

Immunhämatologische Diagnostik bei einer Patientin mit bekannten multiplen Alloantikörpern

Anhang – Methoden

Serologische Antigen- und Antikörperbestimmungen wurden stets als Agglutinationstest durchgeführt. Standardmäßig wurden hierfür Reagenzien und Gerätschaften der Fa. Ortho Diagnostics (Biovue-Technik; VisionMax) verwendet. Für die Antikörpersuchteste und -differenzierung wurden hierbei unbehandelte Testzellen im Antihumanglobulinansatz (AHG) und mit Ficin vorbehandelte Testzellen im Neutralansatz (NaCl, 37 °C) verwendet. Zusätzliche manuelle Ansätze erfolgten mit Reagenzien und Produkten aus dem ID-System der Fa. BioRad. Hiermit wurden Antikörpersuchteste und -identifizierungen in Gelkartentechnik im AHG-Milieu durchgeführt, dieses sowohl mit unbehandelten, als auch jeweils mit papainisierten und mit DTT vorbehandelten Testzellen. Für letztgenanntes wurde – wie für die Diagnostik von Patienten unter Anti-CD38-Therapie empfohlen – eine 0,2 M DTT-Lösung verwendet¹¹. Darüber hinaus wurde die Antikörperdiagnostik um ein 24 Testzellen umfassendes Spezialpanel erweitert, mit welchem Aussagen zu Antigenen aus weiteren Blutgruppensystemen (z. B. Dombrock, YT, Knops, Colton, Scianna) möglich sind. Für die Abklärung von Antikörpern gegen sehr hochfrequente Antigene nutzten wir einerseits Neutralisationsansätze mit verschiedenen rekombinanten Blutgruppenantigenen der Fa. ImuSyn wie zuvor beschrieben¹² und andererseits Probekreuzungen mit kryokonservierten Testerythrozyten, die zum Teil für ein Blutgruppensystem einen Nullphänotyp aufwiesen (z. B. Rh-Null, K-Null, Kx-neg., Gerbich-neg.). Für die Titerung des Antikörpers wurde eine Verdünnungsreihe mit NaCl angelegt, die Titerbestimmung selbst erfolgte in Gelkartentechnik im AHG-Milieu (ID-System der Fa. BioRad). Zur Beurteilung gebundener Antikörper wurde eine Säureelution mit dem kommerziell erhältlichen Testkit DiaCidel (ebenfalls Fa. BioRad) durchgeführt.

Für den Adsorptions-Elutions-Ansatz wurde das vom AABB-Manual empfohlene Verfahren verwendet: Gleiche Volumina von Patientenplasma und Erythrozytensediment wurden in ein Glasröhrchen pipettiert und miteinander vermischt¹³. Hierfür wurden Erythrozyten der Blutgruppe 0 ausgewählt, die für Rh, K, Jk, Fy und Ss den gleichen Phänotyp wie die Patientin aufwiesen. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten unter regelmäßigem Aufschütteln erfolgte anschließend die Zentrifugation für fünf Minuten mit 1.000 rpm. Von den so beladenen Erythrozyten wurde eine Säureelution mit dem kommerziellen Testkit DiaCidel (Fa. BioRad) durchgeführt. Das so gewonnene Eluat (= Adsorptions-Eluat) konnte anschließend mit den oben beschriebenen Neutralisations- und Agglutinationsansätzen weiter beurteilt werden.

Die molekulargenetische Untersuchung erfolgte als Screeningansatz im Agena-Mass-Array mittels MALDI-ToF. Für die Sequenzierung von LW (= ICAM4) wurde ein Taq-Cycle-Verfahren unter Verwendung von vier fluoreszenzmarkierten Amplifikationsterminatoren verwendet, wobei der Homologievergleich mit der Gensequenzdatenbank GenBank® erfolgte.