Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Herausgeber: Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften

Band: 26 (1970)

Artikel: Technik der Leukozytentypisierung (heutiger Stand)

Autor: Weck, A.L. de

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-307819

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 10.12.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Aus der Abteilung für Allergie und Klinische Immunologie der Dermatologischen Universitätsklinik Bern – Vorsteher: Prof. H. Kuske

Technik der Leukozytentypisierung (heutiger Stand)

A. L. DE WECK

Die Bedeutung der Bestimmung der Leukozytengruppenantigene (sogenannte «Typisierung») beruht auf der Tatsache, dass solche Membranantigene in verschiedenen Zellen des Organismus vorhanden sind und für eine Sensibilisierung gegenüber Organen bzw. Gewebetransplantaten verantwortlich sein können. Wie kann man beweisen, dass Leukozytenantigene bei der Transplantatabstossung eine Rolle spielen? Einerseits wurde schon 1946 durch MEDAWAR gezeigt, dass eine Vorsensibilisierung durch intradermale Injektion von Spenderleukozyten bei der Maus zu einer schnelleren Abstossung («second set rejection») des Transplantats prädisponiert. Andererseits konnte festgestellt werden, dass Transplantationen zwischen Individuen ohne nachweisbare Inkompatibilitäten hinsichtlich Leukozytenantigenen eine geringere Abstossungsquote aufweisen als zwischen Individuen mit nachgewiesenen Inkompatibilitäten. Bei Transplantationen zwischen Verwandten (Eltern–Kinder oder zwischen Geschwistern), insbesondere bei der Nieren- und Hauttransplantation, ist ein solcher Beweis überzeugend erbracht worden. Bei Transplantationen zwischen nicht verwandten Personen (Kadavernieren) war es für einige Zeit nicht möglich, einen deutlichen Einfluss der Leukozytenkompatibilität nachzuweisen. Dies beruhte aber hauptsächlich auf der Tatsache, dass noch nicht genügend Leukozytenantigene bekannt waren. Seit einiger Zeit zeigen die Statistiken verschiedener Gruppen deutlich, dass die Leukozytenkompatibilität die Prognose der Nierentransplantation beeinflusst.

Vom historischen Standpunkt aus war die Leukoagglutination die erste Methode, die es ermöglichte, Leukozytenantigene nachzuweisen. Die entsprechenden notwendigen Antileukozytenantiseren konnten entweder bei polytransfundierten Patienten, bei schwangeren Frauen und bei transplantierten Patienten gefunden und zur Typisierung verwendet werden. Die Hauptschwierigkeit bei der Leukozytentypisierung ist wohl die, sogenannte monospezifische Typing-Antiseren zu finden. Bei den Leukozytenantigenen handelt es sich um ein Mosaik von Antigenstrukturen, die auf der Membran der Zelle haften bzw. konstituierende Strukturen der Zellmembrane dar-

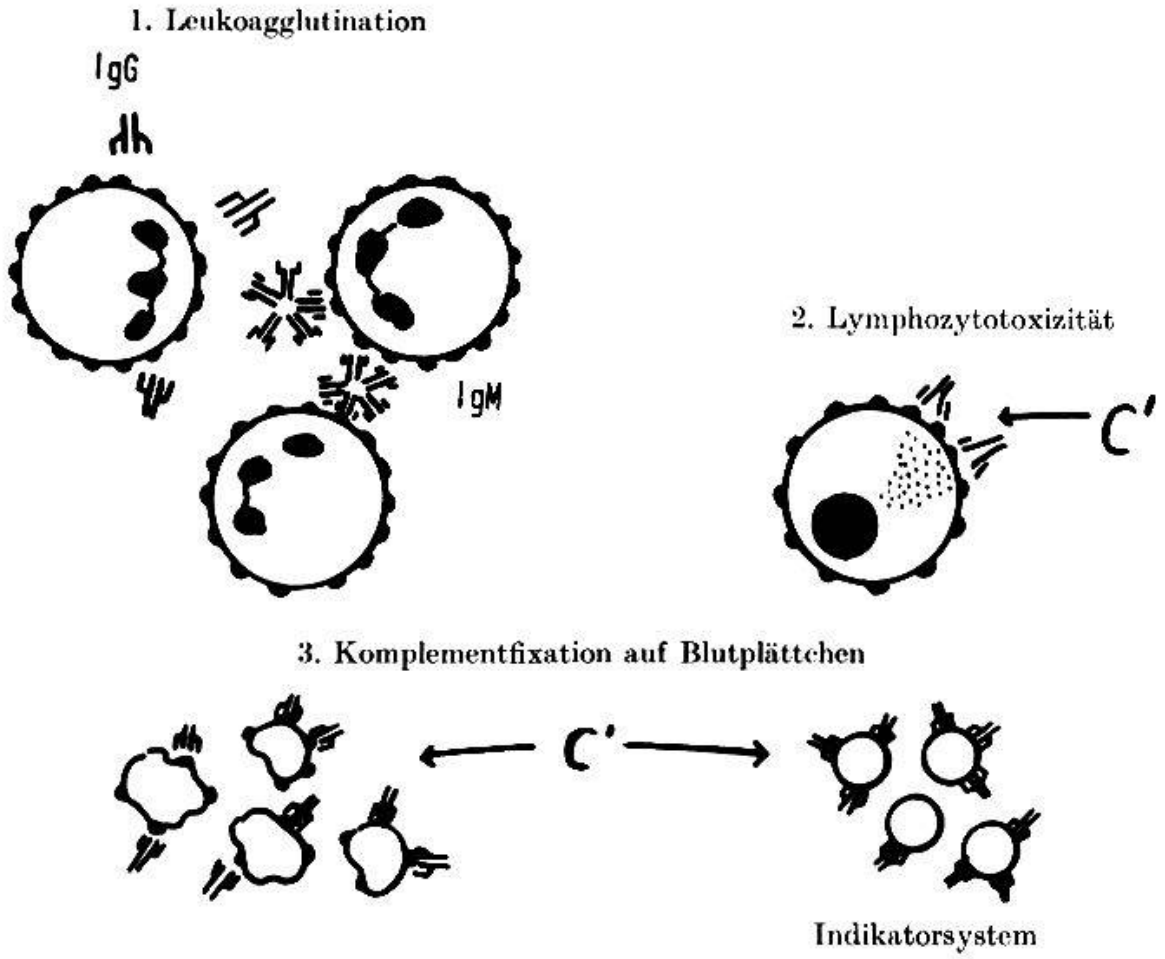

Abb. 1. Bestimmung von Histokompatibilitätsantigenen.

stellen. Monospezifische Antikörper, d. h. Antikörper, die nur gegen eines aller möglichen Gruppenantigene gerichtet sind, werden theoretisch nur dann erwartet, wenn bei der Immunisierung Spender und Empfänger sich nur durch ein solches Antigen unterscheiden. Da wir aber nicht nur eines, sondern mehrere der möglichen Leukozytenantigene gleichzeitig besitzen, differieren öfters Spender- und Empfängerpaare durch mehrere Leukozytenantigene, was zur Bildung von polyspezifischen Antikörpern führt.

Das Prinzip der *Leukozytenagglutination* wird auf Abb. 1 schematisch dargestellt. Wie bei anderen Immunsystemen scheinen die IgM-Immunglobuline in ihrer Agglutinationsfähigkeit wirksamer zu sein als IgG-Immunglobuline. Die Leukoagglutination wurde vor kurzem zu einer Mikrotechnik entwickelt. Da monospezifische Antiseren selten und sehr schwer erhältlich sind, wird es unerlässlich, dass Mikrotechniken verwendet werden, wenn die Leukozytentypisierung sich zu einer Routinemethode entwickeln soll. Die Methode der Leukoagglutination ist relativ einfach und schnell durchzuführen. Sie hat aber zwei wesentliche Nachteile: Erstens ist sie relativ schwer reproduzierbar, und zweitens erfordert sie frische Leukozyten, die nicht mehr als einige Stunden gestanden haben. Weitere Einzelheiten über die Leukoagglutinationsmikrotechnik sind in Tabelle 1 aufgeführt. Mit Ausnahme der Eurotransplantzone Benelux und Norddeutschland, wo die

Tabelle 1
Lymphozytotoxizität (Mikrotechnik)

1. Defibriniertes Blut

2. Vorbereitung der Lymphozytensuspension

a) Beschleunigte Sedimentation in Dextran → Leukozytensuspension (Supernat) durch Baumwolle/Nylon-Fasern (Entfernen der Granulozyten) → Gradientenzentrifugation auf 30% Albumin (Entfernen der Erythrozyten)

b) Direkte Zentrifugation des verdünnten Blutes auf Ficoll-Isopaque Gradient – Waschen, Zählen und Anpassen der Lymphozytensuspension (2000/mm³), Viabilitätskontrolle (Trypanblautest)

3. Reaktion

1 µl Lymphozytensuspension (2000)
1 µl Antileukozytenserum (auf Terasaki-Platte)
Inkubation 30–60 min bei 37°, dann 5 µl Kaninchen C′ beifügen
Inkubation 60 min bei 37°

4. Auswertung

Eosin (Kontrast) und Formaldehyd (Fixation) hinzufügen
Ablesen in umgekehrtem Phasenkontrastmikroskop

Vorteile:
- sehr empfindlich (zahlreiche Antigene entdeckt)
- gute Reproduzierbarkeit (≥95%)
- fixierte Reaktion (Kontrollmöglichkeit)
- Einsparung von Reagenzien, Aufbewahrungsmöglichkeit

Nachteile:
- sehr empfindlich (monospezifische Antiseren selten)
- zahlreiche Manipulationen (erfordert viel Zeit)

Gesamtzeit: Methode a) ~5 Std.
Methode b) ~3 Std.

Leukoagglutinationsmikrotechnik noch routinemässig verwendet wird, scheinen heutzutage die zwei anderen Methoden von den meisten Gruppen bevorzugt zu werden.

Die *Lymphozytotoxizitätstechnik*, insbesondere in der Form, wie sie von TERASAKI entwickelt wurde, ist die in der Praxis am meisten verbreitete Methode. Ihr Prinzip ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Für diese Methode verwendet man nicht Gesamtleukozyten wie bei der Leukoagglutination, sondern Lymphozyten, die resistenter als die Granulozyten sind und deshalb erlauben, noch in einem Blut, das schon 24–48 Std. alt ist, eine lebende Lymphozytenpopulation zu isolieren. Spezifische Antiseren für Lymphozytenmembranantigene üben auf die Membran eine toxische Wirkung aus, wenn Komplement vorhanden ist und wenn diese Antikörper fähig sind, das Komplementsystem zu aktivieren. Die spezifische Schädigung der Lymphozyten kann verschiedentlich nachgewiesen werden (Vitalfärbung, Fluorochromasie, Phasenkontrast). Die Differenzierung von toten und lebenden Zellen im Phasenkontrast nach TERASAKI hat zahlreiche Vorteile und hat

sich gut eingeführt. Für längere Zeit hatte die Lymphozytotoxizitätsmethode den Nachteil, lange und delikate Manipulationen zu erfordern, um die notwendige reine Lymphozytensuspension zu gewinnen (Tab. 1). Seit einiger Zeit ist es aber möglich, durch eine einfache Gradientzentrifugation eine solche Suspension in ca. 30 Minuten vorzubereiten, so dass die Gesamtzeit der Reaktion wesentlich verkürzt werden konnte. Vorteile und Nachteile der Lymphozytotoxizitätsmethode sind in Tabelle 1 kurz zusammengefasst. Da diese Methode besonders empfindlich ist, ist es in diesem Fall auch schwieriger, echte monospezifische Antiseren zu erhalten.

Die Komplementbindungsreaktion mit Thrombozyten ist zurzeit nur von einzelnen Gruppen entwickelt und routinemässig zur Charakterisierung der Leukozytenantigene verwendet worden. Das Prinzip ist identisch mit demjenigen der Wassermann-Reaktion oder irgendeinem anderen Komplementkonsumptionstest. Der Verbrauch an Komplement durch eine Thrombozyten-Immunglobulinreaktion wird durch das entsprechende hämolytische Indikatorsystem (sensibilisierte Schafzellen) gemessen (Abb. 1). Dieser Test ist relativ unempfindlich und hat in diesem Sinne den Vorteil, da operationell monospezifische Antiseren relativ leichter zu finden sind. Plättchen sind auch mehrere Monate bei 4° C haltbar, was ebenfalls ein grosser praktischer Vorteil ist. Dagegen war es bisher nicht möglich, eine echte Mikrotechnik zu entwickeln, so dass die Komplementbindungsmethode relativ viel Typing-Antiserum braucht. Ferner sind nicht wie bei der Lymphozytotoxizitätsreaktion alle Reagenzien in gefrorenem Zustand für längere Zeit haltbar. Andererseits ist die Komplementbindungsreaktion gut geeignet für halbquantitative Arbeit.

In der Schweiz wurde als einheitliche Methode für die Typisierung von Organspendern und -empfängern in verschiedenen schweizerischen Laboratorien die Lymphozytotoxizitätsmethode, wie sie von TERASAKI entwickelt und vor kurzem vom NIH kodifiziert wurde, angenommen. Für die Vorbereitung der Lymphozytensuspension haben wir zuerst die Methode von KISSMEYER-NIELSEN [1] verwendet, seit kurzer Zeit aber die schnellere und zuverlässigere Zentrifugation auf einen Ficoll-Isopaque Gradient [2]. Diese Technik hat bei uns zu gut reproduzierbaren Resultaten geführt. Bei individuellen Serumreaktionen ist eine 100%ige Reproduzierbarkeit nie zu erreichen, was auch den Erfahrungen in den USA entspricht. Wenn man aber für die Bestimmung eines spezifischen Leukozytenantigens nicht nur über ein Typing-Serum, sondern über mehrere verfügt, kann die Bestimmung der Antigenformel einwandfrei durchgeführt werden. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, ist die Reproduzierbarkeit zwischen zwei verschiedenen schweizerischen Laboratorien (Abteilung für Allergie und klinische Immunologie, Bern, und Referenzlaboratorium Genf) als befriedigend zu bezeichnen. Die Tatsache, dass die Reproduzierbarkeit doch nicht 100%ig ist, empfiehlt, dass bei so wichtigen Untersuchungen wie für eine Organtransplantation Doppelbestimmungen und regelmässige Kontrollen zwischen den Laboratorien zur Regel werden.

Tabelle 2
Korrelation der Typisierungsresultate Bern–Genf
27 Patienten zweimal typisiert

Individuelle Serumreaktionen: 1846

Bern	+	—	+	—
Genf	+	—	—	+
	710	988	90	58
	identisch 92,3%		4,8%	2,9%

Bestimmte Antigene: 305 identisch: 299 nicht identisch: *2%** («matching error»)

* Nur für Antigene, die von 2 verschiedenen Seren oder weniger bestimmt worden sind.

Tabelle 3
Leukozytentypisierung nach dem Tod

Blutentnahme 2 Std. vor dem Tod	+	—	+	—
Blutentnahme 2 Std. nach dem Tod	+	—	—	+
	25%	64%	3%	6%
	identisch 90%			

Bestimmte Antigene: 8 identisch: 8

Wie wir auch vor kurzem feststellen konnten, ist es möglich, mit derselben Methode auch nach dem kardiovaskulären Tod einen Patienten zu typisieren. Durch intrakardiale Punktion ist es noch eine Stunde nach Eintreten des Todes möglich, genügend flüssiges Blut zu gewinnen, um eine Typisierung durchzuführen. Die Resultate einer solchen Typisierung sind denen vor dem Tod gleich (Tab. 3). Mit der Entwicklung der Methoden für Organkonservierung wäre damit zu rechnen, dass die Typisierung eventuell nicht wie bisher vor, sondern sogar nach dem Tod des Spenders durchgeführt werden könnte. Ein solches Verfahren würde die Anzahl der potentiellen Spender wesentlich vergrössern und auch gewisse der gegenwärtigen Schwierigkeiten ausschalten (Komplikationen bei der Feststellung des Hirntodes usw.). Selbstverständlich bringt die Verwendung des kardiovaskulär toten Spenders auch andere Probleme mit sich (Reduktion der warmen Ischämiezeit usw.).

Zusammenfassung

Die Vorteile und Nachteile der verschiedenen Methoden, die zur Bestimmung spezifischer Leukozytenantigene (sogenannte Leukozytentypisierung) verwendet werden können, werden kurz besprochen. In der Schweiz wurde als einheitliche Methode eine Lymphozytotoxizitätstechnik nach Terasaki eingeführt, wobei die Vorbereitung der Lymphozytensuspension durch eine

vereinfachte Gradientzentrifugation geschieht. Die Leukozytentypisierung kann heutzutage als eine Routinetechnik beschrieben werden, deren Reproduzierbarkeit befriedigend ist.

Résumé

Les avantages et désavantages des diverses méthodes utilisées pour la détermination d'antigènes leucocytaires spécifiques («groupage leucocytaire») sont brièvement énumérés. En Suisse, la technique de lymphocytotoxicité d'après TERASAKI a été introduite comme méthode unique, la préparation des suspensions lymphocytaires étant toutefois affectuée plus simplement par une centrifugation sur gradient. Le groupage leucocytaire peut aujourd'hui être considéré comme une technique de routine, dont la reproducibilité est satisfaisante.

Riassunto

Si discutono brevemente i vantaggi e gli svantaggi dei differenti metodi che possono essere usati per determinare gli antigeni leucocitari specifici (si parla in tal caso di tipizzare i leucociti). In Isvizzera fu introdotta quale metodo unificato la tecnica secondo TERASAKI, basata sulla tossicità dei linfociti; in questo caso la preparazione della sospensione linfocitaria è ottenuta grazie ad un sistema semplificato della centrifugazione graduata. Tipizzare i leucociti è diventato oggi una tecnica abituale, riproducibile in maniera soddisfacente.

Summary

The advantages and disadvantages of the various methods which may be used to determine specific leukocyte antigens ("leukocyte typing") are briefly discussed. In Switzerland, the lymphocytotoxicity technique according to TERASAKI has been introduced as unique method, the preparation of lymphocyte suspension being however performed by a simple gradient centrifugation. Leukocyte typing may be considered nowadays as a routine investigation with a satisfactory reproducibility.

1. KISSMEYER-NIELSEN F. und KJERBYE K. E.: Histocompatibility Testing 1967, S. 381. Munksgaard, Kopenhagen.
2. BOYUM A.: Scand. J. clin. Lab. Invest. *21*, Suppl. 97 (1968).

Adresse des Autors: PD. Dr. A. de Weck, Abteilung für Allergie und Klinische Immunologie, Dermatologische Klinik, Inselspital, 3008 Bern.