

Lehrmodul Serologische Methoden (Antikörper gegen Polymorphismen der Erythrozytenmembran)

Dieses Lehrmodul ist eine Praktikumseinheit, zu der Sie bitte Schutzkleidung (Kittel) mitbringen. Nach Durchführung der Aufgaben werden die Resultate vom Betreuer durchgesehen und mit Unterschrift bestätigt

Blutgruppen und erythrozytäre Antikörper werden aus venösen Blutproben bestimmt. Für spezielle Untersuchungen (z.B. den direkten Antiglobulintest) werden Erythrozyten aus mit EDTA antikoagulierten Blutproben isoliert. Zu den praktischen Übungen dieses Kurses werden Serumproben (z.T. Plasma) und Erythrozytensuspensionen (3-5 % in isotonischer Kochsalzlösung) bereitgestellt.

Untersuchungsmethoden

Die in der Blutgruppenserologie wichtigsten Antigen-Antikörperreaktionen sind mit **Hämagglutinationstests** und durch die Beobachtung einer antikörperbedingten Hämolyse nachweisbar. Sogenannte „**komplette**“ Antikörper agglutinieren Erythrozyten (suspendiert in isotonischer Kochsalzlösung) ohne weitere Hilfsmittel. „**Inkomplette**“ Antikörper benötigen dazu verstärkende Reaktionsbedingungen z.B. die Beifügung von 20-30 prozentiger Rinderserumalbuminlösung, die Vorbehandlung der Erythrozyten mit proteolytischen Enzymen (Bromelin, Papain o.ä.) oder eine weitere Inkubation unter Verwendung eines sekundären Antikörpers (Antihumanglobulintest oder Coombs-Test).

Blutgruppen sind genetisch determinierte, immunogene Merkmale der Erythrozytenmembran (Alloantigene), die nach Transfusion oder infolge von Schwangerschaften zur Bildung von Alloantikörpern führen können.

Im **ABO-Blutgruppensystem** sind bei fast allen Individuen Alloantikörper gegen die Merkmale A, B („Isoagglutinin“) nachweisbar, die sich nicht auf den eigenen Erythrozyten befinden, ohne daß zuvor eine Fremdblutübertragung/Schwangerschaft stattgefunden hat:

Blutgruppe („Antigen“)	Vorhandene Isoagglutinine
0	Anti-A, Anti-B
A1, A2	Anti-B
B	Anti-A
A1B, A2B	keine

Zu einer vollständigen Bestimmung der ABO-Blutgruppe gehört neben der eigentlichen Antigenbestimmung auch die Bestimmung der Serumeigenschaften:

Serumgegenprobe Probanderserum + Testerythrozyten				Antigenbestimmung Probandenery. + Testserum			Blutgruppe
0-Ery.	A1-Ery.	A2-Ery.	B-Ery.	Anti-A	Anti-B	Neg. Ko	
-	+	+	-	-	+	-	B
-	-	-	+	+	-	-	A
-	-	-	-	+	+	-	AB
-	+	+	+	-	-	-	0

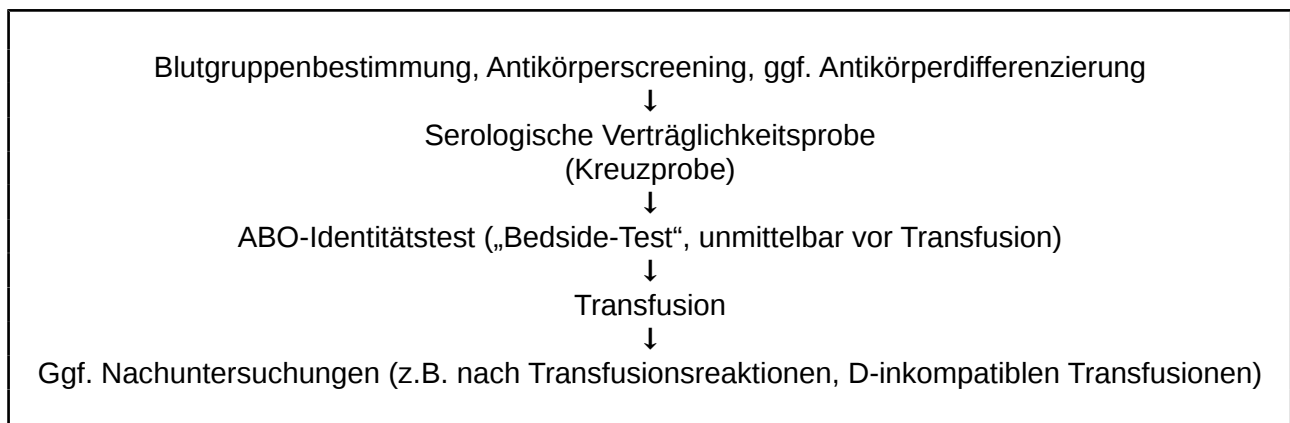
Alloantikörper gegen andere Blutgruppenmerkmale (Anti-D, Anti-Kell) werden als **irreguläre erythrozytäre Antikörper** bezeichnet. Sie sind fast stets Folge von Transfusionen oder Schwanger-

schaffen und müssen bei Transfusionen berücksichtigt werden (d.h. es sind Erythrozytenkonzentrate auszuwählen, die das entsprechende Antigen nicht tragen).

Das nach dem ABO-System zweitwichtigste Blutgruppensystem ist das **Rhesus-System**. Als „Rhesus positiv“ werden Personen bezeichnet, die das Merkmal „D“ auf ihren Erythrozyten tragen. Das Fehlen von „D“ wird mit „d“ bezeichnet, d. h. „d“ ist kein Merkmal, gegen das man sich immunisieren kann. Da D sehr immunogen ist, werden Rhesus-negative Patienten mit Rhesus-negativen Blut (dd) transfundiert. Weitere Blutgruppen (Alloantigene) im Rhesus-System sind C, c, E, e. Die Merkmale „c“ und „e“ sind (im Gegensatz zu „d“) echte Antigene, gegen die Alloantikörper gebildet werden können.

Diagnostische Bedeutung

Blutgruppenserologische Untersuchungen im Zusammenhang mit Bluttransfusionen:



Eine Blutgruppenbestimmung (ABO, Rh D, ggf. Cc, Ee) wird bei Patienten veranlaßt, bei denen grundsätzlich damit gerechnet werden muß, daß Bluttransfusionen erforderlich werden. Bei dem gleichzeitig durchgeführten Antikörperscreening werden irreguläre erythrozytäre Antikörper ausgeschlossen bzw. nachgewiesen.

Vor einer Bluttransfusion von Erythrozytenkonzentraten werden ABO-kompatible Präparate ausgewählt und Konservenerothrozyten im „Major-Ansatz“ der serologischen Verträglichkeitsprobe („Kreuzprobe“) gegen das Serum des Patienten angesetzt. Unmittelbar vor Transfusion werden ABO-Blutgruppe von Patient und Konserven vom transfundierenden Arzt im ABO-Identitätstest überprüft (Bedside-Test).

Kommt es im Rahmen von Transfusionen erythrozytenhaltiger Blutpräparate zu Transfusionsreaktionen (TR), so werden Blutgruppe von Konserven und Patient (Probe vor und nach Transfusion) erneut bestimmt: Es wird noch einmal mit einem Antikörperscreening nach irregulären erythrozytären Antikörpern gesucht. Die serologische Spezifität irregulärer Alloantikörper wird mit einer Antikörperdifferenzierung bestimmt. Die IgG Beladung der Patientenerothrozyten vor/nach Transfusion wird mit dem direkten Antiglobulintest überprüft.

Literatur

Folgende Abschnitte des Manuskripts „**Transfusionsmedizin und Immunhämatologie**“ - verfügbar über die Homepage der Abteilung für Transfusionsmedizin:

www.tmed.med.uni-rostock.de/tmed.pdf

oder

www.tmed.med.uni-rostock.de

dann dem Link „Veröffentlichungen, Manuskripte“ folgen - sind **vor dem Praktikumstag vorzubereiten**:

- Abschnitt: „Immunologische Grundlagen der Transfusionsmedizin“
- Abschnitt: „Blutgruppenserologische Untersuchungen vor Transfusionen“
- Im Abschnitt „Blutgruppen auf Erythrozyten“: „Das ABO-Blutgruppensystem“, „Rhesus-System“
- Im Abschnitt „Transfusionsreaktionen“: „Akute hämolytische Transfusionsreaktion“, „Verzögerte hämolytische Transfusionsreaktion“

Inhalte dieser Abschnitte können Inhalt der Leistungsnachweise zum Praktikum sein.

Praktische Übungen

Bei den meisten der im folgenden beschriebenen Versuche verwenden Sie Objektträger mit insgesamt 10 Vertiefungen. Von diesen werden Sie allerdings nur die ersten 8 Vertiefungen benutzen.

1. Aufgabe: Bestimmung der ABO-Blutgruppe und der Isoagglutinine (Serumgegenprobe)

Serumgegenprobe:				Blutgruppenbestimmung (Erythr.):				Probe Nr.
1	2	3	4	5	6	7	8	
0 T-Ery.	A ₁ T-Ery	A ₂ T-Ery.	B T-Ery.	-	Anti-A	Anti-B	NaCl	1, 2, 3

Die Blutgruppen der Blutproben 1, 2 und 3 sind zu bestimmen. Die Blutproben sind bereits in Erythrozyten (aufgeschwemmt in isotonischer Kochsalzlösung) und in Serum / Plasma getrennt worden. Die Untersuchung jeder Blutprobe erfolgt auf einem eigenen Objektträger. Die 4 Vertiefungen auf der linken Seite dienen der Bestimmung der Isoagglutinine (Serumeigenschaften) der Blutprobe, die Vertiefungen 6-8 dienen der eigentlichen Blutgruppenbestimmung (Blutgruppen: Oberflächenmerkmale der Erythrozyten).

Bestimmung der Erythrozytenmerkmale:

Vertiefung 6-8: Je 2 Tropfen der zu untersuchenden Erythrozytensuspension

Vertiefung 6 : 2 Tropfen Anti-A

Vertiefung 7 : 2 Tropfen Anti-B

Vertiefung 8 : 2 Tropfen isotonischer Kochsalzlösung

Serumgegenprobe (Bestimmung der Isoagglutinine):

Vertiefung 1-4: Je 2 Tropfen Serum / Plasma der Blutprobe

Vertiefung 1 : 2 Tropfen 0-Testerythrozyten

Vertiefung 2 : 2 Tropfen A1-Testerythrozyten

Vertiefung 3 : 2 Tropfen A2-Testerythrozyten

Vertiefung 4 : 2 Tropfen B-Testerythrozyten

Bitte vermischen Sie Erythrozytensuspension und Seren durch vorsichtiges Schwenken der Reaktionskammern. Nach 5 – 15 minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur lesen Sie bitte das Ergebnis ab und protokollieren Sie es. Dabei bewerten Sie bitte die Reaktionsstärke mit „Scores“ von 0 bis 4: kennzeichnen Sie bitte **negative Reaktionen mit 0, schwache Agglutinate mit 1, mäßig starke Agglutinate mit 2 oder 3 und starke Agglutinate mit 4**. Tragen Sie als Ergebnis die ermittelte Blutgruppe ein, oder weisen Sie darauf hin, wenn Widersprüchlichkeiten eine Blutgruppenbestimmung nicht erlauben.

Serumgegenprobe					Blutgruppenbestimmung			
O T-Ery	A ₁ T-Ery	A ₂ T-Ery	B T-Ery	--	Anti-A	Anti-B	NaCl	
1	2	3	4	5	6	7	8	Blutgruppe
				-				
				-				
				-				

2. Aufgabe: Bestimmung des Merkmals Rhesus D

Bestimmen Sie das Merkmal D auf den Erythrozyten der Blutproben I, II und III. Verwenden Sie dazu bitte einen Objektträger:

1	2	3	4	5	6	7	8
Pr I +	Pr I +		Pr II +	Pr II +		Pr III +	Pr III +
Anti-D	NaCl		Anti-D	NaCl		Anti-D	NaCl

- Vertiefung 1-2: Je 2 Tropfen der zu untersuchenden Blutprobe I
- Vertiefung 4-5: Je 2 Tropfen der zu untersuchenden Blutprobe II
- Vertiefung 7-8: Je 2 Tropfen der zu untersuchenden Blutprobe III
- Vertiefung 1: 2 Tropfen Anti-D
- Vertiefung 4: 2 Tropfen Anti-D
- Vertiefung 7: 2 Tropfen Anti-D
- Vertiefung 2: 2 Tropfen NaCl
- Vertiefung 5: 2 Tropfen NaCl
- Vertiefung 8: 2 Tropfen NaCl

Vermischen Sie bitte Serum und Zellsuspension durch vorsichtiges Schwenken und inkubieren Sie die Ansätze 15 – 20 min bei Raumtemperatur. Tragen Sie die Reaktionsstärken in das folgende Schema ein:

1	2	3	4	5	6	7	8
		-			-		

Geben Sie das Ergebnis (D positiv/D-negativ) für die einzelnen Blutproben I, II und III an:

Probe I	
Probe II	
Probe III	

Anmerkungen: Die Ansätze in den Vertiefungen 2, 5 und 8 („NaCl-Ansätze“) dienen als negative Kontrolle, eine D-Antigenbestimmung gilt nur dann als gültig, wenn diese Kontrollansätze keine Spontanagglutination zeigen.

3. Aufgabe: Kreuzprobe (Majortest)

Prinzip: Erythrozyten der Konserve werden mit Serum des Empfängers inkubiert, eine mögliche Agglutination (oder Hämolyse) zeigt eine Unverträglichkeit einer geplanten Bluttransfusion an. Nach heute geltenden Bestimmungen ist die Kreuzprobe nur einschließlich des indirekten Antiglobulintests vollständig, im Praktikum wird der indirekte Antiglobulintest aus organisatorischen und zeitlichen Gründen jedoch nicht durchgeführt. Führen Sie bitte 3 Kreuzproben durch, wobei die Spender/Empfänger-Probenpaare auf dem Probenständer im Praktikum nebeneinander stehen:

1	2	3	4	5 (E)	6 (E)	7 (Sp)	8 (Sp)
NaCl	Enzym	Eigenans. (Enzym)	-	Anti-A	Anti-B	Anti-A	Anti-B
NaCl	Enzym	Eigenans. (Enzym)	-	Anti-A	Anti-B	Anti-A	Anti-B
NaCl	Enzym	Eigenans. (Enzym)	-	Anti-A	Anti-B	Anti-A	Anti-B

Jeden Kreuzprobenansatz pipettieren Sie bitte nach folgendem Schema auf je einem Objektträger:

Vertiefung 1-3: Je 2 Tropfen Empfängerserum

Vertiefung 2-3: Je 2 Tropfen Bromelinlösung

Vertiefung 1-2: Je 2 Tropfen Spendererythrozyten

Vertiefung 3 : Je 2 Tropfen Empfängererythrozyten

Vertiefung 5-6: Je 2 Tropfen Empfängererythrozyten

Vertiefung 7-8: Je 2 Tropfen Spendererythrozyten

Vertiefung 5, 7: Je 2 Tropfen Anti-A

Vertiefung 6, 8: Je 2 Tropfen Anti-B

Lassen Sie den Ansatz bitte 20 min bei Raumtemperatur inkubieren, lesen Sie die Resultate ab und tragen Sie die Reaktion in das folgende Schema ein. Geben Sie bitte an, ob das Resultat der Verträglichkeitsprobe Kompatibilität anzeigt oder nicht.

1	2	3	4	5	6	7	8	kompa- tibel [ja/nein]	Blutgr. Empfänger	Blutgr. Spender
			-							
			-							
			-							

4. Aufgabe: Blutgruppenidentitätstest

Die hier durchgeführte ABO-Kurzbestimmung wird als Blutgruppenidentitätstest am Krankenbett (Bedside-Test) verwandt.

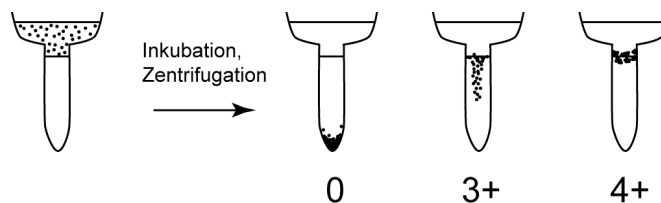
	Anti-A	Anti-B	Blutgruppe
Probe 1			
Probe 2			

5. Aufgabe: Ableitung des Rh-Phänotyps (der „Rhesusformel“) aus einer serologischen Antigenbestimmung.

Anti-C	Anti-c	Anti-D	Anti-E	Anti-e	Phänotyp
+	+	+	-	+	CcDee
-	+	-	-	+	
+	+	+	+	-	
-	+	-	+	+	
+	+	-	+	+	
+	-	+	-	+	
+	+	+	+	+	
-	+	+	-	+	
-	+	+	+	-	
-	+	+	+	+	

6. Aufgabe: Auswertung von Antikörperdifferenzierungen

Das zu untersuchende Serum wurde zuvor mit 11 Testerythrozyten in Geltest-Karten inkubiert. Reaktionen werden mit negativ (0) oder positiv ("Score" 1+ bis 4+) bewertet und in die entsprechenden Spalten des Differenzierungsprotokolls eingetragen. Reaktionsstärken werden folgendermaßen bewertet



und in die entsprechenden Spalten den Testzellen zugeordnet eingetragen. Durch Vergleich der Reaktionsmuster mit den Angaben zu den Antigenen, die die Zellen des Testzellpanels tragen, werden die Antikörperspezifitäten ermittelt. Hinweis: Es kann sich auch mehr als Alloantikörper in einem Serum befinden, deren Reaktionsmuster sich überladen.

Resultat:

Serum Nr.	Antikörper-Spezifität(en)
	Anti-
	Anti-
	Anti-

Bitte lassen die Resultate vom Betreuer durchsehen und besprechen Sie mögliche Unklarheiten.

Kursteilnehmer:

Betreuer: