte es sich um monoklonales IgG der Maus, das auch schon für die Sandwichbeschichtung benutzt wurde. Als Analyt diente Blut der Gruppe A_1 , das mit monoklonalen IgG bzw. IgM inkubiert worden war. Auch wurden Erythrozyten der Gruppe A_1 , mit humanem Plasma der Blutgruppe 0 (überwiegend Anti-A Immunglobulinen vom IgG-Typ) bzw. mit humanem Plasma der Blutgruppe B (überwiegend Anti-A Immunglobuline vom IgM-Typ) inkubiert. Die Kontrollproben wurden mit nicht inkubiertem Blut der Gruppe A_1 durchgeführt. Bei der Detektion von Erythrozyten, die mit monoklonalen Antikörpern inkubiert waren, wurde zudem eine Kontrollprobe mit roten Blutkörperchen durchgeführt, die mit den jeweils nicht zur Schicht passenden Antikörpern inkubiert waren. Diese entfiel bei den Versuchen mit Plasma inkubiertem Blut, da hier auch Antikörper der jeweils anderen Gruppe vorhanden waren. Alle Proben mussten gewaschen sein, da Plasmareste dazu führen, dass Anti-Ig-Bindungsstellen besetzt werden und die Schicht ihre Sensibilität verliert. Ebenso durfte die Beschichtung nicht mit Plasma gesättigt sein.

Die Auswertung der Messungen mit roten Blutkörperchen, die mit monoklonalen Antikörpern belegt waren, zeigte, dass eine Detektion von beladenen Erythrozyten bis zum angegebenen Titer möglich war (*Tab. 3-29* und *3-30*). Mit steigender Verdünnung der Antikörperlösung und geringer werdender theoretischer Sättigung der Erythrozyten, nahm die Dichte der gebundenen Agglutinate kontinuierlich ab.

Die Messung über eine Anti-IgG Beschichtung zeigte eine wesentlich geringere Dichte an gebundenen Agglutinaten. Der Grund dafür ist, dass dieselbe Architektur wie bei der Sandwichbeschichtung genutzt wurde. Die verminderte Erythrozytendichte lässt sich mit der geringeren Affinität des Anti-IgG zum IgG₃ der Maus erklären. Die Variation der Messtechnik zeigte, dass in den jeweils optimalen Temperaturbereichen das Anti-A Immunglobulin besser an den Erythrozyt binden konnte. Dieser lag für BS 66 bei 37 °C und für Birma I bei 3 °C. Messungen mit ladungsreduzierenden Lösungen, wie LISS oder bovines Albumin 22 %, führten zu einer höheren Dichte an spezifisch gebundenen Agglutinaten, ebenso wie die Zentrifugation des mit Agglutinaten belegten Quarzes.

Bei Anti-IgM war eine Detektion bis zu einer Verdünnung von 1 : 512 und einer theoretischen Sättigung von nur 0,16 % möglich. Dies bedeutet im Vergleich mit herkömmlichen serologischen Methoden, wie dem DiaMed-System, eine erhöhte Sensitivität.

Insgesamt zeigte sich, vor allem bei der Anti-IgM Beschichtung, verglichen mit der maximalen Dichte von 20 000 Zellen / mm² bei der Sandwichtechnik, eine wesentlich geringere Dichte an gebundenen Agglutinaten. Die Technik der Sandwichbeschichtung immobilisiert den freien Antikörper auf der Anti-Ig-Schicht. Die Konzentration der angebotenen Antikörper bei Beschichtung liegt um ein Vielfaches höher, als die an einen Erythrozyten gebundenen Antikörper. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit mit der eine Bindung zwischen Anti-Ig und Anti-A zustande kommt deutlich geringer ist. Zudem beträgt die Masse eines IgG ca. $2,5 \cdot 10^{-10}$ pg und eines IgM ca. $15 \cdot 10^{-10}$ pg. Die Masse eines Erythrozyten beträgt etwa 100 pg. Vergleicht man die Massen miteinander und berücksichtigt man, dass der Erythrozyt in Bewegung ist und in ganzen Agglutinationsansammlungen auftritt, im Gegensatz zum Antikörper bei der Beschichtung des Quarzes, so wird deutlich, dass es für das Anti-Ig schwierig ist, eine Bindung mit dem an den Erythrozyten gebundenen Antikörper einzugehen. Eine weitere Erklärung ist, dass durchaus eine hohe Anzahl von Bindungen zwischen dem Anti-Ig und dem Blutgruppenantikörper zustande kommen kann, aber dass diese durch die Masse des Erythrozyten und durch die Flussverhältnisse in der Zelle wieder auseinander gerissen werden. Die Frage, warum dies nicht nach einer einfachen Blutgruppenbestimmung passiert, lässt sich dadurch beantworten, dass das Netz an Bindungen zwischen Anti-Ig ⇔ Anti-A

⇔ Erythrozyt bei der Blutgruppendetektion dichter ist, als beim „Einfangen“ inkubierter Erythrozyten. Auch die Zeit, in der Anti-Ig den Erythrozyt einfangen muss, spielt eine Rolle. Die Kontaktzeit kann unter diesen schwierigen Bedingungen zu kurz sein. Eine Verlängerung der Kontaktzeit auf zehn Minuten erbrachte aber keine deutlich erkennbar dichtere Belegung. Sie hätte zudem keinen praktischen Vorteil, da dann ebenfalls andere serologische Methoden überlegen wären.

Die Vorteile die sich durch Zusätze von ionenarmen Lösungen und durch die Zentrifugation ergaben, haben mehrere Gründe. Einerseits sind durch eine verbesserte Antigen ⇔ Antikörper Bindung, andererseits durch eine verbesserte Anbindung der inkubierten Antikörper auf der sensiblen Anti-Ig Beschichtung, höhere Dichten möglich. Da die Antigen ⇔ Antikörper Bindung ein aktives System darstellt, das sich in einem Gleichgewicht befindet, binden und lösen sich auch noch nach der Inkubation immer wieder Antikörper von ihren Antigenstellen. So können Techniken zur Reduktion, bzw. Überwindung der negativen Ladung des Zetapotentials, das die Bindung des Antikörpers an den Erythrozyten behindert, durchaus auch noch nach der Inkubation von Vorteil sein. Der zweite Grund besteht darin, ähnlich der Verwendung der basischen EDTA-TRIS-Lösung, dass die Reduktion (LISS, Albumin) bzw. Überwindung (Zentrifugation) des Zetapotentials, zu weniger gegenseitigen Wechselwirkungen führt und so zu einer besseren Annäherung des Erythrozyten an die Quarzoberfläche. Dies wiederum bedeutet eine wesentlich höhere Wahrscheinlichkeit einer Bindung zwischen Anti-Ig und dem Blutgruppenantikörper am Erythrozyt und so eine dichtere Belegung.

Die hohe Selektivität der Oberflächenarchitektur wurde durch die Kontrollproben bestätigt. Sie fielen alle negativ aus. Es kam zu keinen Interferenzen mit nicht inkubiertem Blut. Die Kontrollprobe mit IgM bzw. IgG inkubierten Erythrozyten, bewies die hohe Diskriminierungsfähigkeit der Oberfläche.

Die Versuche mit Erythrozyten, die mit natürlichem Plasma inkubiert wurden, brachten ähnliche Ergebnisse. Insgesamt konnten höhere Dichten an Agglutinen gebunden werden. Die Detektion gelang bei Plasma der Gruppe 0 bis zu einer Verdünnung von 1: 512, wobei keine Versuche mit höheren Verdünnungen durchgeführt wurden und bei Plasma der Blutgruppe 0 bis zu einer Verdünnung von 1 : 256. Die Variation der Messtechnik zeigte ebenfalls eine leicht erhöhte Dichte an

gebundenen Agglutinaten, verglichen mit der Messung unter Standardbedingungen. Die höheren Belegungsdichten von mit Plasmaantikörpern inkubierten Erythrozyten sind dadurch zu erklären, dass einerseits höhere Konzentrationen an Antikörpern vorlagen, andererseits spielt auch die höhere Affinität des Anti-Ig-Immunglobulins für humane Antikörper [1, 2] eine entscheidende Rolle.

4.6.4 Vergleich mit dem DiaMed-System

Vergleiche der Detektion von inkubierten Erythrozyten auf dem Quarz mit dem direkten Coombstest im DiaMed-System, zeigten, dass die Sensitivität und Spezifität des Quarzsystems durchaus mit der des DiaMed-System vergleichbar ist. Lediglich die Detektion von Erythrozyten, die mit den monoklonalen IgG-Antikörpern BS 66 inkubiert waren, zeigte im DiaMed-System ein besseres Ergebnis. Die verwendeten Anti-Ig-Immunglobuline des DiaMed-Systems scheinen eine höhere Affinität zum IgG3 der Maus zu besitzen, als die der Schichtarchitektur des Quarzes.

Die Detektion von mit monoklonalen IgM beladenen roten Blutkörperchen, zeigte im DiaMed-System eine positive Reaktion bis zu einer Verdünnung von 1 : 256. Mit dem beschichteten Quarz ließ sich noch eine Verdünnung von 1 : 512 unter Einsatz der Zentrifugation nachweisen.

Anzumerken ist, dass im DiaMed-System mit zwei Hilfsmitteln gearbeitet wurde, die im Quarzsystem nicht unter Standardbedingungen verwendet wurden. Das DiaMed-System arbeitete immer mit Zentrifugation und Zugabe ladungsreduzierender LISS-Lösung. Deshalb muss beim direkten Vergleich mit dem Quarz-System das Ergebnis der entsprechenden Variation der Messung herangezogen werden und nicht die Ergebnisse unter Standardbedingungen.

4.6.5 Fazit Detektion antikörperbeladener Erythrozyten

Die Detektion antikörperbeladener Erythrozyten funktionierte auf dem Quarz nicht nur bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern, sondern auch und sogar besser mit Erythrozyten, die mit natürlichem Plasma inkubiert worden waren. Dies ist für den späteren Einsatz in der serologischen Routine wichtig. Leider kann das Ergebnis nicht in absoluten Zahlen ausgedrückt werden, wie es bei der

Blutgruppenbestimmung mit dem Quarz-System möglich ist. Die Verwendung dieser Beschichtungs- und Messtechnik in der Zukunft wird von der Möglichkeit der Umsetzung in das „schwingende“ Quarzsystem abhängen.

Es sollten zudem weitere serologische Fragestellungen durch diese Technik beantwortet werden können, z. B die Durchführung einer Kreuzprobe, bei der selektiv Immunglobuline aus Patientenplasma auf die Quarzoberfläche gebunden werden und die Erythrozyten vom Spender getestet werden können. Ein weiterer Ansatz ist die Durchführung eines indirekten Coombstests, bei dem Testerythrozyten auf die Quarzoberfläche gebunden werden und Spenderplasma über diese Schicht läuft. Darauf gebundene Antikörper werden zusammen mit den Erythrozyten von der Schicht abgestoßen und auf einem zweiten Quarz, nach der hier beschriebenen Methode detektiert. Erste Erfolg versprechende Versuche in diese Richtung wurden bereits durchgeführt [38].

4.7 Regeneration gebrauchter Quarze

Die Regeneration gebrauchter Quarze stellt eine wichtige Methode zur Verwendung des Quarzes in der alltäglichen serologischen Routinediagnostik dar. Nur bei Regenerationsmethoden, die ohne den Quarz aus der Messzelle auszubauen, also im Fluss, möglich sind, kann das System Zeit und Kosten sparend arbeiten. Die ideale Methode der Regeneration besteht in einer schnellen Entfernung der gebundenen Erythrozyten von der Antikörperschicht, ohne diese dabei zu beschädigen. Bisherige Arbeiten verwendeten zur Regeneration entweder stark saure oder alkalische Reagenzien, im sauren Bereich Glycin [24, 66] und im alkalischen Bereich NaOH unterschiedlicher Molarität [38, 54, 66, 108]. Die Arbeiten beschreiben aber noch keine Technik, die den Anforderungen der Blutgruppenbestimmung im Quarz-System gerecht wird. Die gebundenen Erythrozyten lösen sich zwar von der Oberfläche, jedoch immer auch ein Teil der Beschichtung, so dass diese wieder ersetzt werden muss.

In dieser Arbeit wurden die bisher bekannten chemischen Regenerationsmethoden im Dummy-System getestet und deren Optimierung versucht. Zusätzlich wurden

Techniken aus der herkömmlichen Serologie, wie die Wärmeelution und die Elution mit Diethyläther im Quarzsystem geprüft. Im dritten Abschnitt wurden mechanische Methoden zur Abspaltung der gebundenen Erythrozyten untersucht.

Eine wichtige Rolle spielte bei diesen Versuchen die Kontrollprobe mit Blut der Gruppe B. Da durch die Regeneration die Beschichtung beschädigt werden konnte, war ohne Kontrollprobe eine sichere Aussage, ob Erythrozyten spezifisch oder durch unspezifische Wechselwirkungen zwischen beschädigter Oberfläche und Zelle gebunden hatten, nicht möglich. Dies würde ein falsch positives Ergebnis bedeuten. Wenn direkt im Anschluss an die Regeneration keine erfolgreiche Blutgruppenbestimmung durchgeführt werden konnte, wurde zuerst die oberste Schicht des Quarzes erneuert und dann wieder detektiert. Gelang erneut keine positive Detektion, wurde die nächste darunter liegende Schicht ersetzt. Dieser Vorgang wiederholte sich so lange, bis die gesamte Schichtarchitektur erneut aufgebaut und eine positive Detektion möglich war.

Getestet wurden sowohl eine Monolayer-Beschichtung, als auch eine Sandwich-Beschichtung. Zudem wurde getestet, ob sich Blut der Gruppe A₂ durch die geringere Anzahl der Antigenstellen, besser von der Oberfläche ablösen lässt. Insgesamt zeigten sich aber keine Unterschiede zwischen der Monolayer- und der Sandwich-Beschichtung. Auch konnten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Ablöseverhaltens zwischen den beiden A Untergruppen erkennen lassen.

4.7.1 Regeneration mit Chemikalien

Es zeigte sich, dass eine Regeneration mit Aqua bidest. nicht möglich war. Es kam zur erwarteten Hämolyse. Die verbliebenen Erythrozytenreste konnten nicht von der Quarzoberfläche abgelöst werden (*Abb. 3–29*). Durch Hämolyse kam es zum Verlust des Zetapotentials und damit zur notwendigen Abstossungskraft der Erythrozyten, was zu unspezifischen Bindungen auf der Quarzoberfläche und Anhaftungen im gesamten Flusssystem des Dummys führte.

Die Regeneration mit Salzsäure bei einem pH Wert von 1,5 zeigte, dass alle roten Blutkörperchen von der Oberfläche gelöst wurden, doch kam es ebenfalls zur Beschädigung der Oberflächenbeschichtung (*Tab. 3–39 und 3–40*). Die gebundenen

Antikörper und das Protein A wurden denaturiert und der Großteil von der Goldoberfläche gelöst. Erst nach vollständiger Neubeschichtung des Quarzes war wieder eine erfolgreiche Blutgruppendetektion möglich. Eine Regeneration mit Salzsäure bringt also keine Vorteile gegenüber anderen Methoden, wie z: B das Quarzrecycling mit Piranha-Lösung.

Die Regeneration mit Glycin zeigte, dass direkt im Anschluss, ohne Teilerneuerung, eine Blutgruppenbestimmung wieder möglich war. Die Kontrollprobe führte zu einem negativen Ergebnis. Die Dichte der gebundenen Erythrozyten wies jedoch schon nach dem ersten Zyklus eine Reduktion um ca. 4 000 Zellen / mm² auf (*Abb. 3–30*). Nach dem vierten Zyklus, bei dem nur noch ca. 8 000 bis 9 000 Zellen / mm² spezifisch gebunden werden konnten, wurde der Versuch abgebrochen und der Quarz recycelt und erneut beschichtet. Die anschließende Messung zeigte bei beiden Beschichtungsmodellen und Blutgruppen wieder eine volle Sensitivität mit ca. 20 000 Zellen / mm².

Eine Regeneration mit Glycin löst die Bindung zwischen Erythrozytenantigen und Blutgruppenantikörper, gleichzeitig aber auch, wenn auch nicht in diesem Ausmaß, die Bindung zwischen Protein A und Antikörper [24, 54, 66]. Dies erklärt die abnehmende Sensitivität der Quarzbeschichtung. Ein permanenter Einsatz von Glycin zur Regeneration kann also nicht ohne intermittierende Beschichtung mit Blutgruppenantikörpern stattfinden.

Der Einsatz von saurer EDTA-TRIS-Lösung mit einem pH Wert von 4,0, bzw. basischer EDTA-TRIS-Lösung mit einem pH Wert von 12,0 ist zur Regeneration des Quarzsystems nicht geeignet. Die extremen pH Werte führen zu keiner Lösung der Bindung zwischen Blutgruppenantikörper und Erythrozytenantigen. Lediglich eine Hämolyse der gebundenen Erythrozyten konnte beobachtet werden. Es traten somit dieselben Probleme wie bei der Regeneration mit Aqua bidest. auf. Diese Art der Regeneration stellt also ebenfalls keine Alternative zur herkömmlichen Methode mit NaOH 0,1 molar da.

Trotz ähnlicher pH Werte zeigen Glycin (pH 2,9) und die leicht saure EDTA-TRIS-Lösung (pH 4,0) ein unterschiedliches Verhalten in der Ablösung von Erythrozyten von der Quarzoberfläche. Dies spricht dafür, dass nicht allein der pH Wert, sondern

auch andere Faktoren für ein unterschiedliches Verhalten in der Oberflächenregeneration verantwortlich sind.

Die Verwendung von NaOH zur Regeneration zeigte dieselben Ergebnisse, wie in den vorangegangenen Arbeiten [38, 54, 108]. Eine Verwendung von 0,1 molarer Lösung erbrachte eine vollständige Entfernung von gebundenen Erythrozyten. Eine sofortige Blutgruppenbestimmung war nicht möglich, da bei der Monolayer-Beschichtung erst die Blutgruppenantikörperschicht ersetzt werden musste. Bei der Sandwich-Beschichtung musste zudem das Anti-Ig-Immunglobulin erneut immobilisiert werden. Im Anschluss daran gelang eine erneute positive Blutgruppendetektion. Insgesamt ließ sich dieser Vorgang fünfmal wiederholen, bis die Dichte der gebundenen Erythrozyten geringer wurde (*Abb. 3–31*). Nach Recycling und erneuter vollständiger Beschichtung konnte wieder eine erfolgreiche Messung durchgeführt werden.

NaOH in einer Konzentration von 0,1 molar löst nicht nur die Bindung zwischen Erythrozyt und Antikörper sondern auch die zwischen Protein A und dem Anti-A [54]. Deshalb musste die Antikörperschicht vor jeder Messung erneut immobilisiert werden. Zudem ließ sich feststellen, dass bei jeder Regeneration mit NaOH ein Teil des Protein A von der Oberfläche abgelöst wurde. Dies erklärt den Verlust an Sensibilität nach fünf Zyklen, zeigt aber auch die hohe Bindungspotenz von Protein A zum IgG-Antikörper. Erst nach mehreren Zyklen wird soviel Protein A abgelöst, dass die gebundene Anzahl an Antikörpern so reduziert wird, dass eine Dichtedifferenz in der Dichte der detektierten Erythrozyten zu erkennen ist.

Die Verwendung von drei molarem NaOH führte zur vollständigen Entfernung der Erythrozyten von der Quarzoberfläche. Doch konnte der Quarz erst nach Rekonstruktion der gesamten Oberflächenbeschichtung zur erneuten erfolgreichen Blutgruppendetektion eingesetzt werden (*Tab. 3–70* und *3–71*). NaOH in dieser hohen Konzentration löste das Protein A nahezu vollständig mit von der Oberfläche. Die Verwendung der stark basischen NaOH-Lösung zeigte damit das gleiche Ergebnis wie die Verwendung von Salzsäure.

4.7.2 Regeneration mit serologischen Elutionsmethoden

Die Regeneration mit Methoden der Elution wurde auf das Quarzsystem übertragen. Es wurden die Techniken mit Diethyläther und mit Wärme im Wasserbad untersucht. Die Elutionsmethoden dienen in der Laborserologie der Loslösung von Antikörpern aus der Bindung mit den Erythrozyten, um sie in Lösung zu bekommen und verschiedenen Tests zu unterziehen [47, 90].

4.7.2.1 Elution mit Diethyläther

Die Regeneration wurde nach Standardmethoden durchgeführt. Sie stellte sich als sehr aufwendig dar, da das gesamte System unter einer Abluftanlage aufgebaut werden musste. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte eine vollständige Entfernung der Erythrozyten von der Oberfläche. Ein direkt darauf folgender Wiederverwertbarkeitsversuch zeigte keine erneute Bindung von Erythrozyten auf der Oberfläche. Erst nach Rekonstruktion der gesamten Schichtarchitektur war wieder eine Blutgruppenbestimmung möglich (*Tab. 3–48* und *3–49*). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Monolayer- und Sandwich-Beschichtung, sowie zwischen den Blutgruppen A₁ und A₂.

Folglich werden durch Diethyläther sowohl die Bindungen von Antikörper zu Antigen, als auch die Bindungen zwischen den Antikörpern in der Sandwichschicht bzw. zwischen Protein A und Antikörper gelöst. Zudem reduziert Diethyläther die Menge an gebundenem Protein A in dem Maße, dass keine ausreichende Menge an Antikörpern mehr gebunden werden kann. Die Technik der Regeneration mit Äther stellt somit, angesichts des Aufwandes und des unbefriedigende Ergebnisses, keine Alternative zu den herkömmlichen Regenerationsmethoden dar.

4.7.2.2 Wärmeelution

Die Regeneration bei 56 °C im Wasserbad zeigte ebenfalls eine erfolgreiche Ablösung von Erythrozyten von der Quarzoberfläche. Allerdings wurde auch hier wieder die Oberflächenbeschichtung beschädigt. Erst eine vollständige Rekonstruktion der Beschichtung führte wieder zu einem positiven Ergebnis im anschließenden Wiederverwertbarkeitstest (*Tab. 3–50* und *3–51*). Es zeigten sich

keine Unterschiede zwischen der Monolayer- und Sandwich-Beschichtung, sowie zwischen den Blutgruppen A₁ und A₂.

Die Elution bei 56 °C ist eine sehr aufwendige Technik zur Regeneration gebrauchter Quarze und erfordert den Ausbau aus der Messzelle. Zudem scheint die Hitze die Proteinstrukturen von Protein A und den Antikörpern so zu denaturieren, dass eine anschließende Messung ohne erneute Beschichtung nicht mehr möglich ist. Die Technik der Regeneration mit Wärme bei 56 °C stellt somit, angesichts des Aufwandes und des unbefriedigende Ergebnisses, auch keine Alternative zu den herkömmlichen Regenerationsmethoden dar.

4.7.3 Regeneration mit mechanischen Methoden

Zwei verschieden Ansätze zur Regeneration mit mechanische Methoden wurden getestet. Der Versuch in der Zentrifuge zur Ablösung der Erythrozyten mit Zentrifugalkraft und der Versuch im Mischschüttler mit Stosswellen. Erste Ansätze zur mechanischen Ablösung der Erythrozyten gibt es bereits im schwingenden System. Durch Erhöhung der Amplitude des Quarzes wurden die Bindungen zwischen Erythrozytenantigenen und Antikörper [38], bzw. zwischen Antikörper und Virus [21] gelöst.

4.7.3.1 Regeneration mit der Zentrifuge

Die Ergebnisse zeigen, dass es in der Zentrifuge nicht möglich war die gebundenen Antikörper von der Oberfläche abzulösen (*Tab. 3–52*). Auch eine Verlängerung der Zeit und eine Erhöhung der Drehzahl, führten zu keinem positiven Ergebnis. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Monolayer- und Sandwich-Beschichtung, sowie zwischen den Blutgruppen A₁ und A₂.

Die alleinige Kraft mit einem Vektor von ca. 90 ° gemessen an der Oberfläche reicht nicht aus, die Bindungen zwischen Erythrozytenantigenen und Antikörper zu lösen. Es war auch keine Ablösung von Teilen der Beschichtung zu beobachten.

4.7.3.2 Regeneration mit dem Mischschüttler

Die Auswertung der Versuche im Mischschüttler führte zu einer erfolgreichen Ablösung von spezifisch gebundenen roten Blutkörperchen von der Oberfläche. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Monolayer- und Sandwich-Beschichtung, sowie zwischen den Blutgruppen A₁ und A₂. Auffallend war die Verteilung der Erythrozytenablösung. Bei Ablösung von roten Blutkörperchen mit Chemikalien zeigte sich eine vollständige Lösung von Erythrozyten auf der gesamten Quarzoberfläche. Hier zeigte sich eine zentrale Zone von ca. 0,5 mm Durchmesser, die frei von Erythrozyten war und eine Zone am Rand, die mit zunehmendem Abstand von der Mitte, eine immer größer werdende Dichte an noch gebundenen roten Blutkörperchen aufwies (*Abb. 3–33*). Diese Verteilung konnte auch schon in einer anderen Arbeit bei Erhöhung der Amplitude des schwingenden Quarzes beobachtet werden.

Eine Erklärung für dieses Phänomen ist die Form der Welle, die durch die Schwingungen auf dem Mischschüttler entsteht. Durch diese Welle wird Kraft mit sich schnell änderndem Vektor auf den Quarz und damit auf die Antigen ↔ Antikörper Bindung übertragen. Diese lässt sich so lösen. Die Summe der Vektoren führt zur größten Kraft im Zentrum des Quarzes, so dass es dort zu einer maximalen Ablösung der roten Blutkörperchen kommt. Mit Zunahme der Entfernung vom Zentrum wurde die Dichte an noch gebundenen Erythrozyten größer. Es ist unwahrscheinlich, dass die Stärke der Bindung zwischen Erythrozyt und Blutgruppenantikörper innerhalb des Quarzes unterschiedlich ist. Das Phänomen der unterschiedlichen Dichte von gebundenen Erythrozyten ist bei den bisherigen Versuchen nicht aufgetreten.

Der Wiederverwertbarkeitstest zeigte, dass eine Blutgruppendetektion direkt im Anschluss an die Regeneration möglich ist, ohne dass die Beschichtung erneuert werden muss. Ab dem vierten Zyklus zeigte sich eine Abnahme der gebundenen Erythrozyten. Ab dem sechsten Zyklus konnten nur noch etwa. 8 000 bis 8 500 Zellen / mm² detektiert werden. Nach erneuter Immobilisation mit Blutgruppen- bzw. Sandwich- und Blutgruppenantikörpern konnte eine erneute Detektion der Blutgruppe A₁ mit ca. 20 000 Zellen / mm² durchgeführt werden (*Abb. 3–34*). Dies spricht dafür, dass neben den roten Blutkörperchen auch Antikörper aus der

Oberflächenbeschichtung mitgerissen werden. Für einige Zyklen reicht die Dichte der Anti-A Immunglobuline aus, um eine maximale Belegung mit Erythrozyten zu garantieren. Auch die Erythrozyten der Gruppe A₂ konnten noch nach mehreren Zyklen mit maximaler Dichte detektiert werden, was wiederum für die hohe Bindungspotenz des Antikörpers spricht.

Die Regeneration im Mischschüttler stellt eine Basis für weitere Entwicklungen dar. Die Ergebnisse zeigen, dass eine selektive Ablösung von spezifisch gebundenen Erythrozyten mit mechanischen Methoden bis zu vier Zyklen möglich war. Das Verbleiben von restlichen noch spezifisch gebundenen roten Blutkörperchen und die langsame Mitlösung von Antikörpern aus der Protein A Bindung stellen jedoch ein noch zu lösendes Problem dar.

4.7.4 Recycling von Quarzen

Gebrauchte Quarze können durch Recycling regeneriert werden. Durch eine Behandlung im Piranhabad wurde die gesamte organische Beschichtung von der Oberfläche abgelöst. Die Goldoberfläche wurde im Anschluss noch im Acetonbad gelagert, so dass eine größere Hydrophilität für die anschließende Beschichtung entstand. Die Ergebnisse der Recyclingzyklen zeigten, dass nach ca. zehn Zyklen die Dichte der bei einer Blutgruppendetektion gebundenen Erythrozyten kontinuierlich abnahm. Die Ursache, dass Protein A nicht selektiv von der Goldoberfläche entfernt werden konnte ohne dass Goldatome von der Oberfläche mit abgelöst wurden, liegt in der starken Bindung zwischen Protein A und Gold, die durch Disulfidbrücken aufrechterhalten wird. Nach einigen Messzyklen war die Oberfläche der Goldbeschichtung so verändert, dass immer weniger Protein A immobilisiert werden konnte. Dies führte in der Folge zur Abnahme der Antikörperdichte (*Abb. 3–35*). Dieses Phänomen wurde schon in vorangegangenen Arbeiten erkannt. [54, 66].

4.7.5 Fazit Regeneration

Nach Auswertung aller Regenerationsversuche steht fest, dass für das Dummy-System noch keine optimale Regenerationsmethode entwickelt werden konnte. Die viel versprechenden Ansätze stellen die Regeneration mit Glycin und niedrig molarer NaOH-Lösung sowie die mechanische Regeneration mit dem Mischschüttler dar. Die Übertragung dieser Regenerationstechniken in das „schwingende“ System wird zeigen, welche Ansätze letztlich Erfolg haben werden. Die Basis hierfür konnte durch diese Versuche geschaffen werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Fazit

Die Blutgruppenbestimmung über einen mit Antikörpern beschichteten Schwingquarz ist ein zuverlässiges und sehr sensitives Verfahren, das bereits die prinzipielle Fähigkeit zur vollautomatisierten Blutgruppenanalyse nachweisen konnte.

Diese Arbeit sollte die Bedingungen zur Beschichtung des Quarzes mit Antikörpern und der anschließenden Detektion von Erythrozyten, durch optische Auswertung der Belegungsart und –Dichte in einem Dummy–System untersuchen.

Die Umsetzung der Technik in das Dummy–System, sowie die Verwendung der Schichtarchitektur mit Protein A und Anti–A zur Blutgruppenanalyse, gelangen problemlos. Die Auswertung der Ergebnisse über eine optische Vermessung der spezifisch gebundenen Erythrozyten stellt ein sehr elegantes Verfahren dar, das eine zuverlässige Sensitivität und Spezifität zeigt. Mit Hilfe dieser Technik und der hohen Flexibilität des gesamten Dummy–Systems konnten die gestellten Fragen zur Optimierung und Weiterentwicklung der QCM–Beschichtung hinreichend beantwortet werden.

Die hohe Sensitivität der Beschichtung konnte durch die Versuche mit einer A₂–Blutprobe gezeigt werden, die die gleiche Dichte an spezifisch gebundenen Erythrozyten aufwies, wie die Tests mit A₁. Zudem zeigten die Versuche mit Konzentrationsvariationen bei der Beschichtung und bei der Blutgruppendetektion, dass eine Blutgruppenbestimmung bis zu einer mehrfachen Verdünnung möglich ist. Dies trifft sowohl auf die Lösungen bei der Beschichtung, als auch auf die Verdünnung der zu analysierenden Blutprobe zu. In vielen Fällen konnten sogar höhere Verdünnungen detektiert werden als bei der Gelzentrifugationsmethode, mit der das Dummy–System verglichen wurde.

Die Optimierung der Beschichtung zeigte, dass der Einsatz von Aqua bidest. als Trägerlösung für die einzelnen Substanzen am besten geeignet ist. Der Unterschied zu den anderen getesteten Lösungen war jedoch nicht gravierend. Ferner zeigte die

Beschichtung bei unterschiedlichen Temperaturen, dass in einem Temperaturbereich zwischen 3 °C und 22 °C eine optimale Erythrozytendichte erreicht werden kann. Die Beschichtung des Quarzes im Fluss ist nur bei sehr langsamer Geschwindigkeit möglich oder bei Einhaltung einer Immobilisationszeit ohne Fluss.

Die Versuche zur Optimierung der Messung zeigten, dass der Einsatz von EDTA–TRIS–Lösung mit einem pH Wert zwischen 8 und 8,5 als Trägerlösung bei der Blutgruppendetektion am besten geeignet ist. Der Puffer hat den Vorteil, dass er als einzige Substanz den optimalen pH Wert garantieren kann, bei dem eine maximale spezifische Erythrozytenbindung möglich ist. Ferner kann durch EDTA die Gerinnungsfähigkeit des Blutes reduziert werden, ebenso die Aktivität des Komplementsystems, was bei der Verwendung einer Vollblutprobe eine entscheidende Rolle spielt. Der Einsatz von Tween stellt ebenfalls einen Vorteil für die Fluidik dar. Nachteilig ist, dass die EDTA–TRIS–Lösung bis jetzt noch nicht kommerziell zu erwerben ist und deshalb selbst hergestellt werden muss. Die Temperaturvariationen zeigten, dass die Messung mit einem IgG–Monolayer in einem Temperaturbereich von 22 °C bis 37 °C optimal funktionierte. Zusätze zur Förderung der Antigen–Antikörper–Bindung, wie sie in der serologischen Routinediagnostik verwendet werden, bringen beim Einsatz einer IgG–Monolayer–Beschichtung keine Vorteile. Vergleichende Messungen mit Belegung im Fluss und Belegung mit der Pipette zeigten, dass die spezifische Bindung von Erythrozyten im Fluss zu einer höheren Dichte führt, trotz geringerer Immobilisationszeit. Insgesamt lässt sich festhalten, dass eine Erhöhung der Dichte an spezifisch gebundenen Erythrozyten über ca. 20 000 Zellen / mm² nicht möglich ist. Bei dieser Konzentration zeigt die Quarzoberfläche eine vollständige Belegung mit roten Blutkörperchen. Es konnten immer nur Monolagen beobachtet werden. Doppelte Lagen an roten Blutkörperchen traten nicht auf.

Die Antworten auf andere serologische Fragestellungen im Dummy-System konnten durch die Entwicklung neuer Architekturen der Beschichtung gegeben werden. Der IgG–Monolayer zeigte, dass eine Bindung von IgM–Molekülen an die Protein A Schicht möglich ist. Auf die Kompatibilität zwischen Klasse und Herkunft des Antikörpers und Protein A muss jedoch geachtet werden. Das gleiche Ergebnis brachten auch die Versuche zur Blutgruppendetektion über eine Sandwichbeschichtung. Wenn man auf die Kompatibilität zwischen

Blutgruppenantikörper und Anti-Ig-immunglobulin achtet, ist diese Technik ein guter Ansatz zur Beantwortung neuer immunhämatologischer Fragestellungen.

Die Durchführung eines direkten Coombstests war im Dummy-System nur über eine Anti-Ig-Immunglobulin-Beschichtung möglich. Die direkte Ankopplung von Erythrozyten auf die Protein A Oberfläche misslang. Da es zur Agglutination der Analyten kam, konnten die Ergebnisse nicht quantitativ dargestellt werden. Das bedeutet, dass eine Angabe in absoluten Werten, wie bei der Blutgruppendetektion, bei Agglutination des Analyten nicht möglich ist. Auch bei dieser Art der Beschichtung und Detektion müssen die notwendigen Kompatibilitäten zwischen Antikörpern und Protein A und zwischen den Antikörpern untereinander beachtet werden. Die Unterschiede bei den Versuchsergebnissen mit monoklonalen Antikörperlösungen und natürlichem humanem Plasma waren eher gering. Vergleiche mit dem DiaMed-System zeigten, dass die Sensitivität der Quarzbeschichtung durchaus mit der des DiaMed-Systems vergleichbar ist.

Die Versuche zur Regeneration des Quarzes zeigten, dass es auch hier Ansätze für befriedigende Problemlösungen gibt. Die Optimierung der chemischen Methoden führte allerdings zu keiner Lösung, die auf eine erneute Antikörperbeschichtung vollständig verzichten kann. Auch die aus der Serologie bekannten Methoden der Elution enttäuschten. Erste positive Ansätze brachten die Versuche mit mechanischen Methoden, bei denen eine selektive Abspaltung von Erythrozyten gezeigt werden konnte. Aber auch hier lösten sich nach einigen Zyklen Blutgruppenantikörper von der Protein A Beschichtung. Dadurch war die Blutgruppendetektion nur noch mit einer immer geringeren werdenden Dichte an spezifisch gebundenen Erythrozyten möglich. Erst nach erneuter Antikörperimmobilisierung konnte die gewohnte Dichte wieder erreicht werden.

5.2 Ausblick

Die erfolgreichen Versuche haben die Grundlage für die Beantwortung weiterer serologischer Fragestellungen geschaffen. Neben der Detektion weiterer Blutgruppensysteme, wie z. B. Rhesus, Kell und Duffy, können auch Antikörpersuchtests mit inkompletten Antikörpern, wie z. B. Anti-D, im Dummy-System durchgeführt werden [28]. Aber auch völlig neue serologische Fragestellungen können mit dem Prinzip der verwendeten Schichtarchitektur beantwortet werden. So konnte die Separierung von Thrombozyten aus einer Vollblutprobe mit auf Protein A gebundenen Glykoprotein-IIa / IIIa-Antikörpern mit dieser Technik im Dummy gezeigt werden.

Mit zukünftigen Beschichtungstechniken und völlig anderen Schichtarchitekturen, werden weitere serologische und andere biotechnologische Fragestellungen beantwortet werden können. Ein Ansatz ist die Verwendung von Polylysinen und Erythrozytenmembranen, sog. Ghosts, ein weiterer der Einsatz von Phytoagglutininen, sog. Lektinen. Ein interessantes Beispiel stellt die Verwendung von sog. Aptameren dar. Hierbei handelt es sich um Einzelstrang-DNA-Moleküle, die als Antikörperersatz auf dem Schwingquarz dienen und für jedes beliebige Antigen synthetisiert werden kann. Hiermit konnten bereits erfolgreich Thrombozyten spezifisch auf der Quarzoberfläche gebunden werden [19]

Letztlich muss sich zeigen, welche im Dummy entwickelte Technik und Architektur der Beschichtungen auch im „schwingenden“ System zur Anwendung kommen kann. Bei der Projektion in dieses System müssen sehr viele Faktoren beachtet werden, sowohl technischer, als auch biologischer und immunologischer Art. Es können neue Interferenzen entstehen, die mit den Komponenten des Dummys bisher nicht erkannt wurden.

Festzustellen bleibt, dass auch bei voller Funktion in der „schwingenden“ Anlage und Detektion der Ergebnisse über einen Frequenzabfall, die parallele optische Beobachtung der Messung und Auswertung der Ergebnisse immer eine wichtige Rolle spielen wird. Die dafür benötigten Systeme befinden sich bereits in der Erprobung.

6 Anhang

6.1 Verzeichnis der Tabellen

| | | |
|----------------------|--|----|
| Tabelle 1–1: | Geno- und Phänotypen im AB0–System_____ | 17 |
| Tabelle 1–2: | Häufige Blutgruppenantikörper_____ | 20 |
| Tabelle 1–3: | Antigenanzahl pro Erythrozyt im AB0–System_____ | 22 |
| Tabelle 2–1: | Qualitative Auswertung direkter Coombstest auf Quarz_____ | 64 |
| Tabelle 3–1: | Detektion Blutgruppe A ₁ und A ₂ über IgG–Monolayer_____ | 69 |
| Tabelle 3–2: | Lösungsmittelvariation bei Beschichtung_____ | 70 |
| Tabelle 3–3: | Ladungsreduzierende Lösungen bei Blutgruppendetektion_____ | 74 |
| Tabelle 3–4: | Temperaturvariation im DiaMed–System_____ | 77 |
| Tabelle 3–5: | Verdünnungsreihe Protein A_____ | 78 |
| Tabelle 3–6: | Verdünnung und Titer Anti–A BS 66_____ | 78 |
| Tabelle 3–7: | Verdünnungsreihe Blut A ₁ _____ | 80 |
| Tabelle 3–8: | Verdünnungsreihe Blut A ₁ , Test im DiaMed–System_____ | 81 |
| Tabelle 3–9: | Volumen und Masse Protein A und Anti–A BS 66_____ | 83 |
| Tabelle 3–10: | Immobilisationszeit und Massengeschwindigkeit_____ | 83 |
| Tabelle 3–11: | Analytvolumen und Erythrozytenanzahl_____ | 85 |
| Tabelle 3–12: | Immobilisationszeit und Zellgeschwindigkeit A ₁ _____ | 85 |
| Tabelle 3–13: | Masse, Konzentration und Titer von Anti–A Birma I_____ | 88 |
| Tabelle 3–14: | Masse, Konzentration und Titer von Anti–B LB 2_____ | 91 |
| Tabelle 3–15: | Masse, Konzentration und Titer von Anti–IgG und Anti–A BS 66_____ | 93 |
| Tabelle 3–16: | Masse, Konzentration und Titer von Anti–IgM, Anti–A Birma I und Anti–B LB 2_____ | 94 |
| Tabelle 3–17: | Konzentration Blut der Gruppe A ₁ _____ | 96 |
| Tabelle 3–18: | Masse, Konzentration und Titer Anti–A BS 66_____ | 96 |
| Tabelle 3–19: | Masse und Konzentration von Protein A_____ | 96 |
| Tabelle 3–20: | Detektion mit monoklonalen AK beladener Erythrozyten über Protein A_____ | 97 |

| | | |
|----------------------|--|-----|
| Tabelle 3–21: | Konzentration Blut der Gruppe A ₁ _____ | 97 |
| Tabelle 3–22: | Masse, Konzentration und Titer von Anti–A aus Plasma 0_____ | 97 |
| Tabelle 3–23: | Masse und Konzentration von Protein A_____ | 98 |
| Tabelle 3–24: | Detektion mit Plasma–AK beladener Erythrozyten über Protein A_____ | 98 |
| Tabelle 3–25: | Masse, Konzentration und Titer von Anti–IgG und Anti–IgM_____ | 99 |
| Tabelle 3–26: | Konzentration Blut der Gruppe A ₁ _____ | 99 |
| Tabelle 3–27: | Masse, Konzentration und Titer Anti–A BS 66_____ | 99 |
| Tabelle 3–28: | Masse, Konzentration und Titer Anti–A Birma I_____ | 99 |
| Tabelle 3–29: | Detektion mit monoklonalen–IgG beladener Erythrozyten über Anti–IgG_____ | 100 |
| Tabelle 3–30: | Detektion mit monoklonalen–IgM beladener Erythrozyten über Anti–IgM_____ | 101 |
| Tabelle 3–31: | Detektion monoklonal–AK beladener Erythrozyten im DiaMed–System_____ | 103 |
| Tabelle 3–32: | Masse, Konzentration und Titer von Anti–IgG und Anti–IgM_____ | 104 |
| Tabelle 3–33: | Konzentration Blut der Gruppe A ₁ _____ | 104 |
| Tabelle 3–34: | Masse, Konzentration und Titer von Anti–A aus Plasma 0 und Plasma B_____ | 104 |
| Tabelle 3–35: | Detektion Plasma–0–AK beladener Erythrozyten über Anti–IgG_____ | 104 |
| Tabelle 3–36: | Detektion Plasma–B–AK beladener Erythrozyten über Anti–IgM_____ | 105 |
| Tabelle 3–37: | Detektion Plasma–AK beladener Erythrozyten im DiaMed–System_____ | 106 |
| Tabelle 3–38: | Regeneration mit Aqua bidest._____ | 107 |
| Tabelle 3–39: | Regeneration mit HCl_____ | 108 |
| Tabelle 3–40: | Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit HCl._____ | 108 |
| Tabelle 3–41: | Regeneration mit Glycin_____ | 109 |
| Tabelle 3–42: | Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit Glycin_____ | 109 |
| Tabelle 3–43: | Regeneration mit EDTA–TRIS–Lösung, sauer und alkalisch_____ | 110 |
| Tabelle 3–44: | Regeneration mit NaOH 0,1 molar_____ | 111 |
| Tabelle 3–45: | Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit NaOH 0,1 molar_____ | 111 |
| Tabelle 3–46: | Regeneration mit NaOH 3 molar_____ | 112 |
| Tabelle 3–47: | Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit NaOH 3 molar_____ | 112 |
| Tabelle 3–48: | Regeneration mit Diethyläther_____ | 113 |
| Tabelle 3–49: | Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit Diethyläther_____ | 113 |
| Tabelle 3–50: | Regeneration durch Wärmeelution_____ | 114 |

| | | |
|----------------------|--|-----|
| Tabelle 3–51: | Wiederverwertbarkeitsversuch nach Wärmeelution_____ | 114 |
| Tabelle 3–52: | Regeneration mit Zentrifuge_____ | 114 |
| Tabelle 3–53: | Wiederverwertbarkeitsversuch nach Regeneration mit dem Mischschüttler_____ | 117 |

6.2 Verzeichnis der Abbildungen

| | | |
|------------------------|--|----|
| Abbildung 1–1: | Zusammensetzung und Funktion humanen Blutes_____ | 3 |
| Abbildung 1–2: | Viskosität von Blut und Verformung von Erythrozyten_____ | 5 |
| Abbildung 1–3: | Übersicht der Immunantwort_____ | 6 |
| Abbildung 1–4: | Struktur und molekularer Aufbau von Immunglobulinen_____ | 9 |
| Abbildung 1–5: | Klassen und Serumkonzentrationen von Immunglobulinen_____ | 10 |
| Abbildung 1–6: | Konzentrationsverhältnis von Antigen und Antikörper_____ | 12 |
| Abbildung 1–7: | Molekularer Aufbau der Antigen–Antikörper–Bindung_____ | 12 |
| Abbildung 1–8: | Flexibilität von Immunglobulinen_____ | 13 |
| Abbildung 1–9: | Gewinnung monoklonaler Antikörper_____ | 14 |
| Abbildung 1–10: | Aufbau der Erythrozytenmembran_____ | 19 |
| Abbildung 1–11: | Isoagglutinine im AB0–System_____ | 20 |
| Abbildung 1–12: | Komplette und inkomplette Antikörper_____ | 21 |
| Abbildung 1–13: | Verteilung, Entstehung und Aufbau der AB0–Blutgruppen_____ | 24 |
| Abbildung 1–14: | Antikörpernachweis mit dem Coombstest_____ | 28 |
| Abbildung 1–15: | Tüpfelplatte_____ | 28 |
| Abbildung 1–16: | ID–Micro–Typing–System der Firma DiaMed_____ | 29 |
| Abbildung 1–17: | Auto–Typer–System „Tango“ der Firma Biotest_____ | 30 |
| Abbildung 1–18: | Funktionsprinzip eines Biosensors_____ | 31 |
| Abbildung 1–19: | Blutgruppendetektion mit einem QCM–System_____ | 34 |
| Abbildung 1–20: | Beschichtung eines Quarzes_____ | 36 |
| Abbildung 1–21: | Regeneration der sensitiven Beschichtung_____ | 37 |
| Abbildung 1–22: | Vollautomatisiertes Blutgruppenanalysegerät Fidget–Type Fg T1_____ | 38 |
| Abbildung 1–23: | Dummy–System und Auflicht–Mikroskop_____ | 40 |

| | | |
|------------------------|--|----|
| Abbildung 1–24: | Neue Schichtarchitektur_____ | 42 |
| Abbildung 1–25: | Antikörpernachweis_____ | 42 |
| Abbildung 2–1: | Auswertung Cell–Dyn–Blutbildanalysator_____ | 54 |
| Abbildung 2–2: | Auswertung der DiaMed–Karte_____ | 58 |
| Abbildung 2–3: | Auswertungssoftware_____ | 65 |
| Abbildung 3–1: | Detektion der Blutgruppe A ₁ über IgG–Monolayer_____ | 84 |
| Abbildung 3–2: | pH Wert Variation bei EDTA–TRIS–Lösung bei Beschichtung_____ | 71 |
| Abbildung 3–3: | Beschichtung mit EDTA–TRIS–Lösung _____ | 71 |
| Abbildung 3–4: | Lösungsmittelvariation bei Blutgruppendetektion_____ | 73 |
| Abbildung 3–5: | pH Wert Variation bei EDTA–TRIS–Lösung bei Blutgruppendetektion_____ | 73 |
| Abbildung 3–6: | Variation der Temperatur bei Beschichtung_____ | 75 |
| Abbildung 3–7: | Variation der Temperatur bei Blutgruppendetektion_____ | 76 |
| Abbildung 3–8: | Variation der Konzentration von Protein A bzw. Anti–A_____ | 78 |
| Abbildung 3–9: | Kombination von Verdünnungen bei Beschichtung_____ | 79 |
| Abbildung 3–10: | Variation der Konzentration von Vollblut_____ | 80 |
| Abbildung 3–11: | Blutgruppendetektion mit Analytverdünnung 1 : 100 000_____ | 81 |
| Abbildung 3–12: | Blutgruppendetektion mit Analytverdünnung im DiaMed–System_____ | 82 |
| Abbildung 3–13: | Beschichtung mit Pipette_____ | 83 |
| Abbildung 3–14: | Beschichtung im Fluss Protein A_____ | 84 |
| Abbildung 3–15: | Beschichtung im Fluss Anti–A BS 66_____ | 84 |
| Abbildung 3–16: | Erythrozytenbelegung mit Pipette_____ | 86 |
| Abbildung 3–17: | Variation der Flussgeschwindigkeiten bei Blutgruppendetektion_____ | 86 |
| Abbildung 3–18: | Zentrifugation bei Blutgruppendetektion_____ | 87 |
| Abbildung 3–19: | Detektion A ₁ über IgM–Monolayer, Variationen bei Beschichtung_____ | 89 |
| Abbildung 3–20: | Detektion A ₁ über IgM–Monolayer, Variationen bei Blutgruppendetektion_____ | 89 |
| Abbildung 3–21: | Detektion der Blutgruppe A ₁ über IgM–Monolayer_____ | 90 |
| Abbildung 3–22: | Detektion B über IgM–Monolayer, Variationen bei Beschichtung_____ | 81 |
| Abbildung 3–23: | Detektion B über IgM–Monolayer, Variationen bei Blutgruppendetektion_____ | 91 |
| Abbildung 3–24: | IgG–Sandwich, Variationen bei Beschichtung_____ | 93 |

| | | |
|------------------------|--|-----|
| Abbildung 3–25: | IgG–Sandwich, Variationen bei Blutgruppendetektion_____ | 93 |
| Abbildung 3–26: | IgM–Sandwich, Variationen bei Blutgruppendetektion_____ | 95 |
| Abbildung 3–27: | Blutgruppendetektion über IgM–Sandwich_____ | 95 |
| Abbildung 3–28: | Detektion monoklonal–IgM beladener Erythrozyten über Anti–IgM_____ | 102 |
| Abbildung 3–29: | Regeneration mit Aqua bidest._____ | 107 |
| Abbildung 3–30: | Zyklusversuche nach Regeneration mit Glycin_____ | 109 |
| Abbildung 3–31: | Zyklusversuche nach Regeneration mit NaOH 0,1 molar_____ | 111 |
| Abbildung 3–32: | Regeneration mit Mischschüttler_____ | 116 |
| Abbildung 3–33: | Regeneration mit Mischschüttler_____ | 116 |
| Abbildung 3–34: | Zyklusversuche nach Regeneration mit Mischschüttler_____ | 117 |
| Abbildung 3–35: | Recyclingzyklus_____ | 118 |
| Abbildung 4–1: | Vergleich Monolayer- und Sandwichbeschichtung_____ | 141 |

6.3 Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|---------|--|
| ∅ | im Durchschnitt |
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| bidest. | bidestilatatum |
| EDTA | <u>E</u> thylendinitriol <u>t</u> etra <u>e</u> ssigsäure |
| Ig | Immunglobulin |
| LISS | <i>englisch:</i> <u>L</u> ow <u>I</u> onic <u>S</u> trength <u>S</u> olution |
| MHC | <i>englisch:</i> <u>M</u> ajor <u>H</u> istocaompatibility <u>C</u> omplex |
| MHz | Megahertz |
| neg. | negativ |

| | |
|------|--|
| PBS | <i>englisch:</i> <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> olution |
| PCR | <i>englisch:</i> <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction |
| pos. | positiv |
| QCM | <i>englisch:</i> <u>Q</u> artz <u>C</u> ystal <u>M</u> icrobalance |
| rh | Blutgruppe Rhesus negativ |
| Rh | Blutgruppe Rhesus positiv |
| Tab. | Tabelle |
| TRIS | Trishydroxylmethylaminomethan |
| ZKT | Zentrum für klinische Transfusionsmedizin |

7 Literaturverzeichnis

- 1 **Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten**, Deutscher Ärzte Verlag, Köln 2000.
- 2 Product Specifications: anti-IgG, monoclonal mouse IgG (2004). **Jackson ImmunoResearch**
- 3 Product Specifications: anti-IgM, monoclonal mouse IgG (2004). **Jackson ImmunoResearch**
- 4 Abad J, Pariente F, Hernández L, Lorenzo E (1998). A Quartz Crystal Microbalance Assay for Detection of Antibodies against the recombinant African Swine Fever Virus Attachment Protein p12 in Swine Serum. **Anal Chim Acta**; 368:183-189.
- 5 Aizawa M, Kato S, Suzuki S (1980). Electrochemical Typing of Blood using affinity Membranes. **J Membr Sci**; 7:1-10.
- 6 Arndt-Hanser A (1987). Coombs-Fibel. **Biotest Mitteilungen**; Sonderheft 3:
- 7 Bailey L, Kambhampati D, Kanazawa K (2002). Using surface plasmon Resonance and the Quartz Crystal Microbalance to monitor in situ the interfacial Behavior of thin organic Films. **Langmuir**; 18:479-489.
- 8 D. Ballantine, R. White and S. Martin, **Acoustig Wave Sensors**, Academic Press, San Diego 1997.
- 9 Bender K (1987). Das HLA-System. **Biotest Mitteilungen**; Sonderheft 3:
- 10 Bernstein F (1925). Zusammenfassende Betrachtung über die erblichen Blutstrukturen des Menschen. **Z indukt Abstamm u Verb Lehre**; 37:237.
- 11 Bird G, Wingham J (1976). Erythrocyte membrane modification in malignant disease of myeloid and lymphoreticular tissues. **Br J Haemat**; 33:295.
- 12 Bjorck J, Kronvall G (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. **J Immunol**; 133:969-978.
- 13 Boyle M, Rice GP (1987). Bacterial Fc Receptors. **Biotechnology**; 5:697-703.
- 14 G. Burmester and A. Pezzutto, **Taschenatlas der Immunologie**, Thieme, Stuttgart 1998.
- 15 K. Cammann, **Instrumentelle analytische Chemie**, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin 2001.
- 16 Cammann K, Lemke U, Rohen A (1991). Chemical Sensors and Biosensors - Principles and Applications. **Angew Chemie**; 103:519-541.

- 17 Cans A, Hook F, Shupliakov O, Ewings A, Eriksson P (2001). Measurement of the Dynamics of Exocytosis and Vesicle Retrieval at Cell Populations using a Quartz Crystal Microbalance. **Anal Chem**; 73:5805-5811.
- 18 Caruso F, Rodda E, Furlong D (1996). Orientational Aspects of Antibody Immobilization and immunological Activity on Quartz Crystal Micro Balance Electrodes. **J Coll Interfac Sci**; 178:104-115.
- 19 Claussen J (2006). Arbeit in Vorbereitung. **Dissertaton, Universität Tübingen**
- 20 Compton B, Lewis M, Whigham F, Gerald J, Countryman G (1989). Analytical Potential of Protein A for Affinity Chromatography of polyclonal and monoclonal antibodies. **Analyt Chem**; 61:1314-1317.
- 21 Cooper M, Dultsev F, Minson T, Ostanin V, Abell C, Klenerman D (2001). Direct and sensitive detection of a human virus by rupture event scanning. **Nature Biotechnol**; 19:833-837.
- 22 Dahr W (1986). Immunochemistry of Sialoglycoproteins in human red blood cell membranes. **Am Assoc Blood Banks**26-65.
- 23 Dahr W: **Blutgruppen von Erythrozyten**; in Mueller-Eckhardt C (ed): *Transfusionsmedizin*. Heidelberg, Springer Verlag, 1996.
- 24 Davis K, Leary T (1989). Continous Liquid-Phase Piezoelectric Biosensor for kinetic Immunoassays. **Anal Chem**; 61:1230-1235.
- 25 Delamarche E, Sundarababu G, Biebuyck G, Michel B, Gerber C (1996). I mmobilization of Antibodies on a Photoactive Self-Assembled Monolayer on Gold. **Langmuir**; 12:1997-2006.
- 26 Dodd R: **Adverse Consequences of Blood Transfusion: quantitative Risk Estimates**; in Nance S (ed): *Blood Supply: Risk, Perceptions and Prospects for the Future*. Bethesda / Maryland, American Association of Blood Banks, 1994.
- 27 Dong S, Li J (1997). Self-assembled Monolayers of Thiols on gold Electrodes for Bioelectrochemistry and Biosensors. **Bioelctr and Bioenerg**; 42:7-13.
- 28 Döring J (2006). Serologische Eignung von Schwingquarzen für die biosensorische Blutgruppenanalyse. **Dissertation, Universität Tübingen**
- 29 Duhamel R, Schur P, Brendel K, Meezan E (1979). pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-Sepharose. **J Immunol Methods**; 31:211-217.
- 30 Dultsev F (2000). Hearing Bond Breakage: Measurement of Bond Ruturte Forces using a Quartz Crystal Microbalance. **Langmuir**; 16:5036-5040.
- 31 I. Dunsford and J. Grant, **The Anti-Globulin Test**, Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh 1959.

- 32 R. Eckstein, **Immunhämatologie und Transfusionsmedizin**, Urban und Fischer Verlag, München 2001.
- 33 Eckstein R, Strohscheer I, Beyer J (1992). Versuche zur Entwicklung eines standardisierten Testsystems immunologischer Reaktivität. **Infusionstherapie**; 30:332.
- 34 Ey P, Prowse S, Jenkin C (1978). Isolation of pure IgG 1, IgG 2a and IgG 2b Immunoglobulins from mouse serum using Protein A Sepharose. **Biochemistry**; 15:429-436.
- 35 M. Ferencik, **Handbook of Immunochemistry**, Chapman&Hall, London 1993.
- 36 Fredriksson C, Kihlman S, Rodahl M, Kasemo B (1998). The piezoelectric Quartz Crystal Mass and Dissipation Sensor: a Means of studying Cell Adhesion. **Langmuir**; 14:248-251.
- 37 Garraty G, Arndt P (1993). Fatal ABO haemolytic Transfusion Reaction resulting from acquired B Antigen only detectable by some monoclonal anti-b Reagents. **Transfusion**; 33:
- 38 Gehring F (2005). Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten. **Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern**
- 39 Geoghegan W, Ackermann G (1977). Adsorption of horseradish Peroxidase, Ovomuroid and Antiimmunoglobulin to colloidal Gold for the indirect Detection of Concanavalin A, wheat Germ Agglutinin and Goat antihuman Immunoglobulin G on Cell Surfaces at the electron microscopic Level. **J Histochem Cytochem**; 25:1187-1200.
- 40 Göpel W, Hesse J, Zemel J: **Sensors: A comprehensive survey**; in: *Chemical and Biochemical Sensors*. Weinheim, Wiley-VHC, 1992.
- 41 J. Grate and G. Frye, **Acoustic Wave Sensors**, Update, VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim 1992.
- 42 Grate J, Martin S, White R (1993). Acoustic Wave Microsensors: Part I. **Anal Chem**; 65:940-945.
- 43 H. Hahn, D. Falke, S. Kaufmann and U. Ullmann, **Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie**, Springer Verlag, Heidelberg 2001.
- 44 H. Harten, **Physik für Mediziner**, Springer Verlag, Heidelberg 1997.
- 45 Horisberger M, Clerk M (1985). Labelling of colloidal gold with protein A: A quantitative study. **Histochem**; 82:219-223.
- 46 Imai S, Mizuno H, Suzuki M, Takeuchi T (1994). Total urinary Protein Sensor based on a piezoelectric Quartz Crystal. **Anal Chim Acta**; 292:65-70.
- 47 P. Issit and D. Anszee, **Applied Blood Group Serology**, Mointgomery Scientific Publications, Durham 1998.

- 48 C. Janeway and P. Travers, **Immunologie**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1995.
- 49 Kaspar M, Stadler H, Weiss T, Ziegler C (2000). Mass-Sensitive Devices in Bioanalysis. **Fres J Anal Chem**; 366:602-610.
- 50 F. Kayser, K. Bienz, J. Eckert and R. Zinkernagel, **Medizinische Mikrobiologie**, Thieme Verlag, Stuttgart 2001.
- 51 König B, Grätzel M (1993). Development of a piezoelectric Immunosensor for the Detection of human Erythrocytes. **Anal Chim Acta**; 276:329-333.
- 52 König B, Grätzel M (1994). Long-term Stability and improved Reusability of a piezoelectric Immunosensor for human Erythrocytes. **Anal Chim Acta**; 230:37-41.
- 53 J. Koolmann and K. Röhm, **Taschenatlas der Biochemie**, Thieme Verlag, Stuttgart 1998.
- 54 Krapf R (2001). Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen. **Dissertation, Universität Tübingen**
- 55 Landsteiner K (1900). Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkung des Blutserums und der Lymphe. **Zbl Bakt**; 27:257.
- 56 Landsteiner K (1901). Über Agglutinationserscheinungen normaler menschlicher Blute. **Wien klin Wochenschr**; 14:1132.
- 57 Leddy J, Whittemore N, Weed R (1970). Human Erythrocyte Membranes, Effect of lipid Extraction on binding IgG and Rh isoantibodies. **Vox Sang**; 19:44.
- 58 G. Löffler and P. Petrides, **Biochemie des Menschen**, Springer Verlag, Heidelberg 1998.
- 59 Marx K (2003). Quartz Crystal Microbalance: A useful Tool for studying thin Polymer Films and complex biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface. **Biomacromolecules**; 4:26-37.
- 60 Marxer C, Coen M, Schlapdach L (2003). Study of Adsorption and viscoelastic Properties of Proteins with a Quartz Crystal Microbalance. **J Coll Interfac Sci**; 261:291-298.
- 61 Mempel W (1988). Blood Group Determination with a new Test System (Erytype Microtest Plates). **Beiträge zur Infusionstherapie**; 21:265-266.
- 62 M. Metaxas-Bühler, **Blutgruppen und Transfusion**, Verlag Hans Huber, Hogrefe AG, Bern 1994.
- 63 Moks T, Abrahamsén L, Nilsson B, Hellman U (1986). Staphylococcal Protein A consists of five IgG binding Domains. **Eur J Biochem**; 156:637-643.

- 64 P. Mollison, C. Engelfriet and M. Contreras, **Blood Transfusion in clinical Medicine**, Blackwell Science Ltd, Oxford 1998.
- 65 A. Mourant and A. Kopec, **The Distribution of human Blood Groups and other biochemical Polymorphism**, University Press, Oxford 1976.
- 66 Muramatsu H, Dicks J, Tamiya E, Karube I (1987). Piezoelectric Crystal Biosensor modified with Protein A for Determination of Immunoglobulins. **Anal Chem**; 59:2760-2763.
- 67 Muramatsu H, Tamiya E, Karube I (1988). Viscosity monitoring with a piezoelectric quartz crystal and its application to determination of endotoxin by gelation of Limulus amebocyte lysate. **Anal Chim Acta**; 215:91-98.
- 68 Muratsugu M, Romanschin A, Thompson M (1997). Adhesion of human Platelets to Collagen detected by ⁵¹Cr labelling and acoustic wave Sensor. **Anal Chim Acta**; 342:23-29.
- 69 S. Nance, **Blood Supply: Risk, Perceptions and Prospects for the Future**, American Association of Blood Banks, Bethesda / Maryland 1994.
- 70 H. Naumer and W. Heller, **Untersuchungsmethoden in der Chemie**, Thieme Verlag, Stuttgart 1986.
- 71 B. Neubig and W. Briese, **Das große Quarzkochbuch**, Franzis Verlag, Poing 1997.
- 72 Nivesns D, Chambers J, Anderson T, White D (1993). Long-term, on-line Monitoring of microbial Biofilms using a Quartz Crystal Microbalance. **Anal Chem**; 65:65-69.
- 73 Ollmann Saphire E, Parren P (2001). Listening for viral infection. **Nature Biotechnol**; 19:823-824.
- 74 O`Sullivan C, Guilbault G (1999). Commercial Quartz Crystal Microbalances - Theory and Applications. **Biosens Bioelectron**; 14:663-670.
- 75 K. Park, **Scanning Microscopy Supplement**, Scanning Microscopy International, O`Hare 1989.
- 76 Pettenkofer H, Stöss B, Helmbold W, Vogerl F (1962). Alleged Causes of the present day World Distribution of the human Blood Groups. **Nature**; 193:444.
- 77 Pottier C (1992). Gel-Test: Interpretation and Value of a new Technique for the detection of irregular Antibodies. **Annales de Biologie Clinique**; 50:679-685.
- 78 Prime K, Whitesides G (1991). Self-assembled organic Monolayers: Model Systems for studying Adsorption of Proteins at Surfaces. **Science**; 252:1164-1166.
- 79 Prokop O, Göhler W (1986). Die menschlichen Blutgruppen. **Gustav Fischer Verlag**

- 80 R. Race and R. Sanger, **Blood Groups in Man**, Blackwell ,Scientific Publications, Oxford 1975.
- 81 Redepenning J, Schlesinger T, Mechalke E, Puleo D (1993). Osteoblast Attachment monitored with a Quartz Crystal Microbalance. **Anal Chem**; 65:3378-3381.
- 82 Redman M, Regan F (1990). Comparison of IgM and IgG anti-A and anti-B Levels. **Vox Sang**; 59:89-91.
- 83 Richman D, Cleveland P, Ozturk O (1982). The Binding of staphylococcal Protein A by the sera of diefferent animal species. **J Immunol**; 128:2300-2305.
- 84 Rickert J, Hayward G, Cavic B, Thompson M, Göpel W: **Biosensor based on acoustic Wave Devises**; in: *Sensor Update*. Weinheim, Wiley VCH, 1999.
- 85 Roederer J, Bastiaans G (1983). Microgravimetric Immunoassay with piezoelectric Crystals. **Anal Chem**; 55:2333-2336.
- 86 I. Roitt, J. Brostoff and D. Male, **Kurzes Lehrbuch der Immunologie**, Thieme Verlag, Stuttgart 1991.
- 87 G. Rump, R. Braun and U. Jahn, **Transfusionsmedizin kompakt**, Thieme Verlag, Stuttgart 2003.
- 88 F. Scheller and R. Schmid, **Biosensors: Fundamentals, Technologies and Applications**, VHC, Weinheim 1992.
- 89 F. Scheller and F. Schubert, **Frontiers in Biosensoric III**, Birkhäuser Verlag, Berlin 1997.
- 90 H. Schenkel-Brunner, **Human Blood Groups**, Springer Verlag, Wien 1995.
- 91 R. Schmidt and G. Thews, **Physiologie des Menschen**, Springer Verlag, Heidelberg 1997.
- 92 Schumacher R (1999). Die Schwingquarzmethode - ein sensibles Messprinzip mit breitem Anwendungsspektrum. **Chemie in unserer Zeit**; 33:268-278.
- 93 S. Silbernagel and A. Despopoulos, **Taschenatlas der Physiologie**, Thieme Verlag, Stuttgart 2003.
- 94 Sjöquist J, Meloun B, Hjelm H (1972). Protein A isolated from Staphylokokkus aureus after digestion with lysostaphin. **Eur J Biochem**; 29:572-578.
- 95 Sonneborn H, Dahr W (1999). Monoklonale Antikörper und Blutgruppenbestimmung sowie weiterführende Technologien. **Infus Ther Transfus Med**; 26:202-210.
- 96 W. Spielmann, **Immunhämatologie und Transfusionsmedizin**, Verlag Chemie, Weinheim 1990.

- 97 P. Strengers and W. van Aken, **Blut - von der Magie zur Wissenschaft**, Spektrum Verlag, Heidelberg 1996.
- 98 Strobel E (2000). Erworbene Veränderungen der erythrozytären AB0-Merkmale. **Infus Ther Transfus Med**; 27:80-89.
- 99 L. Stryer, **Biochemie**, Spektrum Verlag, Heidelberg 1996.
- 100 Tessier L, Patat F, Schmitt N, Feuilland G, Thompson M (1994). Effect of the Generation of compressional Waves on the Response of the thickness-shear Mode acoustic wave Sensor in Liquids. **Anal Chem**; 66:3569-3574.
- 101 Thompson M, Arthur C, Dhaliwal G (1986). Liquid-phase piezoelectric and acoustic transmission Studies of interfacial Immunochemistry. **Anal Chem**; 58:1206-1209.
- 102 Uttenthaler E, Kößlinger C, Drost S (1998). Characterization of Immobilization Methods for African Swine Fever Virus Protein and Antibodies with a piezoelectric Immunosensor. **Biosens Bioelectron**; 13:1279-1286.
- 103 J. van der Tweel, **Immunologie - Das menschliche Abwehrsystem**, Spektrum Verlag, Heidelberg 1999.
- 104 Walker R, Dong-Tsamm L, Hartrick M (1989). Alloimmunization following Blood transfusion. **Arch Path Lab Med**; 113:254-261.
- 105 Watkins W (1959). Possible genetical Pathway for the biosynthesis of Blood Group Mucopolysaccharides. **Vox Sang**; 4:125-128.
- 106 Watkins W, Morgan W (1955). Some Observations on the O and H Characters of human Blood and Secretions. **Vox Sang**; 5:253-257.
- 107 Weisbach V, Ziener A, Zimmermann R, Glaser A (1999). Comparison of the Performance of four different Microtube Column System in the Detection of Red Cell Antibodies. **Transfusion**; 39:772-775.
- 108 Welsch W, Klein C, von Schickfus M, Hunklinger S (1996). Development of a Surface acoustic Wave Immunosensor. **Anal Chem**; 68:2000-2004.
- 109 Wiener A, Unger L (1956). Type-specific cold-Autoantibodies as a cause of acquired haemolytic Anaemia and haemolytic Transfusion Reactions. **Ann Intern Med**; 44:221.
- 110 A. Zeeck, **Chemie für Mediziner**, Urban & Schwarzenberg, München 1997.

8 Danksagung

An der Entstehung dieser Arbeit waren viele Menschen beteiligt. Ihnen allen möchte ich herzlich danken. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. Hinnak Northoff für die Annahme als Doktorand, die Überlassung des Themas, für seine intensive Betreuung und sein Interesse an meiner Dissertation.

Meinen Betreuern Dr. Frank Gehring, Jan Claußen und Bernd Scheufele für die gute und persönliche Betreuung meiner Arbeit, die anregenden Diskussionen, ihre Ratschläge und nicht zuletzt ihr ermutigender Optimismus.

Meinem Kommilitonen und Mitdoktorand Jörg Döring für das gute Arbeitsklima, für alle Gespräche und die gegenseitige Motivation.

Frau Melanie Jesse, unserer Forschungs-MTA, für ihre Hilfe bei der Ausrüstung unseres Labors, für ihre Mühen und Geduld auch das Unmöglichste zu besorgen.

Allen Med.-Tech.-Lab.-Assistentinnen des Zentrums für Klinische Transfusionsmedizin Tübingen, bei denen wir jederzeit willkommen waren, für ihre Hilfe bei der „Zubereitung“ der Blutproben.

Meinen Eltern dafür, dass sie mir den Weg bereitet haben und immer für mich da sind. Besonderen Dank gilt meinem Vater für das unermüdliche Korrekturlesen.

Allen meinen Freunden für die regelmäßige Erinnerung daran, dass es auch noch eine Welt außerhalb der Medizin gibt.

Meiner Frau Tanja für jegliche Unterstützung, für ihre Geduld und dafür, dass sie akzeptierte, dass ich viele Abende und Wochenenden an dieser Arbeit saß.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sven Eberhard Cluss
Geburtsdatum und -ort: 07. Mai 1977 in Sindelfingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: evangelisch
Familienstand: verheiratet mit Tanja Cluss geb. Schuhmacher

Schulbildung

1984 – 1988 Grundschule Sommerhofen, Sindelfingen
1988 – 1997 Gymnasium in den Pfarrwiesen, Sindelfingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Juni 1997

Zivildienst

1997 – 1998 im Rettungsdienst des DRK Kreisverbands Böblingen

Studium

1998 – 2005 Medizinstudium an der Universität Tübingen
28.03.2001 Ärztliche Vorprüfung
11.04.2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.09.2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30.11.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

2004 – 2005 Städtisches Krankenhaus Sindelfingen

Beruflicher Werdegang

seit 06 / 2006 Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin
im Krankenhaus Leonberg