Eine modifizierte Chloroform-Elutionstechnik für erythrozytäre Antikörper

P. M. Winter

Institut für Blutgruppenserologie der Universität Wien* (Vorstand: Prof. Dr. Paul Speiser)

Zusammenfassung:

Durch eine Modifikation der Chloroformelutionstechnik mittels Verwendung von Ammoniumchloridlösung als Waschflüssigkeit wird die Verfärbung des erythrozytären Eluats vermieden und die Eluatmenge vergrößert.

Schlüsselwörter:

Elution – Erythrozyten – Antikörper – Chloroform – Ammoniumchlorid

Summary:

Using ammonium chloride as a washing solution the chloroform elution technique is modified in order to avoid discoloration of the resulting eluate by haemoglobin and rising its quantity.

Keywords:

elution – erythrocytes – antibody – chloroform – ammonium-chloride

Einleitung

Seit der Einführung des thermischen Eluats durch Landsteiner sind weitere Antikörper-Absprengungstechniken bekannt geworden, die in Routine und Forschung Anwendung finden (Tab. 1). Hiervon haben sich in unserem Labor besonders das thermische und das Chloroformeluat bewährt, die gegenüber anderen Methoden die Vorteile der Einfachheit und Sicherheit besitzen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Hämoglobinkonzentration im Chloroformeluat soweit zu vermindern, daß das Erkennen schwacher Agglutinationen im Objektträger- und im Röhrchentest verbessert wird, ohne die Qualität dieser Elutionstechnik zu schmälern.

Material und Methoden

Sera

Spezifitäten: Anti-A,B,M,N,D,CD,E,c,e,Fy^a,Fy^b,Jk^b,Jk^b.

Antihumanglobulin: polyspezifisch (Anti-IgG/IgM/Komplement).

Bei der LISS-Technik (Low Ionic Strength Solution) wird eine 0,01 molare Lösung verwendet.

Hersteller-Firmen: Behring, Biotest, Dr. Molter AG., Ortho Diagnostics. Bei den Spezifitäten Anti-A,M,N kamen auch monoklonale Reagenzien zur Anwendung.

Blutproben

a) Aus klinischem Einsendematerial.

b) Testerythrozyten der Firmen Biotest (Biotestcell I) und Ortho Diagnostics (Resolve Panel A) zur Antikörperspezifisierung.

Blutproben (1 Teil) von a) wurden durch Versetzen mit spezifischem Serum (3 Teile) artifiziell mit Antikörpern beladen.

Bei der Elution verwendete *Ammoniumchloridlösung*

0,155 mol/l NH ₄ Cl	8,3 g
0,01 mol/l KHCO ₃	1,0 g
1 × 10 ⁻⁴ mol/l Na-EDTA	0,037 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

pH 7,3 bei 0°C mittels HCl einstellen.

Chloroformeluat (Standard)

Ein Teil Erythrozyten-Sediment 6–8mal in Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen versetzt mit 1 Teil PBS in 2 Teilen Chloroform; 1 min kräftig geschüttelt; Inkubation bei 56°C im Wasserbad 5 min (mehrmals mit Holz-

Tab. 1: Antikörper-Absprengungstechniken

Elutionsmethode	Vorteile	Nachteile
Thermisch (56°C) (5)	technisch einfach, ungefährlich	weniger sensibel*
Chloroform (1, 8)	technisch einfach, sensibel	stark hämolytisch, daher Eluat Hämoglobin verfärbt
Äther (9)	sensibel	explosiv, hämolytisch, Eluat = unterste Schicht
Säure (4)	sensibel	Eluat muß oft konzentriert werden
Kälteschock (3)	sensibel	nur f. IgG geeignet, hämolytisch
Xylol (2)	sensibel	explosiv

* Sensibel, auch bei geringer Antikörpermenge noch deutlich eluierbar

* National Blood Group Reference Laboratory (WHO)
National Tissue Typing Reference Laboratory (Council of Europe)

Tab. 2: Titerergebnisse des modifizierten Eluats im Vergleich zur Standardtechnik

Spezifitäten Anti-	Serum	Titer		Kommentar
		Standardtechnik	Modifikation	
A	1:200	1:2	1:2	Orig. Serum 1:40
B	1:200	1:2	1:2	Orig. Serum 1:20
A (monokl.)	1:200	1:2	1:2	Orig. Serum 1:40
M	1:32	1:4	1:4	
N	1:32	1:2	1:2	Modif. zeigt schwächere Agglutinate
M (monokl.)	1:32	1:8	1:8	
N (monokl.)	1:32	1:4	1:4	
D	1:2048	1:64	1:64	Titer im i. C.*
E	NT	1:16	1:32	Titer im i. C.*
CD	1:1024	1:32	1:32	Titer im i. C.*
c	1:128	1:32	1:32	Titer im i. C.*
e	1:128	1:16	1:16	Titer im i. C.*
c	NT	1:4	1:4	in vivo sensibilisiert
Fy	1:128	1:16	1:16	Modif. zeigt deutlichere Agglutinate
Fy	1:256	1:16	1:16	
JK	1:16	1:1	1:1	Originalserum schwach

* i. C. = indirekter Coombstest

stäbchen durchmischen); Zentrifugation bei 3000 UpM 5 min; abpipettieren des Überstands (= Eluat).

Die zum *modifizierten* Eluat verwendeten Erythrozyten werden 2mal in PBS gewaschen und danach in einer Ammoniumchloridlösung lysiert: 1,5 ml Erythrozytensediment plus 8,5 ml Ammoniumchloridlösung 5 min bei 0°C; Zentrifugation 5 min bei 3500 UpM; abheben der oberen Hälfte des Lysats; Ergänzung des entnommenen Volumens mit PBS; 3maliges Waschen der teil-lysierten Erythrozyten in PBS (Zentrifugation jeweils 3500 UpM 5 min).

Hämagglutination

100 µl Serum oder Eluat werden 50 µl einer 5% (V/V) Erythrozytensuspension in 0,9% NaCl zugesetzt. Die Inkubation erfolgt bei agglutinierenden Antikörpern (ABO, MN) in geometrischen Verdünnungsreihen auf einer Glasplatte (14°C Kaltwasserdurchlaufplatte); coombsreaktive Eluate der Spezifitäten Anti-Rhesus, Duffy, Kidd werden im Röhrchen unter Zusatz von 100 µl LISS 15 min bei 37°C inkubiert, 3mal in PBS gewaschen, mit 100 µl polyspezifischem Coombsserum versetzt. Das Ergebnis wird nach Zentrifugation 1 min bei 500×g abgelesen.

Ergebnisse

Wie aus Tab.2 hervorgeht, sind die Titer-Ergebnisse des herkömmlichen Chloroformeluats mit jenen des modifizierten zwar praktisch identisch, gleichzeitig aber zeichnet sich das modifizierte Eluat durch das Fehlen einer Verfärbung durch Hämoglobin und eine scharfe Trennlinie gegen den Zelldetritus aus. Die im Interesse geringer Raumluftkontamination erforderliche Entfernung des Chloroforms läßt sich bei Röhrchen, die für das modifizierte Eluat Verwendung fanden, einfach durchführen, beim herkömmlichen Eluat jedoch nicht, da sich dessen Zelldetritus mit üblichen Laborpumpen nicht absaugen läßt.

Diskussion

Während sich eine Elution durch Senkung des pH-Wertes oder durch Kälteschock nicht zur Abspaltung aller Antikörperspezifitäten bzw. -klassen eignet (6), trifft dies bei

Elutionstechniken mittels organischer Lösungsmittel und der thermischen Abspaltung nach Landsteiner zu (6, 7). Wir verwenden als Lösungsmittel Chloroform, weil es nicht explosiv ist.

Der Nachteil von Chloroformeluaten war jedoch bisher die starke Verfärbung des Eluats durch Hämoglobin. Durch die beschriebene Modifikation sind auch schwache Agglutinationen im Eluat noch erkennbar, was bei stark hämolytischen Eluaten nicht immer der Fall ist. Durch die Behandlung mit Ammoniumchlorid tritt eine Teillyse ein, das Hämoglobin wird durch mehrmaliges Waschen entfernt und man erhält ein klares, unverfärbtes Eluat. Eine Titerverminderung tritt durch die Modifikation nicht ein, die gewonnene Eluatmenge ist meist etwas größer als bei der Standardtechnik (siehe Tab.2).

Während erythrozytäre Antikörper der IgG-Klasse mittels indirektem Coombstest unbeeinflusst vom Hämolysegrad des Eluats leicht zu erkennen sind, behindert bei IgM-Antikörpern Hämoglobin die Diagnostik. Durch die beschriebene Modifikation ist dieser Nachteil behoben. Bei Elutionsuntersuchungen mit IgM Antikörpern, wie sie z.B. in der Diagnose schwacher Antigene im ABO-System durchgeführt werden, ist dies von besonderem Vorteil.

Schrifttum:

1. BRANCH, D. R., SY SIOK HAN, A., PETZ, L. D.: A new elution technique using chloroform, an non flammable organic solvent. Vox Sang. 42, 46-83 (1982).
2. BUENO, R., GARRATY, G., POSTOWAY, N.: Elution of antibody from red cells using xylene. A superior method. Transfusion 21, 157-167 (1981).
3. EICHER, C.: The LUI easy freeze elution test: A rapid method for eluting cord samples. South East Ass. Blood Banks J. 199 (1976).
4. JENKINS, D. E., MOORE, W. H.: A rapid method for the preparation of high potency of auto- and alloantibody eluates. Transfusion 17, 110-114 (1977).
5. LANDSTEINER, K., MILLER, C. P.: Serological studies on the blood of primates. II. The blood of anthropoid apes. J. Exp. Med. 42, 853-862 (1925).
6. NESPIHAL, H., SACHS, V.: Zur Effizienz verschiedener Methoden der Abspaltung von antierythrozytären Antikörpern. 10. Bremer Bluttransfusionsgespräche, 40-55 (1983).
7. PANZER, S., SALAMA, A., BÖDEKER, R. H., MÜLLER-ECKHARDT, C.: Quantitative evaluation of elution methods for red cell antibodies. Vox Sang 46, 330-335 (1985).
8. PETZ, L. D., BRANCH, D. R.: In: Immune Cytopenias, ed. by R. MacMillan Churchill Livingstone (1984) Serological tests for the diagnosis of immune haemolytic anaemias Methods in Hematology, Vol. 9, 9-48 (1983).
9. RUBIN, H.: Antibody elution from red blood cells. J. Clin. Path. 16, 70-73 (1963).

Anschrift des Verfassers:

Dr. Peter M. Winter
Institut für Blutgruppenserologie der Universität Wien
Spitalgasse 4, A-1090 Wien

Der neue Weg zur Automatisierung in klinischer Chemie und Immunologie mit

COBAS FARA

**Selektiv-Zentrifugalanalysator
für
Routine- und Spezialanalysen**

COBAS MIRA

**Selektiv-Analysator
für
kleine und mittlere Serien;
»Back-up«-Tests**

Die Hauptmerkmale:

- Wahlfreier Zugang zu Proben und Reagenzien
- 6 verschiedene Ständermodelle (Racks)
- Einfache Programmierung im Bildschirm-Dialog
- Freie Methoden- und Reagenzienwahl
- Niedere Betriebskosten
- Routine- und Notfalltauglich

Warum

- Weil bei **BIOMED**
- **Qualität**
vor Markt-
beherrschung,
- **Flexibilität**
vor Größe und
- **Entwicklung**
vor Werbung steht.

Ihr Vorteil bei

Verunsichert?

inch oder **cm**
läßt die Entfernung
unbeeindruckt,

HbA_{1c} oder **HbA₁**
die Stoffwechsellage
unbeeinflußt.

HbA₁ ist das metrische Maß
der **Langzeitkontrolle**
Ihrer Diabetiker oder
wollen Sie umrechnen?

GLYC-AFFIN – die affini-
tätschromatographische
Methode der Wahl zur Er-
fassung aller **GHB's** oder
Glycoproteine, auch bei
abnormen Hämoglobin-
mustern oder Temperatur-
problemen.

Auch hier sind wir
innovativ und haben den
Vorsprung.

FAST Hb TEST SYSTEM
mit
ALDIMIN ELIMINATOR
VERIFICATOR

und **Glyc-Affin** gibt es für
20 und 100 Bestimmungen.

Bezug und Information durch: