

Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) und
Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin (ZKT) der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

Entwicklung serologisch geeigneter Schwingquarz- Beschichtungen für die Blutgruppenanalyse mit Biosensor

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
JÖRG STEFFEN DÖRING
aus Sigmaringen

2008

Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) und
Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin (ZKT) der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

Entwicklung serologisch geeigneter Schwingquarz- Beschichtungen für die Blutgruppenanalyse mit Biosensor

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
JÖRG STEFFEN DÖRING
aus Sigmaringen

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Schleicher

meinen Eltern

für ihre Liebe, ihre Unterstützung und ihr Vertrauen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Blut: Zusammensetzung und Eigenschaften	2
1.3	Blutgruppensysteme	3
1.4	Biosensoren	4
1.4.1	Massensensitive Sensoren	4
1.4.2	Quartz-Crystal-Microbalance	5
1.4.3	QCM als Immunosensor	5
1.4.4	Sensorbeschichtung	6
1.5	Vollautomatisiertes Blutgruppenanalysegerät	8
1.6	Dummysystem	9
1.7	Ziel der Arbeit	10
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Labormaterialien und Geräte	12
2.1.2	Chemikalien	13
2.1.3	Proteine	14
2.1.4	Immunglobuline	14
2.1.5	Blut und Blutplasma	16
2.1.6	QCM-Sensor	17
2.1.7	Dummy-Messanlage	17
2.1.8	Fließinjektionsanlage	18
2.1.9	Messung und Auswertung	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Schwingquarzpräparation	19
2.2.2	Sensorbeschichtung	19
2.2.3	Blutgruppenantikörper der Klasse IgG auf Protein A	19
2.2.4	Blutgruppenantikörper der Klasse IgM auf Protein A	20
2.2.5	Blutgruppenantikörper Doppelschicht	20
2.2.6	Blut	20
2.2.7	Blutgruppenanalyse mit Dummy	22
2.2.8	Blutgruppenanalyse im AB0 Blutgruppensystem	24
2.2.9	Blutgruppenanalyse im Rhesus Blutgruppensystem	24
2.2.10	Blutgruppenanalyse im Kell Blutgruppensystem	27
2.2.11	Blutgruppenanalyse im Duffy-Blutgruppensystem	28

Inhaltsverzeichnis

2.2.12	Nachweis Anti-Rh D beladener Erythrozyten.....	29
2.2.13	Auswertung und Dokumentation	31
2.2.14	Blutgruppenanalyse mit regeneriertem Schwingquarz.....	32
2.2.15	Testung der Schwingquarzbeschichtungen in der Fließinjektionsanlage	33
3	Ergebnisse	36
3.1	Blutgruppenanalyse im AB0 System	36
3.1.1	Nachweis der Blutgruppe A.....	36
3.2	Blutgruppenanalyse im Rhesus System.....	36
3.2.1	Nachweis des Rhesus D Antigens	36
3.2.2	Nachweis Rhesus D Antigens mit enzymbehandelten Erythrozyten	38
3.2.3	Nachweis eines schwachen Rhesus D Antigens (D^{weak}).....	40
3.2.4	Nachweis der Rhesus Antigene c, C, e und E	41
3.2.5	Vergleich des Ankoppelungsvermögens der verschiedenen Rhesusantigene	43
3.3	Blutgruppenanalyse im Kell System	44
3.4	Blutgruppenanalyse im Duffy System.....	45
3.4.1	Nachweis des Fy^a Antigens mit Fy^a Coombsreaktiv Beschichtung.....	45
3.4.2	Nachweis des Fy^a Antigens mit inkubierten Erythrozyten.....	45
3.5	Nachweis von mit Rhesusantikörpern beladenen Erythrozyten	46
3.5.1	Inkubation mit Rh D immunisiertem Plasma	46
3.5.2	Inkubation in monoklonaler Anti Rh D IgG Lösung	47
3.6	Regeneration von gebrauchten Schwingquarzen.....	48
3.6.1	Regeneration mit Natronlauge	48
3.6.2	Regeneration mit Diethyläther.....	49
3.7	Test der Beschichtungsmodelle in der Fließinjektionsanlage.....	50
3.7.1	Nachweis der Blutgruppe A.....	50
3.7.2	Nachweis des Rhesus D Antigens	51
4	Diskussion	53
4.1	Stand der Wissenschaft	53
4.2	Beschichtungstechnik.....	54
4.3	Blutgruppenanalyse.....	55
4.3.1	Blutgruppenbestimmung im AB0 Blutgruppensystem.....	55
4.3.2	Blutgruppenbestimmung im Rhesus Blutgruppensystem	55
4.3.3	Blutgruppenbestimmung im Kell Blutgruppensystem.....	62
4.3.4	Blutgruppenbestimmung im Duffy Blutgruppensystem	62
4.4	Detektion von Anti-Rh D beladenen Erythrozyten	63

Inhaltsverzeichnis

4.5	Wiederverwertbarkeit von Schwingquarzen	66
4.5.1	Regeneration mit Natronlauge	66
4.5.2	Regeneration mit Diethyläther	67
4.6	Blutgruppennachweis in der Fließinjektionsanlage.....	68
4.6.1	Blutgruppennachweis mit QCM im AB0 Blutgruppensystem	69
4.6.2	Blutgruppennachweis mit QCM im Rhesus Blutgruppensystem.....	70
5	Zusammenfassung.....	71
6	Anhang	73
6.1	Verzeichnis der Tabellen	73
6.2	Verzeichnis der Abbildungen.....	73
6.3	Verzeichnis der Abkürzungen	74
7	Literaturverzeichnis	76
8	Danksagung.....	80
9	Lebenslauf	81

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 (44), 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 Blutantikörperbestimmungen 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 im Vergleich die Technik der Blutgruppenbestimmung eher langsam weiterentwickelt. Zahlreiche Untersuchungen werden auch heute noch „von Hand“ durchgeführt. Zwar wurden im Laufe der Jahre viele Varianten und Optimierungen der Methodik entwickelt, das Grundprinzip der optisch beziehungsweise visuellen beurteilten Agglutination ist jedoch vorherrschend geblieben (64). 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, gelegentlich an ihre Grenzen. Immer jedoch erfordern sie bislang ein großes maschinelles System und einen erheblichen Zeitaufwand.

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 (41, 42). Die ersten Blutgruppenbestimmungen mit einem antikörperbeschichteten Quartz–Crystal–

Microbalance–Biosensor konnten 2001 durch Krapf (43), der Ausbau dieser Methode sowie deren Einsatz in einer automatisierten Anlage, 2003 durch Gehring gezeigt werden (29).

Die Schwierigkeit bei der Verwendung von Biosensoren besteht 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 mit der Optimierung und Weiterentwicklung der sensitiven Beschichtung eines QCM–Biosensors zur Analyse der Blutgruppeneigenschaften von Blutproben.

Die biologischen und technischen Grundlagen der Blutgruppenbestimmung sowie eine Beschreibung der neu entwickelten Technik zur Blutgruppenanalyse über ein Schwingquartzsystem wurde in der Arbeit von Cluss (17) bereits vorgestellt. Aufbauend auf dieser Arbeit sollen mit Hilfe eines Dummy–Systems weitere Beschichtungen entwickelt und optisch-mikroskopisch vorgeprüft werden, um sie anschließend in die QCM-Testung einfließen zu lassen.

1.2. Blut: Zusammensetzung und Eigenschaften

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 1 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 %.

Werden die zellulären Elemente aus dem Blut entfernt, so erhält man Plasma. Es besteht zum größten Teil aus Wasser (> 90 %), in dem hochmolekulare Proteine, ungeladene Stoffe und Ionen mit niedrigem Molekulargewicht gelöst sind. Die Konzentration dieser Teilchen addiert sich zur sogenannten Plasmaosmolarität mit 290 mosm / kg H₂O. Den Hauptanteil daran haben bei den Kationen das Natrium und

bei den Anionen Chlorid- und Bicarbonationen. Die Plasmaproteine tragen ebenfalls zur Osmolarität bei, trotz vieler anionischer Ladungen, aber nur zum kleinen Teil, da die Teilchenanzahl entscheidend ist und nicht die Ladungszahl.

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 μm^3 , die Masse bewegt sich zwischen 28 und 33 pg. Die Erythrozyten sind ausgesprochen gut 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 Erythrozyten beträgt etwa 120 Tage.

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.

Die für das Verständnis der serologischen Methoden der Blutgruppenanalytik relevanten Bereiche des Immunsystems wurden bereits in der Arbeit von Cluss (17) ausführlich dargelegt.

1.3. 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 Blutgruppene Gene sind „schwache Histokompatibilitätssysteme“, die an der Modulation zellulärer Abwehrmechanismen teilhaben. So wird z. B. die chronische „graft–versus–host–Reaktion“ nach Knochenmarkstransplantation auch über genetische Differenzen in den Blutgruppensystemen von Spender und Empfänger vermittelt (8, 26). 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 (44, 45). Die

Vererbbarkeit von Blutgruppenantigenen wurden zum ersten Mal im Jahr 1924 von Bernstein anhand von Familienuntersuchungen im AB0-System berichtet (9). 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 viele 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 Biosensoren

Die Biosensoren stellen eine Weiterentwicklung der Chemosensoren dar. Die spezifische 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. 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 (12).

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 wiederverwendbar (67, 68).

1.4.1 Massensensitive Sensoren

Massensensitive Sensoren können überall dort eingesetzt werden, wo die Detektion von Analyten mit einer Massenänderung an 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.

1.4.2 Quartz–Crystal–Microbalance

Messwertumsetzer auf Basis akustischer Sensoren bestehen aus einem piezoelektrischen Substrat, dem eigentlichen Schwingquarz, 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 besteht darin, dass bei bestimmten Kristallen, wie z.B. α -Quarze, die bei Ausübung von Druck auf bestimmte Oberflächen elektrische Oberflächenladungen erzeugen. Diese Ladungen kann man mit einem Elektrometer, das an der Kristalloberfläche angebracht ist, messen. Da der Piezoeffekt reversibel ist, kann man durch Anlegen einer Wechselspannung den Quarz mechanisch zum Schwingen anregen.

Ein Schwingquarz ist eine Quarzkristallscheibe, die eine bestimmte Geometrie und einen speziellen Kristallschnitt besitzt. An die aufgedampften Goldelektroden wird eine Wechselspannung angelegt. Es entsteht eine transversale Scherwelle, die auch in an die Oberflächen angrenzende Medien eindringt. Ein Schwingquarz besitzt eine hohe Frequenzkonstanz. Die sensorischen Eigenschaften kommen durch die Wechselwirkung der akustischen Wellen an der Grenzfläche zwischen Kristalloberfläche und dem anliegenden Medium zustande. Kommt es nun zu einer Massenänderung auf der Quarzoberfläche, so fällt die Resonanzfrequenz proportional zur Masse der Fremdschicht ab. Dadurch wird es möglich Massen im ng-Bereich zu „wiegen“ (7, 29, 31, 32, 55, 57, 62, 70).

1.4.3 QCM als Immunsensor

Die Einsatzgebiete für Schwingquarze als Immunsensoren sind vielfältig. Die Sensitivitätsgrenze liegt bei wenigen $\mu\text{g} / \text{ml}$ (36). 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 (6, 29, 36, 46). Ebenso kann durch die permanente Beobachtung der Resonanzfrequenz, nicht nur die abgeschlossene Immunreaktion, sondern auch die Antigen–Antikörper–Bindung

in Echtzeit beobachtet werden (38). 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 (13, 14, 22, 28, 52-54, 56, 60, 63, 77, 80). 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 (19, 24, 66).

Die Blutgruppenanalyse mit einem QCM-Biosensor basiert auf einem Schwingquarz, auf dessen Oberfläche Blutgruppenantikörper immobilisiert sind. Die dünne Quarzscheibe ist mit einer Goldschicht überzogen, die als Reaktionspartner für die Beschichtung dient (*Abb. 1-1*). Durch Anlegen einer Spannung wird der Quarz zum Schwingen bei einer konstanten Frequenz von etwa 10 MHz angeregt. Die Blutgruppenantikörper können mit den entsprechenden Epitopen der Erythrozyten reagieren und spezifisch anbinden. Die Veränderung auf der Quarzoberfläche verursacht einen messbaren Abfall der Resonanzfrequenz.

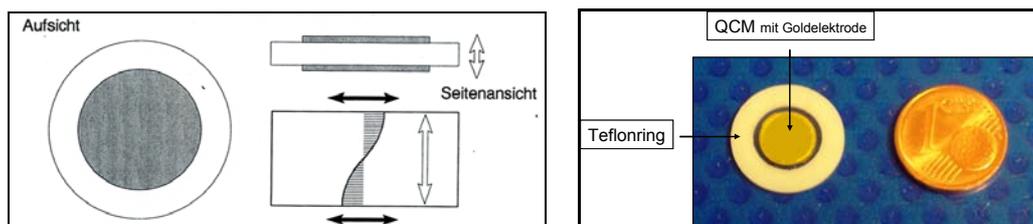


Abbildung 1-1

links: Schwingquarz schematisch mit Scherwellenausbreitung(29)

rechts: Schwingquarz in Halterung, zum Größenvergleich 1 Cent–Stück (rechts)

Sensorbeschichtung

Der wichtigste Faktor für eine erfolgreiche Biosensorik ist die Beschichtung. 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. 1-2*) eine geeignete Methode darstellt. Sie ermöglicht die Bildung einer gerichteten IgG-Schicht. Andere Methoden wie sie frühere Arbeitsgruppen verwendeten, um Immunsensoren für andere

Fragestellungen zu entwickeln, zeigten sich als weniger geeignet. Der Versuch, Antikörper direkt auf die Goldoberfläche anzubinden, führte zu einer ungeordneten Beschichtung auf der nicht ausreichend Erythrozyten gebunden werden konnten. Ferner war diese Schicht nicht sehr stabil (4, 43, 78).

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 (10, 23, 75). 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 (11, 18, 27, 50, 61). 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 (Abb. 1-2). Das Protein A wird durch van-der-Waals-Kräfte an die Goldoberfläche des Quarzes gebunden. Die Affinitätskonstante des Protein A zu Gold liegt bei 10^8 / m. Das Gleichgewicht der Bindung wird nach ca. 60 Minuten erreicht. Die Sättigung liegt bei etwa 2 mg / ml (35, 47, 72).

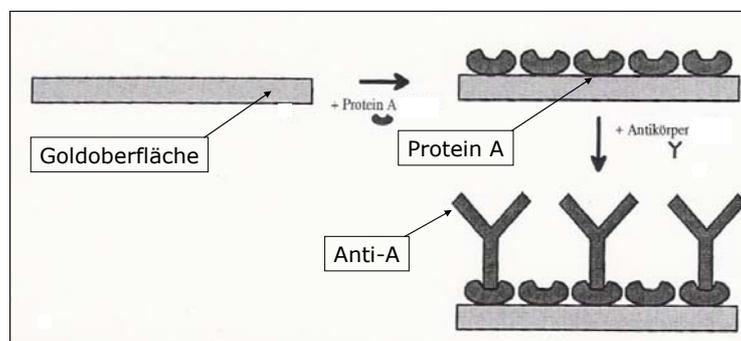


Abbildung 1-2

Detektion der Blutgruppe A mit einer sensitiven Beschichtung des Quarzes
schematische Darstellung, nicht maßstabsgetreu(29)

1.5. Vollautomatisiertes Blutgruppenanalysegerät

Das von Gehring entwickelte vollautomatisierte Blutgruppenanalysegerät Fidget–Type Fg T1 (Abb. 1–3) 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 Wechselwirkungen minimiert werden. Sämtliche Einstellungen der Pumpen und Ventile, sowie die Ansteuerung und Termostatisierung des Schwingquarzes in der Messzelle, werden automatisch durch das Computerprogramm gesteuert (29).

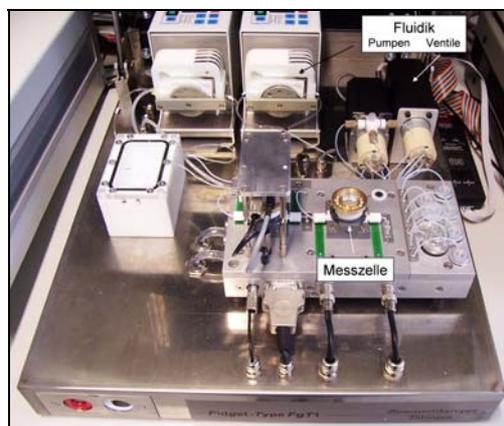
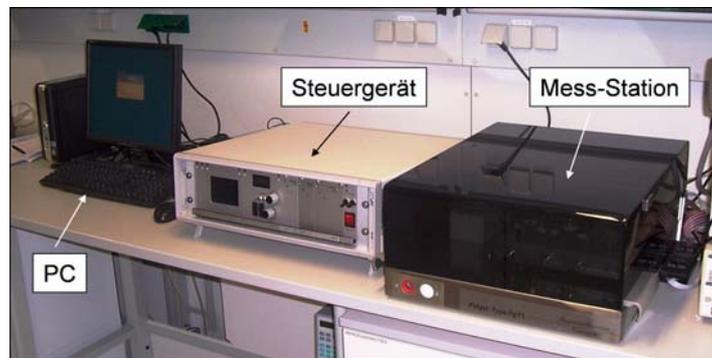


Abbildung 1–3
vollautomatisiertes Blutgruppenanalysegerät Fidget–Type Fg T1

1.6 Dummy-System

Der Dummy besteht aus einer Messzelle in die ein Schwingquarz eingebaut wird (Abb. 1–4). 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. Die Ablesung erfolgt beim Dummy optisch (Abb. 1-5). Notwendige Versuchsserien zur Optimierung und Weiterentwicklung sensitiver Beschichtungen können mit seiner Hilfe durchgeführt werden, um vorgetestetes Material für die Sensoriktests zu erhalten und Sensorergebnisse mit ihnen abzugleichen.

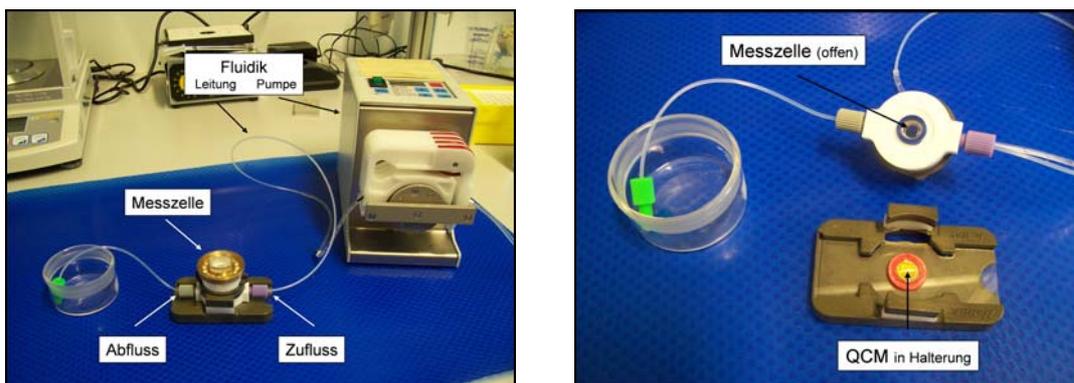


Abbildung 1-4
Aufbau Dummy-System

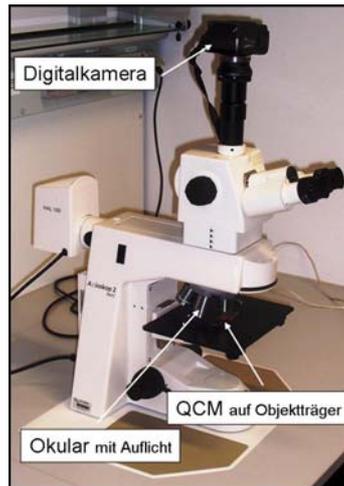


Abbildung 1-5
Mikroskop

1.7 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist es, mit Hilfe des Dummy-Systems eine Reihe von Möglichkeiten und Wegen zur Ankopplung von Erythrozyten auf eine Quarzoberfläche aufzuzeigen und vorläufig zu quantifizieren. Experimente wurden in den transfusionsmedizinisch bedeutendsten Blutgruppensystemen, dem ABO-System sowie dem Rhesus-System, durchgeführt. Weitere Untersuchungen fanden im Kell- und Duffyblutgruppensystem statt.

Als weitere serologische Fragestellung sollte getestet werden, ob es mittels eines beschichteten Schwingquarzes möglich ist, mit inkompletten Antikörpern beladene Erythrozyten zu erkennen. In vorausgegangenen Experimenten hatte sich herausgestellt, dass eine direkte Ankopplung mit Anti-A belegten Erythrozyten auf eine Protein A Beschichtung nicht möglich war (17). In den durchgeführten Versuchen wurde der Ansatz mit einer Anti-IgG Beschichtung verfolgt, die es ermöglichen sollte, die an die Erythrozyten gebundenen Antikörper zu binden. Erythrozyten wurden mit Rhesusantikörpern inkubiert. Es wurden zum einen Antikörper aus einem Plasmapool rhesusimmunisierter Patientinnen, zum anderen Antikörper eines monoklonalen Serums verwendet. Die Ergebnisse wurden quantifiziert und verglichen. Für die Inkubation wurden verschiedene Verdünnungen getestet. Diese Versuchsreihen wurden unter identischen Bedingungen mit enzymbehandelten Erythrozyten wiederholt.

In bezug auf einen späteren Einsatz in der Routinediagnostik muss zudem auf Ökonomie geachtet werden. Aus diesem Grund spielt die Wiederverwertung von Schwingquarzen eine wichtige Rolle. Es werden zwei Verfahren zur Regeneration vorgestellt und miteinander verglichen. Zum einen die Regeneration mit Natronlauge, zum anderen die Regeneration mit Diethyläther.

Der letzte Abschnitt beschäftigt sich mit der technischen Durchführbarkeit der Blutgruppenanalyse der in dieser Arbeit etablierten Schichtsysteme mit einem QCM-Biosensor am Beispiel der Blutgruppenbestimmung im AB0- und Rhesus-Blutgruppensystem.

2 Material und Methoden

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
- Trishydroxylmethylaminomethan (TRIS) 99,8 %, Merck KGaA, Darmstadt

- Tween, Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
- Standard pH bei 7,9

2.1.2.5 NaOH

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

2.1.2.6 N₂-Gas

- Stickstoff (N₂), 4.0, stationäre Laborversorgung

2.1.2.7 Natriumchloridlösung

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

2.1.2.8 PBS-Lösung

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

2.1.2.9 Piranha

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

2.1.3 Proteine

2.1.3.1 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
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

2.1.4.2 Anti-A

- Anti-A BS 66, monoklonal, IgG / Maus,

Biotest AG, Dreieich

2.1.4.3 Anti-B

- ImmuClone Anti-B, LB 2, monoklonal, IgM / Maus

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Rödermark

2.1.4.4 Anti-Rh-D

- Anti D BS 221

Biotest AG, Dreieich

- Anti D BS 232, monoclonal, IgM / human

Biotest AG, Dreieich

- Anti D Rum_1, monoklonal, IgM / human

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Rödermark

2.1.4.5 Anti-Rh-c

- Anti-c MS 35, monoklonal, IgM / human

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Rödermark

2.1.4.6 Anti-Rh-C

- Anti-C BS 273, monoklonal, IgM / human

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Rödermark

2.1.4.7 Anti-Rh-e

- Anti-Rh-e MS 62/ MS 69, monoklonal, IgM / human

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Rödermark

2.1.4.8 Anti-Rh-E

- Anti-Rh-E MS 12/MS 60, monoklonal, IgM / human

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Rödermark

2.1.4.9 Anti-K

- Anti-K MS 56, monoklonal, IgM

Immucor Medizinische Diagnostik GmbH, Rödermark

2.1.4.10 Anti-Duffy-Coombsreaktiv

- Anti- Fy^a Coombsreaktiv, polyclonal / human

Serac, Serologische Reagenzien GmbH, Bad Homburg

2.1.5 Blut und Plasma

2.1.5.1 Unbehandeltes Vollblut

- unbehandelte Vollblutsuspension, Konzentration ca. 500 000 / μ l, in EDTA-TRIS-Lösung, Verhältnis Blut : Puffer 1 :10, gelagert im Pilotröhrchen

aus anonymisierten Blutspenden des ZKT Tübingen

2.1.5.2 Unbehandelte und gewaschene Blutprobe

- unbehandelte Vollblutsuspension, dreimal gewaschen in EDTA-TRIS-Lösung, Konzentration ca. 500 000 / μ l, in EDTA-TRIS-Lösung, Verhältnis Blut : Puffer 1 : 10, gelagert im Pilotröhrchen

aus anonymisierten Blutspenden des ZKT Tübingen

2.1.5.3 Humanes Plasma

- unbehandeltes, unverdünntes Pool-Plasma (aus fünf Blutspenden) der jeweils benötigten Blutgruppe, zentrifugiert und mit EDTA-Zusatz gelagert im Pilotröhrchen

aus anonymisierten Blutspenden des ZKT Tübingen

2.1.5.4 Rh-D immunisiertes Plasma

- Blutplasma in EDTA gelagert
aus Rückstellproben des ZKT Tübingen

2.1.6 QCM-Sensor

2.1.6.1 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

2.1.6.2 Quarzhalterung

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

2.1.7 Dummy-Messanlage

2.1.7.1 Flusszelle

- Kunststoffummantelung mit Dichtring, Volumen: 14 μ l
Entwicklung und Herstellung: Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen

2.1.7.2 Flussleitungen

- aus Teflon, Durchmesser 1 mm, 1/16", Volumen 16 μ l, Ismatec, Wertheim

2.1.7.3 Peristaltikpumpe

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

2.1.8 Fließinjektionsanlage (FIA)

- Blutgruppen–Analysegerät Fidget–Type Fg T1
Entwicklung und Herstellung: Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen

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 Methoden

2.2.1 Schwingquarzpräparation

Der Schwingquarz wurde 30 Sekunden in ein Acetonbad getaucht und anschließend mit H₂O bidest. abgespült. Nach dem Trocknen mit N₂ (4.8) wurde der Quarz 60 Sekunden in frisches Piranha-Bad getaucht. Danach erfolgte erneutes Abspülen mit bidestilliertem Wasser und Trocknung mit N₂ (4.8).

2.2.2 Sensorbeschichtung

Um mit einem goldbeschichteten Quarz Blutanalytik betreiben zu können, muss dieser spezifisch beschichtet werden. Die in dieser Arbeit verwendete Methode, die Antikörper an der Oberfläche zu immobilisieren, ist die Belegung mit Protein A. Die Goldoberfläche des Quarzes wurde vor der Belegung 60 Sekunden mit frischem Piranha behandelt. Danach wurde mit H₂O bidest. gespült. Nach dem Trockenblasen mit N₂ (4.8) sollte die Protein A Belegung sofort beginnen.

40 µl einer Lösung Protein A (2mg/ml) in EDTA/Tris/Tween Puffer wurde auf die Oberfläche des Quarzes pipettiert. Nach ca. 60 Minuten wurde der Quarz mit H₂O bidest. abgespült und anschließend mit N₂ (4.8) getrocknet. Die Eigenschaft des Protein A, Antikörper an ihrem Fc-Fragment zu binden, ermöglicht eine blutgruppenspezifische Weiterbeschichtung.

2.2.3 Blutgruppenantikörper der Klasse IgG auf Protein A

Es wurden 30 µl Antikörperlösung mit einer Pipette auf den mit Protein A belegten Schwingquarz aufgebracht. Dieser Vorgang wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Immobilisationszeit für die Antikörper erwiesen sich in vorausgegangenen Versuchen 20 Minuten als ausreichend. Nach dieser Zeit wurde die Quarzoberfläche sorgfältig mit H₂O bidest. gespült und mit N₂ (4.8) getrocknet.

2.2.4 Blutgruppenantikörper der Klasse IgM auf Protein A

Es wurden 30 µl IgM Antikörperlösung mit einer Pipette auf den mit Protein A belegten Schwingquarz aufgebracht. Dieser Vorgang wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer Immobilisationszeit von 20 Minuten wurde die Quarzoberfläche sorgfältig mit H₂O bidest. gespült und mit N₂ (4.8) getrocknet.

2.2.5 Blutgruppenantikörper Doppelschicht (Sandwich) auf Protein A

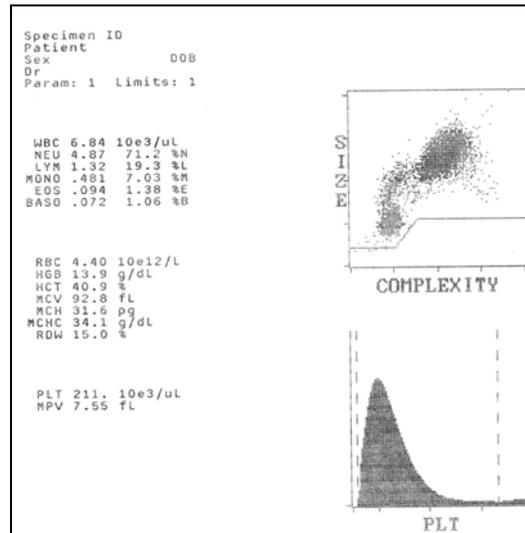
Diese Art der Belegung wird im Folgenden als „Sandwich-Schicht“ bezeichnet. 30 µl Antikörperlösung, die Immunglobuline der Klasse IgG enthält, wurden mit einer Pipette auf den mit Protein A belegten Quarz aufgebracht. Diese Antikörperlösung enthält Anti-IgG Antikörper beziehungsweise Anti-IgM Antikörper. Nach einer Immobilisationszeit von 20 Minuten erfolgte eine sorgfältige Spülung mit Aqua bidest. und Trocknung mit N₂ (4.8). Zur Komplettierung der Sandwich-Schicht erfolgte die Beschichtung mit dem Blutgruppenantikörper der Klasse IgG beziehungsweise IgM. Auch von diesem Antikörper wurden wiederum 30 µl aufpipettiert und analog zum ersten Schritt nach einer Immobilisationszeit von 20 Minuten, sorgfältig mit H₂O bidest. gespült und mit N₂ (4.8) getrocknet.

2.2.6 Blut

Vor Durchführung des Testes wurde die Konzentration der Blutprobe maschinell mit dem Cell-Dyn Analysator (*Abb. 2-1*) ermittelt und das Blut gegebenenfalls einer Vorbehandlung unterzogen.

2.2.6.1 Unbehandeltes Vollblut

Die Pilotröhrchen mit EDTA versetztem Vollblut der gewünschten Gruppe von anonymisierten Blutspendern, 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. 4 °C.

**Abbildung 2-1**

„großes Blutbild“ mit Cell-Dyn-Blutbildanalysator

2.2.6.2 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 2000 U / min für 10 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und das Röhrchen mit 10 ml EDTA-TRIS-Lösung befüllt. Dieser Vorgang wurde zweimalwiederholt. 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 / μ l. Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von ca. 4°C.

2.2.6.3 Enzymbehandlung

Das Probandenblut aus den EDTA-Pilotröhrchen wurde analog zu Punkt 2.2.6.2 dreimal in isotoner Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gewaschen. Bromelin für Erytype wurde im Verhältnis 1:20 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Die gebrauchsfertige Lösung wurde für die Experimente frisch hergestellt und bei 2°C bis 8°C gelagert. Die Lösung darf für die Testung nicht älter als 2 Stunden sein. Die zu untersuchenden Erythrozyten wurden 1%ig in der gebrauchsfertigen Bromelin/Kochsalz-Lösung

suspendiert und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Blut bei etwa 2000 U / min 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die roten Blutkörperchen in EDTA/TRIS/Tween Puffer in einer Verdünnung von 1:20 gelagert. Die Messung der Erythrozytenkonzentration erfolgte im Cell-Dyn-Blutbildanalysator. Die gewünschte Konzentration der roten Blutkörperchen lag bei ca. 300 000 Zellen / µl. Die Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von ca. 4°C.

2.2.6.4 Inkubation der Erythrozyten in Antikörperlösung

Die Konzentration der gewaschenen bzw. enzymbehandelten Blutproben wurden vor Versuchsbeginn maschinell bestimmt. Es wurde 1 ml der Antikörperlösung, bzw. der verdünnten Antikörperlösung in ein Kunststoffreagenzröhrchen pipettiert und 500 µl der gewaschenen Erythrozyten oder der enzymbehandelten Blutproben hinzugefügt. Die Verdünnungsreihe wurde bis zum Verhältnis 1:16 angelegt.

Das Röhrchen wurde bei 37 °C mit monoklonalen Anti-Rhesus D Antikörpern der Klasse IgG bzw. Plasma aus Rhesus D immunisierten Blutproben für 60 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Analyt bei 2000 U / min für 10 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 EDTA-TRIS-Lösung vermischt, so dass die optimale Erythrozytenkonzentration von ca. 500 000 Zellen / µl mit dem Verhältnis 1 : 10 entstand. Im Fall der enzymbehandelten Erythrozyten wurde ein Verdünnungsverhältnis von 1:20 gewählt was einer maximalen Erythrozytenkonzentration von ca. 300 000 Zellen / µl entspricht.

2.2.7 Blutgruppenanalyse mit Dummy

Der Quarz wurde in den Quarzhalter am Boden des Dummys eingelegt. Anschließend wurde das Gehäuse auf den Grundkörper geschraubt. Der zuführende Schlauch wurde mit seinem Ende in das mit Quarzpuffer gefüllte Laborglas gesteckt. Der wegführende Schlauch endete im Auffangbehälter. Zum Entlüften des Systems wurde der Tris/EDTA/Tween Puffer (pH 7,96) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 ml/min durch die Messkammer in den Auffangbehälter gepumpt. Es wurde so lange entlüftet, bis sich die Zelle ganz mit Pufferlösung gefüllt hatte und keine Luftblasen mehr im Kontrollfenster zu erkennen waren. Sobald das System entlüftet war, wurde

die Fließgeschwindigkeit auf 0,13 ml/min reduziert. Nach 180 Sekunden wurde der zuführende Schlauch in den Behälter mit der zu analysierenden Blutprobe umgesteckt. Die in Verdünnung vorliegenden Blutproben wurden vor der Analyse 2 Sekunden in den Mischschüttler gegeben, um eine gleichmäßige Verteilung der Erythrozyten in der Suspension zu schaffen.

Die Pumpe wurde für die Zeit des Umwechselns des Schlauchs angehalten. Das Volumen der Blutprobe umfasste 300 µl Blut. Die Probe wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,13 ml/min durch die Messkammer gepumpt. Im ersten Schritt wurde die Negativprobe durch den Dummy gepumpt. Bei der Negativprobe handelte es sich um Erythrozyten, die nicht Träger des nachzuweisenden Merkmals waren, gegen welches die Antikörper auf dem Messquarz gerichtet waren. Nach dem Durchlauf der Negativprobe wurde die Pumpe angehalten, um wieder Quarzpuffer durch die Anlage fließen zu lassen. Der Pufferfluss war zu Beginn auf 0,13 ml/min eingestellt und wurde nach 120 Sekunden langsam auf 0,6 ml/min erhöht. Nach weiteren 300 Sekunden wurde die Pumpe gestoppt, und der Quarz wurde aus dem Dummy ausgebaut. Danach erfolgte eine Kontrolle unter dem Auflichtmikroskop um eine unspezifische Bindung auszuschließen.

Im zweiten Schritt erfolgte nach gleichem Schema die Analyse der Positivprobe. Bei der Positivprobe handelte es sich um Erythrozyten, die Träger des Merkmals waren, gegen welches die Antikörper auf dem Messquarz gerichtet waren. Unter dem Auflichtmikroskop wurde die Anbindung der Erythrozyten kontrolliert und mittels digitaler Fotografie dokumentiert. Mit Hilfe der Aufnahme und eines eingblendeten Rasters erfolgte die Auszählung der gebundenen roten Blutkörperchen.

Schnellübersicht des Versuchablaufs:

- Einsetzen des Messquarzes
- Puffer 0,13 ml/min für 3 Minuten
- Negativprobe 0,13 ml/min
- Pufferfluss 0,13ml/min für 2 Minuten, dann langsame Beschleunigung auf 0,6 ml/min für 5 Minuten
- Ausbau des Messquarzes und Kontrolle unter dem Mikroskop
- Wiedereinsetzen des Quarzes:

- Puffer 0,13 ml/min für 3 Minuten
- Positivprobe 0,13 ml/min
- Puffer 0,13ml/min für 2 Minuten dann langsame Beschleunigung auf 0,6 ml/min für 5 Minuten
- Ausbau des Messquarzes und Kontrolle unter dem Mikroskop

Insgesamt wurden die Immobilisationsversuche fünf Mal für jedes der in dieser Arbeit getesteten Blutgruppensysteme durchgeführt.

2.2.8 Blutgruppenanalyse im AB0 System

Die Blutgruppenanalyse im AB0-System wird in dieser Arbeit am Beispiel der Blutgruppe A vorgestellt.

2.2.8.1 Nachweis der Blutgruppe A

Zum Nachweis der Blutgruppe A wurden 30 µl Anti-A Antikörperlösung des monoklonalen IgG BS 66 auf dem Protein A immobilisiert.

Die Negativprobe wurde mit Blut der Gruppe 0, Rh+ und im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt durchgeführt.

Die Positivprobe wurde mit Blut der Gruppe A, Rh+ und im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt durchgeführt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $5,1 \cdot 10^5$ Zellen / µl.

2.2.9 Blutgruppenanalyse im Rhesus System

Im Rhesus Blutgruppensystem existieren die Allele C, c, D, E und e. Die Detektion dieser Antigene soll im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

2.2.9.1 Nachweis des Rhesus D-Antigens

Der Nachweis des Rhesus D-Antigens wurde mit unterschiedlichen Quarzbeschichtungen getestet.

2.2.9.1.1 Rh D-Bestimmung mit auf Protein A immobilisierten Antikörpern der Klasse IgG

Der in den Dummy eingesetzte Quarz wurde mit Anti-D BS 221 belegt.

Bei der Negativprobe handelte es sich um Blut der Gruppe 0 rh- und im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt.

Bei der Positivprobe handelte es sich um Blut der Gruppe 0 Rh+ und im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $5,9 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.9.1.2 Rh D-Bestimmung mit auf Protein A immobilisierten Antikörpern der Klasse IgM

30 μ l der Anti-D BS 232 Antikörperlösung der Klasse IgM wurden direkt auf Protein A pipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur immobilisiert. Nach dieser Zeit wurde die Quarzoberfläche sorgfältig mit Aqua bidest. gespült und mit N₂ (4.8) getrocknet.

Bei der Negativprobe handelte es sich um Blut der Gruppe 0 rh- und im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt.

Bei der Positivprobe handelte es sich um Blut der Gruppe 0 Rh+ und im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $5,2 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.9.1.3 Rh D Bestimmung mit IgG Sandwich Beschichtung

Als blutgruppenspezifischer Antikörper wurde Anti-D IgG BS 221 auf die Anti-IgG Schicht pipettiert.

Bei der Negativprobe handelte es sich um Blut der Gruppe 0 rh- und im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt.

Bei der Positivprobe handelte es sich um Blut der Gruppe 0 Rh+ und im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $5,6 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.9.1.4 Rh D Bestimmung mit IgG-IgM Sandwich Beschichtung

Als funktionaler Anti-D Antikörper der Klasse IgM wurden der BS 232 und der Rum_1 Antikörper vergleichend getestet.

Die Negativproben wurde jeweils mit Blut der Blutgruppe 0 rh - und im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt durchgeführt.

Die Positivproben wurden jeweils mit Blut der Blutgruppe 0 Rh+ und im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt durchgeführt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $5,7 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.9.1.5 Nachweis des Rh D Antigens bei einem schwachen D (D^{weak}) mit einer IgM Sandwich Beschichtung

Für diesen Versuch wurden zunächst von 10 Blutproben, markiert als D^{weak} , im PCR-Labor der D^{weak} Subtyp ermittelt. Für die folgenden Experimente lagen die Subtypen I, II und III vor. Die spezifische Quarzbeschichtung erfolgte mit dem BS 232 Anti-D Antikörper auf einer gerichteten IgG-Schicht.

Die Negativprobe wurde mit Blut der Blutgruppe 0 rh - und im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt durchgeführt.

Die Positivprobe wurde mit Blut der Subtypen D^{weak} Typ 1, D^{weak} Typ 2 und D^{weak} Typ 3 durchgeführt. Die Blutproben wurden im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $6,3 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.9.2 Nachweis der Rhesus Antigene c,C,e und E

Der Nachweis der Rhesus C, c, E und e Antigene wurde anhand einer IgM Sandwich Beschichtung untersucht.

2.2.9.2.1 Rh c Bestimmung mit IgM Sandwich Beschichtung

Bei diesem Versuch wurde Anti-c IgM Sandwich Schicht verwendet. Die Negativprobe wurde mit Blut der Gruppe 0 CC und im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt durchgeführt.

Die Positivprobe wurde mit Blut der Gruppe 0 cc und im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt durchgeführt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $5,7 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.9.2.2 Rh C Bestimmung mit IgM Sandwich Beschichtung

Zur Rhesus C Bestimmung wurde eine Anti-C IgM Sandwich Schicht verwendet. Die Negativprobe wurde mit Blut der Gruppe 0 cc und 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt durchgeführt.

Die Positivprobe wurde mit Blut der Gruppe 0 CC und im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt durchgeführt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $5,6 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.9.2.3 Rh e Bestimmung mit IgM Sandwich Beschichtung

Zur Rhesus e Bestimmung wurde eine Anti-e IgM Sandwich Schicht verwendet.

Die Negativprobe wurde mit Blut der Gruppe 0 EE und im Verhältnis 1:10 in Quarzpuffer verdünnt durchgeführt.

Bei der Positivprobe handelt es sich um 300 μ l Blut der Gruppe 0 ee, gewaschen und 1:10 in Quarzpuffer verdünnt durchgeführt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $5,4 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.9.2.4 Rh E Bestimmung mit IgM Sandwich Beschichtung

Zur Rhesus E Bestimmung wurde eine Anti-E IgM Sandwich Schicht verwendet.

Die Negativprobe wurde mit Blut der Gruppe 0 ee und im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt durchgeführt.

Die Positivprobe wurde mit Blut der Gruppe 0 Ee und im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt durchgeführt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $5,2 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.9.2.5 Testung der Anti-Rh-Beschichtungen nach Glykokalixentfernung

Sämtliche der unter 2.2.9 aufgeführten Versuche zum Nachweis der Rhesus Antigene wurden noch einmal mit bromelierten Erythrozyten durchgeführt. Es wurde Testblut von den selben Pilotröhrchen verwendet. Sowohl das Blut der Positivprobe als auch das der Negativprobe wurde mit Bromelin behandelt. Das bromelierte Blut wurde 1:20 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war 2,8 bis $3,0 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.10 Blutgruppenanalyse im Kell System

Zur Bestimmung des K-Antigens wurde eine Anti-K IgM Sandwich Schicht verwendet.

Bei der Negativprobe wurde Blut der Gruppe 0 kk im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt verwendet.

Die Positivprobe fand mit Blut der Gruppe 0 Kk im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt statt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $5,3 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.11 Blutgruppenanalyse im Duffy System

Für die Versuche im Duffy-Blutgrppensystem standen keine monoklonalen Antikörper sondern ein in der Routinediagnostik verwendetes Combsreaktiv zur Verfügung.

2.2.11.1 Analyse mit einer Anti Fy^a Beschichtung

Das humane, polyklonale Coombsreaktiv Anti- Fy^a wurde auf den mit Protein A belegten Schwingquarz pipettiert.

Bei der Negativprobe wurde mit gewaschenem Blut der Gruppe A mit dem Duffy Merkmal Fy^b (Fy^{a-b+}) im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt verwendet.

Die Positivprobe fand mit gewaschenem Blut der Gruppe A mit dem Duffy Merkmal Fy^a (Fy^{a+b-}), im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt, statt.

Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war $6,2 * 10^5$ Zellen / μ l.

2.2.11.2 Durchführung eines modifizierten Antiglobulintests auf dem Schwingquarz zur Blutgruppenanalyse im Duffy-System

500 μ l Vollblut der zu analysierenden Blutprobe mit dem Blutgruppenmerkmal Duffy a (Fy^a) wurden 500 μ l humanes, polyklonales Anti- Fy^a Coombsreaktiv zugegeben und 30 Minuten bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Dasselbe wurde mit der Negativprobe durchgeführt. Als Negativprobe dienten 300 μ l Vollblut mit dem Blutgruppenmerkmal Fy^b . Im Anschluss an die Inkubation wurden die Blutproben dreimal gewaschen und nach dem letzten Abpipettieren des Überstandes in EDTA/Tris/Tween Puffer in der Verdünnung 1:10 gelagert. Die ermittelte Erythrozytenkonzentration war: $6,0 * 10^5$ Zellen / μ l. Die Beschichtung des Schwingquarzes bestand aus einer Gold – Protein A – Anti-Human IgG – Schicht.

Das Untersuchungsprotokoll wurde für diese Fragestellung verändert. Während die Blutprobe die Messzelle durchlief, wurden 3 intermittierende Stopps von 60 Sekunden durchgeführt.

Zuerst wurde das inkubierte Blut der Negativprobe, Duffy-Blutgruppenmerkmal Fy^b, durch die Zelle gepumpt.

Im Anschluss wurde die Positivprobe mit dem Duffy-Blutgruppenmerkmal Fy^a durchgeführt.

2.2.12 Nachweis Anti-Rhesus D beladener Erythrozyten

Die Herstellung vom mit Rh-Antikörpern beladenen Erythrozyten erfolgte zum einen durch Inkubation mit Rh-immunisiertem Probandenserum und zum anderen durch Inkubation der Erythrozyten mit monoklonalen Antikörpern. Ziel war es herauszufinden ob eine Immobilisierung von mit Rhesusantikörpern beladenen Erythrozyten prinzipiell möglich ist und wie sich die unterschiedlich beladenen Erythrozyten in ihrem Anbindungsverhalten unterscheiden.

2.2.12.1 Erythrozyten inkubiert in Rhesus immunisiertem Serum

Vorbereitung der Blutproben: Erythrozyten der Blutgruppe 0 Rhesus positiv wurden als gewaschene Erythrozytenkonzentration, im Verhältnis 1:10 verdünnt, in EDTA/Tris/Tween Puffer, gelagert. 1000 µl der Erythrozytensuspension wurden mit 2000 µl eines Rh D immunisierten Serumpools inkubiert. Der Serumpool besteht aus 5 verschiedenen Seren Rh D immunisierter Blutproben mit dem Blutgruppenmerkmal 0 Rhesus negativ. Die Anti-Rhesus D Titer immunisierter Patientinnen waren mit einem Titer von 1:128 bis 1:64 bestimmt worden. Dieses Serum wurde in einer Versuchsreihe systematisch verdünnt und jeweils 60 Minuten bei 37°C inkubiert. 500 µl des inkubierten Blutes wurden anschliessend enzymatisch mit Bromelin behandelt und nach dem anschließenden Waschen in EDTA/Tris/Tween Puffer, im Verhältnis 1:20 verdünnt, gelagert.

Der Schwingquarz wurde mit Anti-Human-IgG der Klasse IgG auf Protein A belegt. Die Negativprobe wurde im ersten Versuch mit nicht inkubierter Erythrozytensuspension durchgeführt. Die Negativprobe im zweiten Versuch erfolgte mit bromeliertem Blut ohne vorherige Inkubation mit den Rhesusantikörpern. Die Negativproben stammten vom selben Spender wie die Positivprobe und war wie

diese im Fall der Bromelierung im Verhältnis 1:20 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt und im Fall der gewaschenen Erythrozytensuspension im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt.

Die Durchführung der Positivprobe erfolgte mit den inkubierten Blutproben. Vor der Messung wurden die Proben nochmals im Vortex aufgeschüttelt. Das unter Punkt 2.2.7 beschriebene Versuchsprotokoll wurde geringfügig abgeändert. Während die Blutprobe die Messzelle durchlief, wurden drei intermittierende Stopps von 60 Sekunden durchgeführt. Nach Durchlauf der Positivprobe wurde außerdem mit einer maximalen Fließgeschwindigkeit von 0,21 ml/min gespült. Die Erythrozytenkonzentration des 1:10 verdünnten Vollblutes lag bei $5,7 \cdot 10^5$ Zellen/ μ l und die des 1:20 verdünnten bromelierten Bluts bei $2,8 \cdot 10^5$ Erythrozyten/ μ l.

2.2.12.2 Erythrozyten inkubiert in monoklonaler Anti-Rhesus D-IgG Lösung

Die Präparation erfolgte entsprechend 2.2.12.1. Die Erythrozyten der Blutgruppe 0 Rhesus positiv, wurden als gewaschene Erythrozytenkonzentration, im Verhältnis 1:10 verdünnt, in EDTA/Tris/Tween Puffer gelagert. Die monoklonale Anti-Rh D IgG Antikörperlösung wurde in einer Verdünnungsreihe bis zum Faktor 1:128 systematisch verdünnt und anschließend mit der Erythrozytensuspension 60 Minuten bei 37°C inkubiert. 500 μ l des inkubierten Bluts wurden anschließend wie oben einer enzymatischen Behandlung mit Bromelin unterzogen.

Der Schwingquarz wurde mit Anti-Human-IgG der Klasse IgG auf Protein A belegt. Die Negativprobe wurde im ersten Versuch mit nicht inkubierter Erythrozytensuspension durchgeführt. Die Negativprobe im zweiten Versuch erfolgte mit bromeliertem Blut ohne vorherige Inkubation mit den Rhesusantikörpern. Die Negativproben stammten vom selben Spender wie die Positivprobe und waren bromeliert im Verhältnis 1:20 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt und im Fall der gewaschenen Erythrozytensuspension im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt.

Die Durchführung der Positivprobe erfolgte mit den inkubierten Blutproben. Vor der Messung wurden die Proben nochmals im Vortex aufgeschüttelt. Das unter Punkt 2.2.7 beschriebene Versuchsprotokoll wurde geringfügig abgeändert. Während die Blutprobe die Messzelle durchlief, wurden drei intermittierende Stopps von 60

Sekunden durchgeführt. Nach Durchlauf der Positivprobe wurde außerdem mit einer maximalen Fließgeschwindigkeit von 0,21 ml/min gespült. Die Erythrozytenkonzentration des 1:10 verdünnten Vollblutes lag bei $5,7 \cdot 10^5$ Zellen/ μl und die des 1:20 verdünnten bromelierten Bluts bei $2,8 \cdot 10^5$ Erythrozyten/ μl .

2.2.13 Auswertung und Dokumentation

Die Messergebnisse wurden nach einem standardisierten Verfahren ausgewertet und dokumentiert.

2.2.13.1 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.

2.2.13.2 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.

2.2.13.3 Auswertung

Auf der Oberfläche des gesamten Quarzes wurden vier repräsentative Stellen digital fotografiert (*Abb. 2-2*). 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 / mm^2 angegeben. Das Ergebnis wurde dokumentiert und zusammen mit der digitalen Abbildung gespeichert.

Insgesamt wurden die Messungen im AB0-, Rhesus-, Kell- und Duffy Blutgruppensystem 5 mal durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Signifikante Unterschiede wurden mittels Student T-Test für kleine Stichproben errechnet.

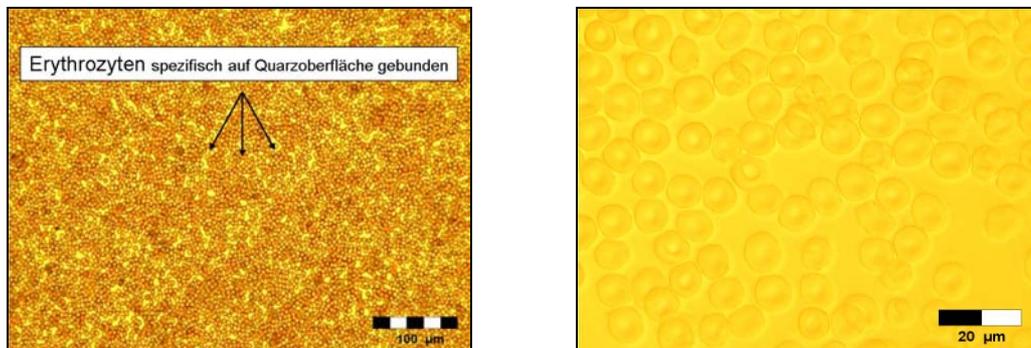


Abbildung 2-2

Auswertungssoftware:

links: digitale Abbildung 100-fache Vergrößerung
rechts: digitale Abbildung 500-fache Vergrößerung

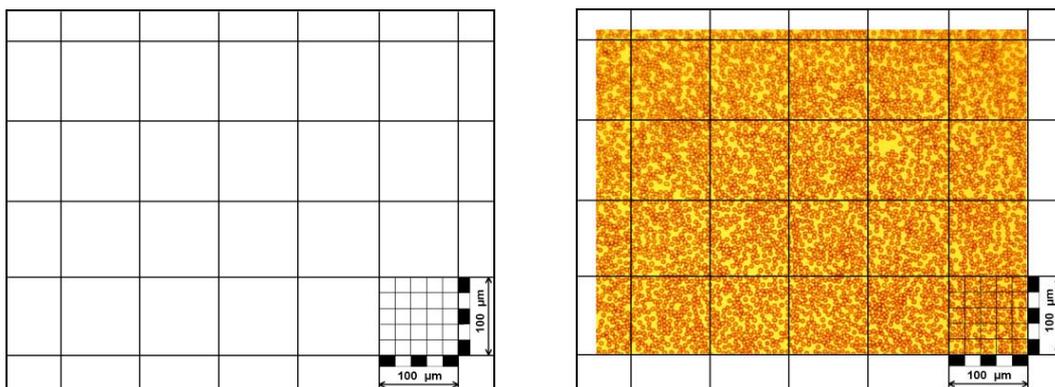


Abbildung 2-3

Auswertungssoftware:

links: Raster zur Bestimmung der Erythrozytendichte
rechts: Raster über digitaler Abbildung

2.2.14 Blutgruppenanalyse mit regeneriertem Schwingquarz

2.2.14.1 Regeneration mit NaOH

Es wurden sieben aufeinander folgende Messungen mit dem gleichen Quarz durchgeführt. Nach jeder Messung wurde der Schwingquarz aus dem Dummy ausgebaut. 50µl einer 0,1 molaren Lösung Natronlauge wurden auf den zu regenerierenden Schwingquarz pipettiert. Es ist darauf zu achten, dass sich die Ausdehnung der Natronlauge auf den goldbedampften Anteil des Schwingquarzes beschränkt. Das NaOH würde bei Kontakt mit der selbstklebenden Plastikfolie diese

fokal ablösen und damit den Quarz undicht machen. Nach 30-60 Sekunden wurde mit H₂O bidest. gespült und mit N₂ (4.8) getrocknet. Anschließend wurde jedes Mal mit Anti-A BS 66 neu belegt. Nach der Belegung erfolgte der Wiedereinbau in den Dummy. Bei der untersuchten Blutprobe handelt es sich um Blut der Gruppe A, im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt. Nach jedem Durchlauf wurde die Anbindung der Erythrozyten unter dem Mikroskop kontrolliert.

2.2.14.2 Regeneration mit Äther

Es wurden zwei aufeinander folgende Messungen mit dem gleichen Quarz durchgeführt. Der Quarz wurde mit Anti-A BS 66 belegt. Bei der untersuchten Blutprobe handelt es sich um Blut der Gruppe A, im Verhältnis 1:10 in EDTA/Tris/Tween Puffer verdünnt.

Nach der Messung wurde der mit roten Blutkörperchen belegte Quarz aus dem Dummy ausgebaut und mikroskopisch die Dichte der Belegung bestimmt. Im Anschluss wurde der Quarz in ein spezielles Reagenzröhrchen mit Quarzhalterung eingebaut. Die belegte Oberfläche des Quarzes zeigt nach unten. Das Röhrchen wird mit 1 ml NaCl 0,9 % und mit 2 ml Diethyläther befüllt und für 3 Minuten bei 2200 U / min zentrifugiert. Die erneute Beschichtung mit Antikörpern ist bei der Äthermethode nicht notwendig. Nach der zweiten Messung wurde erneut die Anbindung der Erythrozyten unter dem Mikroskop kontrolliert.

2.2.15 Testung der Schwingquarzsichten in der Fließinjektionsanlage

Für die Blutgruppenbestimmung mit Schwingquarzen reicht es vollkommen aus, wenn eine spezifische Ankopplung von Erythrozyten zu einer Frequenzänderung führt, die sich deutlich vom Ausgangssignal und dem Signal bei der Benetzung mit einer Negativprobe unterscheidet. Rückschlüsse anhand der Frequenzkurve bei Anregung mit der Oszillatorschaltung auf die tatsächlichen Gegebenheiten an der Schwingquarzoberfläche sind jedoch nur möglich, wenn die ausgelesene Frequenz der mechanischen Resonanzfrequenz des Schwingquarzes entspricht und nicht durch „elektronische Einflüsse“ entscheidend davon abweicht.

2.2.15.1 Nachweis der Blutgruppe A mit dem QCM-Sensor

Die Immobilisierung mit Protein A und mit den BS-66 Anti-A Antikörpern erfolgte außerhalb der Sensoreinheit (siehe Abschnitt 2.2.1 bis Abschnitt 2.2.4). Das Vollblut der Negativprobe der Blutgruppe 0 Rh⁺ sowie das Vollblut der Positivprobe der Blutgruppe A Rh⁺ wurde im Verhältnis 1:20 mit TRIS/EDTA/Tween Puffer (pH 7,96) verdünnt. Diese Verhältnisse entsprechen einer vor dem Experiment bestimmten Erythrozytenkonzentration von $3,4 \cdot 10^5$ Zellen/ μ l bei beiden Blutproben. Das verdünnte Vollblut wurde eingebettet im Trägerstrom des Tris/EDTA/Tween Puffers mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 0,1 ml/min in die Messkammer eingeleitet. Die Sensoreinheit wurde bei beiden Blutproben bei einer Temperatur von 23,3°C betrieben. Nach dem Durchlauf der Negativprobe wurde die Messkammer mit EDTA/Tris/Tween Puffer gespült. Die Flussgeschwindigkeit wurde dabei kurzfristig auf 0,6 ml/min erhöht. Die Injektion des 1:20 verdünnten Vollbluts der Blutgruppe A Rh⁺ erfolgte nachdem sich wieder eine konstante Ausgangssituation eingestellt hatte.

2.2.15.2 Nachweis des Rhesus D Antigens mit dem QCM-Sensor

Wie bei der Blutgruppenanalyse im AB0 System, erfolgte die Beschichtung des Schwingquarzes außerhalb der Sensoreinheit. Zum Nachweis Rhesus positiver Erythrozyten wurde eine IgM Sandwich Schicht gewählt. In diesem Fall mit den Rum_1 Antikörpern in der obersten Schicht. Das Vollblut der Negativprobe der Blutgruppe 0 Rh⁺ sowie das Vollblut der Positivprobe der Blutgruppe A Rh⁺ wurde im Verhältnis 1:10 mit TRIS/EDTA/Tween Puffer (pH 7,96) verdünnt. Diese Verhältnisse entsprechen einer vor dem Experiment bestimmten Erythrozytenkonzentration von $5,8 \cdot 10^5$ beziehungsweise $5,7 \cdot 10^5$ Zellen/ μ l. Die Sensoreinheit wurde bei einer Temperatur von 23,2°C betrieben. Nach Einbau des Schwingquarzes wurde zunächst Serum der Blutgruppe AB rh⁻ durch die Messkammer geleitet. Das Ziel war es die noch freien Bindungsstellen der Anti-Human-IgM Antikörper mit AB0 unspezifischen Antikörpern abzusättigen. Verwendet wurde dazu Blutplasma aus einem Pool von fünf verschiedenen Blutproben der Blutgruppe AB rh⁻. Nach Normalisierung der Resonanzfrequenz wurde Blut der Negativprobe (300 μ l) injiziert. Die Strömungsgeschwindigkeit betrug 0,1 ml/min. Nach Durchlauf des Blutes wurde die Probenschleife auf Tris/EDTA/Tween Puffer umgeschaltet und der Fluss auf 0,6 ml/min erhöht. Nach 3300 Sekunden wurden 300 μ l des Blutes der Blutgruppe A Rh⁺

mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 0,1 ml/min injiziert. Nach Durchlauf der Positivprobe wurde erneut auf die Probenschleife mit der Pufferlösung umgeschaltet und der Fluss auf 0,6 ml/min erhöht.

3 Ergebnisse

3.1 Blutgruppenanalyse im AB0 Blutgruppensystem

3.1.1 Nachweis der Blutgruppe A

Nach dem Durchlauf der Negativprobe mit Blut der Blutgruppe 0 erfolgte der Ausbau des Schwingquarzes aus dem Dummie. Der Quarz war nicht mit Erythrozyten belegt. Die Positivprobe mit Blut der Gruppe A zeigte einen dicht mit Erythrozyten belegten Schwingquarz. Die Auszählung unter dem Mikroskop ergab eine Belegungsdichte von $19\,000 \pm 0$ Erythrozyten / mm^2 (Abb. 3-1).

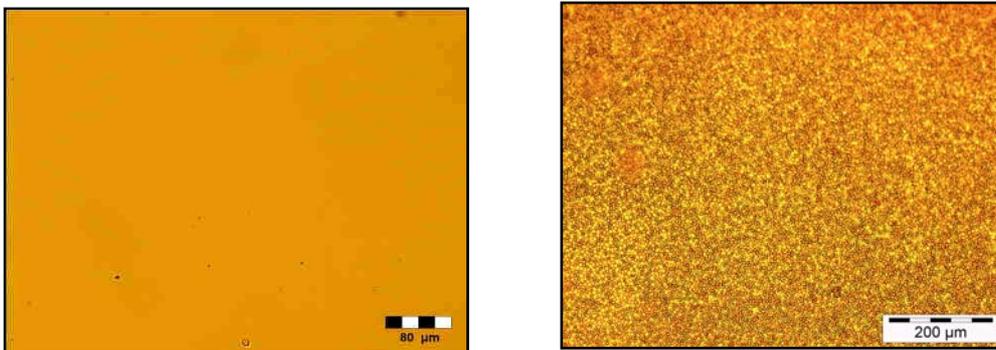


Abbildung 3-1

Detektion der Blutgruppe A über einen IgG-Monolayer

links: Kontrollprobe mit Blut der Gruppe 0, 100fache Vergrößerung

rechts: Positivprobe mit Blut der Gruppe A, 100fache Vergrößerung

3.2 Blutgruppenanalyse im Rhesus Blutgruppensystem

3.2.1 Nachweis des Rhesus D-Antigens

Das Anbindungsverhalten auf Schwingquarzen von Blut mit dem Rhesus D Antigen wurde mit unterschiedlichen Beschichtungstechniken (Abb. 3-2) untersucht. Im Weiteren wurde der Einfluss des Bromelins auf die Ankoppelung von Erythrozyten auf den Schwingquarz getestet.

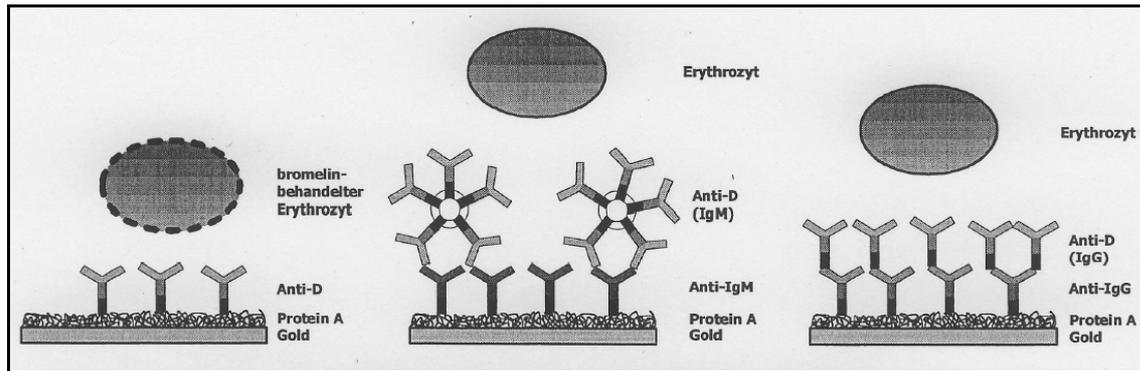


Abbildung 3-2

Schematische Darstellung verschiedener Beschichtungstechniken zur Rhesus Blutgruppenanalyse(29)

Die Negativprobe sämtlicher Versuche zur Rhesus D Analyse verlief ohne Anbindung von Erythrozyten auf den Schwingquarzen. Kein Nachweis einer Anbindung Rhesus D tragender Erythrozyten auf Quarzen mit einer Gold – Protein A – Anti–D–IgG Beschichtung. Ebenfalls ohne Belegung blieb der Quarz, als Rhesus D Blut über einen Gold – Protein A – Anti-Human-IgG – Anti-D-IgG beschichteten Quarz gepumpt wurde. Die Beschichtung mit Anti-D IgM Antikörpern direkt auf Protein A konnte nur vereinzelt Erythrozyten auf die Schwingquarzoberfläche binden.

Bei den Ankoppelungsversuchen auf einen Gold – Protein A – Anti-Human-IgM IgG– Anti D IgM beschichteten Quarz wurden zwei in der Routinediagnostik verwendete Antikörperlösungen im Vergleich getestet. Es handelte sich dabei um den monoklonalen Anti-D BS 232 und den ebenfalls monoklonalen Anti-D Rum_1 Antikörper. Die Positivprobe zeigte, dass beide Antikörperlösungen in der Lage waren, eine große Anzahl roter Blutkörperchen auf den Schwingquarz zu binden. Die Auszählung für die Rum_1 IgM Sandwich Beschichtung ergab 8800 +/-311 Erythrozyten/mm² (Abb. 3-3) und für die BS 232 IgM Sandwich Beschichtung 7540 +/-288 Erythrozyten/mm². Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Ankoppelung Rh-D Merkmal tragender Erythrozyten zu Gunsten des Rum_1 Antikörperklons.

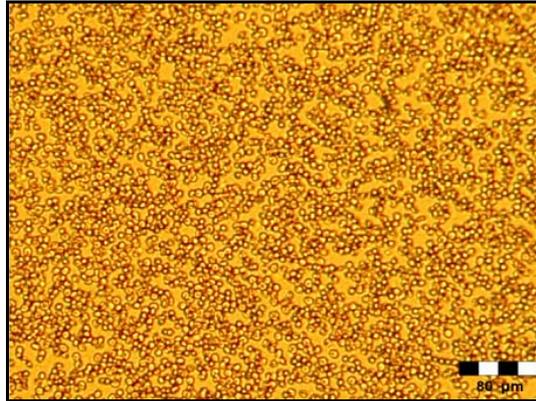


Abbildung 3-3
Anti-D Rum_1 IgM Sandwich, 100fache Vergrößerung

3.2.2 Nachweis des Rhesus D Antigens mit enzymbehandelten Erythrozyten

Im nächsten Schritt wurde die Glykokalix der Erythrozyten mit Bromelin entfernt. Die oben beschriebenen Versuche wurden nun mit bromeliertem Blut durchgeführt.

Jeder Messung ging eine Negativprobe voraus, die jeweils keine Erythrozyten auf dem Schwingquarz hinterließ.

Die Gold – Protein A – Anti-D IgG Beschichtung zeigte auch bei bromelierten Erythrozyten keine Anbindung.

Die Anti-D-IgM Antikörperschicht auf Protein A führte bei bromeliertem Blut zu keiner wesentlich besseren Anbindung von Erythrozyten auf der Quarzoberfläche. Es wurde nur eine vereinzelte Ankoppelung von 117 +/-11 Erythrozyten festgestellt.

Der Test des Anti-D IgG Sandwich zeigte bei Bromelinbehandlung eine verbesserte Ankoppelung roter Blutkörperchen auf dem Quarz. Die Auszählung ergab eine Belegungsdichte von 248 +/-21 Erythrozyten/mm².

Die IgM Sandwich Beschichtung mit wurde erneut mit den Antikörpern der Klasse IgM, Anti-D Rum_1 und BS 232, im Vergleich getestet. Die Auszählung unter dem Mikroskop zeigte für beide Antikörperschichten eine Anbindung von 20000 +/-0 Erythrozyten/mm².

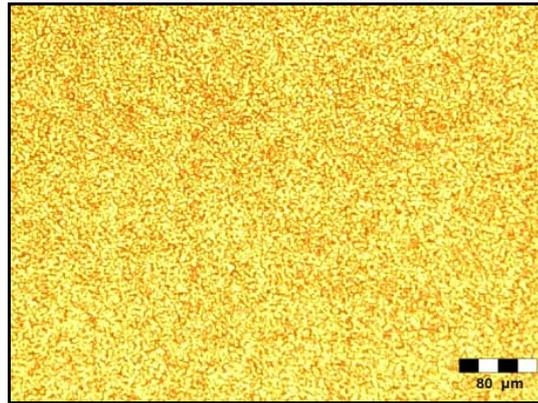


Abbildung 3-4

Anti-D Rum_1 IgM Sandwich, bromelierte Erythrozyten, 100fache Vergrößerung

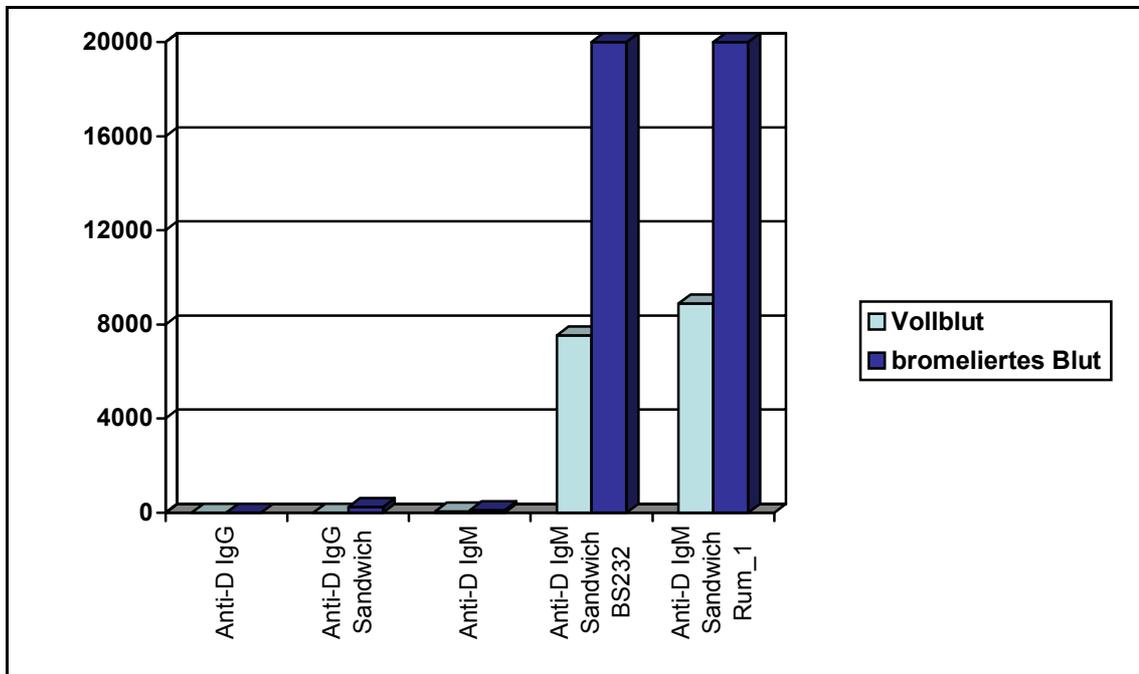


Abbildung 3-5

Anzahl immobilisierter Erythrozyten bei verschiedenen Schichtsystemen

Blut	Anti-D IgG BS 221	Anti-D IgM BS 232	Anti-D IgG Sandwich BS 221	Anti-D IgM Sandwich BS 232	Anti-D IgM Sandwich Rum_1
Vollblut	∅	49,2 +/-7	∅	7540 +/-288	8880 +/-311
Bromeliertes Blut	∅	117 +/-11	248 +/-21	20 000 +/-0	20 000 +/-0

Tabelle 3-1

Anzahl immobilisierter Erythrozyten/mm² bei verschiedenen Schichtsystemen

3.2.3 Nachweis eines schwachen Rhesus D Antigens (D^{weak})

Die Ankoppelung von Erythrozyten mit einem schwachen D wurde mit dem IgM Sandwich-Verfahren getestet. Im Vorfeld dieses Versuchs wurden das Testblut einer PCR Analyse unterzogen um die Anbindung verschiedener D^{weak} Typen vergleichen zukönnen. Es konnten die D^{weak} Typen 1,2 und 3 identifiziert werden. In der Dummie Anlage wurden alle drei getesteten D^{weak} Typen als Rhesus D positiv identifiziert. Es banden zwischen 5200 und 5800 Erythrozyten/ mm^2 auf dem Schwingquarz. Den Messungen ging eine Negativprobe voraus. Alle Erythrozyten der Negativproben durchliefen den Dummy ohne auf der Quarzoberfläche zu binden.

Durch Entfernung der Glykokalix durch Bromelin wurde versucht die Anzahl der Erythrozyten auf der Quarzoberfläche zu erhöhen. Auch hier ging der Messung eine Negativprobe voraus, bei der keine roten Blutkörperchen immobilisiert wurden. Morphologisch zeigte sich bei allen drei getesteten D^{weak} Typen eine dichte, jedoch keine lückenlose Belegung des Schwingquarzes (Abb. 3-6). Die Belegungsdichte war nach Auszählung zwischen 13000 und 14000 Erythrozyten/ mm^2 .

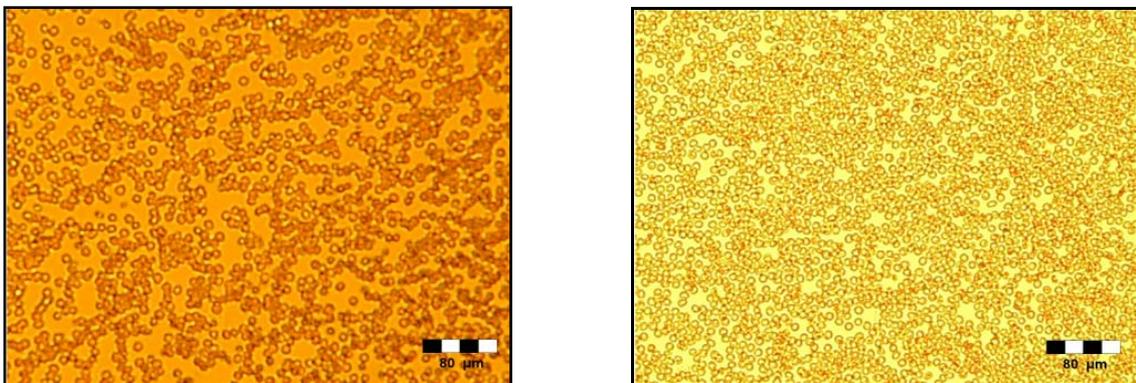


Abbildung 3-6

links: Rhesus D Nachweis aus Vollblut bei D^{weak} Typ 1, 100fache Vergrößerung

rechts: Rh D Nachweis mit bromeliertem Erythrozyten bei Rh D^{weak} Typ 1, 100fache Vergrößerung

D^{weak} Typ	Erythrozyten / mm^2	Erythrozyten auf Quarz
Typ 1 Vollblut	5200 +/-141	~ 26 000
Typ 2 Vollblut	5580 +/-148	~ 27900
Typ 3 Vollblut	5520 +/-204	~ 27600
Typ 1 bromeliert	13100 +/-141	~ 65500
Typ 2 bromeliert	13280 +/-438	~ 66400
Typ 3 bromeliert	13240 +/-433	~ 66200

Tabelle 3-2

Vergleich des Anbindungsverhalten der D^{weak} Typen 1,2 und 3 auf BS 232 Anti-D belegtem Quarz

Es konnten signifikant weniger Erythrozyten mit einem schwachen D Antigen verglichen mit den Messungen mit regulären Rhesus D Antigenen auf dem Quarz immobilisiert werden. Im Vergleich zu den regulär Rhesus D tragenden Erythrozyten wurde bei D^{weak} Typ 1 eine Reduktion der gebundenen Zellen um 31%, bei D^{weak} Typ 2 und bei D^{weak} Typ 3 um 26% festgestellt ($p < 0,05$). Während im direkten Vergleich des Anbindungsverhalten der drei schwachen D Antigene in der Vollblutprobe noch ein statistisch signifikanter Unterschied vorlag ($p < 0,05$) existiert dieser Unterschied nach Enzymbehandlung nicht mehr ($p = 0,06$ bis $0,07$).

3.2.4 Nachweis der Rhesusantigene c,C,e und E

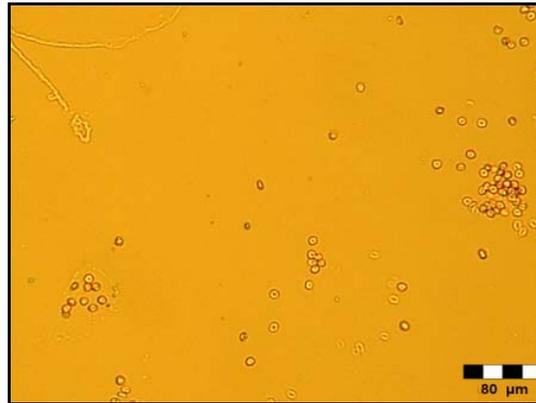
Die Versuche zur Rhesus c,C,e und E Bestimmung wurden mit IgM Sandwich Beschichtungen durchgeführt. Der Durchlauf der Negativproben verlief ohne Anbindung roter Blutkörperchen auf dem Schwingquarz.

Mit der Anti-c IgM Sandwich Schicht gelang es nur vereinzelt, Erythrozyten auf dem Quarz zu immobilisieren. Die Belegungsdichte betrug 52 ± 9 Erythrozyten/ mm^2 .

Die Anti-C IgM Sandwich Schicht konnte bei Durchlauf von Vollblut mit dem Rhesus C Merkmal ebenfalls nur wenige Erythrozyten auf der Quarzoberfläche binden. Die Belegungsdichte war 764 ± 47 Zellen/ mm^2 .

Die Anti-e IgM Sandwich Schicht konnte bei Durchlauf von Vollblut mit dem Rhesus e Merkmal keine Erythrozyten auf die Quarzoberfläche binden. Der Quarz war unverändert gegenüber der vorausgegangenen Negativprobe.

Die Anti-E IgM Sandwich Schicht konnte bei Durchlauf von Vollblut mit dem Rhesus E Merkmal, verglichen mit den Versuchen zur Ankoppelung von c, C und e, die dichteste Belegung erzielen. Es haben 1196 ± 53 Erythrozyten/ mm^2 gebunden, die Träger des Rh E Antigens sind.

**Abbildung 3-7**

Rh c Vollblut auf Anti Rh c beschichtetem Schwingquarz, 100fache Vergrößerung

Funktionaler Antikörper	Erythrozyten / mm ²	Erythrozyten auf Quarz
Anti-c	52 +/-9	~ 250
Anti-C	764 +/-47	~ 3800
Anti-e	∅	∅
Anti—E	1196 +/-53	~ 6000

Tabelle 3-3

Anbindungsvermögen verschiedener Rhesusantigene in Vollblut

Um auch beim Nachweis der Rhesus c, C, e und E Antigene ein besseres Ergebnis zu erzielen, wurden die Blutproben von Positiv- und Negativprobe einer Enzymbehandlung mit Bromelin unterzogen. Bei Durchlauf der Negativproben konnte keine Anbindung von Erythrozyten auf der Quarzoberfläche festgestellt werden.

Die Anti-c IgM Sandwich Schicht konnte bei Durchlauf von mit Bromelin behandeltem Blut mit dem Rhesus c Merkmal nun eine Belegungsdichte von 4260 +/-487 Erythrozyten/mm² auf der Quarzoberfläche erzielen (Abb. 3-8).

Die Anti-C IgM Sandwich Schicht konnte bei Durchlauf von mit Bromelin behandeltem Blut mit dem Rhesus C Merkmal eine Belegungsdichte von 6000 +/-374 Erythrozyten/mm² auf der Quarzoberfläche erzielen.

Die Anti-e IgM Sandwich Schicht konnte bei Durchlauf von mit Bromelin behandeltem Blut mit dem Rhesus e Merkmal eine Belegungsdichte von 12240 +/-654 Erythrozyten/mm² auf der Quarzoberfläche erzielen.

Die Anti-E IgM Sandwich Schicht konnte bei Durchlauf von Bromelin behandeltem Blut mit dem Rhesus E Merkmal eine Belegungsdichte von 20000 +/-0 Erythrozyten/mm² auf der Quarzoberfläche erzielen.

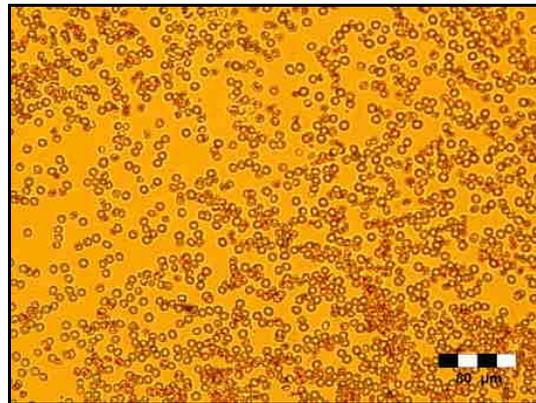


Abbildung 3–8

Bromeliertes Blut mit Rh c Antigen auf Anti Rh c beschichtetem Schwingquarz, 100fache Vergrößerung

Funktionaler Antikörper	Erythrozyten / mm ²	Erythrozyten auf Quarz
Anti-c	4260 +/-487	~ 22000
Anti-C	6000 +/-374	~ 31000
Anti-e	12240 +/-654	~ 60000
Anti—E	20000 +/-0	~ 100000

Tabelle 3–4

Anbindung verschiedener Rhesusantigene in bromelierter Erythrozytensuspension

3.2.5 Vergleich des Ankopplungsvermögens der Rhesus Antigene

Vergleicht man die verschiedenen Beschichtungen für die Blutgruppenanalyse im Rhesus System, zeigt sich, dass es bei Verwendung von Vollblut als Analysat, nur bei der Rhesus D Bestimmung gelingt Erythrozyten, in größerer Anzahl auf dem Schwingquarz zu immobilisieren. Eine gute Belegung konnte auch bei Erythrozyten mit schwachen D Antigenen erzielt werden. Um die Frage nach dem Vorliegen eines Rhesus c-, C-, e- oder E- Antigen beantworten zu können, scheint es unbedingt notwendig zu sein, das Blut vorher einer Behandlung mit Bromelin zu unterziehen.

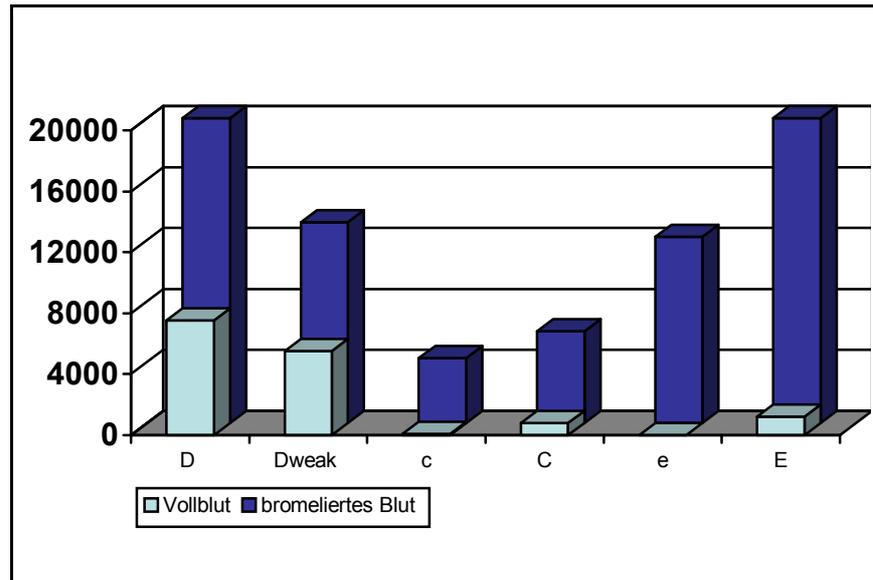


Abbildung 3-9

Vergleich des Anbindungsvermögens der verschiedenen Anti-Rhesus Beschichtungen bei Vollblut und enzymbehandelten Erythrozyten

3.3 Blutgruppenanalyse im Kell-Blutgruppensystem

Untersucht wurde das Bindungsverhalten von Blut mit der Blutgruppeneigenschaft K (Kell positiv) auf einem Schwingquarz mit einer Anti-K IgM Sandwich Beschichtung. Die vorausgehende Negativprobe mit Vollblut des Merkmals kk führte zu keiner Anbindung roter Blutkörperchen auf dem Quarz. Die Positivprobe mit Blut mit der Eigenschaft Kk zeigte einen dicht mit Erythrozyten belegten Quarz (Abb. 3-10). Die Auszählung ergab eine Belegungsdichte von 7980 ± 148 Erythrozyten/mm². Insgesamt wurden circa 40000 Erythrozyten auf dem Quarz immobilisiert.

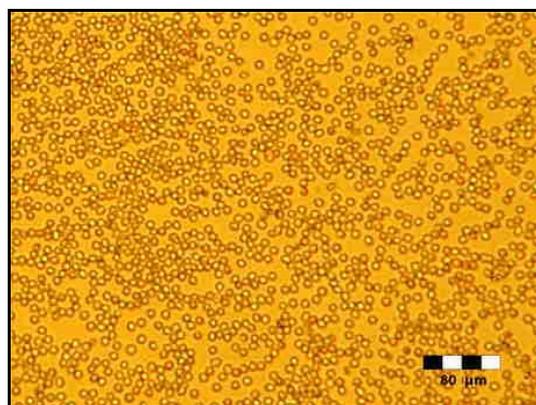


Abbildung 3-10

Blutgruppe Kk auf Anti-K belegtem Schwingquarz, 100fache Vergrößerung

3.4 Blutgruppenanalyse im Duffy-Blutgruppensystem

3.4.1 Nachweis des Fy^a Antigens durch Anti-Fy^a Coombsreaktiv Beschichtung

Die Anti-Fy^a Beschichtung konnte bei Durchlauf von Vollblut mit dem Duffy a-Merkmal keine Erythrozyten auf die Quarzoberfläche binden. Der Quarz war unverändert gegenüber der vorausgegangenen Negativprobe.

3.4.2 Nachweis des Fy^a Antigens mit inkubierten Erythrozyten

Untersucht wurde das Bindungsverhalten von gewaschenem, inkubiertem (Anti-Fy^a Coombsreaktiv) Blut mit der Blutgruppeneigenschaft Fy^a (Duffy a) auf einem Schwingquarz mit einer Anti-Human-IgG Beschichtung. Die vorausgehende Negativprobe mit ebenfalls gewaschenem Blut, welches Träger des Merkmals Fy^b ist, führte zu keiner Anbindung roter Blutkörperchen auf dem Quarz. Die Positivprobe mit Blut mit der Eigenschaft Fy^a zeigte einen dicht mit Erythrozyten belegten Quarz (Abb. 3-11). Die Auszählung ergab eine Belegungsdichte von 2020 +/-109 Erythrozyten/mm². Insgesamt wurden circa 10 000 Erythrozyten auf dem Quarz immobilisiert.

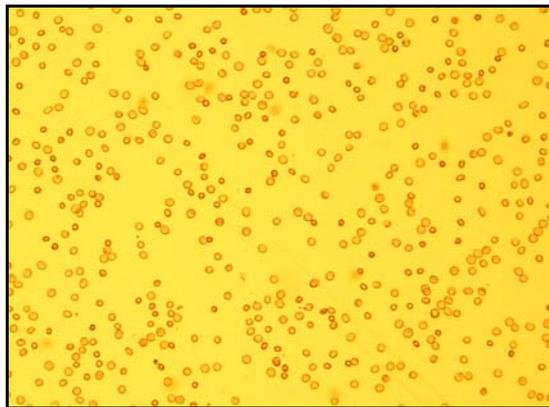


Abbildung 3-11

Erythrozyten mit dem Blutgruppenantigen Fy^a, inkubiert mit Anti-Fy^a Coombsreaktiv auf Anti-Human-IgG beschichteten Schwingquarz, 100 fache Vergrößerung

3.5 Nachweis von mit Rhesusantikörpern beladenen Erythrozyten

Im Duffy System gelang bereits der Nachweis mit Antikörpern beladener Erythrozyten mit dem Schwingquarz. Nun sollte diese modifizierte Form des Antiglobulintestes mit Rhesusantikörpern getestet werden. Dazu gab es zwei Versuchsansätze. Die Inkubation der Erythrozyten erfolgte zum einen mit Rhesus D immunisiertem Serum, zum anderen mit monoklonalen Anti-Rhesus D-Antikörpern der Klasse IgG.

3.5.1 Inkubation in Rhesus D immunisiertem Serum

Der Quarz wurde mit einer Protein A Schicht und einer Anti-Ig-Immunglobulin Schicht gegen IgG nach Standardmethode beschichtet. Bei dem zu detektierenden Analyt handelte es sich um Blut der Gruppe 0, Rh+ nach Inkubation mit Rhesus immunisiertem Serum. Die Einzelblutproben des Plasmapools hatten in vier Fällen einen Anti-Rh D Titer von 1:128 und einem Fällen 1:64. Die Verdünnungsreihe des Plasmapools reichte von der Ausgangskonzentration bis zu einer Verdünnung von 1:512. Bei diesem Versuch sollte die Eignung eines für die Schwingquarzanalyse modifizierten Antiglobulintests untersucht werden. Ziel war es, Erythrozyten, die mit Rhesus-D Antikörpern aus einem Rhesus D immunisierten Serum beladen sind auf der Schwingquarzoberfläche zu immobilisieren. Es wurde dabei das Anbindungsverhalten von bromeliertem und nicht bromeliertem Blut verglichen. Alle Kontrollproben zeigten keine Bindung von Erythrozyten auf der Quarzoberfläche.

Bromelinbehandelte Erythrozyten: Die Messung unter Standardbedingungen bei unverdünnter, beziehungsweise gering verdünnter Serumpool-Antikörperlösung, zeigten sich eine spezifische Ankopplung mit insgesamt 800 Erythrozyten auf dem Quarz. Ab einer 1:8 Verdünnung des immunisierten Patientenserums war eine Anbindung der belegten Erythrozyten nicht mehr möglich (siehe Tab. 3.5). Auf dem Quarz fanden sich kleinere Agglutinate. Unter dem Mikroskop war erkennbar, dass diese sich jedoch wieder von der Quarzoberfläche ablösten. Bei höheren Verdünnungen fand keine Erythrozytenanbindung statt. Es zeigte sich keine Anbindung der nicht mit Bromelin vorbehandelten Erythrozyten.

Verdünnung	Gewaschene Erythrozyten	Bromelierte Erythrozyten
∅	∅	+, 800 Erythrozyten/Quarz
1 : 1	∅	+, 800 Erythrozyten/Quarz
1 : 2	∅	+, 500 Erythrozyten/Quarz
1 : 4	∅	+, 200 Erythrozyten/Quarz
1 : 8	∅	+, 200 Erythrozyten/Quarz
1 : 16	∅	∅
1 : 32	∅	∅
1 : 64	∅	∅
1 : 128	∅	∅
1 : 256	∅	∅
1 : 512	∅	∅

Tabelle 3-5

Detektion antikörperbeladener Erythrozyten der Blutgruppe 0, Rh+, inkubiert mit Plasma der Blutgruppe 0, rh-, über eine Anti-IgG-Beschichtung
 + => kleine Agglutinate
 ∅ => keine Erythrozyten gebunden

3.5.2 Inkubation in monoklonaler Anti-Rhesus D IgG Lösung

Der Quarz wurde mit einer Protein A Schicht und einer Anti-IgG-Immunglobulin Schicht gegen IgG beschichtet. Bei dem zu detektierenden Analyt handelte es sich um Blut der Gruppe 0, Rh+, inkubiert mit Rh D Antikörpern des Klons BS 221. Die Ausgangskonzentration der gewaschenen Erythrozytensuspension lag bei 570 000 Zellen/μl. Die Ausgangskonzentration der bromelierten Erythrozyten lag bei 280 000 Zellen/μl. Die Verdünnungen der Antikörperlösungen in EDTA/TRIS/Tween Puffer reichten von der Ausgangskonzentration bis zu einer Verdünnung von 1 : 128.

Bei diesem Versuch sollte die Anbindungsfähigkeit von Erythrozyten inkubiert in Rhesus D immunisiertem Serum, mit der Anbindungsfähigkeit von Erythrozyten, inkubiert in monoklonaler Anti-D Antikörperlösung, verglichen werden. Dieser modifizierte Antiglobulintest wurde sowohl mit bromeliertem Blut als auch mit Vollblut durchgeführt. Die Kontrollproben beider Versuchsansätze verliefen ohne Anbindung roter Blutkörperchen auf dem Quarz.

Die Auswertung des Schwingquarzes mit immobilisierten Erythrozyten aus gewaschener Vollblutprobe zeigte eine Anbindung von 200 Erythrozyten/mm². Im Vergleich zu der IgG Sandwichbeschichtung zum Nachweis des Blutgruppenantigens Rh-D, gelingt hier die Immobilisierung der Rh-D merkmalttragenden Erythrozyten ohne vorausgehende Enzymbehandlung. Bei bromelierten Erythrozyten resultierte

eine homogene Quarzbelegung mit immobilisierten Erythrozyten. Es konnten bis zu 3000 Erythrozyten/mm² immobilisiert werden (siehe Tab. 3.6). Dies ist quantitativ ein deutlich besseres Ergebnis im Vergleich zur Anti-Rhesus D-IgG Sandwichbeschichtung. Bei höherer Verdünnung der monoklonalen BS 221 Antikörper ging die Zahl der gebundenen Erythrozyten zurück.

Verdünnung	Gewaschene Erythrozyten	Bromelierte Erythrozyten
∅	200 Zellen/mm ²	3000 Zellen/mm ²
1 : 1	200 Zellen/mm ²	3000 Zellen/mm ²
1 : 2	200 Zellen/mm ²	2000 Zellen/mm ²
1 : 4	∅	1500 Zellen/mm ²
1 : 8	∅	1200 Zellen/mm ²
1 : 16	∅	1000 Zellen/mm ²
1 : 32	∅	500 Zellen/mm ²
1 : 64	∅	500 Zellen/mm ²
1 : 128	∅	500 Zellen/mm ²

Tabelle 3-6

Detektion antikörperbeladener Erythrozyten der Blutgruppe 0, Rh⁺₁ inkubiert mit monoklonaler Anti-D IgG Antikörperlösung über eine Anti-IgG-Beschichtung
 ∅ => keine Erythrozyten gebunden

3.6 Regeneration von Schwingquarzen

Es existieren mehrere ansätze zur Regeneration der Schwingquarzes. Exemplarisch weden in dieser Arbeit zwei chemische Methoden vorgestellt.

3.6.1 Regeneration mit Natronlauge

Nach den ersten fünf Messungen konnten jeweils 19000 Erythrozyten/mm² der Blutgruppe A auf dem Schwingquarz immobilisiert werden. Jede NaOH Behandlung erforderte jedoch eine erneute Belegung mit den entsprechenden Anikörpern. Nach der fünften Regeneration mit 0,1 molaren NaOH konnten nur noch 8000 Erythrozyten/mm² immobilisiert werden. Nach der sechsten Messung war keine Anbindung mehr möglich.

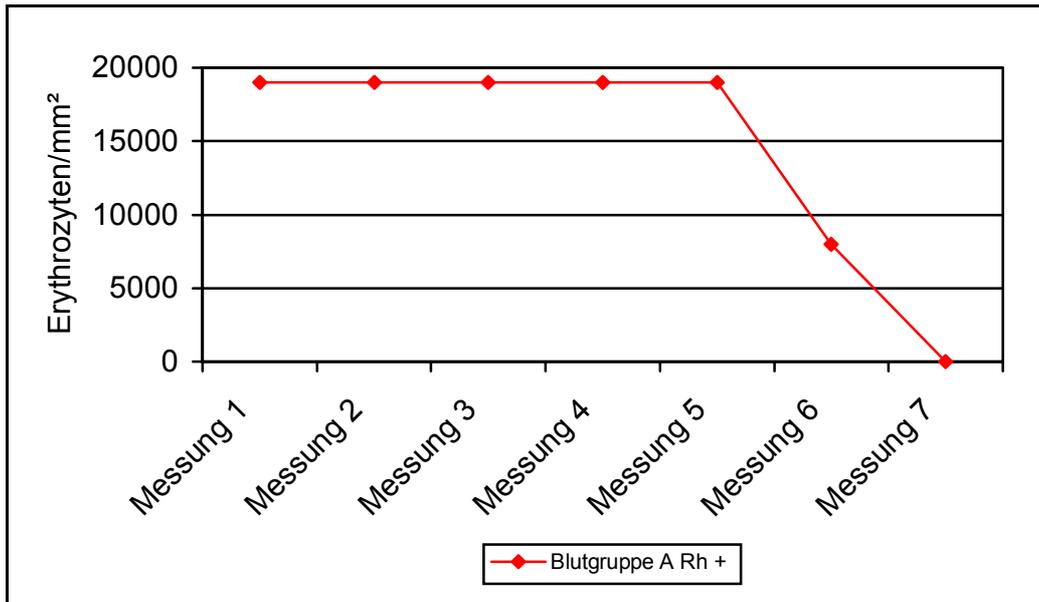


Abbildung 3–12
Wiederholte Messungen bei Regeneration mit NaOH

3.6.2 Regeneration mit Diethyläther

Nach der ersten Messung waren 19000 Erythrozyten/ mm^2 der Blutgruppe A auf dem Schwingquarz immobilisiert. Nach der Regeneration mit Diethyläther war die Oberfläche des Schwingquarzes von den immobilisierten Erythrozyten befreit. Bei erneutem Durchlauf von der Testerythrozyten konnte keine Belegung mehr erzielt werden. Nach der Regeneration war die Quarzbeschichtung jedoch nur dann wieder in der Lage Erythrozyten zu binden, wenn die Beschichtung mit Protein A und Antikörpern wie bei einem frischen Quarz durchgeführt wurde. Die Belegung betrug dann erneut 19000 Erythrozyten/ mm^2 .

3.7 Test der Beschichtungsmodelle in der Fließinjektionsanlage

3.7.1 Nachweis der Blutgruppe A

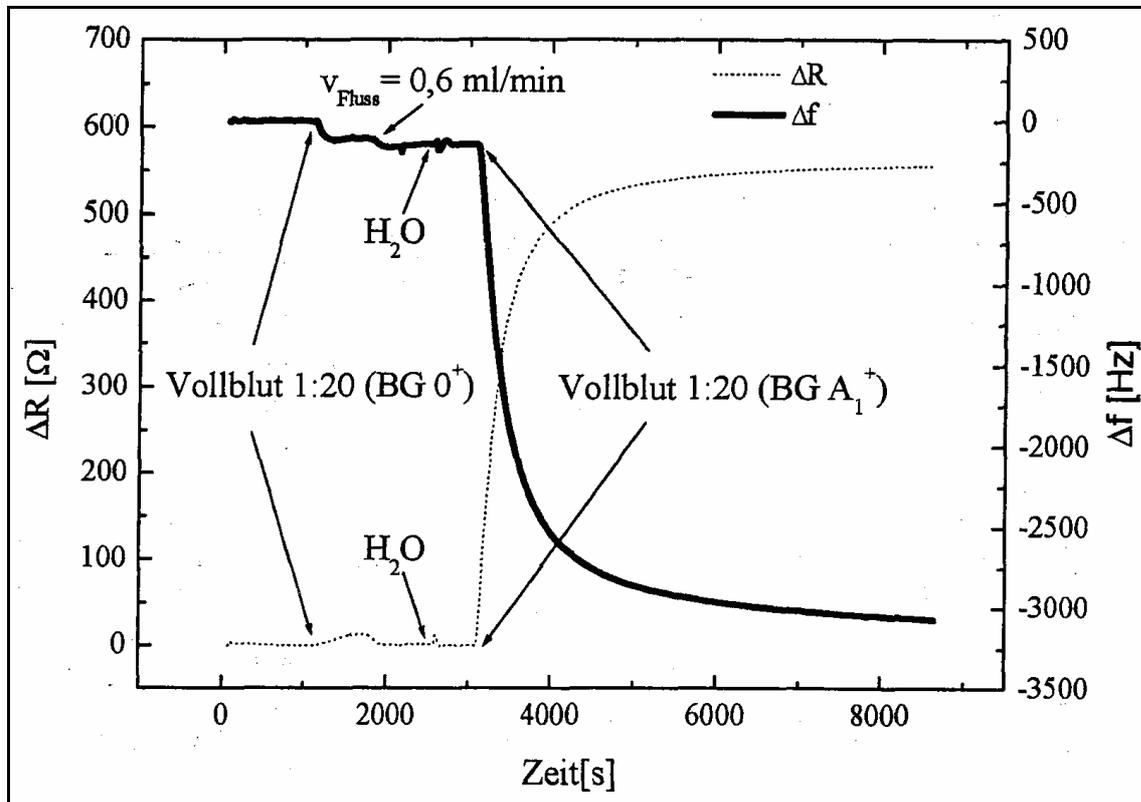


Abbildung 3-13

Nachweis der Blutgruppe A mit einem Anti-A IgG Monolayer

Bei der in Abbildung 3-13 dargestellten Bestimmung der Blutgruppe A, wurde ein außerhalb der Sensoreinheit mit Protein A beschichteter Schwingquarz verwendet. Die im Verhältnis 1:10 mit Tris/EDTA/Tween Puffer verdünnte Anti-A BS-66 Antikörperlösung wurde nach 230 s injiziert. Zwischen den Zeitpunkten 290 s und 3350 s wurde der Fluss gestoppt. Die Immobilisierung der Anti-A-Antikörper innerhalb der Sensoreinheit ergab eine resultierende Frequenzänderung von 294 Hz. 4465 s nach Start der Messung wurde eine im Verhältnis 1:10 mit Tris/EDTA/Tween Puffer verdünnte Erythrozytensuspension ($1,1 \cdot 10^5$ Zellen/ μl) der Blutgruppe 0 Rh positiv in die Messkammer geleitet. Die Negativprobe ergab auch nach einer Stop-Flow-Phase von 100 s keine resultierende Frequenzänderung. Nach einem Spülschritt mit zunächst Pufferlösung und dann bidestilliertem Wasser wurde nach Erreichen einer stabilen Ausgangslage zum Zeitpunkt 5553 s eine im Verhältnis 1:10

mit Tris/EDTA/Tween Puffer verdünnte Erythrozytensuspension ($1,0 \cdot 10^5$ Zellen/ μl) der Blutgruppe A Rh+ injiziert. Die resultierende Frequenzänderung von 2,5 kHz unterscheidet sich deutlich von der Negativprobe. Das Spülen mit bidestilliertem Wasser und die dadurch bedingte Hämolyse reduzierte die resultierende Frequenzänderung auf einen Wert von 475 Hz.

3.7.2 Nachweis des Rhesus D Antigens

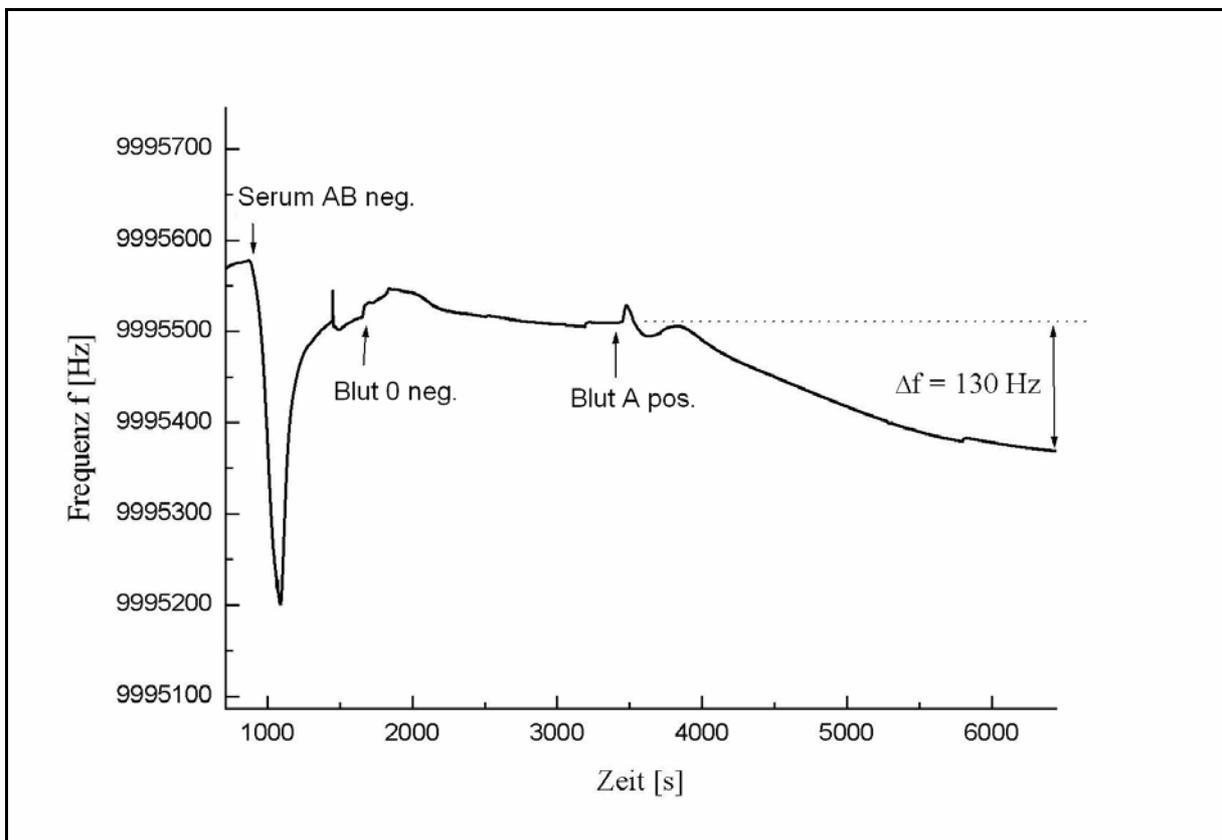


Abbildung 3–14

Nachweis Rhesus positiver Erythrozyten mit Anti-Rhesus D IgM Sandwich Beschichtung

Für die Bestimmung des Rhesusfaktors wurde eine Antikörperdoppelschicht bestehend aus Anti-Human-IgM IgG-Antikörpern und Anti-D Rum_1 Antikörpern versehen. Die Vollblutproben wurden im Verhältnis 1:10 in Tris/EDTA/Tween Puffer verdünnt.

Abbildung 3–14 zeigt die Frequenzänderung bei der Messung zur Rhesusbestimmung. Vor der Rhesusbestimmung wurde die Schwingquarzoberfläche mit Pufferlösung gespült, um die Messkammer zu entlüften. Zur Absättigung der

noch freien Anti-Human-IgM Antikörper Bindungsstellen mit AB0 unspezifischen Antikörpern wurde zunächst Blutplasma aus einem Pool von fünf verschiedenen Blutproben der Blutgruppe AB rh- in die Messkammer eingeleitet. Nach Stabilisierung der Frequenz wurde die Negativprobe der Blutgruppe 0, rh- injiziert. Die Strömungsgeschwindigkeit war auf 0,1 ml/min eingestellt. Die resultierende Frequenzänderung der Negativprobe betrug 5 Hz. Zu einer mit 130 Hz deutlich höheren Frequenzänderung bei gleicher Strömungsgeschwindigkeit führte die Positivprobe der Gruppe A Rh+

4 Diskussion

4.1 Stand der Wissenschaft

Es ist bekannt, dass die Resonanzfrequenz eines oszillierenden piezoelektrischen Kristalls durch eine Massenänderung auf der Quarzoberfläche beeinflusst werden kann (39). Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt um Anteile von Verdampfungsablagerungen bei chromatografischer Detektion von Gasen zu überwachen (40). Muramatsu und Dicks demonstrierten, dass ein piezoelektrischer Kristall, überzogen mit einer Schicht aus immobilisiertem Protein A, wirkungsvoll zur Bestimmung von IgG-Konzentrationen herangezogen werden kann. Auf einem Schwingquarz mit einer Grundfrequenz von 9000 MHz konnte bei Immobilisierung von Protein A in der Messzelle ein Frequenzunterschied von 180 bis 200 Hz gemessen werden. Die Absättigung mit humanen IgGs fand bei einem Frequenzabfall von ungefähr 250 Hz statt (52).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen nutzten Davies und Leary einen mit Protein A überzogenen Schwingquarz, der anschließend mit humanen IgGs abgesättigt wurde, zum Nachweis biologischer Makromoleküle (*Abb. 4-1*). Die Zugabe von Schaf IgGs eines gegen humane IgGs immunisierten Tieres verursachte einen dramatischen Abfall der Resonanzfrequenz um 1400 Hz (21).

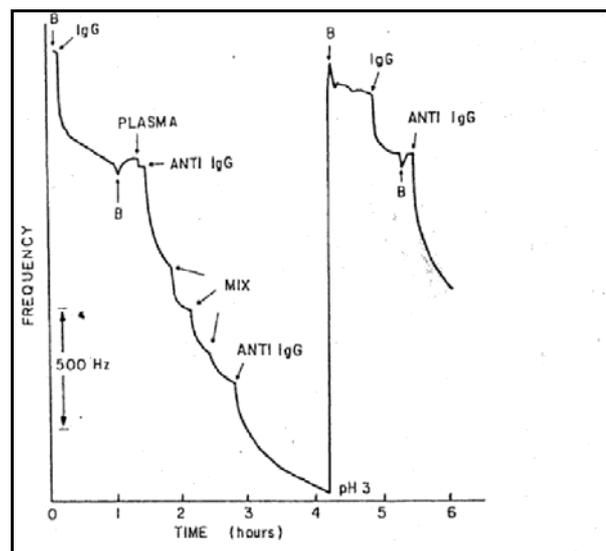


Abbildung 4-1

Frequenzabfall eines Protein A beschichteten Schwingquarzes nach Zugabe von Human IgGs und anschließender Benetzung mit Anti-Human-igGs aus Schafsserum (21).

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Grundlagen für die massensensitive Blutgruppenanalyse mit Schwingquarzen zu schaffen. Es sollte herausgefunden werden, ob und wie es möglich ist, Erythrozyten entsprechend ihrer antigenen Eigenschaften, spezifisch auf die Oberfläche von Schwingquarzen anzukoppeln, was konsekutiv zu einer Änderung der Resonanzfrequenz führt. Die Erythrozytenankoppelung sollte über Antikörperschichten erreicht werden.

4.2 Die Beschichtungstechnik

Die einfachste Möglichkeit der Fixierung von Antikörpern auf dem Quarz scheint die direkte Ankoppelung an die Goldelektrode. Man geht davon aus, dass die Schwefelbindungen der Antikörper an Gold binden. Diese Technik führt jedoch zu einer ungeordneten Beschichtung und in unseren vorausgegangenen Versuchen zu keinen verwertbaren Ergebnissen (43).

Für diese Arbeit wurde die Antikörperankoppelung via Protein A gewählt. Protein A wird extrazellulär an der Außenseite der Zellmembran des Bakteriums *Staphylococcus aureus* gebildet (71). Das Protein A bindet IgG-Moleküle einiger Spezies, vor allem Human- und Kaninchen-IgGs. Da die Bindungsstelle an deren F_c -Fragment liegt, resultiert eine ausgerichtete Antikörperschicht (34). Bindungen mit hoher Affinität werden weiter für IgG von Meerschweinchen und Mausantikörper der Subklasse IgG2 ausgebildet. Schwächere Bindungen kommen bei den IgG1- bzw. IgG3- Antikörpern von Mäusen und den humanen IgM-, IgA-, IgD- und IgE-Antikörpern vor (30). Da nun die F_{ab} -Fragmente mit ihren spezifischen Bindungsstellen sterisch ungehindert sind, sollte eine hohe Antigenbindungskapazität erreichbar sein (20). Ein Protein A Molekül ist in der Lage zwei IgG Moleküle zu binden (72). Gold-Protein A Komplexe sind sehr stabil, besitzen eine Affinitätskonstante von 10^8 M^{-1} und werden wahrscheinlich durch Van-der-Waals-Kräfte zusammengehalten (33).

Optimale Bedingungen für die Ankoppelung von Erythrozyten auf beschichteten Schwingquarzen in einem Dummysystem sind eine Fließgeschwindigkeit von 0,1 ml/min, eine Verdünnung des mit $4,5 \text{ bis } 5,8 \cdot 10^{12}$ Zellen/l in EDTA gelagerten Testblutes um den Faktor 10 und ein PH Wert der Pufferlösung von 7,9 (16, 17).

4.3 Blutgruppenanalyse

Nachdem die optimalen Parameter für die Quarzbeschichtung herausgearbeitet wurden, konnten die Blutprobenmessungen durchgeführt werden. In den folgenden Abschnitte werden die Messungen zum Nachweis verschiedener Blutgruppensysteme diskutiert. Jeder Messung ging eine Negativprobe voraus, um unspezifische Erythrozytenankopplungen auszuschließen.

4.3.1 Blutgruppenbestimmung im AB0-Blutgruppensystem

Die Blutgruppenanalyse im AB0-System wurde mit einem IgG-Monolayer beim Nachweis des A-Antigens durchgeführt. Die Blutgruppe A lässt sich in A_1 und A_2 unterteilen. A_2 ist gegenüber A_1 ein abgeschwächtes A-Antigen. Die Zahl der Antigenstellen auf einem Erythrozyt der Blutgruppe A_1 liegt bei 800 000 bis 1 200 000. Bei der Blutgruppe A_2 sind es dagegen nur 160 000 bis 440 000 Antigenstellen pro Erythrozyt (49). Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen im AB0-System wurde Blut der Gruppe A_1 verwendet. Cluss hatte bereits gezeigt, dass eine IgG-Beschichtung des Schwingquarzes einer IgM-Beschichtung deutlich überlegen ist (17).

Mit 19000 Erythrozyten/mm² war die maximale Belegung erreicht. Die eng stehenden Antigenbindungsstellen der Antikörper auf der Quarzoberfläche, zusammen mit den zahlreichen Antigenen auf den Erythrozyten, erlaubten eine optisch lückenlose Belegung des Schwingquarzes. Um eine noch kompaktere Belegungsdichte zu erhalten, müsste das Zetapotential der Erythrozytenoberfläche biochemisch reduziert werden. Für eine spezifische Blutgruppenanalyse ist dies jedoch nicht zwingend notwendig (s. u. 4.6.1).

4.3.2 Blutgruppenbestimmung im Rhesus Blutgruppensystem

4.3.2.1 Das Rhesus D-Antigen

Das wichtigste Blutgruppensystem auf Proteinbasis ist das Rhesussystem. Anti-D ist noch immer der häufigste und wichtigste Rh-Antikörper. Man unterscheidet zwei Gene am Rh-Locus auf Chromosom 1, die die Expression der fünf wichtigsten Antigene D, C, c, E und e steuern (76). Die Bestimmung des Rhesusfaktors ist mit einem höherem Aufwand verbunden als die Analyse im AB0-System. Ein Quarz mit

Protein A und BS 221 Belegung konnte auch nach direktem Aufpipettieren Rhesus D positiven Bluts keine Ankoppelung erzielen. Versuche mit Zugabe von Albumin- oder Reaktionsverstärkerzusätzen im Verhältnis 1:1 brachten keine Verbesserung (37). Der Grund für die bis dahin erfolglosen Ankopplungsversuche ist in den sterischen Verhältnissen in der Region des Rhesusantigens zu suchen. Während die Kohlenhydratstrukturen der Antigene des AB0-Systems (Abb. 4-2) außerhalb der Erythrozytenmembran lokalisiert sind, sind die Rhesus Moleküle (Abb. 4-3) transmembrane Proteine aus 417 Aminosäuren, welche meanderförmig in der Membran angeordnet sind und diese 12 mal durchqueren (28, 69, 76).

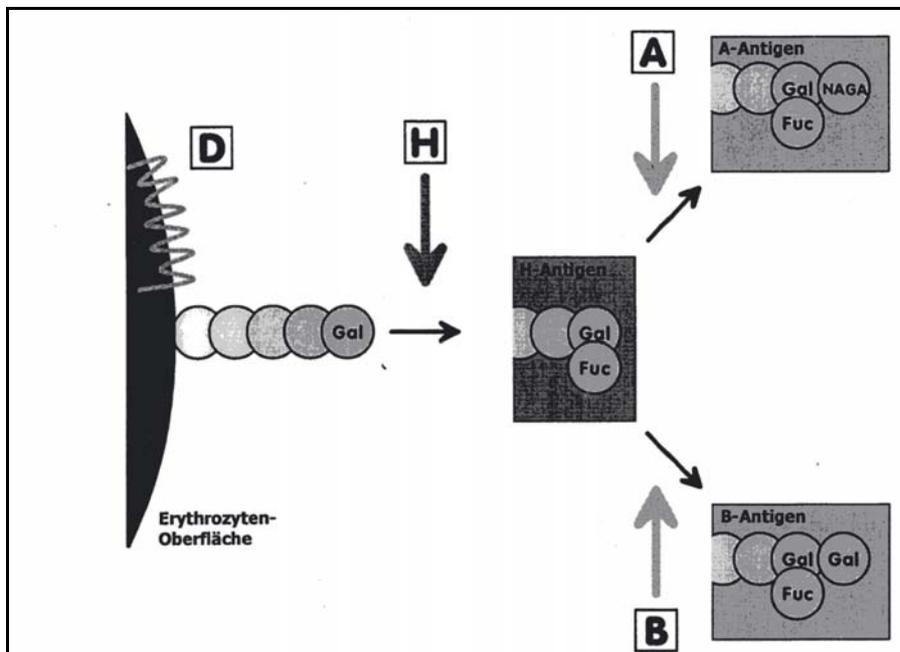


Abbildung 4-2

Antigene D sowie H („0“-Antigen, A und B auf der Erythrozytenmembran (73)

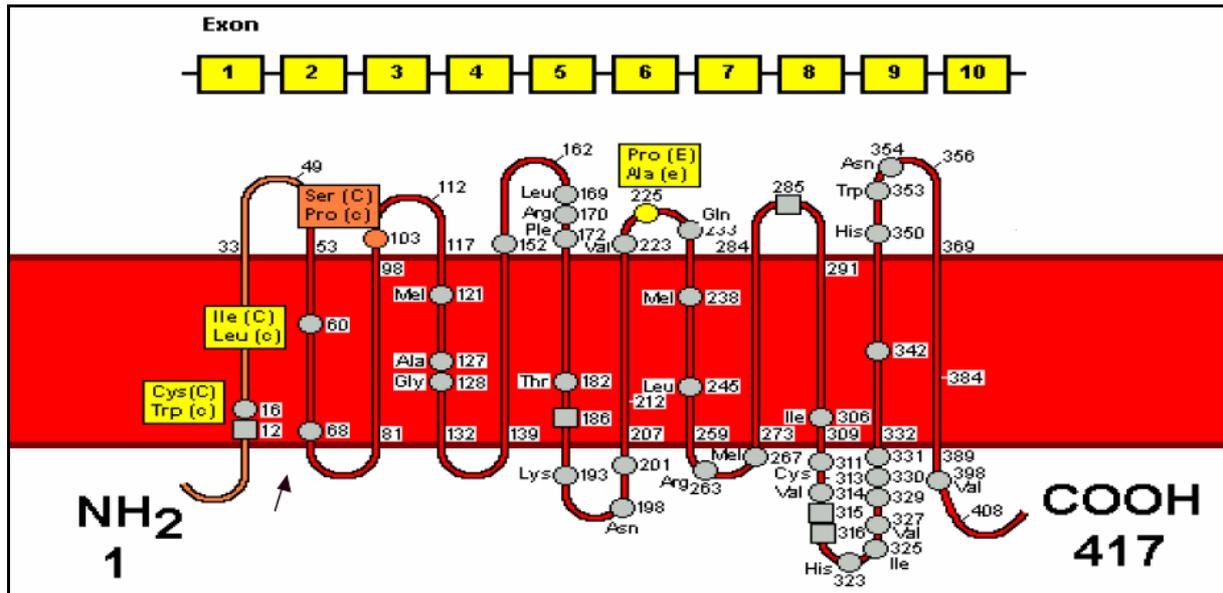


Abbildung 4-3
Rhesustransmembranprotein und Zuordnung zu den Exons der Rhesusantigene (3)

Die Glykokalix, bestehend aus Glykolipiden und Glykoproteinen, ragt 12,5 nm aus der Lipiddoppelschicht der Erythrozytenmembran heraus. Durch diese Topographie sind die Rhesusantigene weniger gut zugänglich. Desweiteren beträgt die Länge der IgG Antikörper 8,5 nm (37). Eine Bindung zwischen einem Antigen des Rhesussystems und einem Festphasengebundenen Antikörper kann aufgrund der zu geringen Länge des IgG-Antikörper nicht ausgebildet werden. Zur Lösung dieses sterischen Problems wurden drei verschiedene experimentale Ansätze durchgetestet. Diese waren eine Doppel-IgG-Beschichtung, eine IgM-Beschichtung und die Entfernung der Glykokalix.

Ein Ansatz zur Umgehung sterischer Probleme bei der Zugänglichkeit des Rhesusantigens durch die IgG-Antikörper beruhte auf einer doppelten IgG-Beschichtung (Sandwich) (58). In den Versuchen zeigte sich jedoch, dass dieses Schichtsystem ungeeignet ist. Ein Grund dafür ist darin zu suchen, dass IgG-Antikörper im Serum in T-Form vorliegen (*Abb. 4-4*) und es erst nach Antigenbindung zu einer Angulierung der F_{ab} -Arme in der Hinge-Region um bis zu 30° bezogen auf das F_c -Fragment kommt (29). Das bedeutet, dass die Länge der IgG-Antikörper von 8,5 nm erst nach Antigenbindung erreicht wird. Durch die Spannweite von 14 nm der T-förmigen IgG-Antikörper ist zum einen das Passieren der Glykokalixketten des Erythrozyten erschwert zum anderen ist eine Änderung des Angriffswinkels der F_{ab} -

Fragmente durch Fixierung des F_c -Fragments an den Anti-IgG Antikörpern beziehungsweise deren Fixierung auf der Quarzoberfläche nicht möglich.

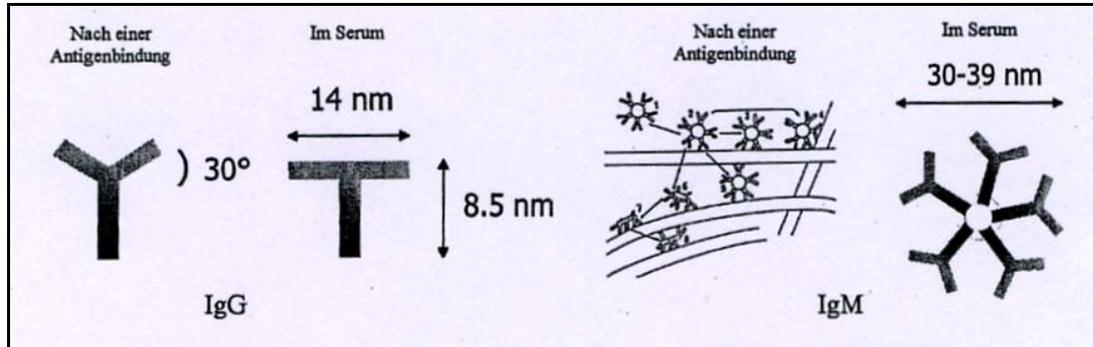


Abbildung 4-4

Größe und Form von Antikörpern der IgG- und IgM-Klasse nach einer Antigenbindung und im Serum. Die Gelenkregion von IgG-Antikörpern erlaubt eine Rotation der Fab-Arme um bis zu 30° bezogen auf das F_c -Fragment. Die außerordentliche Verbiegbarkeit der gelenklosen IgM-Antikörpern nach einer Antigenbindung ist auf der rechten Seite des Bildes gezeigt (37, 43).

Es ist davon auszugehen, dass die IgG-Antikörper nicht ausschließlich am hinteren Ende des F_c -Fragmentes gebunden werden, sondern auch in anderen Bereichen bis hin zur Hinge-Region. Somit ist nur zu einem Teil die maximale Ausdehnung von $2 \cdot 8,5 \text{ nm} = 17 \text{ nm}$ der IgG-Doppelschicht zu erreichen.

Die Affinität des Protein A ist gegenüber den pentameren IgM-Antikörpern vermindert, so dass mit dieser Beschichtungsvariante nur sehr wenige Erythrozyten angekoppelt werden konnten. Die IgM-Antikörper werden wie auch die IgG-Antikörper vom Protein A am F_c -Fragment gebunden. Die Höhe der Beschichtung entspricht folglich nicht dem Durchmesser der IgM Moleküle, sondern liegt deutlich darunter.

Ein erfolgreicher Rhesus Nachweis gelang mit IgM-Antikörpern als Bestandteil einer Sandwich Beschichtung. Ein Durchmesser der IgM-Antikörper von 30 – 39 nm erlaubt der Antikörperschicht eine ausreichende Eindringtiefe bis zu den Rhesusantigenstellen (37). Der Grund, warum sowohl der BS 232- als auch der Rum_1-Antikörper keine lückenlose Quarzbelegung hinterließen, wie sie im AB0-System erreicht werden konnte, ist in der Antigendichte zu suchen. Während sich auf einem Erythrozyten das Blutgruppenantigen A_1 800000 bis 1200000 mal befindet, kommt das Rhesus D-Antigen nur 10000 bis 30000 mal vor (76).

Der dritte Lösungsansatz sah vor, die Rhesusantigenstellen für die Antikörperschicht besser zugänglich zu machen. Die Glykokalix eines Erythrozyten kann mit proteolytischen Enzymen, z.B. Bromelin aus der Ananas oder Papain aus der Papaya, entfernt werden (74). Papain hat die Eigenschaft Antikörper in ihrem Gelenkteil in zwei F_{ab} -Fragmente und ein F_c -Fragments aufzuspalten (37). Um eine Zerstörung der Antikörperschicht zu vermeiden, wurde die Enzymbehandlung der Erythrozyten aus diesem Grund ausschließlich mit Bromelin vorgenommen. Vergleichende Studien haben gezeigt, dass die Vorbehandlung roter Blutkörperchen mit Enzym die um vieles sensitivere Methode ist, als die bloße Zugabe von Enzym beim Versuch. Die Entfernung von Teilen der Membranglykoproteine erlaubt einigen Antikörpern einen besseren Zugang zu ihren Antigenen (37).

Für eine IgG-Monoschicht auf Protein A erwies sich die Bromelierung als nicht ausreichend. Im Falle der IgG-Sandwich Schicht konnte aber eine stark verbesserte Zugänglichkeit der Rhesusantigene erzielt werden. Die dichteste Belegung konnte jedoch bei der Kombination aus IgM-Sandwich und Bromelierung des Testblutes erreicht werden. In diesem Fall übertraf die Belegungsdichte sogar die bei der Messung im AB0-System.

Dieses Ergebnis lässt sich mit dem Phänomen des Zetapotentials erklären. Erythrozyten lassen aufgrund ihrer negativen Membranladung eine doppelschichtige Ionenwolke entstehen. Die innere, aus positiven Ionen bestehende Schicht ist unverschieblich fest an die negativ geladene Erythrozytenmembran gebunden, während sich peripher eine zweite Ionenschicht mit überwiegend negativen Ladungen anlegt. Die Potentialdifferenz zwischen diesen beiden Ionenwolken, das Zetapotential, bedingt, dass Erythrozyten sich gegenseitig abstoßen und normalerweise einen physiologischen Abstand voneinander einhalten, der durch die Dicke ihrer jeweiligen Ionenwolke bestimmt ist. Die Dicke dieser Wolken beträgt bis zu 150 Angström, somit beträgt die minimale Distanz zweier Erythrozyten in physiologischem Millieu bis zu 300 Angström (26). Die Entfernung der Glykokalix führt zu einer Senkung des Zetapotentials und die Erythrozyten können näher aneinanderrücken. Durch Entfernung des Erythrozyten-„Abstandhalters“ nimmt die Adhäsion der Zellen untereinander und an die Schläuche der Anlage zu.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Tatsache, dass die meisten Glykoproteine Träger von N-Acetyl-Neuraminsäure sind, welche den größten Teil der negativen Ladung der Zellmembran beiträgt. Die N-Acetyl-Neuraminsäure tragenden Glykoproteine ziehen Wasser an und sind der Hauptmechanismus für die Hydrierung der Membran roter Blutkörperchen. Werden Anteile der Glykoproteine entfernt, sind die roten Blutkörperchen gezwungen sich Wassermoleküle zu teilen und sich somit weiter anzunähern (37). Diese ungewünschten unspezifischen Wechselwirkungen konnten durch den Verdünnungsfaktor 1:20 sowie durch den Puffer-pH von 7,9 deutlich reduziert werden.

4.3.2.2 Das Antigen Rhesus D^{weak}

Im Vergleich zu normalen Rhesus positiven Erythrozyten werden in weniger als 1% der Fälle deutlich weniger Rh-D-Antigene auf den Zellen exprimiert (D^{weak}). Da diese Rh-D-Antigene alle Epitope aufweisen, besteht keine Immunisierungsgefahr gegenüber Erythrozyten mit normaler Ausprägung von Rh D. Es gibt daher keinen Grund, Personen mit D^{weak} als Rhesus negativ zu bezeichnen und gegebenenfalls mit Rh D negativem Blut zu transfundieren (11). Alle Träger des Rhesus D-Antigens sind grundsätzlich Rhesus positiv (2). Für die maschinelle Blutgruppenanalyse ist es daher von entscheidender Bedeutung, auch ein schwaches D als Rhesus positiv zu identifizieren. Dieser Anforderung wird mit einer Belegungsdichte von 26000 bis 28000 Zellen genüge getan. Wie bei der Analyse des normalen D musste bei der Erkennung eines schwachen D auf die IgM-Sandwich Methode zurückgegriffen werden. Wurde das zu analysierende Blut vorher mit Bromelin behandelt, konnte die Anzahl der auf dem Schwingquarz immobilisierten Erythrozyten um bis zu 60% erhöht werden.

4.3.2.3 Die Antigene Rhesus c, C, e, E

Bei „D-Negativität“ oder „schwachem D“ musste früher zusätzlich das C- und E-Antigen bestimmt werden. In der weißen Bevölkerung genügte es, die C+ D? E-, C-D?E+ und die C+D?E+ auf D zu prüfen, weil das „schwache D“ praktisch nur in Begleitung eines C- oder E-Antigens vorkommt. Rhesus negative (C-D-E-) Individuen mussten daher nicht auf D^w untersucht werden (49). Die Träger der Phänotypen Ccddee, ccddEe, CCddee und CcddEe wurden damals als Empfänger Rhesus negativ und als Spender Rhesus positiv bewertet. Die neuen Richtlinien

enthalten hier substantielle Änderungen, so gelten alle Menschen die das Antigen D nicht besitzen, sowohl als Empfänger als auch als Spender Rhesus negativ (2).

Die Bestimmung der Rhesus c-,C-,e- und E-Antigen ist weiterhin von großer Bedeutung. Anti-c ist nach Anti-D aus klinischer Sicht der wichtigste Rhesusantikörper. Anti-c ist relativ oft für verzögerte Transfusionsreaktionen verantwortlich. Nach Anti-D und Anti-A stellt Anti-c die häufigste Ursache für einen Morbus hämolyticus neonatorum dar (76). Die Zahl der Antigenstellen (Tab. 4-1) des Antigen c auf einem Erythrozyten liegt zwischen 37 000 und 85 000 (49). Wenn man nun die hohe antigene Potenz sowie die, verglichen mit dem D-Antigen, erhöhte Antigenichte des c-Antigen auf den Erythrozyten betrachtet, ist es erstaunlich, dass der Nachweis auf dem Schwingquarz erst nach Bromelinbehandlung des Blutes gelingt.

Es gilt hierbei zu beachten, dass einige Antigene auf enzymbehandelten roten Blutkörperchen nicht mehr nachweisbar sind. Die Behandlung mit Proteinase führt zum Beispiel zur zahlreichen Entfernung des Glykophorin A, dem Glykoprotein, welches die M- und N-Antigene trägt (37).

Untersucher Locus	Zelltypus	Anzahl der Antigenstellen
c	Cc	37 000 – 53 000
	Cc	70 000 – 85 000
e	Ee	13 400 – 14 500
	Ee	18 200 – 24 400
E	Ee	5 800 – 11 800
	EE	22 400 – 25 600

Tabelle 4-1

Zahl der Antigenstellen für die Rhesus Antigen c, e und E (49)

Trotz geringerer Antigenität und geringerer Antigenexprimierung lassen sich die C-, e- und E- Antigene besser als das c-Antigen nachweisen. Die Identifikation der Rhesus c-, C-, e- und E- Antigene auf Erythrozyten war jedoch ohne vorausgegangene Bromelinbehandlung der zu analysierenden Blutprobe nicht möglich.

4.3.3 Blutgruppenbestimmung im Kell Blutgruppensystem

Aufgrund vieler Transfusionen ohne Berücksichtigung anderer Antigene steigt die Häufigkeit des Auftretens anderer irregulärer Antikörper, wie z. B. Anti-K und Anti-Fy^a (48). Die genetischen Verhältnisse im Kellsystem sind ähnlich kompliziert wie im Rhesussystem. Dem Kellsystem liegt ein Genkomplex auf dem Chromosom 7 mit wenigstens drei Genloci zugrunde (51). Anti-K ist der häufigste irreguläre Antikörper gegen Erythrozyten außerhalb des Rhesussystems. Die Immunisierung von Frauen vor und im gebärfähigen Alter kann bei Geburt eines K positiven Kindes zu einem Morbus hämolyticus neonatorum führen, der jedoch meist einen milden Verlauf hat. Das c-Antigen ist im Vergleich stärker wirksam (49, 76).

Für den Nachweis des K-Antigens stand nur eine IgM-Antikörperlösung zur Verfügung. Die Blutgruppenanalyse wurde deshalb mit einer IgM-Sandwich Schicht durchgeführt. Das Schwingquarzsystem konnte im Kell-System eine doppelt so dichte Belegung erzielen als bei der Identifikation des Rhesus c Antigens.

4.3.4 Blutgruppenbestimmung im Duffy-Blutgruppensystem

Die Gene des Duffy-Systems sind wie die des Rhesussystems auf dem Chromosom 1 lokalisiert (26). Zwei kodominante Allele determinieren die beiden wichtigsten, zueinander antithetischen Antigene Fy^a und Fy^b. Strukturell handelt es sich um transmembrane Glykoproteine aus 278 Aminosäuren, wobei sich Fy^a und Fy^b lediglich durch einen Glycin-Asparaginsäure Austausch in Position 44 unterscheiden. Es finden sich circa 17 000 Fy^a- und Fy^b- Antigene pro Erythrozyt. Die Immunogenität von Fy^a ist deutlich höher als von Fy^b und liegt im Bereich der Rh-Antigene c und E (bei Transfusion ca. 1%). Die beiden Antigene sind sehr empfindlich gegenüber proteolytischen Enzymen (außer Trypsin) und zeigen besonders bei niedrigem pH Lagerungsstabilität (76). Neugeborenenerythroblastosen sind selten und nur bei durch Transfusion vorimmunisierten Müttern beschrieben (51).

Die Duffy-Diagnostik wird in der Routine nicht mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt, so dass für die Quarzbeschichtung nur ein Coombsreaktiv zur Verfügung stand. Eine Gold – Protein A – Duffy Coombsreaktiv Beschichtung war nicht in der Lage, Erythrozyten auf dem Schwingquarz zu immobilisieren. Im

Messprotokoll der Standardanalyse wurde die empfohlene Einwirkzeit von 30 Minuten der Reagenzienmischung auf die Erythrozyten nicht berücksichtigt (1). Da die Duffy Antigene, wie die Rhesusantigene transmembran lokalisiert sind, besteht auch hier wieder das Problem der Zugänglichkeit der immobilisierten Antikörpern zum Antigen. Mit den zur Verfügung stehenden funktionalen Antikörpern ist eine Sandwich-Beschichtung zur Blutgruppenanalyse im Duffy nicht effektiv.

Es wurde deshalb versucht, die Herstellervorgaben so weit wie möglich auf das Schwingquarzsystem zu übertragen. Nachdem die Erythrozyten 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend gewaschen wurden, gelang es mit einer Anti-Human-IgG Antikörperschicht, die Erythrozyten auf die Quarzoberfläche anzukoppeln. Die 3 Stopps von 60 Sekunden während des Durchlaufs der Erythrozyten durch die Zelle erwiesen sich als ausreichend, um eine Quarzbelegung von etwa 10 000 Erythrozyten auf dem Schwingquarz zu erhalten. Die aus der Erythrozytenmembran herausragenden F_c-Anteile der Anti-Duffy-Antikörper sind für die auf der Quarzoberfläche immobilisierten sehr gut zugänglich. Verglichen mit dem im Röhrchen durchgeführten Coombstests, hat die Analyse mit dem Schwingquarz den Vorteil, dass durch die festphasengebundenen Antikörpern ein Prozonephänomen, was durch einen Überschuss von Anti-IgG-Antikörpern bedingt ist, nicht auftritt (26).

4.4 Detektion von Anti-Rhesus D beladenen Erythrozyten

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. 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 (37). 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 (37, 51, 59).

Der Nachweis antikörperbeladener Erythrozyten stellt einen klinisch wichtigen Test in der serologischen Diagnostik dar, z. B. zum Nachweis eines Transfusionszwischenfalls oder eines Morbus hämolyticus neonatorum. Auch das Auftreten vieler weiterer irregulärer Antikörper muss durch solche Tests nachgewiesen werden. Es existieren verschiedene Techniken zum Nachweis der schon beladenen roten Blutkörperchen oder der sich im Plasma befindlichen Antikörper. Im Quarzsystem wurde ein modifizierter direkter Coombstest durchgeführt, bei dem bereits an Erythrozyten gebundene Antikörper nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden Erythrozyten der Blutgruppe 0, Rhesus positiv detektiert, die mit monoklonalen Antikörpern bzw. mit immunisiertem Serum inkubiert wurden. Der Nachweis der inkubierten roten Blutkörperchen wurde über eine Anti-IgG-Immunglobulin-Schicht getestet.

Ein Vorteil der hier getesteten Technik gegenüber herkömmlichen serologischen Methoden, wie z. B. dem direkten Coombstest im Röhrchen, war die Vermeidung des sogenannten Prozonophänomens (25, 33). Beim direkten Coombstest im Röhrchen werden zu den mit Antikörpern belegten Erythrozyten Anti-IgG-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 für die Schwingquarzmethode kein Problem dar.

4.4.1 Antikörper aus immunisiertem Serum

Die Detektion Rhesusantikörperbeladener Erythrozyten stellt die Quarzbeschichtung und die Technik des Dummy-Systems vor neue Herausforderungen, da die Analyse der Blutproben der mit immunisiertem Serum inkubierten Erythrozyten teilweise zur Bildung kleinerer Agglutinationen führte, die jedoch nicht vollständig auf dem Quarz immobilisiert werden konnten. Verantwortlich für die Agglutinationen ist die Anti-D IgM-Fraktion des immunisierten Serums. Vor der Messung wurden die Proben nochmals im Vortex aufgeschüttelt. Es zeigte sich, dass es durch die Agglutinate nicht zu Verlegungen im Flusssystem kam. Die Auswertung der Messungen stellten

sich jedoch als Problem dar, da mikroskopisch eine Ablösung von der Quarzoberfläche zu erkennen war. Neben den in Ablösung befindlichen Agglutinaten konnten auch singuläre Erythrozyten fest auf der Oberfläche gebunden werden. Die Verteilung der in Ablösung befindlichen Agglutinate war zudem ungeordnet. Die Auswertung der Belegungsdichte wurde in diesem Fall nicht anhand der vorbeschriebenen quadranten vorgenommen, sondern die Quarzoberfläche als Ganzes bewertet. Die Versuche im Dummy-System stellen eine Basis für die spätere Messung im „schwingenden“ System dar. Dort muss gezeigt werden, ob die Anzahl der gebundenen Erythrozyten für eine Signaländerung ausreicht bzw. ob die lockeren Agglutinate eine Änderung des Frequenzverhaltens über die Effekte der Viskositätsveränderung von Puffer zu Blut hinaus bewirken können.

4.4.2 Monoklonale Antikörper der Klasse IgG

Das unter 4.4.1 beschriebene Problem der Agglutination manifestierte sich bei Verwendung monoklonaler IgG-Antikörper nicht. Die Anti-Rh-D-IgG des Rhesusblutgruppensystems verursachen alleine noch keine Agglutination. Eine Auswertung der Belegung in Zellen / mm² war möglich. Eine nachträgliche Ablösung der Erythrozyten von der Quarzoberfläche fand nicht statt. Nur ein kleiner Teil der IgG Fraktion des Serumpools sind Anti-D Immunglobuline. Es werden während der Inkubation wahrscheinlich nicht alle Antigenstellen der Erythrozytenmembran besetzt, was die Ankopplung auf der Quarzoberfläche erschwert. Bei der Inkubation mit monoklonaler Anti-D Lösung ist von einer Sättigung der Antigenstellen auszugehen.

Beim Versuch des direkten Rhesus Nachweises mittels einer Anti-D-IgG-Sandwichschicht gelang es nicht, die Erythrozyten auf der Quarzoberfläche zu immobilisieren (s.o. 4.3.2.1.). Die freie Beweglichkeit der Rhesusantikörper, sowie die Inkubationszeit von 60 min, erleichtern den Zugang der F_{ab}-Anteile der Antikörper zum Antigen in der Erythrozytenmembran. Die F_c-Anteile der an die Rhesus Antigene gebundenen Immunglobuline ragen nun bis zu 8,5 nm aus der Membran heraus und sind dadurch den festphasengebundenen Antikörpern auf der Schwingquarzoberfläche als antigene Struktur leichter zugänglich. Die festphasengebundenen Anti-Human-IgG-Antikörper müssen dadurch eine geringere Distanz von jedoch immer noch mindestens 4 nm überbrücken. Im Ergebnis zeigt

sich hier noch einmal der Vorteil einer vorausgehenden Enzymbehandlung der Erythrozyten mit Bromelin.

Eine ähnlich dichte Belegung des Quarzes wie sie bei Rhesusbestimmung mit einer IgM-Sandwich-Beschichtung erzielt wird, kann mit dieser Technik nicht erreicht werden. Die Masse eines IgG liegt bei 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, so wird deutlich, dass es für das Anti-IgG 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-IgG und dem Rhesusantikörper zustande kommen kann, aber dass diese durch die Masse des Erythrozyten und durch die turbulenten Flussverhältnisse in der Zelle wieder auseinander gerissen werden. Die Kontaktzeit kann unter diesen schwierigen Bedingungen zu kurz sein. Gerade aber die schnelle Analyse ist eine der großen Vorteile des hier zu etablierenden neuen Analysesystems.

4.5 Wiederverwertbarkeit von Schwingquarzen

Die Regeneration und Wiederverwertung des Quarzes spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich der Schnelligkeit und Wirtschaftlichkeit der Messung. Die sensible Oberfläche sollte sich einfach, schnell und ohne dabei in ihrer Integrität beschädigt zu werden regenerieren lassen. Es wurden zwei Methoden zur Regeneration verglichen und hinsichtlich ihrer Eignung beurteilt.

4.5.1 Regeneration mit Natronlauge

NaOH in 0,1 molarer Lösung spaltet als basisches Reagenz die Bindung zwischen Protein A und dem gebundenen Immunglobulin (*Abb. 4-5*). 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.

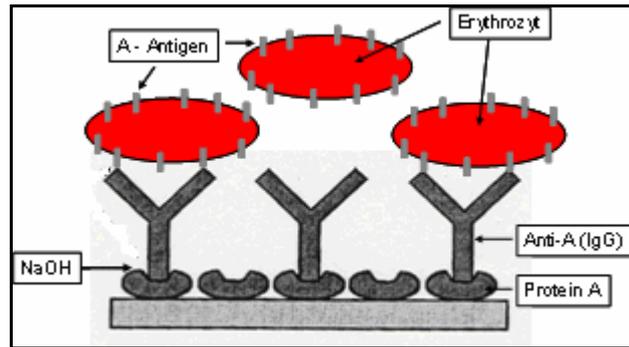


Abbildung 4-5

Regeneration der sensitiven Beschichtung nach Detektion der Blutgruppe A
schematische Darstellung, nicht maßstabsgetreu(16)

Die Verwendung von NaOH zur Regeneration zeigte dieselben Ergebnisse, wie in den vorangegangenen Arbeiten (17, 29). Eine Verwendung von 0,1 molarer Lösung erbrachte eine vollständige Entfernung von gebundenen Erythrozyten. Eine sofortige Blutgruppenbestimmung war nicht möglich, da erst die Blutgruppenantikörperschicht ersetzt werden musste. Insgesamt ließ sich dieser Vorgang fünfmal wiederholen, bis die Dichte der gebundenen Erythrozyten geringer wurde. 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 Bindung zwischen Protein A und dem Anti-A. In früheren Arbeiten konnte festgestellt werden, dass auch etwa 25 % des gebundenen Protein A pro Regeneration mitabgelöst wird (43). 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 Differenz in der Dichte der detektierten Erythrozyten zu erkennen ist.

4.5.2 Regeneration 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 eine erneute Blutgruppenbestimmung möglich.

4.6 Blutgruppennachweis in der Fließinjektionsanlage

Die im Dummy getesteten und als zuverlässig beurteilten biologischen Schichtsysteme wurden in einem weiteren Schritt in der Fließinjektionsanlage getestet. Die Ergebnisse sollten nun in ein technisches Signal umgewandelt werden.

Bei den verwendeten Schwingquarzen wird im Inneren des piezoelektrischen Kristalls eine elastische Volumenwelle (BAW = Bulk Acoustic Wave) angeregt. Dadurch bilden sich horizontal polarisierte Scherwellen an den beiden Quarzoberflächen aus, die mit dem anliegenden Medium in Wechselwirkung treten. Schwingquarze werden deshalb auch als Scherschwinger oder auch aufgrund ihrer sensorischen Eigenschaften als Quarzmikrowaage (QCM = Quartz Crystal Microbalance) bezeichnet. Die transversale Natur der Wellen an der Quarzoberfläche erlaubt einen Einsatz der Schwingquarze in Flüssigphase (29).

Schwingquarze sind sowohl für den Betrieb in Gasphase als auch in Flüssigphase geeignet. Die Einsatzgebiete für Schwingquarze als Immunosensoren sind dementsprechend vielfältig (46).

Der Detektionsbereich erstreckt sich vom Nachweis sehr geringer Massen, die sich durch Bindung von sehr kleinen Molekülen ergeben, bis hin zu sehr großen Massen, die sich durch Bindung von Biomakromolekülen oder durch Zellen ergeben. Die Sensitivitätsgrenze liegt bei einigen $\mu\text{g/ml}$ (15, 36, 65).

Bei allen akustischen Sensorelementen können durch spezielle elektronische Aufbauten die Frequenzverschiebung und die Energiedissipation gemessen werden. Zusätzlich sind mit Schwingquarzen aufgrund ihrer Elektrodenanordnung gleichzeitig zu den akustischen Messungen auch elektrochemische Messungen möglich (6, 46, 79).

4.6.1 Blutgruppenanalyse mit QCM im AB0 System

Der Nachweis der Blutgruppe A wurde mit einem Anti-A BS 66 beschichteten Schwingquarz durchgeführt. Die Negativprobe ergibt keine wesentliche Signaländerung. Die Injektion der Analytlösung mit der Blutgruppe A lässt die Frequenz in kurzer Zeit um 2500 Hertz abfallen. Es braucht nur geringe Zeit um die Blutgruppen 0 und A sicher voneinander unterscheiden zu können.

Die Erythrozytenankopplung lässt sich wie folgt charakterisieren:

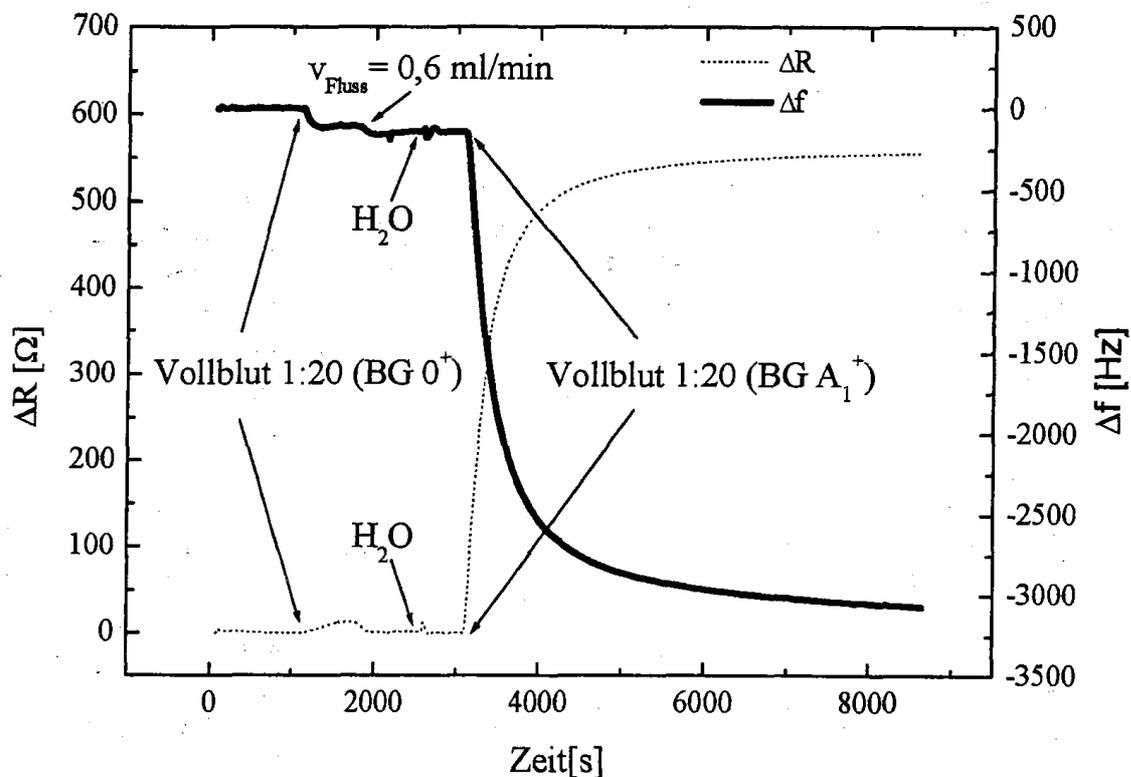


Abbildung 4-6

Frequenz- und Widerstandsänderung bei Bestimmung der Blutgruppe A

Abbildung 4-6 zeigt die aus dem Impedanzspektrum gewonnene Frequenz- und Widerstandsänderung für die Bestimmung der Blutgruppe A. Der Nullpunkt der Frequenz- und Wirkwiderstandskurve bezieht sich auf die Resonanzfrequenz eines mit dem Trägermedium Tris/EDTA Puffer benetzten Schwingquarzes. Die Negativprobe führte zu einer resultierenden Frequenzänderung von 110 Hz und zu einer resultierenden Widerstandsänderung von 10 Ω . Die resultierende

Frequenzänderung stieg durch Spülen der Messkammer mit bidestilliertem Wasser geringradig auf einen Wert von 140 Hz an, während die Widerstandsänderung wieder auf 0 Ω absank. Nach Injektion der Positivprobe kam es zu einer resultierenden Frequenz- und Wirkwiderstandsänderung von 2930 Hz beziehungsweise 555 Ω .

Da bei der Aufgabe der Negativprobe der resultierende Wirkwiderstand nach dem Spülen wieder den Ausgangswert 0 Ω erreicht, obwohl die resultierende Frequenzänderung erhalten bleibt, kann die Anlagerung als reine Massenlagerung betrachtet werden. Der kurzfristige Anstieg des Wirkwiderstandes auf 10 Ω ist demnach auf die unterschiedliche Dichte und Viskosität von Vollblut zurückzuführen. Im Vergleich zur spezifischen Vollblutprobe, kann es sich bei der resultierenden Frequenzänderung von 140 Hz nur um eine unspezifische Anlagerung von Plasmaproteinen handeln, da der Frequenzabfall auch nach dem Entfernen aller Erythrozyten durch Spülen noch vorherrscht, und bei einer spezifischen Bindung der Erythrozyten der Wirkwiderstand deutlich ansteigt. Der starke Anstieg der Wirkwiderstandsänderung im Fall der spezifischen Bindung macht deutlich, dass es sich nicht um eine reine Massenbelegung, sondern um ein viskoelastisches Schichtsystem handelt (29).

4.6.2 Blutgruppenanalyse mit QCM Sensor im Rhesus-System

Aufgrund des besseren Ergebnis beim Vergleich des Anbindungsverhalten der Rhesus Antikörper wurde für den maschinelle Blutgruppenanalyse eine Rum_1 antikörperbeschichtung gewählt. Die resultierende Frequenzänderung der Negativprobe betrug 5 Hz. Zu einer deutlich höheren Frequenzänderung von 130 Hz führte die Positivprobe der Blutgruppe A, Rh+ mit einer Konzentration $5,7 \cdot 10^5$ Zellen/ μl . In beiden Fällen betrug die Strömungsgeschwindigkeit 0,1 ml/min.

Bei der Bestimmung des Rhesusfaktors sind die Frequenzänderungen im Vergleich zur Bestimmung der Blutgruppe A deutlich geringer. Dies liegt mit größter Wahrscheinlichkeit daran, dass der Realteil des komplexen Schermoduls im Fall des Doppelschichtsystems kleiner ist und die Entfernung zwischen Schwingquarzoberfläche und angekoppeltem Erythrozyt größer (29).

5 Zusammenfassung

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

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Testung biologischer Schichtarchitekturen auf Protein A / Antikörper Basis zum Nachweis transfusionsmedizinisch äusserst relevanter Blutgruppensysteme. Weiter wurde die Möglichkeit der Regeneration und Wiederverwertung der Schwingquarze eruiert.

Die Versuche wurden in einem der Fließinjektionsanlage nachkonstruierten, mechanischen Dummysystem durchgeführt. Als Trägersubstanz wurde eine selbsthergestellte EDTA-Tris-Tween Pufferlösung verwendet. Dadurch wird sichergestellt, dass der pH-Wert des Analysats in einem Bereich liegt, bei dem eine maximale spezifische Erythrozytenbindung möglich ist. EDTA reduziert die Gerinnungsfähigkeit des Blutes und die Aktivität des Komplementsystems. Die Messungen mit den unterschiedlichen Quarzbeschichtungen fanden bei Raumtemperatur statt. Die Auswertung der Ergebnisse über eine optische Vermessung der spezifisch gebundenen Erythrozyten stellt ein elegantes Verfahren dar, das eine zuverlässige Sensitivität aufweist. Die im Dummysystem gewonnenen Ergebnisse bestätigten die Eignung dieser Technik zur Blutgruppenanalyse und wurden im letzten Abschnitt dieser Arbeit am Beispiel des AB0- und Rhesus-Blutgruppensystems auf die schwingende Anlage übertragen.

Bei keinem der in dieser Arbeit analysierten Blutgruppensysteme wurde ein falsch positives Ergebnis festgestellt. Eine hohe Sensitivität dieser Methode konnte im AB0-Blutgruppensystem gezeigt werden.

Aufgrund der sterischen Verhältnisse ist zum Nachweis des Rhesusantigens eine Sandwich-Beschichtung notwendig. Eine sehr gute Ankopplung ließ sich mit der IgM-Sandwich-Beschichtung erzielen. Eine lückenlose Belegung des Quarzes war jedoch erst bei enzymatischer Vorbehandlung der Blutproben zu erzielen. In der technischen Analyse konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die Messung mit unbehandeltem Vollblut zu einer signifikantem Signaländerung führt. Die Rhesus Identifizierung bei Erythrozyten mit einem schwachen D Antigen (Rhesus D^{weak}) gelang zuverlässig

mittels IgM-Sandwich-Beschichtung. Ebenso gelang der Nachweis des Rhesus c-, C- und E- Antigens. Der Nachweis des Rhesus e Antigens war nur durch vorherige Enzymbehandlung der Erythrozyten möglich.

Aus Praktikabilitäts- und Kostengründen wurden zur Analyse im Kell-Blutgruppensystem die in der Routinediagnostik verwendeten IgM-Antikörper für eine IGM-Sandwich herangezogen. Das Ergebnis der Belegungsdichte ist mit dem der Rhesus-Messungen vergleichbar.

Durch Abweichung vom Standardmessprotokoll gelang auch der Nachweis und Identifizierung des Duffy Antigens. Erfolg versprechend erscheint hier die Verwendung monoklonaler IgM-Antikörper, die derzeit jedoch nicht kommerziell zur Verfügung stehen.

Mit der derzeitigen Beschichtungstechnik stößt das System beim Nachweis beladener Erythrozyten an seine Grenzen. Hier wurden die Erythrozyten nicht rein singular, sondern auch in Form von Agglutinaten immobilisiert. Die Stabilität der angekoppelten Agglutinate könnte durch Zugabe von LISS-Lösung bzw. humanem Albumin erhöht werden (17).

Eine direkte Wiederverwertung gebrauchter Quarze durch eine chemische Behandlung ist derzeit nicht möglich. Erfolgversprechender sind erste Ansätze zur physikalischen Regeneration (17).

Die biosensorische Blutgruppenanalyse mit Schwingquarzen ist ein zuverlässiges Verfahren, das keine optische Auswertung von Agglutinationen erfordert. Versuche mit der Fließinjektionsanlage zum Nachweis antikörperbeladener Erythrozyten, z.B. nach einem Transfusionszwischenfall, stehen noch aus. Das Dummy-System hat hier bereits optisch die prinzipielle Eignung von Schwingquarzen zur Durchführung eines variierten Coombs-Tests aufgezeigt. Die Bandbreite dieser neuen Technologie ist sehr weit. So konnte beispielsweise die Separierung von Thrombozyten aus einer Vollblutprobe mit auf Protein A gebundenen glykoprotein-IIb/IIIa-Antikörpern mit dieser Technik im Dummy gezeigt werden. Die parallele optische Auswertung wird zunächst ihre wichtige Rolle als Vergleichskriterium bei der Weiterentwicklung dieser Technologie beibehalten.

6 Anhang

6.1 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 3–1:	Anbindung von Erythrozyten auf verschiedenen Schichsystemen_____	39
Tabelle 3–2:	Detektion des schwachen D Antigens_____	40
Tabelle 3–3:	Anbindung der Rhesusantigene in Vollblut_____	42
Tabelle 3–4:	Anbindung der Rhesusantigene in bromelierter Erythrozytensuspension_____	43
Tabelle 3–5:	Detektion von in Serum inkubierten Erythrozyten_____	47
Tabelle 3–6:	Detektion von in monoklonaler Antikörperlösung inkubierten Erythrozyten_____	48
Tabelle 4–1:	Anzahl der Rh-antigenstellen_____	61

6.2 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1–1:	QCM-Sensor_____	6
Abbildung 1–2:	Beschichtungsschema_____	7
Abbildung 1–3:	vollautomatisiertes Blutgruppenanalysegerät_____	8
Abbildung 1–4:	Dummy-System_____	9
Abbildung 1–5:	Auflichtmikroskop_____	10
Abbildung 2–1:	Auswertung Cell–Dyn–Blutbildanalysator_____	21
Abbildung 2–2:	Erythrozyten auf Quarz_____	32
Abbildung 2–3:	Auswertungssoftware_____	32
Abbildung 3–1:	Detektion der Blutgruppe A mit IgG-Monolayer_____	36
Abbildung 3–2:	Schematische Darstellung verschiedener Beschichtungstechniken_____	37
Abbildung 3–3:	Detektion des Rhesus D Antigens mit IgM-Sandwich_____	38
Abbildung 3–4:	Detektion enzymbehandelter Erythrozyten über IgM–Sandwich_____	39
Abbildung 3–5:	Anbindungsvermögen verschiedener Schichtsysteme_____	39
Abbildung 3–6:	Detektion von D ^{weak} _____	40
Abbildung 3–7:	Rh c Nachweis aus Vollblut_____	42
Abbildung 3–8:	Rh-c Nachweis aus bromelierter Erythrozytensuspension_____	43

Abbildung 3–9:	Anbindungsvermögen bei verschiedenen Rh Beschichtungen	43
Abbildung 3–10:	Nachweis von Kell (K)	44
Abbildung 3–11:	Nachweis von Duffy a (Fy ^a)	45
Abbildung 3–12:	Auf Quarz treibende Agglutinate	49
Abbildung 3–13:	Nachweis der Blutgruppe A in der FIA	50
Abbildung 3–14:	Nachweis des Rhesus Antigens in der FIA	51
Abbildung 4–1:	Nachweis von Antikörpern auf einem QCM-Sensor	53
Abbildung 4–2:	„D“ und „H“ Antigene	56
Abbildung 4–3:	Rhesustransmembranprotein	57
Abbildung 4–4:	Flexibilität von Immunglobulinen	58
Abbildung 4–5:	Regeneration mit NaOH	67
Abbildung 4–6:	Frequenz- und Widerstandsänderung in der FIA	69

6.3 Verzeichnis der Abkürzungen

∅	nichts
+/-	Standardabweichung
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bidest.	bidestilatatum
EDTA	<u>E</u> thylendinitriol <u>t</u> etraessigsäure
FIA	<u>F</u> lie <u>ß</u> injektions <u>a</u> n <u>l</u> age
Ig	Immunglobulin
MHC	<i>englisch:</i> <u>M</u> ajor <u>H</u> istocaompatibility <u>C</u> omplex
MHz	Megahertz

mm ²	Quadratmillimeter
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
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U / min	Umdrehungen pro Minuten
µm	Mikrometer
ZKT	Zentrum für klinische Transfusionsmedizin

7 Literaturverzeichnis

1. Product specifications: Anti-Fya Coombs-reaktiv polyklonal, human (2003); SERAC, Serologische Reagenzien.
2. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten. In *Deutscher Ärzte Verlag*
3. 2006. schematische Zeichnung, variiert nach Thomas L.
4. Abad J PF, 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: 183-9
5. Aizawa M, Kato S, Suzuki S. 1980. Electrochemical typing of blood using affinity membranes. *J Membr Sci* 7: 1-10
6. Bailey L KD, 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
7. Ballantine D WR, Martin S. 1997. Acoustic Wave Sensors. *Academic Press, San Diego*
8. Bender K. 1987. Das HLA-System. *Biotest Mitteilungen Sonderheft 3*
9. Bernstein F. 1925. Zusammenfassende Betrachtung über die erblichen Blutstrukturen des Menschen. *Z indukt Abstamm u Verb Lehre* 37: 237
10. Bjorck J KG. 1984. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*: 969-78
11. Boyle M RG. 1987. Bacterial Fc Receptors. *Biotechnology*: 697-703
12. Cammann K. 2001. *Instrumentelle analytische Chemie*. Berlin
13. Cans AS, Hook F, Shupliakov O, Ewing AG, Eriksson PS, et al. 2001. Measurement of the dynamics of exocytosis and vesicle retrieval at cell populations using a quartz crystal microbalance. *Anal Chem* 73: 5805-11
14. Caruso F RE, Furlong D. 1996. Orientational Aspects of Antibody Immobilization and immunological Activity on Quartz Crystal Micro Balance Electrodes. *J Coll Interfac Sci*: 104-15
15. Chang H-C YC-C, Yeh T-M 1997. Detection of lipopolysaccharide binding peptides by the use of a lipopolysaccharide-coated piezoelectric crystal biosensor. *Analytica Chimica Acta* 340: 49-54
16. Claussen J. 2006. Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren. *Dissertation, Universität Tübingen*
17. Cluss S. 2006. Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen von Schwingquarzen zur Messung einer blutgruppenspezifischen Ankopplung von Erythrozyten. *Dissertation, Universität Tübingen*
18. Compton BJ, Lewis MA, Whigham F, Gerald JS, Countryman GE. 1989. Analytical potential of protein A for affinity chromatography of polyclonal and monoclonal antibodies. *Anal Chem* 61: 1314-7
19. 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: 833-7
20. Dahr W. 1986. Immunochemistry of sialoglycoproteins in human red blood cell membranes. In *Recent Advances in Blood Group*

- Biochemistry*, ed. JWW Vengelen-Tyler V, pp. 23-65. Arlington: Am Assoc Blood Banks
21. Davis KA, Leary TR. 1989. Continuous liquid-phase piezoelectric biosensor for kinetic immunoassays. *Anal Chem* 61: 1227-30
 22. Delamarche E SG, Biebuyck G, Michel B, Gerber C. 1996. Immobilization of Antibodies on a Photoactive Self-Assembled Monolayer on Gold. *Langmuir* 12: 1997-2006
 23. Duhamel RC, Schur PH, Brendel K, Meezan E. 1979. pH gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose. *J Immunol Methods* 31: 211-7
 24. Dultsev F. 2000. Hearing Bond Breakage: Measurement of Bond Ruturte Forces using a Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir*: 5036-40
 25. Dunsford I GJ. 1959. *The Anti-Globulin Test*. Edinburgh: Oliver and Boyd Ltd.
 26. Eckstein R, Strohscheer I, Beyer J, Lenz K, Wittmann G, et al. 1992. Attempts in developing a standardized test system of immunologic reactivity. *Beitr Infusionsther* 30: 332-7
 27. 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: 429-36
 28. Fredriksson R, Kihlman S, Rodahl M, Kasemo B. 1992. The piezoelectric quartz crystal mass and dissipation sensor: a means of studying cell adhesion. *Langmuir* 14: 248-51
 29. Gehring FK. 2005. Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten. *Dissertation, Universität Tübingen*
 30. Godfrey MAJ. 1997. Affinity separations: a practical approach. ed. Matejtschuk P., pp. 141-96: IRL Press at Oxford University
 31. Grate J, Frye G. 1992. *Acoustic wave sensors, update*. Weinheim
 32. Grate J, Martin S, White R. 1993. Acoustic wave microsensors: part I. *Anal Chem* 65: 940-5
 33. Hahn D. FD, Kaufmann S., Ullmann U.,. 2001. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Heidelberg: Springer Verlag
 34. Harlow E, Lane D, . 1988. *Antibodies - A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory
 35. Horisberger M, Clerk M. 1985. Labelling of colloidal gold with Protein A: a quantitative study. *Histochem* 82: 219-23
 36. Imai S, Mizuno H, Suzuki M, Takeuchi T. 1994. Total urinary protein sensor based on piezoelectric quartz crystal. *Anal Chem Acta* 292: 65-70
 37. Issit P., Anzee D. 1998. *Applied Blood Group Serology*. Durham: Montgomery Scientific Publications
 38. Kaspar M, Stadler H, Weiss T, Ziegler C. 2000. Mass-sensitive devices in bioanalysis. *Fres J Anal Chem* 366: 602-10
 39. King H. W. 1964. Piezoelectric sorption detector. *Anal Chem* 36: 1735-9
 40. King H. W. 1969. Relative oxygen absorption and volatility properties of asphalt using the quartz crystal microbalance *Anal Chem* 41: 580-3
 41. König G, Grätzel M. 1993. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of human erythrocytes. *Anal Chim Acta* 276: 329-33
 42. König G, Grätzel M. 1994. Long-term stability and improved reusability of a piezoelectric immunosensor for human erythrocytes. *Anal Chim Acta* 230: 37-41

43. Krapf R. 2001. Blutanalytik und Biosensorik. *Dissertation, Universität Tübingen*
44. Landsteiner K. 1900. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkung des Blutserums und der Lymphe. *Zbl Bakt* 27: 257
45. Landsteiner K. 2001. [Agglutination phenomena of normal human blood]. *Wien Klin Wochenschr* 113: 768-9
46. Marx KA. 2003. Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules* 4: 1099-120
47. 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: 291-8
48. Mempel W, Leeping M, Bock M, Pachmann U, Wagner M, Heim MU. 1988. Blood group determination with a new test system (Erytype-Microtest plates). *Beitr Infusionsther* 21: 265-6
49. Metaxas-Bühler M. 1994. *Blutgruppen und Transfusion*. Bern: Verlag Hans Huber
50. Moks T, Abrahmsen L, Nilsson B, Hellman U, Sjoquist J, Uhlen M. 1986. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem* 156: 637-43
51. Mollison P, Engelfriet C, Contreras M. 1998. *Blood Transfusion in clinical Medicine*. Oxford Blackwell Science Ltd
52. Muramatsu H, Dicks JM, Tamiya E, Karube I. 1987. Piezoelectric crystal biosensor modified with protein A for determination of immunoglobulins. *Anal Chem* 59: 2760-3
53. 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* amoebocyte lysate. *Anal Chim Acta* 215: 91-8
54. 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: 23-9
55. Neubig B, Briese W. 1997. *Das große Quarzkochbuch*. Poing: Franzis Verlag, Poing
56. Nivens D, Chambers J, Anderson T, White D. 1993. Long-term, on-line monitoring of microbial biofilms using a quartz crystal microbalance. *Anal Chem* 65: 65-9
57. O'Sullivan C, Gibault G. 1999. Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications. *Biosens Bioelectron* 14: 663-70
58. Price CP, Newman DJ. 1997. *Principles and Practice of Immunoassay*. London Macmillan Reference Ltd
59. Prokop O, Göhler W. 1986 *Die menschlichen Blutgruppen*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
60. Redepenning J, Schlesinger TK, Mechalke EJ, Puleo DA, Bizios R. 1993. Osteoblast attachment monitored with a quartz crystal microbalance. *Anal Chem* 65: 3378-81
61. Richman DD, Cleveland PH, Oxman MN, Johnson KM. 1982. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. *J Immunol* 128: 2300-5

62. Rickert J, Hayward G, Cavic B, Thopson M, Göpel W. 1999. *Biosensor based on acoustic wave devices*. Weinheim: Wiley VCH, Weinheim
63. Roederer J, Bastiaans G. 1983. Microgravimetric Immunoassay with piezoelectric crystals. *Anal Chem* 55: 2333-6
64. Rump G, Braun R, Jahn U. 2003. *Transfusionsmedizin kompakt*.
65. Sakti SP, Lucklum R, Hauptmann P, Buhling F, Ansorge S. 2001. Disposable TSM-biosensor based on viscosity changes of the contacting medium. *Biosens Bioelectron* 16: 1101-8
66. Saphire EO, Parren P. 2001. Listening for viral infection. *Nature Biotechnol* 19: 823-4
67. Scheller F, Schmid R. 1992. *Biosensors: Fundamentals, Technologies and Applications*. Weinheim: VHC
68. Scheller F, Schubert F. 1997. *Frontiers in Biosensoric III*. Berlin: Birkhäuser Verlag
69. Schenkel-Brunner H. 1995. *Human Blood Groups*. Wien: Springer Verlag
70. Schumacher R. 1999. Die Schwingquarzmethode - ein sensibles Messprinzip mit breitem Anwendungsspektrum. *Chemie in unserer Zeit* 33: 268-78
71. Sjødahl J. 1976. Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*: three highly homologous Fc-binding regions. *FEBS Lett* 67: 62-7
72. Sjöquist J, Meloun B, Hjelm H. 1972. Protein A isolated from *staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin. *Eur J Biochem* 29: 572-8
73. Strengers P., van Aken W. 1996. *Blut-von der Magie zur Wissenschaft*. Heidelberg: Spektrum Verlag
74. Strohm PL, Busch S. 1969. Comparison of effectiveness of various proteolytic enzymes in blood-group antibody detection. *Transfusion* 9: 93-7
75. Stryer L. 1996. Erworbene Veränderungen der AB0-Merkmale. *Infus Ther Transfus Med* 27: 80-9
76. Thomas L. 2005. *Labor und Diagnose*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft
77. Thompson M, Arthur CL, Dhaliwal GK. 1986. Liquid-phase piezoelectric and acoustic transmission studies of interfacial immunochemistry. *Anal Chem* 58: 1206-9
78. Uttenthaler E, Kosslinger C, Drost S. 1998. Characterization of immobilization methods for African swine fever virus protein and antibodies with a piezoelectric immunosensor. *Biosens Bioelectron* 13: 1279-86
79. Wang J, Jiang M, Lu F. 1998. Electrochemical Quartz Microbalance Investigation of Surface Fouling due to Phenol Oxidation. *Electroanal. Chem.* 444: 127-33
80. Weisch W, Klein C, von Schickfus M, Hunklinger S. 1996. Development of a surface acoustic wave immunosensor. *Anal Chem* 68: 2000-4

8 Danksagung

An der Entstehung dieser Arbeit waren viele Menschen beteiligt, ihnen allen möchte ich herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Hinnak Northoff für die Annahme als Doktorand, die Überlassung des Themas, für seine intensive Betreuung sowie das Anleiten und Motivieren zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Meinen Betreuern Dr. Frank Gehring, Dr. Jan Claussen und Dipl.-Phys. 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 Dr. Sven Cluss für die gute und beispielhafte Kollegialität, Unterstützung und Zusammenarbeit, die ermutigenden Diskussionen und die gegenseitige Motivation.

Frau Melanie Jesse, Forschungs-MTA am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET), für ihre Hilfe bei der Ausrüstung unseres Labors, ihre Bemühungen und Geduld auch das Unmöglichste zu besorgen.

Allen Med.-Tech.-Lab.-Assistentinnen des IKET, die uns stets helfend und freundlich zur Seite standen, wenn Referenztests oder Blutpräparationen anstanden.

Dipl.-Ing. Stefan Albrecht und Evelyn Gärtner-Albrecht für das sorgfältige Korrekturlesen, den interdisziplinären wissenschaftlichen Austausch und alle anderen Gespräche.

Meinen Eltern dafür, dass sie mir den Weg bereitet haben und immer für mich da sind.

Meinem Kommilitonen Ilias Tsiflikas der mich von Beginn an zielsicher durch unser Studium geleitete und damit einen nicht unwesentlichen Teil zu meiner Promotion beigetragen hat.

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

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Döring
 Vornamen: Jörg Steffen
 Geburtsdatum: 03/03/1977
 Geburtsort: Sigmaringen

Schulbildung

08/1984 bis 07/1988 Bilharz-Schule Sigmaringen
 08/1988 bis 06/1997 Hochschulreife am Hohenzollerngymnasium Sigmaringen

Bundeswehr

01/09/1997 bis 30/06/1998 Wehrdienst beim Sanitätsregiment 10 in Horb a.N.
 01/08/2000 bis 26/08/2000 Wehrübung mit Lehrgang zum Unteroffizier d. Res.

Studium

01/10/1998 bis 31/03/1999 Politikstudium an der Universität Konstanz
 06/03/2000 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
 26/03/2002 Ärztliche Vorprüfung
 25/03/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 30/03/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 21/11/2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

10/2005 bis 09/2006 Universitätsklinikum Tübingen, Radiologie
 Kreiskrankenhaus Sigmaringen, Innere Medizin
 Kreiskrankenhaus Sigmaringen, Chirurgie

Beruflicher Werdegang

01/06/2005 bis 30/09/2005 Unterassistent in der Abteilung für Allgemeinchirurgie am National Referral Hospital, Honiara, Solomon Islands
 Seit 01/12/2006 Assistenzarzt in der Abteilung für Radiologische Diagnostik am Universitätsklinikum Tübingen