

Aus dem Zentralinstitut für Transfusionsmedizin in Hamburg

Ärztl. Direktor: Professor Dr. med. A. Poschmann

# Durchflußzytometrische Untersuchungen adulter und fetaler Erythrozyten

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Aus dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

Vorgelegt von

M a r t i n K l u x e n

aus Hamburg

Hamburg 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg: 14. Juni 1999

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. K. Fischer

Korreferent: Prof. Dr. P. Kühnl

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methode	5
2.1. Flowzytometrie in der Immunhämatologie	5
2.2. Das Durchflußzytometer	5
2.2.1. Flußsystem	5
2.2.2. Optisches System	6
2.2.3. Elektronisches System	6
2.3. Darstellung der Meßergebnisse - Datenanalysesystem	8
2.3.1. Gating und Setzen eines Schwellenwertes	8
2.3.2. Histogramm Größe vs. Granulation	8
2.3.3. Histogramm Anzahl vs. Fluoreszenzintensität	8
2.4. Grundeinstellung	10
2.5. Datenauswertung	10
2.6. Geräte	13
2.7. Reagenzien	13
2.7.1. Blutgruppen-Testreagenzien	13
2.7.1.1. Anti-A-Serum	13
2.7.1.2. Anti-D-Serum	13
2.7.2. FITC-markiertes Anti-Human-IgG-Globulinserum	13
2.8. Sonstige Reagenzien	13
2.9. Lösungen und Puffer	14
2.9.1. Herstellung von Phosphate-Buffered-Saline (PBS), pH 7,2	14
2.9.2. Herstellung von Phosphatpuffer pH 8,2, 1% Humanalbumin	14
2.9.3. Herstellung von 0,1 M Glycin-Lösung, pH 3,0	14
2.9.4. Herstellung von Digitoninsäure - Lösung 0,5 %	14
2.9.5. Herstellung der Fixierlösung mit Dimethylsuberimidate (DMS)	14
2.10. Herstellung der Erythrozytensuspensionen	15
2.11. Digitoninsäureelution zur Herstellung von IgG-anti-A-Eluat	15
2.12. Antikörperverdünnungen	16
2.12.1. Verdünnung des Anti-Human-IgG-FITC-F(ab') <sub>2</sub> -Fragmentes	16
2.12.2. Verdünnung des IgG1-anti-D <sub>4</sub>	16
2.12.3. Verdünnung des IgG-anti-A Eluates	16
2.13. Fixierung der Erythrozyten	18
2.13.1. Fixierung mit Paraformaldehyd	18
2.13.2. Fixierung mit Dimethylsuberimidate	18
3. Ergebnisse	19
3.1. Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Auswirkung der Fixierung von Erythrozyten mit Paraformaldehyd und Dimethylsuberimidate	19

3.1.1.	Auswirkung der Fixierung auf die Fluoreszenz nicht markierter Erythrozyten	20
3.1.2.	Auswirkung der chemischen Fixierung auf die Fluoreszenz nach Inkubation mit Anti-Human-IgG-FITC-F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	21
3.1.3.	Auswirkung der chemischen Fixierung auf die Fluoreszenz nach Inkubation mit IgG1-anti-D <sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	22
3.2.	Rh(D)-Eigenschaft adulter und fetaler Erythrozyten	25
3.2.1.	Rh-Eigenschaft D <sup>weak</sup>	29
3.3.	Nachweis und Quantifizierung kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Gemischen mit adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten	30
3.3.1.	Durchflußzytometrische Untersuchungen von Gemischen mit fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten und adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten zum Nachweis und zur Quantifizierung kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten	31
3.3.2.	Vergleichende Messungen der Quantifizierung fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten mit einer HbF-Färbemethode und durchflußzytometrischem Nachweis der Rh(D)-Eigenschaft	33
3.3.2.1.	Auswirkung der Probenalterung auf den Nachweis und die Quantifizierung kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Gemischen mit adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten	35
3.3.3.	Nachweis kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten - Eine Auswertung durch Darstellung der Summationskurven	37
3.3.3.1.	Beschreibung einer feto-maternalen-Transfusion bei Rhesus (D)-Inkompatibilität	39
3.4.	A-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten	41
3.4.1.	A-Eigenschaft fetaler A <sub>1</sub> -Erythrozyten bei Mutter/Kind-Konstellationen 0/A <sub>1</sub> und A/A <sub>1</sub>	44
4.	Diskussion	46
5.	Zusammenfassung	53
6.	Literaturverzeichnis	57
7.	Anhang	63
8.	Danksagung	83
9.	Lebenslauf	84

## 1. Einleitung

Der Nachweis der genetisch determinierten Rh(D)- und A-Blutgruppeneigenschaften von Humanerythrozyten geschieht im immunhämatologischen Labor in der Regel durch unterschiedliche Hämagglutinationsreaktionen. Nahezu alle Maßnahmen, welche die Empfindlichkeit des Antigen- bzw. Antikörpernachweises erhöhen, beziehen sich auf eine Verstärkung der Hämagglutination [13].

Die mit geringem technischen Aufwand durchführbare Hämagglutination, die ein hohes Maß an meist gut reproduzierbaren qualitativen Ergebnissen erreicht hat, führt leider nicht zu objektiv archivierbaren Meßwerten. Es ergeben sich insbesondere folgende Nachteile dieser Methode :

- Das Ergebnis ist von der subjektiven Beurteilung und Erfahrung des Untersuchers abhängig.
- Hämagglutinate in Mischpopulationen bzw. schwache Hämagglutinationsreaktionen können vom Untersucher übersehen werden.
- Die Auflösung einer Hämagglutinationsreaktion ist gering, erst Titerdifferenzen einer geometrischen Verdünnungsreihe von 2 - 3 Stufen können sicher unterschieden werden.

Unter Berücksichtigung der geschilderten Problematik wird in der vorliegenden Arbeit erläutert, ob es mit Hilfe der Durchflußzytofluorometrie möglich ist, zu einem einfachen, schnellen und vor allem exakten Nachweis der A- bzw. Rh(D)-Eigenschaften von fetalen und adulten Erythrozyten zu gelangen.

Der Nachweis der Blutgruppeneigenschaften A und Rh(D) bei Feten und Neugeborenen sowie der Nachweis kleiner Populationen Rh(D)-positiver fetaler Erythrozyten in Rh(D)-negativem mütterlichen Blut ist von praktischer Bedeutung bei der Abklärung der Pathogenese des Morbus haemolyticus neonatorum (Mhn) durch AB0-Inkompatibilität (AB0-Erythroblastose) [16, 17] und Rh(D)-Inkompatibilität (Anti-D-Erythroblastose), woraus sich diagnostische und therapeutische Konsequenzen ergeben können [19, 22, 31, 35].

Im Gegensatz zu der Anti-D-Erythroblastose bleiben die meisten Feten bei der Anti-A-Erythroblastose vor der Geburt gesund, auch wenn bei der Mutter sehr hohe IgG-anti-A-Titerwerte nachzuweisen sind. Es erscheint daher von Interesse, ob sich durchflußzytofluorometrisch Unterschiede im Spektrum der A-Eigenschaft von A<sub>1</sub>-Erythrozyten reifer, gesunder Neugeborener bei Mutter/Kind Konstellation 0/A<sub>1</sub> bzw. A/A<sub>1</sub> erkennen lassen.

Auch bei der Anti-D-Erythroblastose gibt es unterschiedliche klinische Verlaufsformen, wobei neben der unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit der Immunglobulinklas-

sen von IgG-anti-Rh(D) [69, 74, 75] auch die Zahl der genetisch determinierten Rh(D)-Epitope von Bedeutung ist.

Im Zusammenhang mit dem klinisch schweren Krankheitsbild der Anti-D-Erythroblastose wird untersucht, in welchem Ausmaß sich die bereits vor der Geburt vorhandene starke Ausprägung der fetalen Rh(D)-Eigenschaft durchflußzytofluorometrisch darstellen läßt und ob sich hierbei eine unterschiedliche Ausprägung bei den verschiedenen Rh-Untergruppen zeigt.

Durchflußzytofluorometrische Untersuchungen scheinen dazu besonders geeignet, da durch dieses Verfahren die unterschiedliche Antikörperbindung des einzelnen Erythrozyten erfaßt werden kann. Diese Information kann durch Hämagglutinationsreaktionen nicht erbracht werden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die verbesserte statistische Auswertung der Meßdaten, insbesondere die graphische Darstellung der Untersuchungsergebnisse [21, 53, 59, 72].

Es wurden bei jeder Messung eine große Anzahl von Erythrozyten erfaßt und die Fluoreszenzintensität der einzelnen Erythrozyten in 256 Kanälen registriert. Zur Auswertung der Daten werden die Kanalinhalt des FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramms herangezogen. Nach Speicherung der durch ein Computerprogramm gewonnenen Daten [53] stehen diese Kanalinhalt für vergleichende Untersuchungen und Verlaufskontrollen zur Verfügung. Mit einem weiteren Computerprogramm [21] kann anschließend sowohl eine exakte statistische Auswertung als auch eine vergleichende graphische Darstellung vieler Einzelbefunde in einem Diagramm durchgeführt werden. Diese Auswertungsmethode und unsere in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse der Analyse fetaler A- und Rh(D)-Eigenschaften sind bereits in der von *Gutensohn, Sonneborn und Kühnl* [30, 59] herausgegebenen Monographie erschienen. Diese Methode ist durch folgende Merkmale charakterisiert:

- Die Meßwerte liegen in einer speicher- und abrufbaren Form mit einem allgemein verfügbaren Computer vor.
- Zu Vergleichszwecken und für Verlaufskontrollen ist die gleichzeitige graphische Darstellung mehrerer Messungen möglich.
- Die Meßwerte als Inhalt von 256 Kanälen (256 Befunde pro Messung) erlauben eine gezielte mathematische Auswertung.

Vor dem Hintergrund der einleitend beschriebenen Nachteile von Hämagglutinationsreaktionen werden jetzt mit Hilfe der verbesserten Auswertungsmethode folgende Ansätze durchflußzytofluorometrischer Untersuchungen von fetalen und adulten Erythrozyten durchgeführt :

- Indirekte Immunfluoreszenzdarstellung von Rh(D)- bzw. A-Rezeptoren fetaler und adulter Erythrozyten zur durchflußzytofluorometrischen Charakterisierung der Ausprägung dieser Eigenschaften.

- Durchflußzytofluorometrische Untersuchung von adulten Erythrozyten mit der schwachen Rh(D)-Eigenschaft (D<sup>weak</sup>).
- Durchflußzytofluorometrischer Nachweis kleiner Populationen (unter 5 Promille) fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Rh(D)-negativem Blut im Sinne einer fetomaternalen Transfusion.

Die Untersuchungen der Rh(D)-Eigenschaft wurden mit einem monoklonalen IgG1-anti-D<sub>4</sub>-Antikörper, der uns von der Firma BIOTEST Pharma GmbH zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt. Dieser Antikörper erkennt spezifisch das Epitop 4, eines von 37 heute bekannten Epitopen des Rh(D)-Antigens.

IgG-anti-A wurde aus einem Anti-A-Testserum nach Absorption an A<sub>1</sub>-Erythrozyten und anschließender Hämolyse mit Digitoninsäure und Elution mit Glycin-Puffer gewonnen.

Bei Untersuchungen der A- und Rh(D)-Eigenschaft von Erythrozyten kommt es bedingt durch die hohe Antigendichte der Rezeptoren zur partiellen Hämagglutination. Die Hämagglutinate können die durchflußzytofluorometrische Messung stören oder sogar unmöglich machen [67]. Es werden daher folgende Möglichkeiten der `Desagglutination` besprochen und untersucht:

- Mechanische Auflösung von Hämagglutinaten.
- Chemische Vorbehandlung von Erythrozyten mit Paraformaldehyd (PFA) und Dimethylsuberimidate (DMS).
- Verwendung von FITC-markiertem Anti-Human-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment.

Es ist die Absicht der vorliegenden Dissertation zu klären, ob mit der Durchflußzytofluorometrie eine einfache, schnelle und vor allem exakte Diagnostik der erythrozytären A- bzw. Rh(D)-Eigenschaften von fetalen und adulten Erythrozyten möglich ist.

Es wird besonderer Wert auf die unterschiedliche Antikörperbindung der einzelnen Erythrozyten gelegt, da andere Nachweismethoden, insbesondere die Hämagglutination, diese Information nicht geben. Weiterhin ist von Interesse, ob die in dieser Arbeit benutzte Auswertungsmethode mit Darstellung der Meßdaten als Summationskurven und vor allem mit der Möglichkeit, viele Einzelbefunde in einem Diagramm vergleichend darzustellen, sich als eine Verbesserung und Vereinfachung erweist.

Folgende Fragen sollen im Verlauf dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Welche Auswirkung hat die Fixierung von Erythrozyten mit Paraformaldehyd und Dimethylsuberimidate zur Vermeidung einer störenden Hämagglutination auf den durchflußzytofluorometrischen Nachweis der Rh(D)-Eigenschaft ?

2. Kann durch Auswahl geeigneter primärer bzw. sekundärer Antikörper und Optimierung des Reaktionsablaufes die störende Hämagglutination minimiert und somit auf eine Fixierung der Erythrozyten verzichtet werden ?
3. Lassen sich, im Hinblick auf die Pathogenese der Anti-D- bzw. AB0-Erythroblastose, die Unterschiede der Ausprägung der Rh(D)- bzw. A-Blutgruppeneigenschaft von fetalen und adulten Erythrozyten durchflußzytometrisch erkennen und weiter differenzieren ?
4. Zeigen sich durchflußzytometrisch Unterschiede in der Ausprägung der A-Eigenschaft von A<sub>1</sub>-Erythrozyten reifer, gesunder Neugeborener bei Mutter/Kind-Konstellationen O/A<sub>1</sub> und A/A<sub>1</sub> ?
5. Können bei feto-maternalen Transfusionen klinisch relevante Makrotransfusionen von mindestens 5 ‰ fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Gemischen mit Rh(D)-negativem Blut durchflußzytometrisch verläßlich nachgewiesen werden ?  
Ist die Durchflußzytometrie, was Genauigkeit und Reproduzierbarkeit betrifft, bisherigen Methoden, wie der HbF-Zellfärbung [40], überlegen ?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Flowzytometrie in der Immunhämatologie

Das Prinzip der Flowzytometrie ist seit den 50er Jahren durch *Coulter* [9] bekannt. Die Herstellung optischer Flowzytometer (Cytograf<sup>®</sup> und Cytofluorograf<sup>®</sup>) beruht im wesentlichen auf den Entwicklungen von *Kamentsky* [39].

1976 beschreibt *Herzenberg* [33] die verbesserte Version eines neu entwickelten Cell-Sorters, welcher mit einem starken Argon-Laser versehen war. Jetzt war es auch möglich, die relativ schwache Fluoreszenz von Zellen zu messen, die direkt mit Fluorescein oder Rhodamine markiert sind.

### 2.2. Das Durchflußzytometer

Bei dem für die vorliegende Dissertation verwendeten Gerät handelt es sich um das Durchflußzytometer CYTORON ABSOLUTE<sup>®</sup> der Firma ORTHO-Diagnostics GmbH.

Dieses setzt sich aus folgenden Hauptkomponenten zusammen: Flußsystem, optisches System, elektronisches System und Datenanalysesystem.

#### 2.2.1. Flußsystem

Die Zellen oder Partikel passieren in einem Flüssigkeitsstrom einen empfindlichen Apparat von Detektoren. Aufgabe dieses Systems ist, die Zellen/Partikel in einer konstanten Geschwindigkeit bei konstantem Druck durch das optische System zu befördern (Hydro-Dynamische-Fokussierung) [14, 65].

Bei der Hydro-Dynamischen-Fokussierung wird die Zellsuspension (‘Sample Fluid’) in eine partikelfreie Flüssigkeit (‘Sheath Fluid’) geleitet.

Hierbei sind Einstellungen des ‘Sheath-’ und ‘Sample-Fluid’, sowie Konzentrationen der Zell- oder Partikelsuspensionen so zu wählen, daß die Zellen/Partikel die Detektoren möglichst einzeln passieren. Die Beziehung von ‘Sample-’ zu ‘Sheath-Fluid’ stellt einen kritischen Punkt für die optische Auflösung des Systems dar. Die Veränderungen der optischen Auflösung resultieren vor allem aus den Veränderungen des Durchmessers des hydrodynamisch fokussierten Probenstromes.

### 2.2.2. Optisches System

Das optische System besteht aus einem Argonlaser (Wellenlänge 488 nm) zur Anregung der mit fluoreszierenden Farbstoffen (z.B. Fluoresceinisothiozyanat) markierten Zellen sowie aus einer Sammeleinheit aus optischen Filtern und Detektoren zur Messung des emittierten Lichts.

Im `Forward-Scatter` (FW-SC) werden Lichtimpulse gemessen, die in einem Winkel von 2°-20° zur Achse der Lichtquelle stehen. Lichtstreuung im 'Forward-Scatter' steht im Zusammenhang mit Zellvolumen oder Zellgröße, aber auch Faktoren wie Asymmetrie, Alterung der Zellen und zelluläre Komponenten, die in der Lage sind Licht zu absorbieren, beeinflussen die Lichtstreuung im 'Forward-Scatter'.

Die Detektoren des `Right-Angle-Scatter` (RT-SC) stehen 90° zur Lichtquelle. Im 'Right Angle Scatter' werden intrazelluläre Substanzen (Granula, Lysosomen), aber auch Oberflächenunregelmäßigkeiten gemessen.

Laserlicht, das ungestreut die Durchflußzelle passiert, wird vor der Optik des Forward-Scatter-Detektors und der Photomultiplier reflektiert. Nur das schwache Fluoreszenzlicht wird durchgelassen.

### 2.2.3. Elektronisches System

Photodetektoren wandeln die Lichtsignale in elektrische Impulse um, wobei Analogimpulse in digitale Signale umgeformt und anschließend in einem Computer gespeichert werden.

Zur Messung des relativ starken Laserlichts im `Forward-Light-Scatter` wird eine Halbleiter Photodiode verwendet.

Das schwache Fluoreszenz- und Seitenlicht wird durch Photomultiplier (PMT) verstärkt. Die Verstärkung der PMT hängt von der angelegten Spannung ab, die in der Regel 300 - 1000 Volt beträgt. Abhängig von der angelegten Spannung ist die optoelektrische Verstärkung  $10^3$ - bis  $10^8$ -fach.

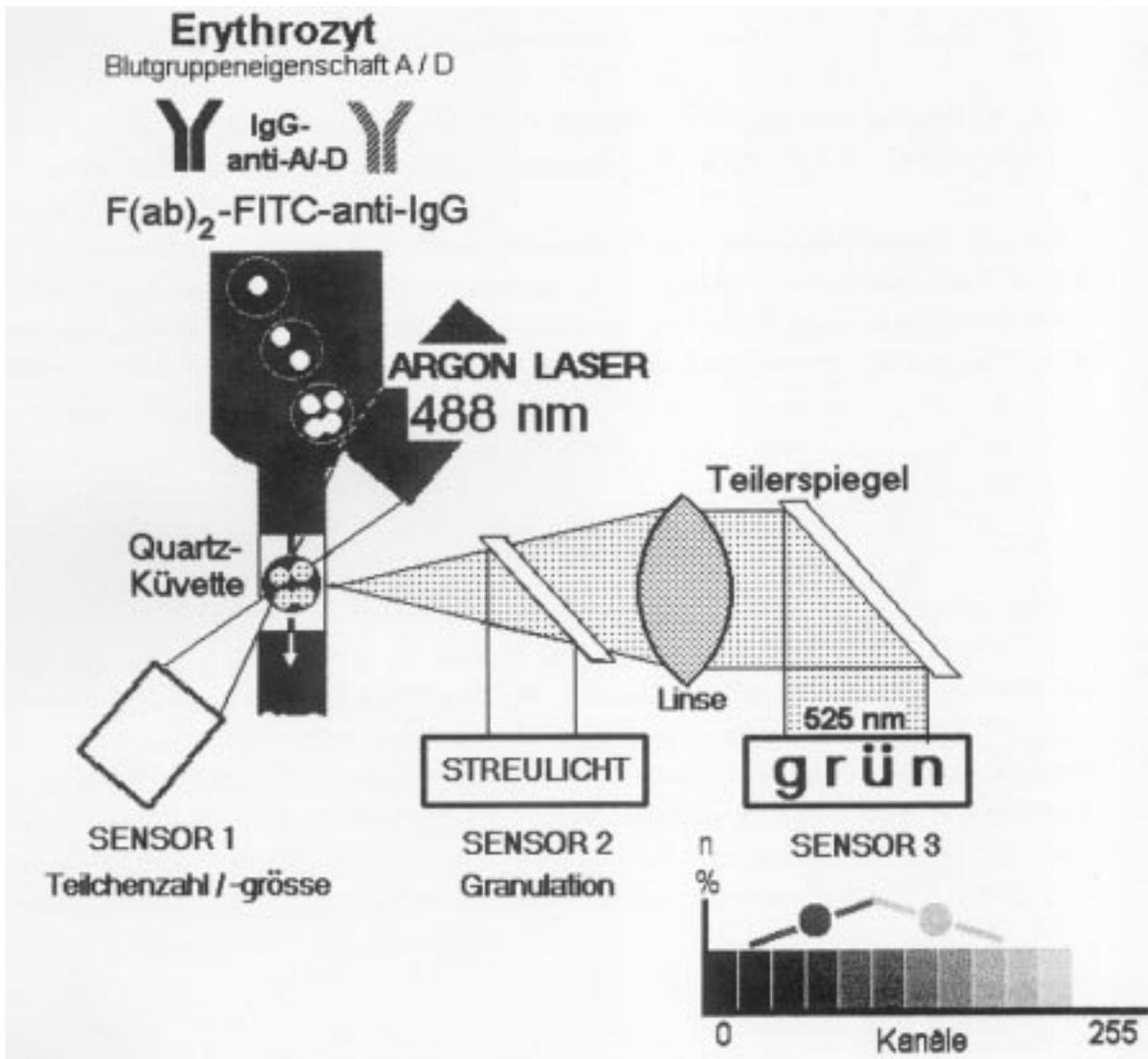


Abb. 1. Aufbau der Meßeinheit des Durchflußzytometers.

## 2.3. Darstellung der Meßergebnisse - Datenanalyzesystem

### 2.3.1. Gating und Setzen eines Schwellenwertes

Um eine Population zur weiteren fluoreszenzspezifischen Analyse auszuwählen, wird ein "Gate" (Bitmap) um eine Population von Interesse gelegt. Nur die Zellen innerhalb dieser Region werden dann analysiert.

Um unerwünschte Partikel (Zelltrümmer, tote Zellen) von der Analyse auszuschließen, wird ein Schwellenwert (Diskriminator) gesetzt. Alle Partikel, die Impulse unterhalb des Schwellenwertes erzeugen, werden automatisch von der Analyse ausgeschlossen. Diese oft sehr zahlreichen Partikel können nun die Messung der "Zielzellen" nicht mehr beeinflussen.

### 2.3.2. Histogramm Größe vs. Granulation (Abb. 2)

Im Histogramm Größe vs. Granulation werden auf der y-Achse die Größe der Zellen (FW-SC) und auf der x-Achse die Struktur der Zellen (RT-SC) dargestellt.

In diesem Histogramm werden sowohl die Gesamtzahl der Impulse (Total cells) als auch die im Gate gezählten Impulse (Gated cells) angegeben.

Es ist somit möglich, Zell-Subpopulationen auch ohne Fluoreszenzmarkierung durch die unterschiedliche Lichtstreuung im Forward-Scatter (FW-SC) und Right-Angle-Scatter (RT-SC) zu differenzieren. Mittelwert (Mode), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (CV) werden getrennt für das Forward-Scatter (FW-SC) und Right-Angle-Scatter (RT-SC) berechnet.

### 2.3.3. Histogramm Anzahl vs. Fluoreszenzintensität (Abb. 3)

Im Histogramm Anzahl vs. Fluoreszenzintensität wird auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität und auf der y-Achse die Anzahl der Zellen dargestellt. Die x-Achse wird logarithmisch eingeteilt (Kanal 0-255), wobei starke Fluoreszenzintensitäten rechts und schwache links aufgetragen werden. Der Grund, für die Immunfluoreszenz eine logarithmische Verstärkung zu wählen, liegt darin, daß die Verstärkung über vier Bereiche ( $10^1$ - $10^4$ ) stattfindet und somit bis zu 10 000 unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten differenziert werden können. Auch in dieser Darstellung läßt sich ein Gate definieren. In dem gezeigten Beispiel liegt das Gate zwischen Kanal 35 und 36. Alle Ereignisse (Impulse), die zwischen Kanal 0 und 35 liegen, werden als `negativ`, alle Ereignisse (Impulse) zwischen Kanal 36 und 255 werden als `positiv` gewertet. Für jedes Areal werden Mittelwert (Mode), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (CV) berechnet.

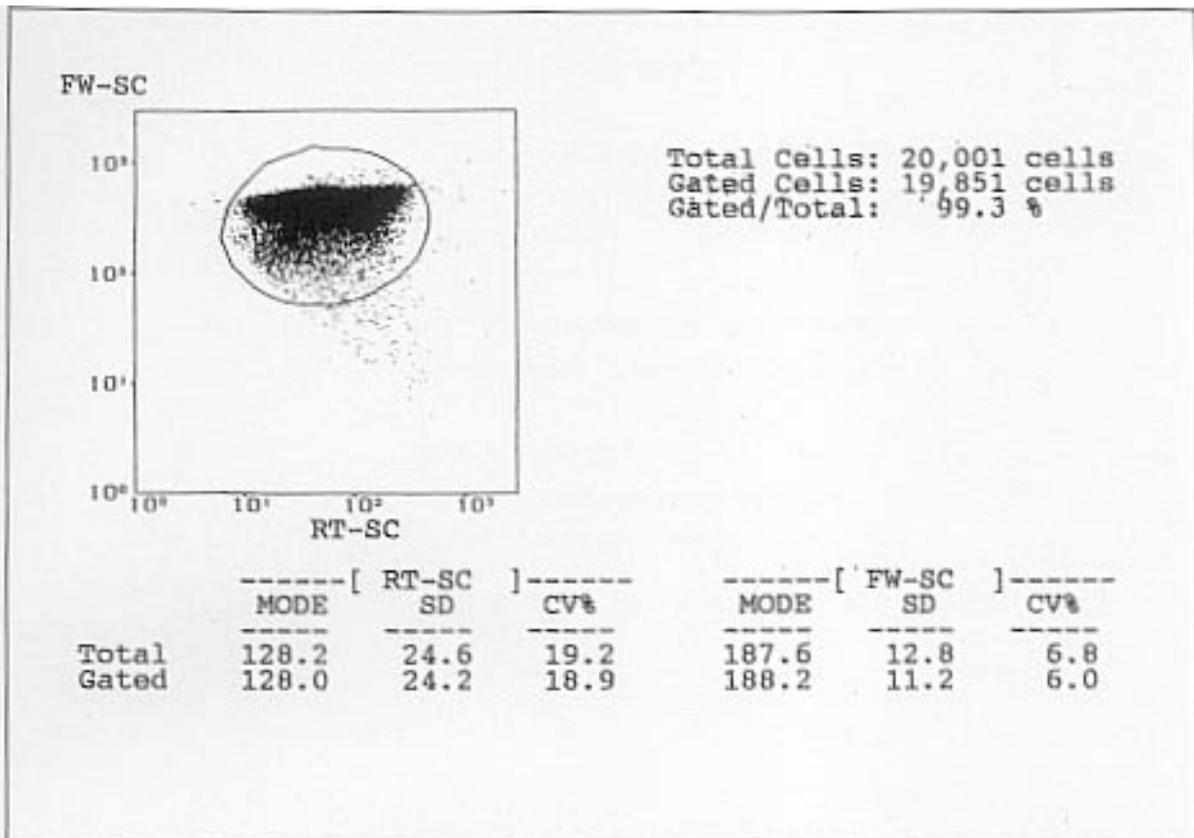


Abb. 2. Histogramm Größe (FW-SC) vs. Granulation (RT-SC)

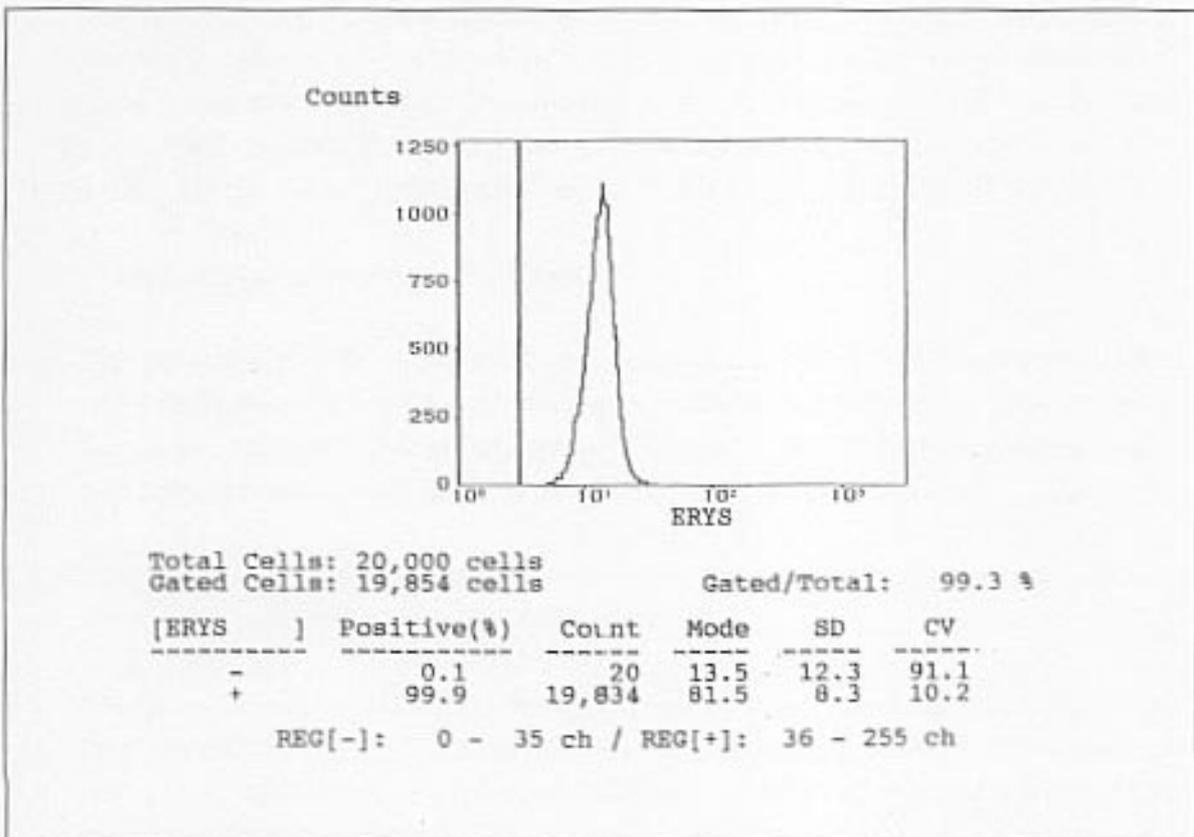


Abb. 3. Histogramm Anzahl (y-Achse) vs. Fluoreszenzintensität (x-Achse)

## 2.4. Grundeinstellung

Die Grundeinstellungen des Gerätes sind folgende:

Zellzahl pro Messung : 40 000 (65 000 zum Nachweis fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Gemischen mit adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten)

Fließgeschwindigkeit : Sample-rate (Probenstrom) : middle  
Sheath rate (Hüllstrom) : middle

Verstärkungen : Vorwärtsstreulicht 15  
Rechtwinkliges Streulicht 50  
Grünfluoreszenz (FITC) 90

Rauschunterdrückung : Kanal 216  
Winkel - 42°

## 2.5. Datenauswertung

Die Datenauswertung der ersten Untersuchungen erfolgte durch Unterteilung des Histogramms Anzahl vs. Fluoreszenzintensität (Abb. 2) durch ein Gate in ein 'negativ'- (Kanal 0-35) und ein 'positiv'-Areal (Kanal 36-255). Dieses Gate wurde ermittelt indem 100 Blutproben gesunder Erwachsener, mit Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment inkubiert, untersucht wurden. Das Gate wurde daraufhin so definiert, daß sich maximal 0,1% der Gesamtpulse im 'positiv'-Areal (Kanal 36- 255) befinden.

Diese Methode hat gravierende Nachteile:

- Die Software des Durchflußzytofluorometers kann den Inhalt einzelner Kanäle nicht darstellen. Eine differenzierte mathematische Auswertung ist nicht möglich. Die Auswertung beschränkt sich auf den Mittelwert, die Standardabweichung und den Variationskoeffizient der in einem Areal gemessenen Impulse.
- Die graphische Darstellung der Verlaufskurven mehrerer Messungen mit direktem Vergleich in einem Diagramm ist nicht möglich.
- Die Daten können nur in einem speziellen Format gespeichert werden (\*.fcs-Datei, IMMUNOCOUNT II, v 1.0). Diese Dateien belegen einen großen Speicherraum, so daß bei 40 000 Zellen pro Messung auf einer 1,4 MB Diskette nur 4 Messungen gespeichert werden können.

- Das Format der gespeicherten Dateien ist von üblichen Datenverarbeitungsprogrammen (Microsoft Excel, Access) nicht weiter zu bearbeiten.

Um diesen Nachteilen zu begegnen, wurde von *Fischer* [21] und *Niesytto* [53] ein Computerprogramm entwickelt, welches aus den Dateien des Durchflußzytfluorometers (\*.fcs-Dateien) die für die Auswertung relevanten Daten des Grün-Fluoreszenz-Histogramms 'heraussucht' und in einem üblichen Format (\*.txt-Datei) speichert. Diese Dateien (\*.txt-Dateien) haben eine Größe von etwa 1 KB. Somit können etwa 1000 Messungen auf einer 1,4 MB Diskette gespeichert werden. In diesen Dateien werden nur die relevanten Inhalte der 256 Kanäle des Grün-Fluoreszenz-Histogramms gespeichert.

Weiterhin wurde die Software von *Fischer* [21] soweit verbessert, daß aus den ermittelten Daten eine mathematisch-statistische Auswertung mit gleichzeitiger graphischer Darstellung mehrerer Messungen erfolgen konnte.

Abweichend von der ursprünglichen Einteilung der Fluoreszenzintensität (x-Achse) von Kanal 0 bis 255, wird aus mathematischen Gründen der Bereich der x-Achse von Kanal 1 bis 256 eingeteilt.

Um mehrere Befunde gleichzeitig darstellen zu können, werden Summenprozentverteilungskurven (= Summationskurven) berechnet, wobei die Inhalte (=Impulse) von Kanal 256 bis 1 summiert werden. Bei jetzt prozentualer Teilung der y-Achse enthält Kanal 1 somit 100 Prozent der Impulse.

Um zu einer mathematischen Auswertung zu gelangen, wurde aus den Summationskurven empirisch ein Intervall 'herausgeschnitten', das die Ereignisse über 20% und unter 80% enthält. An diesen Intervallen konnte eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt werden, wobei neben dem Regressionskoeffizienten und der Korrelation vor allem der 50%-Schnittpunkt mit der errechneten Regressionsgeraden und die Abweichungen zur Auswertung herangezogen wurden (Abb. 4).

Vorteil dieser Methode ist die exakte mathematische Berechnungsmöglichkeit als Grundlage für eine statistische Auswertung der Ergebnisse.

Mit dieser Software ist folgende graphische Darstellung und mathematisch-statistische Auswertung der Daten möglich :

- Summenprozentverteilungskurven: Durch diese neue Darstellung lassen sich in einem Diagramm mehrere Kurven (Messungen) darstellen, unmittelbar miteinander vergleichen und differenzieren.
- Mathematische Auswertung: Auswahl eines Intervalls zwischen 20% und 80% mit Angabe der Kanalnummer, Regressionsanalyse, Erstellung einer Regressionsgeraden, Korrelation, Standardabweichung sowie dem errechneten 50%-Kanal.

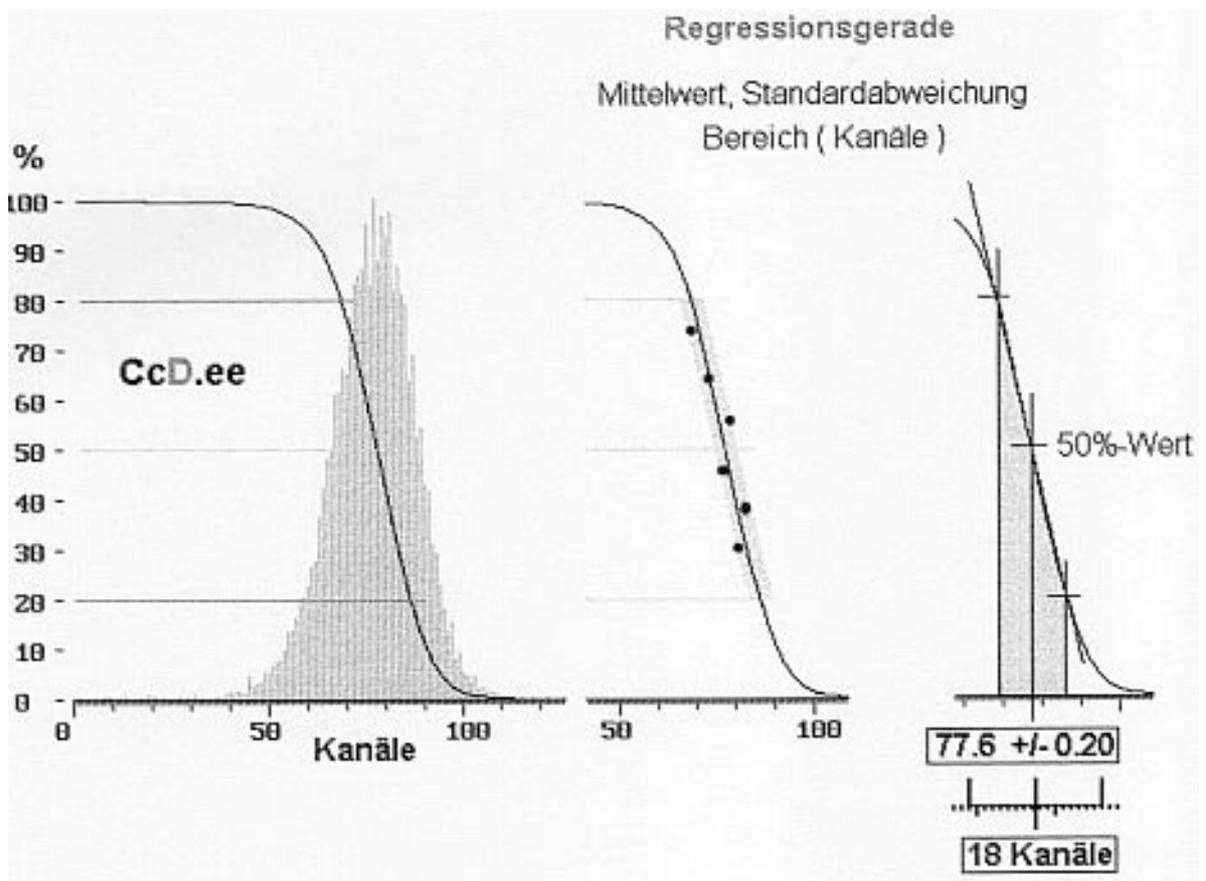


Abb. 4. Befunddarstellung als Summationskurve mit statistischer Auswertung

## 2.6. Geräte

Die Konzentrationseinstellung der Erythrozytensuspensionen erfolgt mit folgendem Zell-Counter:

COULTER<sup>®</sup> T 660, Coulter Electronics GmbH, Krefeld.

## 2.7. Reagenzien

### 2.7.1. Blutgruppen-Testreagenzien

#### 2.7.1.1. Anti-A-Serum

- Anti-A Blutgruppentestreagenz, Immucor GmbH, Rödermark, Ch.-B. 2H191.

#### 2.7.1.2 Anti-D-Serum

- IgG1-anti-D (=IgG1-anti-D<sub>4</sub>), human monoklonal, BIOTEST Pharma GmbH, Dreieich.

### 2.7.2 FITC-markiertes Anti-Human-IgG-Globulinserum

- Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment vom Kaninchen, DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg, Lot.: 012C, Code F 315 02.

## 2.8. Sonstige Reagenzien

- Dimethylsuberimidate (DMS) 5 g, SIGMA CHEMIE GmbH, Deisenhofen, Deutschland, Lot.: 21H3732.
- Humanalbumin 5%, Behringwerke AG, Marburg, Ch.-B 900123
- Phosphatpuffer pH 7,2, eigene Herstellung (s. 2.9.1.)
- Phosphatpuffer pH 8,2, 1% Humanalbumin, eigene Herstellung (s. 2.9.2.)
- Glycin-Puffer, pH 3,0, eigene Herstellung (s. 2.9.3.)

## 2.9. Lösungen und Puffer

### 2.9.1. Herstellung von Phosphate-Buffered-Saline (PBS), pH 7,2

NaCl	85,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	13,4 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	3,9 g
Aqua dest.	ad 1000,0

### 2.9.2. Herstellung von Phosphatpuffer pH 8,2, 1% Humanalbumin

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,96 g
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,38 g
Humanalbumin 5%	20 ml
Aqua dest.	ad 100,0

### 2.9.3. Herstellung von 0,1 M Glycin-Lösung, pH 3,0

Glycin	0,751 g
Aqua dest.	ad 100,0

Die Lösung wird mit 1 N HCl auf pH 3 eingestellt. Lagerung bei 4°C.

### 2.9.4. Herstellung von Digitoninsäure - Lösung 0,5 %

0,25 g Digitoninsäure in 50 ml Aqua dest. auflösen. Lagerung bei 4°C.

### 2.9.5. Herstellung der Fixierlösung mit Dimethylsuberimide (DMS)

5 ml 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung  
5 ml 0,15 M NaCl-Lösung  
30 mg Dimethylsuberimide

## 2.10. Herstellung der Erythrozytensuspensionen

Um für alle Untersuchungen annähernd gleiche Konzentrationen der Erythrozytensuspensionen zu gewährleisten, wird die Zellzahl einer Meßprobe jeweils mit einem Zell-Counter (COULTER<sup>®</sup> T 660, Coulter Electronics GmbH, Krefeld) eingestellt.

- Dreimaliges Waschen von Erythrozyten aus EDTA-Blut mit PBS. Zentrifugation bei 600 g für 5 Minuten, Absaugen des Überstandes.
- 1 Teil Erythrozytensediment + 1 Teil PBS ( $\approx$  50 %ige Erythrozytensuspension), anschließende Messung im Zell-Counter.
- Für Immunfluoreszenzuntersuchungen der Rh(D)-Eigenschaft wurde die Zellzahl auf 250 000 Erythrozyten pro  $\mu$ l PBS eingestellt.
- Für Immunfluoreszenzuntersuchungen der A-Eigenschaft wurde die Zellzahl auf 100 000 Erythrozyten pro  $\mu$ l PBS eingestellt.

## 2.11. Digitoninsäureelution zur Herstellung von Anti-A<sub>Hu</sub>-Eluat

IgG-anti-A wurde aus einem Anti-A-Blutgruppentestserum (Immucor GmbH, Rödermark) nach Adsorption an adulte A<sub>1</sub>-Erythrozyten gewonnen. Es wurde einmalig eine größere Menge Anti-A eluiert, um für alle Versuche das gleiche Ausgangsmaterial zur Verfügung zu haben. Die folgenden Arbeitsschritte wurden in mehreren großen Reagenzgläsern durchgeführt. Die Angaben beziehen sich jeweils auf ein Reagenzglas:

- Dreimaliges Waschen von adulten A<sub>1</sub>-Erythrozyten aus EDTA-Blut mit PBS. Zentrifugation bei 600 g für 5 Minuten, Absaugen des Überstandes.
- Inkubation von 1 ml Erythrozytensediment mit 4 ml Anti-A-Blutgruppentestserum eine Stunde bei 37°C im Wasserbad.
- Dreimaliges Waschen in isotoner NaCl-Lösung, wobei darauf zu achten ist, daß die Agglutinate nach jedem Waschgang möglichst gut gelöst werden.
- Erythrozytensediment mit 9 ml isotoner NaCl-Lösung auffüllen und gründlich mischen, die Agglutinate sollten sich lösen.
- Zugabe von 1 ml 0,5%ige Digitoninsäurelösung. Mischen bis alle Erythrozyten hämolysiert sind.
- Das Hämolysat bei 1000 g für 5 Minuten zentrifugieren. Überstand absaugen.
- Erythrozytenstroma fünfmal in isotoner NaCl-Lösung waschen, Zentrifugation bei 1000 g für 2 Minuten, Absaugen des Überstandes.
- Bodensatz mit 300  $\mu$ l einer 0,1 M Glyzin-Lösung (pH 3.0) versetzen. Erythrozytenstroma vollständig resuspendieren.
- Resuspendiertes Stroma bei 1000 g für 5 Minuten zentrifugieren.
- Eluatüberstand in ein Reagenzglas überführen, in dem sich 30  $\mu$ l eines 0,8 M Phosphatpuffers, der 1 %tig Humanalbumin enthält, befinden.
- Zentrifugieren des neutralisierten Eluates bei 1000 g für 2 Minuten.
- Eluat abheben, portionieren und bei -20°C einfrieren.

## **2.12. Antikörperverdünnungen**

### *2.12.1. Verdünnung des Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes*

Die Herstellung der Erythrozytensuspension erfolgt wie unter 2.10. beschrieben. Zur Sensibilisierung werden 50 µl des primären Antikörpers (IgG1-anti-D<sub>4</sub>, IgG-anti-A) mit 50 µl Erythrozytensuspension für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend werden die Erythrozyten für 20 Minuten mit 50 µl des Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes unter Lichtabschirmung inkubiert. Die Verdünnung des Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragmentes von 1:30 in PBS erwies sich im Hinblick auf unspezifische Reaktionen und starke Fluoreszenz als optimal.

### *2.12.2. Verdünnung des IgG1-anti-D<sub>4</sub>*

Die Herstellung der Erythrozytensuspension erfolgt wie unter 2.10. beschrieben. Das Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment wird 1:30 in PBS verdünnt. Im Reagenzglas werden 50 µl Erythrozytensuspension mit 50 µl IgG1-anti-D<sub>4</sub> bei 37°C im Wasserbad 30 Minuten inkubiert. Nach Inkubation erfolgt die Zugabe von 50 µl Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment. Die Inkubation erfolgt für 20 Minuten unter Lichtabschirmung bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit 5 ml PBS aufgefüllt. Vor der Messung wird die Probe vorsichtig geschüttelt, um schwache Agglutinate aufzulösen. Die Verdünnung des IgG1-anti-D<sub>4</sub> von 1:10 in PBS erwies sich im Hinblick auf unspezifische Reaktionen und starke Fluoreszenz als optimal.

### *2.12.3. Verdünnung des IgG-anti-A Eluates*

Die Herstellung der Erythrozytensuspension erfolgt wie unter 2.10. beschrieben. Das Anti-Human-IgG FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment wird 1:30 in PBS verdünnt. Im Reagenzglas werden 50 µl Erythrozytensuspension mit 50 µl IgG-anti-A-Eluat für 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Inkubation werden 50 µl FITC-markiertes Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment zugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschirmung inkubiert. Anschließend wird mit 5 ml PBS aufgefüllt. Um Agglutinate zu lösen, wird vor der Messung 1 ml der Probe entnommen und mehrmals durch die Spitze einer blauen Eppendorfpipette gezogen. Eine Verdünnung des IgG-anti-A-Eluats von 1:2 in PBS erwies sich als optimal.

## IgG1-anti-D<sub>4</sub>

human / monoklonal (Epitop 4)

BIOTEST

## IgG-anti-A

human / polyklonal

IMMUCOR (CH.-B. 2H191)

### Digitoninsäureelution

zur Herstellung von  
IgG-anti-A-Eluat (vgl. 2.10.)

## Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment

DAKO Diagnostica (Lot.: 012C, Code F 315 02)

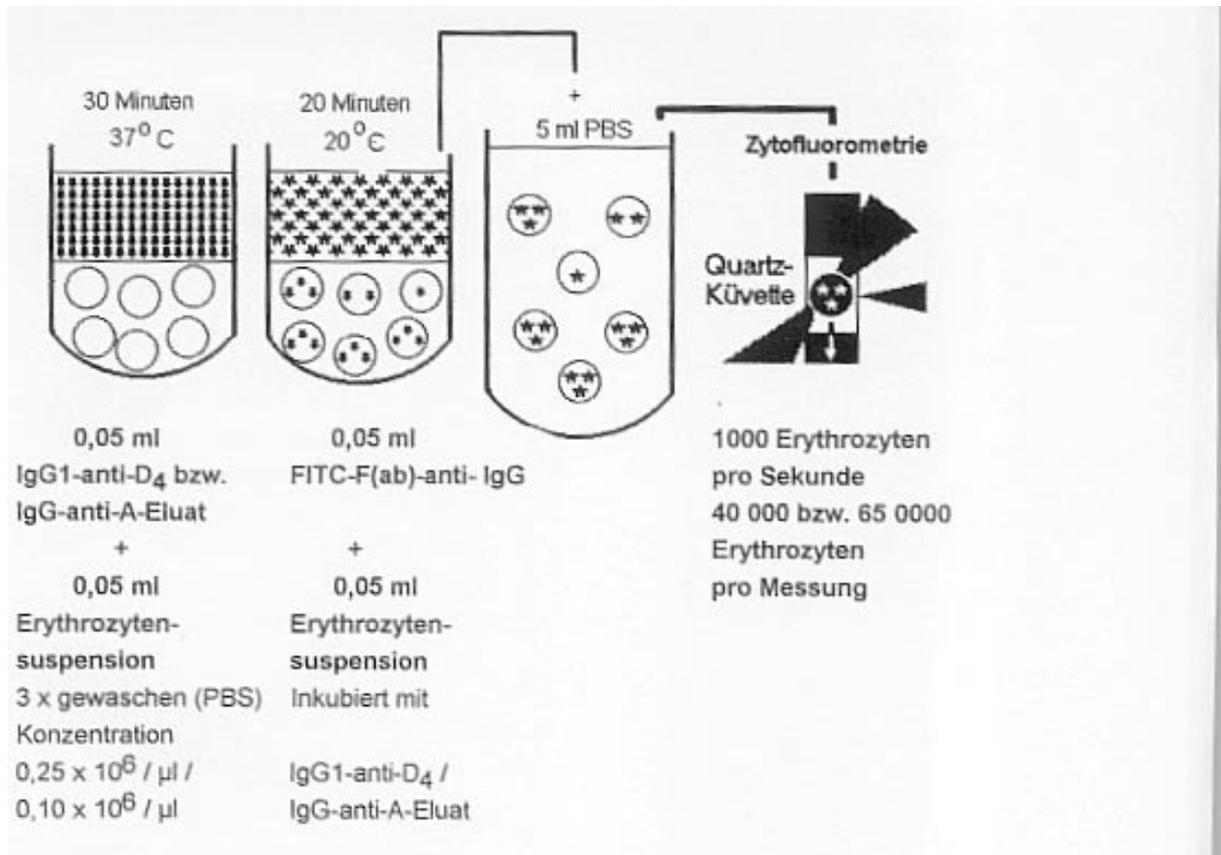


Abb. 5. Übersicht der Methode zum Nachweis der Rh(D)- bzw. A-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten

## 2.13. Fixierung der Erythrozyten

### 2.13.1. Fixierung mit Paraformaldehyd

Die Fixierung erfolgt mit dreimal in isotoner Kochsalzlösung gewaschenen Erythrozyten aus EDTA-Blut.

Die Herstellung der Erythrozytensuspension erfolgt wie unter 2.10. beschrieben. Es wird 1 ml Erythrozytensuspension mit 4 ml 3,2%iger Paraformaldehydlösung versetzt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die fixierten Erythrozyten viermal in PBS gewaschen.

### 2.13.2. Fixierung mit Dimethylsuberimidate

Die Fixierung erfolgt mit dreimal in isotoner Kochsalzlösung gewaschenen Erythrozyten. Die Herstellung der Erythrozytensuspension erfolgt wie unter 2.10. beschrieben.

Anschließend wird eine Fixierlösung mit Dimethylsuberimidate hergestellt (s. 2.9.5.).

200 µl Erythrozytensuspension und 1800 µl DMS-Fixierlösung werden für 30 Minuten bei 30 °C im Wasserbad inkubiert.

Die Erythrozyten müssen sofort in die frisch angesetzte DMS-Fixierlösung gegeben werden, da es sonst zu einer Hämolyse kommt.

Nach der Fixierung werden die Erythrozyten viermal in PBS gewaschen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Durchflußzytometrische Untersuchungen zur Auswirkung der Fixierung von Erythrozyten mit Paraformaldehyd und Dimethylsuberimidate

Ein wesentliches Problem durchflußzytometrischer Untersuchungen von Erythrozyten ist die störende Hämagglutination nach Zugabe des sekundären, Fluorescein-markierten Antikörpers. Die Hämagglutinate verfälschen die Meßergebnisse, da sie entweder durch den Meßprobenfilter des Durchflußzytometers eliminiert werden oder als eine einzelne, besonders stark fluoreszierende Zelle fehlinterpretiert werden. Es besteht die Möglichkeit, Erythrozyten zu fixieren, um die Hämagglutination zu hemmen.

Hierzu wurde die Auswirkung der chemischen Fixierung von Erythrozyten mit Paraformaldehyd (PFA) und Dimethylsuberimidate (DMS) am Beispiel des durchflußzytometrischen Nachweises der Rh(D)-Eigenschaft untersucht.

Diese Untersuchungen wurden mit adulten Rh(D)-positiven (0 CcD.Ee) und adulten Rh(D)-negativen (0 ccddee) Erythrozyten durchgeführt.

##### 3.1.1. Auswirkung der chemischen Fixierung auf die Fluoreszenz nicht markierter Erythrozyten

Im Durchflußzytometer wurde die Auswirkung der chemischen Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) und Dimethylsuberimidate (DMS) auf die Fluoreszenz 'nativer', unmarkierter adulter Rh(D)-positiver und Rh(D)-negativer Erythrozyten im FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramm untersucht (Tab 1. und Tab. 2).

Tab. 1. Fluoreszenz unbehandelter und fixierter Rh(D)-positiver Erythrozyten (0 CcD.Ee) im FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramm.

---

Erythrozyten	n	Mittelwert (50%-Kanal)	max./min. (50%-Kanal)	SD des 50%-Kanals	Kanäle >20%-<80%	max./min. (Kanäle)
unbehandelt	10	7,09	7,73 / 6,51	0,316	8,10	9 / 7
PFA fixiert	11	10,00	10,44 / 9,72	0,101	5,40	6 / 5
DMS fixiert	9	7,46	7,77 / 7,17	0,347	8,22	9 / 8

---

Tab. 2. Fluoreszenz unbehandelter und fixierter Rh(D)-negativer Erythrozyten (0 ccddee) im FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramm.

Erythrozyten	n	Mittelwert (50%-Kanal)	max./min. (50%-Kanal)	SD des 50%-Kanals	Kanäle >20%<80%	max./min. (Kanäle)
unbehandelt	9	7,20	7,57 / 6,69	0,265	7,77	9 / 6
PFA fixiert	8	9,73	10,25 / 9,23	0,178	5,63	7 / 4
DMS fixiert	9	7,49	7,89 / 7,12	0,278	7,89	9 / 7

Die Ergebnisse zeigen, daß insbesondere die Fixierung mit Paraformaldehyd zu einer deutlichen Fluoreszenzverstärkung 'nativer', unmarkierter Erythrozyten im FITC-Grün-Fluoreszenzhistogramm führt.

Die Fluoreszenz, gemessen am summierten 50%-Kanal, ist bei Paraformaldehyd fixierten Rh(D)-positiven Erythrozyten um 2,91 Kanäle und bei Rh(D)-negativen Erythrozyten um 2,53 Kanäle gegenüber den unbehandelten Erythrozytenproben erhöht.

Die Fixierung mit Dimethylsuberimidate führt zu einer sehr geringen Verstärkung der Fluoreszenz sowohl Rh(D)-positiver Erythrozyten (+ 0,37 Kanäle) als auch Rh(D)-negativer Erythrozyten (+ 0,29 Kanäle).

### 3.1.2. Auswirkung der chemischen Fixierung auf die Fluoreszenz nach Inkubation mit Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment

Im Durchflußzytofluorometer wurde jetzt die Auswirkung der chemischen Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) und Dimethylsuberimidate (DMS) auf die Fluoreszenz adulter Rh(D)-positiver und Rh(D)-negativer Erythrozyten im FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramm nach Inkubation mit Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment (Verdünnung 1:30 in PBS) untersucht (Tab. 3 und Tab. 4).

Tab. 3. Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment-Bindung an unbehandelte und fixierte adulte Rh(D)-positive Erythrozyten (O CcD.Ee).

Erythrozyten	n	Mittelwert (50%-Kanal)	max./min. (50%-Kanal)	SD des 50%-Kanals	Kanäle >20%-<80%	max./min. (Kanäle)
unbehandelt	10	7,09	7,739 / 6,567	0,316	8,20	9 / 7
PFA fixiert	11	14,26	15,22 / 14,62	0,269	13,63	15 / 14
DMS fixiert	11	8,92	9,26 / 8,45	0,435	14,27	15 / 13

Tab. 4. Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment-Bindung an unbehandelte und fixierte adulte Rh(D)-negative Erythrozyten (O ccddee).

Erythrozyten	n	Mittelwert (50%-Kanal)	max./min. (50%-Kanal)	SD des 50%-Kanals	Kanäle >20%-<80%	max./min. (Kanäle)
unbehandelt	10	7,33	7,89 / 7,13	0,281	8,00	8 / 6
PFA fixiert	11	13,67	14,95 / 12,15	0,264	12,82	14 / 9
DMS fixiert	11	8,90	9,17 / 8,15	0,376	13,82	14 / 13

Insbesondere durch die Fixierung mit Paraformaldehyd kommt es gegenüber den un-behandelten Erythrozytenproben zu einer deutlichen Fluoreszenzverstärkung bei Rh(D)-positiven (+ 7,17 Kanäle) und Rh(D)-negativen (+ 6,34 Kanäle) Erythrozytenproben im FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramm.

Mit Dimethylsuberimidate fixierte Erythrozyten zeigen geringgradig höhere Werte bei Rh(D)-positiven (+ 1,83 Kanäle) und auch bei Rh(D)-negativen (+ 1,57 Kanäle) Erythrozytenproben gegenüber den un-behandelten Proben.

### 3.1.3. Auswirkung der chemischen Fixierung auf die Fluoreszenz nach Inkubation mit IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment

Untersucht wurde die Auswirkung der chemischen Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) und Dimethylsuberimidate (DMS) auf die Fluoreszenz beim Nachweis der Rh(D)-Eigenschaft adulter Rh(D)-positiver und Rh(D)-negativer Erythrozyten nach Inkubation mit IgG1-anti-D<sub>4</sub> und anschließender Inkubation mit Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment (s. 2.12.2.).

Danach erfolgte die durchflußzytofluorometrische Messung (Tab. 5 und Tab. 6).

Tab. 5. IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Bindung an unbehandelte und fixierte adulte Rh(D)-positive Erythrozyten (0 CcD.Ee).

Erythrozyten	n	Mittelwert (50%-Kanal)	max./min. (50%-Kanal)	SD des 50%-Kanals	Kanäle >20%-<80%	max./min. (Kanäle)
unbehandelt	9	83,46	89,74/73,76	0,178	17,67	19 / 13
PFA fixiert	7	72,05	79,71 / 68,64	0,203	12,29	13 / 12
DMS fixiert	8	94,09	105,95 / 83,86	0,315	15,88	20 / 13

Tab. 6. IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Bindung an unbehandelte und fixierte adulte Rh(D)-negative Erythrozyten (0 ccddee).

Erythrozyten	n	Mittelwert (50%-Kanal)	max./min. (50%-Kanal)	SD des 50%-Kanals	Kanäle >20%-<80%	max./min. (Kanäle)
unbehandelt	6	6,88	7,20 / 6,52	0,339	8,67	9 / 8
PFA fixiert	3	46,88	48,94 / 43,81	0,226	16	17 / 15
DMS fixiert	5	14,65	16,03 / 12,25	0,289	15,60	16 / 14

Die Fixierung der Erythrozyten mit Paraformaldehyd führt zu einer hochgradigen Bindung von IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment an adulte Rh(D)-negative Erythrozyten. Dies zeigte sich vor allem an einer deutlichen Fluoreszenzverstärkung (+ 40 Kanäle) gegenüber den unbehandelten adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten.

Rh(D)-positive Erythrozyten zeigten nach Fixierung mit Paraformaldehyd eine Fluoreszenzabschwächung (- 11,41 Kanäle) im FITC-Grün-Fluoreszenzhistogramm gegenüber den unbehandelten Erythrozyten.

Die Fixierung der Erythrozyten mit Dimethylsuberimidate führte nach Inkubation mit IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment zu einer deutliche Fluoreszenzverstärkung von Rh(D)-negativen Proben (+ 7,77 Kanäle) und Rh(D)-positiven Proben (+ 10,63 Kanäle).

In Tabelle 7 werden die Werte des 50%-Kanals der unterschiedlichen Ansätze (Tab. 1 bis Tab. 6) vergleichend zusammengestellt.

Desweiteren wird die absolute Kanaldifferenz und die relative Zunahme (in Prozent) der Fluoreszenz (50%-Kanal) der Rh(D)-negativen Erythrozytenproben zu den Rh(D)-positiven Erythrozytenproben der unfixierten bzw. fixierten Proben nach Inkubation mit IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment (Ansatz 3) angegeben.

Die relativ größte Zunahme der Fluoreszenz (50%-Kanal) weisen hierbei die unfixierten Erythrozytenproben auf (+ 1113,08 %; s. Tab. 7, Ansatz 3) .

Sowohl die Fixierung mit Dimethylsuberimidate (+ 542,25 %) als auch mit Paraformaldehyd (+ 53,69 %) führt, als Ausdruck einer geringeren Meßempfindlichkeit, zu deutlich geringeren Werten.

Tab. 7. Vergleichende Mittelwerte (50%-Kanal) von Rh(D)-negativen und Rh(D)-positiven adulter Erythrozyten unfixiert sowie nach Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) bzw. Dimethylsuberimidate (DMS).

Blutgruppe	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Kanaldifferenz von Ansatz 3 (absolut)	Zunahme des 50%-Wertes von Ansatz 3 (in Prozent)	
0 Rh(D)-neg.	7,20	7,33	6,88			unfixierte
0 Rh(D)-pos	7,09	7,09	83,46	76,58	1113,08	Erythrozyten
0 Rh(D)-neg.	9,73	13,67	46,88			PFA fixierte
0 Rh(D)-pos	10,00	14,26	72,05	25,17	53,69	Erythrozyten
0 Rh(D)-neg.	7,49	8,90	14,65			DMS fixierte
0 Rh(D)-pos	7,46	8,92	94,09	79,44	542,25	Erythrozyten

Ansatz 1: Erythrozyten "nativ" (unmarkiert)

Ansatz 2: Erythrozyten + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)-Fragment

Ansatz 3: Erythrozyten + IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)-Fragment

Durch die Fixierung der Erythrozyten läßt sich die störende Hämagglutination wirksam verhindern, weder makro- noch mikroskopisch ließen sich Hämagglutinate nachweisen.

Die Fixierung der Erythrozyten sowohl mit Paraformaldehyd als auch mit Dimethylsuberimidate führt jedoch zu unspezifischen Reaktionen, die nicht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung beruhen.

Da auch die Rh(D)- bzw. A-Rezeptoren durch die Fixierung beeinflußt werden können, haben wir nach diesen Vorbefunden auf jegliche Fixierung verzichtet.

Das Problem der störenden Hämagglutination läßt sich auch ohne Fixierung durch folgendes Vorgehen minimieren :

Für den Nachweis der Rh(D)-Eigenschaft wird ein monoklonaler IgG1-Antikörper benutzt, der von der Firma BIOTEST zur Verfügung gestellt wurde.

IgG-anti-A wird aus einem humanem Anti-A-Testserum (IMMUCOR) nach Absorption an adulte A<sub>1</sub>-Erythrozyten, Digitoninsäure-Hämolyse und Elution mit Glycin-Puffer gewonnen, da ein monoklonaler humaner IgG-Antikörper nicht zur Verfügung stand.

Die Erythrozyten werden mit IgG1-anti-D<sub>4</sub> bzw. IgG-anti-A und anschließend mit einem FITC-markierten Anti-Human-IgG-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment inkubiert.

### 3.2. Rh(D)-Eigenschaft adulter und fetaler Erythrozyten

Bei den folgenden Untersuchungen wurde die Ausprägung der Rh(D)-Eigenschaft gleicher Rhesusuntergruppen (ccddee, CcD.ee, ccD.Ee, CCD.ee, ccD.ee, CcD.Ee, ccD.EE) von adulten und fetalen Erythrozyten durchflußzytometrisch verglichen (Tab. 8).

Von Erwachsenen wurden auch Erythrozyten mit dem Rhesus-Faktor D<sup>weak</sup> untersucht.

Tab. 8. Rh(D)-Eigenschaft adulter und fetaler Erythrozyten gleicher Rhesusuntergruppen

Rhesusgruppe	n	Mittelwert (50 % Kanal)	max./min. (50 % Kanal)	SD (50% Kanal)	max./min. (SD)	Kanäle >20%<80%	max./min. (Kanäle)
ccddee adult	30	11,90	13,31/10,71	0,261	0,404/0,174	13,50	16/11
ccddee fetal	19	9,94	12,04/9,16	0,520	0,670/0,463	15,37	18/14
CcD.ee adult	23	72,72	83,61/65,12	0,302	0,707/0,183	16,87	26/11
CcD.ee fetal	12	61,63	64,54/55,81	0,366	0,490/0,255	18,83	22/17
ccD.Ee adult	23	73,66	83,32/64,37	0,249	0,415/0,145	11,00	17/11
ccD.Ee fetal	7	73,50	81,40/65,95	0,270	0,457/0,187	15,90	21/15
CCD.ee adult	30	76,40	91,65/60,76	0,216	0,539/0,121	14,30	22/12
CCD.ee fetal	10	72,48	80,43/61,61	0,352	0,564/0,225	19,80	20/13
ccD.ee adult	25	79,67	88,73/73,42	0,238	0,408/0,133	12,64	17/11
ccD.ee fetal	11	76,03	80,43/61,61	0,246	0,425/0,225	16,18	21/16
CcD.Ee adult	30	82,82	89,09/73,41	0,195	0,262/0,146	13,88	19/11
CcD.Ee fetal	13	82,76	93,00/72,93	0,237	0,333/0,199	16,00	21/15
ccD.EE adult	30	88,26	96,47/80,68	0,183	0,299/0,109	13,36	16/11
ccD.EE fetal	8	87,16	92,80/82,56	0,425	0,775/0,245	19,75	24/15

Bewertet man die Rh(D)-Eigenschaft adulter Erythrozyten an der Fluoreszenzintensität im FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramm mit den aus der Regressionsanalyse errechneten Werten des 50%-Kanals, zeigt sich folgende Abstufung: ccddee (rr) < CcD.ee (R<sub>1</sub>r) < ccD.Ee (R<sub>2</sub>r) < CCD.ee (R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>) < ccD.ee (R<sub>0</sub>r) < CcD.Ee (R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>) < ccD.EE (R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>).

Für fetale Erythrozyten ergibt sich dagegen folgende Abstufung: ccddee (rr) < CcD.ee (R<sub>1</sub>r) < CCD.ee (R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>) < ccD.Ee (R<sub>2</sub>r) < ccD.ee (R<sub>0</sub>r) < CcD.Ee (R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>) < ccD.EE (R<sub>2</sub>R<sub>2</sub>).

Im Vergleich der Abstufung der Rh(D)-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten fällt auf, daß im Unterschied zu adulten Erythrozyten fetale Erythrozyten der Rhesusuntergruppe CCD.ee (R<sub>1</sub>R<sub>1</sub>) eine schwächere Fluoreszenz zeigen als Blutproben der Rh-Untergruppe ccD.Ee (R<sub>2</sub>r).

Weiterhin zeigt sich, daß die Werte des 50%-Kanals fetaler und adulter Erythrozyten der Rhesusuntergruppen CcD.Ee, cc.D.Ee und ccD.EE eng beieinander liegen.

Im Gegensatz hierzu liegen die Werte der Blutproben von Neugeborenen mit den Rh-Formeln CcD.ee (Differenz -11,09 Kanäle), CCD.ee (Differenz - 3,92 Kanäle) und ccD.ee (Differenz - 3,64 Kanäle) zum Teil deutlich niedriger als adulte Erythrozyten. Es konnte für die Rh-Untergruppe CcD.ee (R<sub>1</sub>r) eine signifikant schwächere Fluoreszenzintensität gegenüber adulten Erythrozyten der gleichen Untergruppe ermittelt werden.

Weiterhin zeigt sich, daß die Fluoreszenz fetaler Erythrozyten im Vergleich mit Erythrozyten von Erwachsenen sich über einen etwas größeren Bereich verteilt. Der Bereich zwischen 80 %- und 20 %- Kanal umfaßt bei Erythrozyten von Erwachsenen bei allen Rhesusuntergruppen etwa 14 Kanäle, bei fetalen Erythrozyten umfaßt dieser Bereich etwa 17,5 Kanäle.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 6) zeigen im direkten Vergleich den Verlauf der Summationskurven gleicher Rhesusuntergruppen von adulten Erythrozyten und fetalen Erythrozyten.

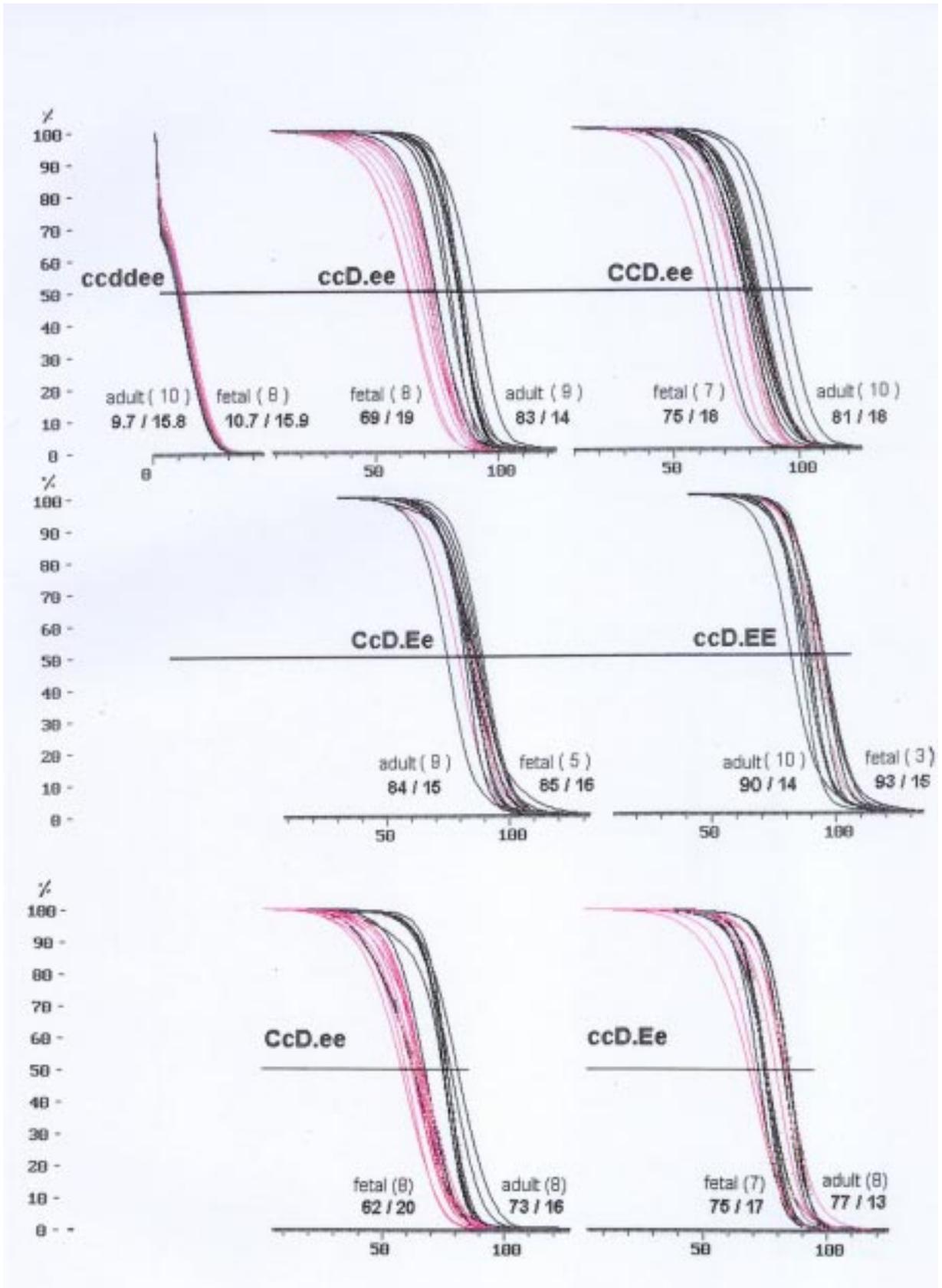


Abb. 6. Summationskurven der Rh(D)-Eigenschaft fetaler (rot) und adulter (schwarz) Erythrozyten mit jeweils gleicher Rhesusformel.

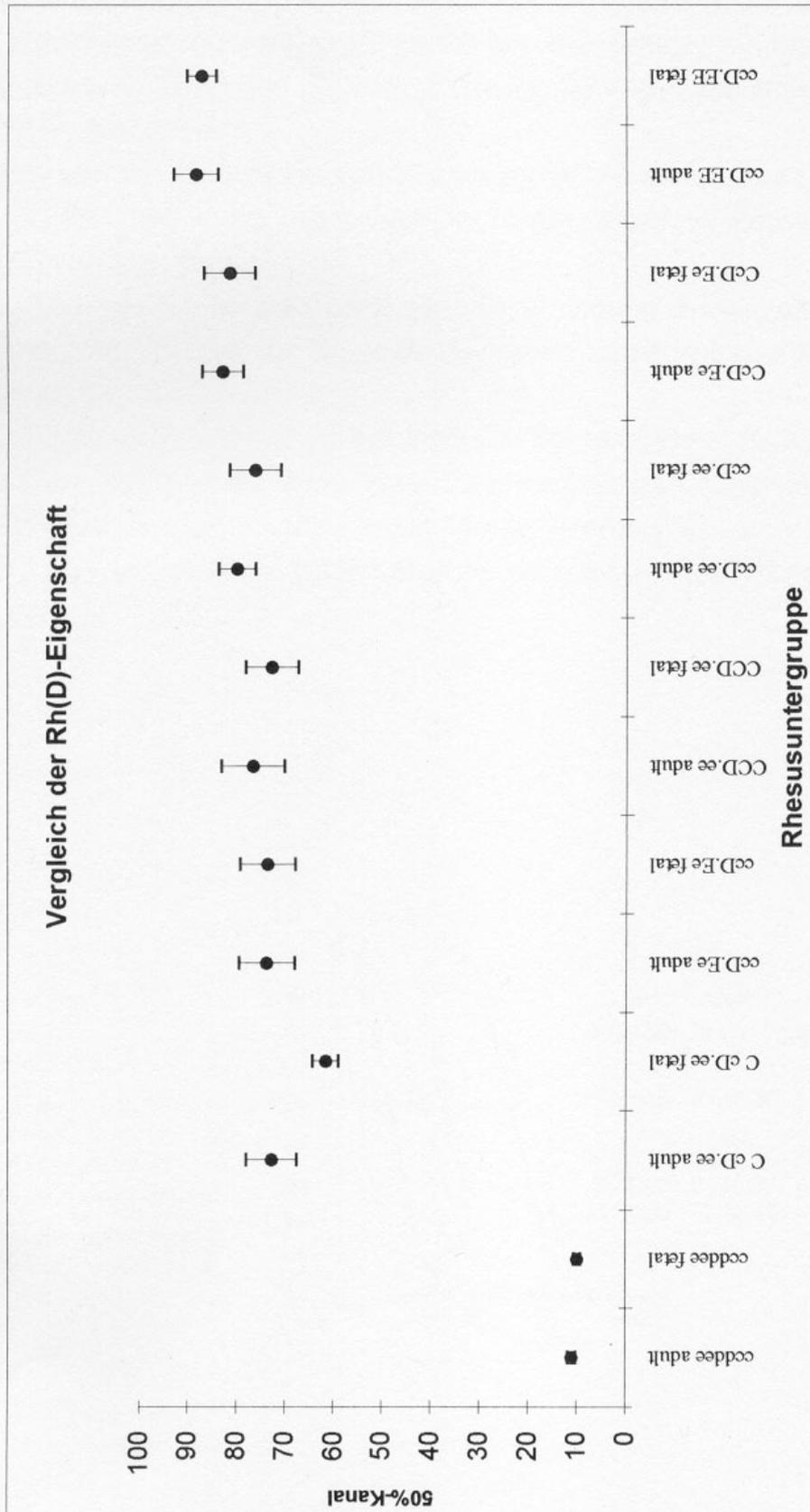


Abb. 7. Verteilung der Rh(D)-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten verschiedener Rhesusuntergruppen (50%-Kanal  $\pm$  1 Standardabweichung).

### 3.2.1 Rh-Eigenschaft D<sup>weak</sup>

Durch die indirekte Markierungsmethode lassen sich auch schwache Rh(D)-Eigenschaften (D<sup>weak</sup>) von Erythrozyten nachweisen.

Das Diagramm (Abb. 8) zeigt links die Summationskurve einer Rh(D)-negativen Blutprobe (0 ccddee, schwarze Kurve) und rechts die Summationskurven (schwarze Kurven) von Rh(D)-positiven fetalen Erythrozyten der entsprechenden Rhesusuntergruppen (CcD.ee, CCD.ee und ccD.Ee). Dazwischen liegen die Kurven von 8 untersuchten D<sup>weak</sup>-Blutproben.

Die acht untersuchten Blutproben von Erwachsenen mit schwacher D-Eigenschaft im Sinne von D<sup>weak</sup>, zeigen alle gegenüber der Rh(D)-negativen Probe (0 ccddee) eine stärkere Fluoreszenzintensität.

Mit der Abnahme der Rezeptorendichte wird die Verteilung der einzelnen Erythrozyten nicht verändert. Der Verlauf der Summationskurven entspricht qualitativ dem Verlauf normaler Rh(D)-Erythrozyten.

Quantitativ finden sich besonders niedrige Fluoreszenzwerte (50%-Kanal) der Rh-Formeln ccD.Ee (17) und der Rh-Formel CCD.ee (42) im Gegensatz zu 'normalen' adulten Erythrozyten gleicher Rh-Formel. Diese Werte sind noch geringer als die niedrigsten gemessenen Werte fetaler Erythrozyten der gleichen Rhesusuntergruppe.

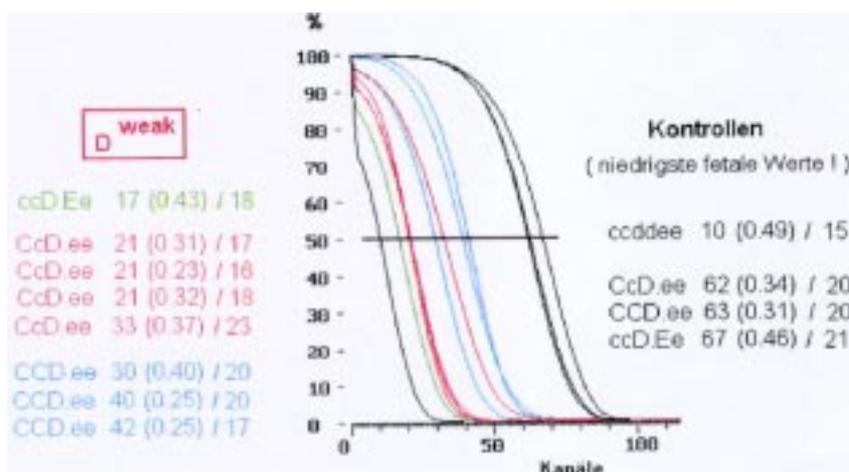


Abb. 8. Summationskurven der Reaktion von IgG1-anti-D<sub>4</sub> mit verschiedenen Erythrozytenproben mit der Rh-Eigenschaft D<sup>weak</sup>

### **3.3. Nachweis und Quantifizierung kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Gemischen mit adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten**

Die Durchflußzytofluorometrie wurden benutzt, um kleine Populationen Rh(D)-positiver Erythrozyten bei der feto-maternalen Transfusion nachzuweisen.

Es wird durchflußzytofluorometrisch der Nachweis der Rh(D)-Eigenschaft geführt und der Anteil fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten quantifiziert.

Untersucht wird, welche Anteile fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Gemischen mit adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten (ccddee) sich mit dieser Methode verlässlich nachweisen lassen.

Zuerst erfolgt die Auswertung durch Einteilung des FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramms in ein Negativareal (Kanal 0-35) und Positivareal (Kanal 36-255) und Auswertung der Impulse (= Rh(D)-positive Erythrozyten) im Positivareal.

Danach werden die Ergebnisse vergleichender Untersuchung mit Nachweis und Quantifizierung fetaler Erythrozyten mittels der Durchflußzytofluorometrie (Nachweis der Rh(D)-Eigenschaft) und durch HbF-Färbung dargestellt.

Im weiteren erfolgt die Auswertung mit der neuen Methode und Darstellung der Summationskurven.

3.3.1. Durchflußzytometrische Untersuchungen von Gemischen mit fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten und adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten zum Nachweis und zur Quantifizierung kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten

Zunächst werden Gemische mit Anteilen von 0,5 bis 100 Promille fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten untersucht. Bei jeder Messung wurden 65.000 Erythrozyten durchflußzytometrisch ausgewertet und der Anteil fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten durch die Impulse im Positivareal (Kanal 36-255) ermittelt (Tab. 9).

Tab. 9. Impulse im Positivareal (Kanal 36-255) von Gemischen fetaler Rh(D)-positiver (0 CcD.Ee) und adulter Rh(D)-negativer (ccddee) Erythrozyten.

Rh(D)-Erythrozyten im Ansatz (in ‰)	n	Impulse im Positivareal (in ‰)			Differenz (Ansatz 3) zum Leerwert (ccddee)
		Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	
0,0 (ccddee)	100	0,054 ± 0,022	0,67 ± 0,19	1,52 ± 0,61	<b>0</b>
0,5	12	0,067 ± 0,012	0,84 ± 0,41	1,72 ± 0,51	<b>0,20</b>
1,0	12	0,073 ± 0,021	0,82 ± 0,21	2,43 ± 0,66	<b>0,91</b>
2,5	12	0,067 ± 0,031	0,77 ± 0,12	5,01 ± 0,34	<b>3,49</b>
5,0	12	0,062 ± 0,014	0,71 ± 0,29	7,34 ± 0,87	<b>5,82</b>
10,0	12	0,068 ± 0,025	0,71 ± 0,31	12,13 ± 0,56	<b>10,61</b>
25,0	10	0,071 ± 0,012	0,62 ± 0,41	28,76 ± 3,86	<b>27,24</b>
50,0	12	0,068 ± 0,023	0,74 ± 0,14	56,38 ± 1,44	<b>54,86</b>
100,0	12	0,068 ± 0,014	0,77 ± 0,34	116,21 ± 3,43	<b>114,69</b>

Ansatz 1: Erythrozyten nativ

Ansatz 2: Erythrozyten + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment

Ansatz 3: Erythrozyten + IgG1-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment

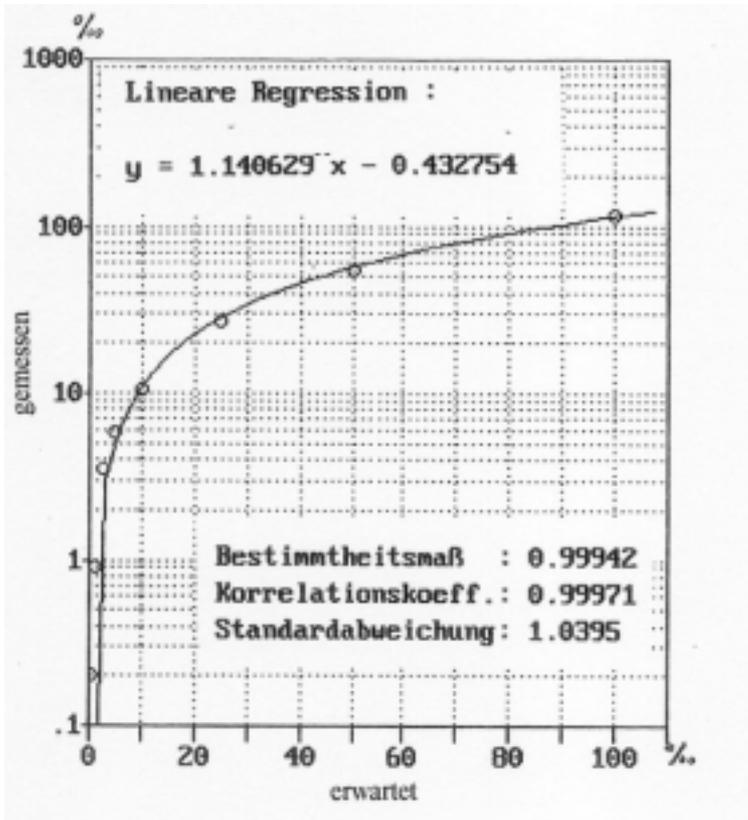


Abb. 9. Quantitativer durchflußzytometrischer Nachweis von fetalen Rh(D)-Erythrozyten (vgl. Tab. 9)

Die ermittelten Werte der Negativkontrolle (ccddee) zeigen sehr geringe Streuungen um den Mittelwert und gute Reproduzierbarkeit.

Gemische mit Anteilen von 0,5 und 1 Promille fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten zeigen keine signifikante Erhöhung der Impulse im Positivareal des FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramms gegenüber dem Leerwert (ccddee) ( $1,519 \pm 0,607$  vs.  $1,720 \pm 0,510$  bzw.  $1,519 \pm 0,607$  vs.  $2,430 \pm 0,660$ ).

Erst Gemische mit Anteilen über 2,5 Promille fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten lassen sich sicher und reproduzierbar von den Rh(D)-negativen Kontrollproben unterscheiden.

### 3.3.2. Vergleichende Messungen der Quantifizierung fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten (0 CcD.Ee) mit einer HbF-Färbemethode und durchflußzytofluorometrischem Nachweis der Rh(D)-Eigenschaft

Eine im immunhämатologischen Labor häufig angewendete Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung fetaler Erythrozyten ist eine HbF-Färbemethode nach *Kleihauer und Bethke* [40].

In der folgenden Tabelle werden die Ergebnisse der Versuche zur Quantifizierung fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Gemischen mit adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten durch HbF-Färbung und durch indirekte Immunfluoreszenzdarstellung des Rh(D)-Rezeptors der fetalen Erythrozyten und anschließender durchflußzytofluorometrischer Messung dargestellt (Tab. 10). Neben dem Nachweis kleiner Populationen fetaler Erythrozyten wird auch die Reproduzierbarkeit der Methoden untersucht.

Es wurden Gemische (Proben 1-5) mit Anteilen von 100 bis 1 Promille fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten (0 CcD.Ee) in adultem Rh(D)-negativen Blut (0 ccddee) untersucht.

Nach der HbF-Färbung wurden unter dem Mikroskop etwa 1000 Erythrozyten gezählt und der Anteil HbF-positiver Zellen ermittelt. Zur durchflußzytofluorometrischen Messung wurden pro Messung 65.000 Erythrozyten gemessen und die Impulse im 'Positivareal' (Kanal 36-255) ausgewertet.

Im direkten Vergleich einer Meßreihe zeigen die Werte der durchflußzytofluorometrischen Messungen eine wesentlich bessere Übereinstimmung zu dem im Ansatz vorhandenen Anteil fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten und der gemessenen Anzahl der fetalen Rh-(D)-positiven Erythrozyten.

Gemische mit einem Anteil von 5 Promille fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten, was einer klinisch bedeutsamen feto-maternalen Makrotransfusion entspricht, zeigen nach der HbF-Färbemethode deutlich niedrigere Werte (unter 5 Promille) als nach Messung im Durchflußzytofluorometer ( $3,96 \pm 1,87$  vs.  $6,31 \pm 1,89$ ). Weiterhin zeigt sich, daß trotz sorgfältiger Durchführung der Versuche die Ergebnisse der HbF-Färbemethode eine erheblich größere Streuung der Werte aufweisen als die durchflußzytofluorometrisch ermittelten Ergebnisse.

Tab. 10. Nachweis von fetalen Erythrozyten durch HbF-Färbung (H) und durchflußzytometrische Messung der Rh(D)-Eigenschaft (D); (n=5).

Anteil fetaler Erythrozyten im Gemisch (in ‰)		Impulse im 'Positivareal' (in ‰); Kanal 36-255					Mittelwert ±SD
		Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	
100	H	135	113	84	102	93	105,40 ± 17,64
	D	<b>98,28</b>	<b>98,32</b>	<b>106,42</b>	<b>102,54</b>	<b>99,25</b>	<b>100,92 ± 3,51</b>
50	H	114	93	40	70	56	76,60 ± 26,28
	D	<b>54,35</b>	<b>48,25</b>	<b>51,03</b>	<b>49,56</b>	<b>54,23</b>	<b>51,48 ± 2,75</b>
10	H	21	20	8	13	9	14,20 ± 5,42
	D	<b>14,10</b>	<b>8,54</b>	<b>11,00</b>	<b>12,25</b>	<b>13,83</b>	<b>11,95 ± 2,28</b>
5	H	1,8	7	2,4	5	3,6	3,96 ± 1,87
	D	<b>9,6</b>	<b>6,25</b>	<b>5,30</b>	<b>5,14</b>	<b>5,25</b>	<b>6,31 ± 1,89</b>
2	H	6	5	2	3	5	4,20 ± 1,47
	D	<b>5,73</b>	<b>4,56</b>	<b>4,43</b>	<b>4,12</b>	<b>3,98</b>	<b>4,56 ± 0,69</b>
1	H	2	2	5	3	3	3,00 ± 1,10
	D	<b>3,69</b>	<b>1,65</b>	<b>2,32</b>	<b>1,58</b>	<b>1,83</b>	<b>2,214 ± 0,874</b>

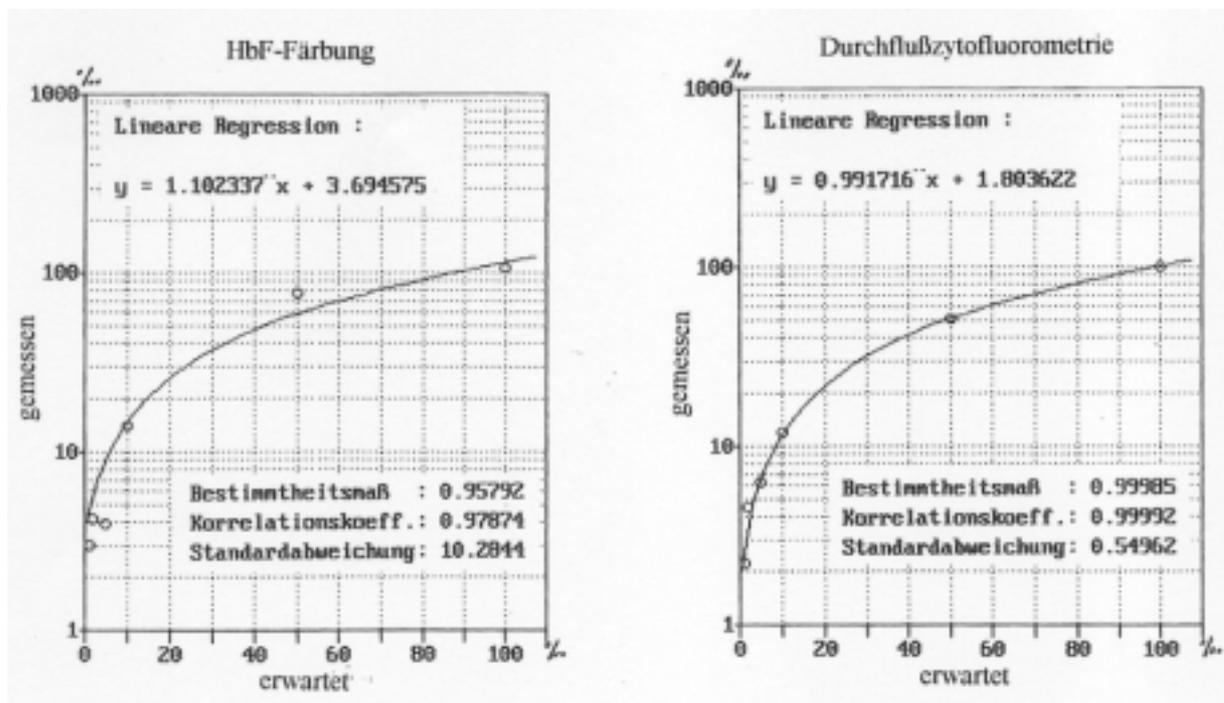


Abb. 10. Quantifizierung fetaler Rh(D)-Erythrozyten mittels HbF-Färbung (links) und durchflußzytometrischer Messung (rechts)

### 3.3.2.1. Auswirkung der Probenalterung auf den Nachweis und die Quantifizierung kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Gemischen mit adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten

Um die Auswirkungen durch Lagerung und Alterung der Proben auf die Meßergebnisse zu überprüfen, wurden Gemische (n=10) mit Anteilen von 2 Promille Rh(D)-positiver fetaler Erythrozyten (0 CcD.Ee) sofort nach Gemischansatz und nach 24 Stunden durchflußzytometrisch (Tab. 11) und mittels der HbF-Färbung (Tab. 12) untersucht.

Tab. 11. Durchflußzytometrischer Nachweis fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten (0 CcD.Ee) im Positivareal (Kanal 36-255); (n=10).

		Impulse im Positiv-Areal;(in ‰); Kanal 36-255			
Probe		Messung sofort	Differenz zur Negativkontrolle (ccddee)	Messung nach 24 h	Differenz zur Negativkontrolle (ccddee)
Negativkontrolle (ccddee)	1	0,098 ±0,045		0,115 ±0,039	
	2	0,748 ±0,247		1,024 ±0,314	
	3	<b>1,450 ±0,243</b>		<b>1,700 ±0,343</b>	
2 Promille fetale Rh(D)- Erythrozyten im Ansatz	1	0,119 ±0,035		0,187 ±0,063	
	2	0,652 ±0,244		0,790 ±0,254	
	3	<b>3,890 ±0,258</b>	<b>2,440</b>	<b>4,812 ±0,536</b>	<b>3,112</b>

1 = Erythrozyten nativ  
 2 = Erythrozyten + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment  
 3 = Erythrozyten + IgG1-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment

Tab. 12. Nachweis von 2 Promille fetaler Erythrozyten (0 CcD.Ee) durch HbF-Färbung; (n=10).

		Anteil von HbF-Zellen (in ‰)	
		HbF-Zellen - Zählung sofort (in ‰)	HbF-Zellen - Zählung nach 24 h (in ‰)
2 Promille fetale Rh(D)- Erythrozyten im Ansatz		5,40 ±3,47	12,60 ±3,10

Diese Untersuchungen zeigen, daß die `Alterung` der Meßproben eine deutliche Auswirkung auf die Meßergebnisse hat.

Mit der HbF-Färbung werden nach 24 Stunden mit 7,20 Promille (5,40 vs. 12,60) deutlich mehr HbF-Zellen ausgezählt.

Durchflußzytofluorometrisch zeigt sich nach 24 Stunden eine geringere Erhöhung nachgewiesener Rh(D)-positiver Erythrozyten um 0,922 Promille (3,890 vs. 4,812).

Der Vergleich (HbF-Färbung vs. Durchflußzytofluorometrie) der sofort nach Ansatz gemessenen Gemische zeigt, daß die Ergebnisse der HbF-Färbung um 1,51 Promille höher liegen als die Ergebnisse der Messung im Durchflußzytofluorometer.

Weiterhin zeigen die Werte der HbF-Färbung eine deutlich größere Streuung um den Mittelwert ( $5,40 \pm 3,47$  vs.  $3,89 \pm 0,258$ ).

Nach 24 Stunden Lagerung werden nach HbF-Färbung 7,79 Promille (12,60 vs. 4,81 Promille) mehr fetale Erythrozyten ausgezählt als bei Messung der Rh(D)-Eigenschaft fetaler Erythrozyten im Durchflußzytofluorometer .

Die Methode mit Einteilung des Grün-Fluoreszenz-Histogramms in ein Negativ- und ein Positivareal hat mehrere Nachteile. Insbesondere ist die graphische Darstellung der Verlaufskurven mehrerer Messungen (z. B. Meßprobe / Negativ- und Positivkontrolle) nicht möglich.

Nachfolgend werden deshalb die Ergebnisse des Nachweises kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten mit Auswertung der Summationskurven dargestellt. Mit dieser Methode ist die gleichzeitige graphische Darstellung mehrerer Messungen möglich.

### 3.3.3. Nachweis kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten - Eine Auswertung durch Darstellung der Summationskurven

Es wurden Gemische mit Anteilen von 0,5, 1 und 2 Promille fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten (CcD.Ee) mit adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten (ccddee) untersucht. Insbesondere ist von Interesse, ob sich durch die graphische Darstellung der Summationskurven eine bessere Differenzierung eines Proben-Gemisches von einer Negativkontrolle (ccddee) erreichen läßt.

Zunächst wurde ein größeres Kollektiv an 'Leerwerten' ermittelt. Es wurden 100 Proben von Rh(D)-negativen gesunden Blutspendern untersucht (Tab.13).

Tab.13. Rh(D)-negative Proben (n=100)

Ansatz	Mittelwert (50%-Kanal)	max. / min. (50%-Kanal)	SD (50%-Kanal)	max. / min. (SD)	Kanäle >20% <80%	max. / min. (Kanäle)
1	8,07	9,64/6,18	0,257	0,369/0,075	7,34	9/6
2	9,18	9,35/7,95	0,459	0,535/0,391	14,02	16/12
3	9,23	10,64/9,10	0,468	0,678/0,411	14,26	16/12

Ansatz 1 Erythrozyten nativ  
 Ansatz 2 Erythrozyten + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment  
 Ansatz 3 Erythrozyten + IgG1-anti D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment

Die ermittelten Werte zeigen geringe Schwankungen und gute Reproduzierbarkeit. Es zeigt sich, daß es nach Inkubation mit Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment zu einer geringen Fluoreszenzverstärkung (+ 1,11 Kanäle) im FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramm im Vergleich zu nativ gemessenen Erythrozytenproben kommt.

Werden die Proben mit IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment inkubiert, ist die Fluoreszenzverstärkung im FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramm gering um 1,16 Kanäle zu nativ gemessenen Erythrozytenproben erhöht.

Bei Untersuchungen eines Gemisches von Erythrozyten mit verschiedenen Rhesuseigenschaften (Rh(D)-positiv, Rh(D)-negativ) läßt sich die mathematische Auswertung des Kurvenverlaufs mit Bestimmung der Regressionsgeraden nicht durchführen. Die Darstellung der Summationskurven läßt aber eine quantitative Schätzung (Kurvenplateau und Summen-Prozent-Skala) im Vergleich mit den 'Negativkontrollen' (ccddee) zu.

Die Summationskurven von Gemischen mit Anteilen von 1 Promille und 2 Promille fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten zeigen im Bereich zwischen Kanal 60 und Kanal

80 einen Kurvenverlauf, der deutlich über dem Bereich der Kurve von adulten Rh(D)-negativen Erythrozytenproben liegt (Abb. 11).

Bei Gemischen mit Anteilen von 0,5 Promille fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten liegen die Kurven nur zum Teil über dem Kurvenverlauf von adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten. Ein sicherer Nachweis der fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten ist bei diesen Proben nicht gegeben.

Durch Darstellung der Impulse als Summationskurven lassen sich auch Gemische mit Anteilen von etwa 1 Promille fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten sicher und reproduzierbar nachweisen.

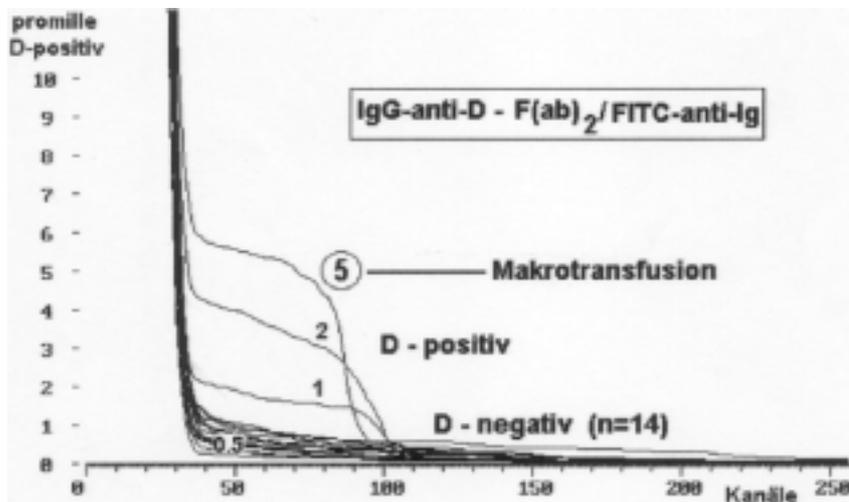


Abb. 11. Summationskurven von Gemischen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten mit adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten. Auf dem Summationsdiagramm können die Verlaufswerte direkt auf der y-Achse (Einteilung in ‰) beurteilt werden. Das Minimum der quantitativ erfaßbaren fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten liegt bei 1 ‰.

### 3.3.3.1. Beschreibung einer feto-maternalen-Transfusion bei Rhesus (D)-Inkompatibilität.

Bei dieser klinischen Fallbeschreibung handelt es sich um eine 34-jährige Erstgravida (Blutgruppe 0 ccddee) mit Schnittentbindung in der 35. Schwangerschaftswoche. Der bei der Mutter vor der Schnittentbindung bestimmte HbF-Wert war mit 52 Promille stark erhöht, es bestand klinisch der Verdacht auf ein feto-maternales Transfusions-syndrom.

Das sehr blasse Frühgeborene (Blutgruppe A ccD.Ee) hatte einen extrem niedrigen Hb-Wert (mit einem laut klinischer Angabe Hb-Wert von 1,9 g/dl liegt dieser außerhalb des Referenzmeßbereiches).

Nach der Schnittentbindung erhielt das Kind sofort ein Erythrozytenkonzentrat (0 Rh neg.) und in den folgenden 24 Stunden zwei weitere Erythrozytenkonzentrate (0 Rh neg.).

Bei der Mutter wurde nach der Schnittentbindung eine Anti-D-Propylaxe durchgeführt. Es wurden innerhalb kurzer Zeit insgesamt dreimal 300 µg IgG-Anti-D-Serum verabreicht.

In den folgenden Tagen wurden von der Mutter Blutproben entnommen und der Anteil der fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten durchflußzytofluorometrisch und durch HbF-Zellfärbung bestimmt (Tab. 14).

Bereits 13 Tage nach der Schnittentbindung (17.6.96) ließen sich keine fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten im mütterlichen Blut mehr nachweisen. Dies kann durch die Anti-D-Prophylaxe und dem dadurch bedingten schnellen Abbau der fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten erklärt werden.

Tab.14. Bestimmung der fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten im mütterlichen Blut durchflußzytofluorometrisch und durch HbF-Zellfärbung

Blutentnahme (Datum)	HbF-Zellen nach Färbung	Durchflußzytofluorometrie
6.6.96	67 ‰	26.0 ‰
17.6.96	negativ	0 ‰

Abbildung 12 zeigt die ermittelte Summationskurve und das Säulendiagramm der Blutprobe vom 6.6.96. Zur besseren Darstellung der Summationskurve wurde für die y-Achse eine Promille-Einteilung gewählt.

Insbesondere im Säulendiagramm der FITC-Grün-Fluoreszenz fällt die heterogene Verteilung der fetalen Rh(D)-Erythrozyten auf. Es zeigt sich eine Verteilung mit zwei Maxima (etwa bei Kanal 90 und 110).

Das Säulendiagramm der Kontrollprobe (rechts) dagegen zeigt eine uniforme, homogene Verteilung.

Die heterogene Verteilung der fetalen Rh(D)-Erythrozyten kommt durch die starke fetale Blutregeneration mit Auftreten vieler unreifer fetaler Erythrozyten zustande. Diese weisen deutlich weniger Rh(D)-Rezeptoren auf und liegen im Säulendiagramm im Bereich schwächerer Fluoreszenz (weiter links).

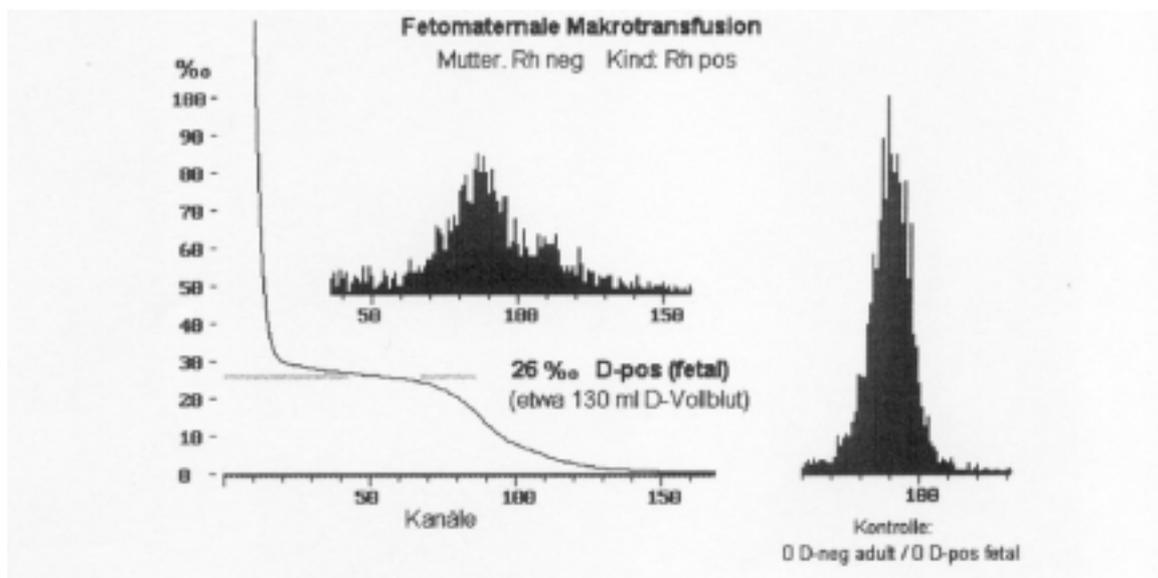


Abb. 12. Auf dem Summationsdiagramm kann die transfundierte Blutmenge durch Anlegen einer Geraden durch das Kurvenplateau und dem Schnittpunkt mit der y-Achse (Einteilung in ‰) einfach bestimmt werden (= 26 ‰).

### 3.4. A-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten

Die folgenden Untersuchungen befassen sich mit der A-Eigenschaft adulter und fetaler Erythrozyten (Tab. 15, Abb. 13).

Bei diesen Messungen wurde auf eine Fixierung der Erythrozyten verzichtet. Zum einen, da sich durch Anwendung des IgG-anti-A-Eluats und des Anti-Human-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragments die Hämagglutination minimieren ließ, und zum anderen, da die chemische Fixierung zu unspezifischen, nicht auf Antigen-Antikörper-Bindungen beruhenden Reaktionen führt.

Tab. 15. A-Eigenschaft adulter und fetaler Erythrozyten

Blutgruppe	n	50 %-Kanal	max./min. (50%-Kanal)	SD des 50%-Kanals	Kanäle >20%<-80%	max./min. (Kanäle)
A1 adult	28	94,04	106,12/79,74	0,418	26,60	33/24
A1 fetal	32	51,63	86,27/13,00	1,638	55,73	70/49
A1B adult	12	84,01	97,92/71,25	0,906	35,00	45/27
A1B fetal	9	47,48	56,02/23,50	1,706	60,22	70/44
A2 adult	10	34,95	44,84/32,78	0,724	46,38	50/41
A2 fetal	10	29,12	69,80/14,60	1,871	39,11	45/36
A2B adult	7	14,25	17,70/12,35	0,491	19,14	20/17
A2B fetal	6	11,33	13,38/10,23	0,509	16,50	18,15

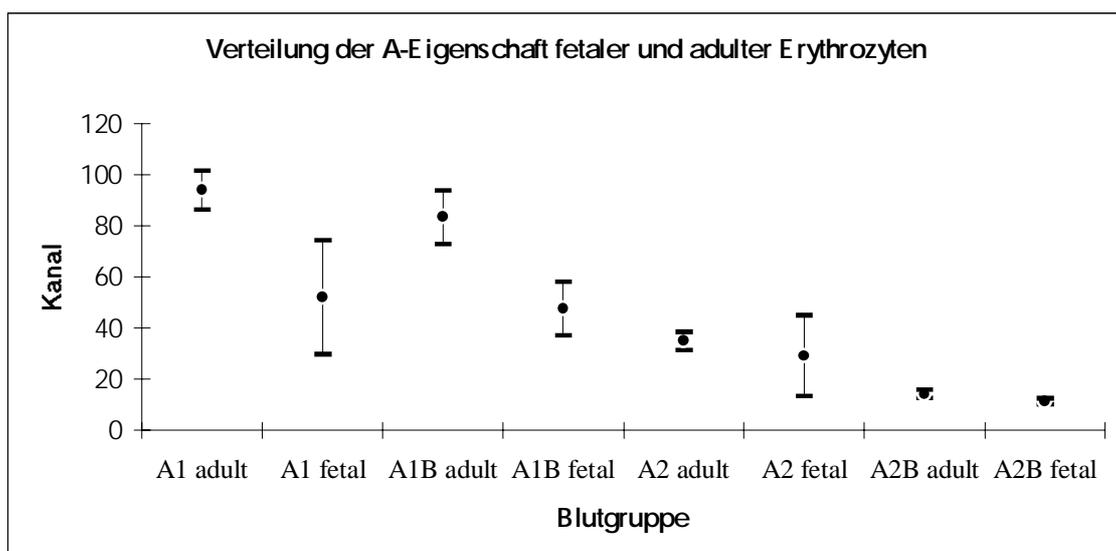


Abb. 13. IgG-anti-A-Bindung adulter und fetaler Erythrozyten (50%-Kanal ± Standardabweichung).

Die folgenden Abbildungen (Abb. 14) zeigen exemplarisch die Impulsverteilungs-Kurven im Grün-Fluoreszenz-Histogramm von adulten und fetalen A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Erythrozyten.

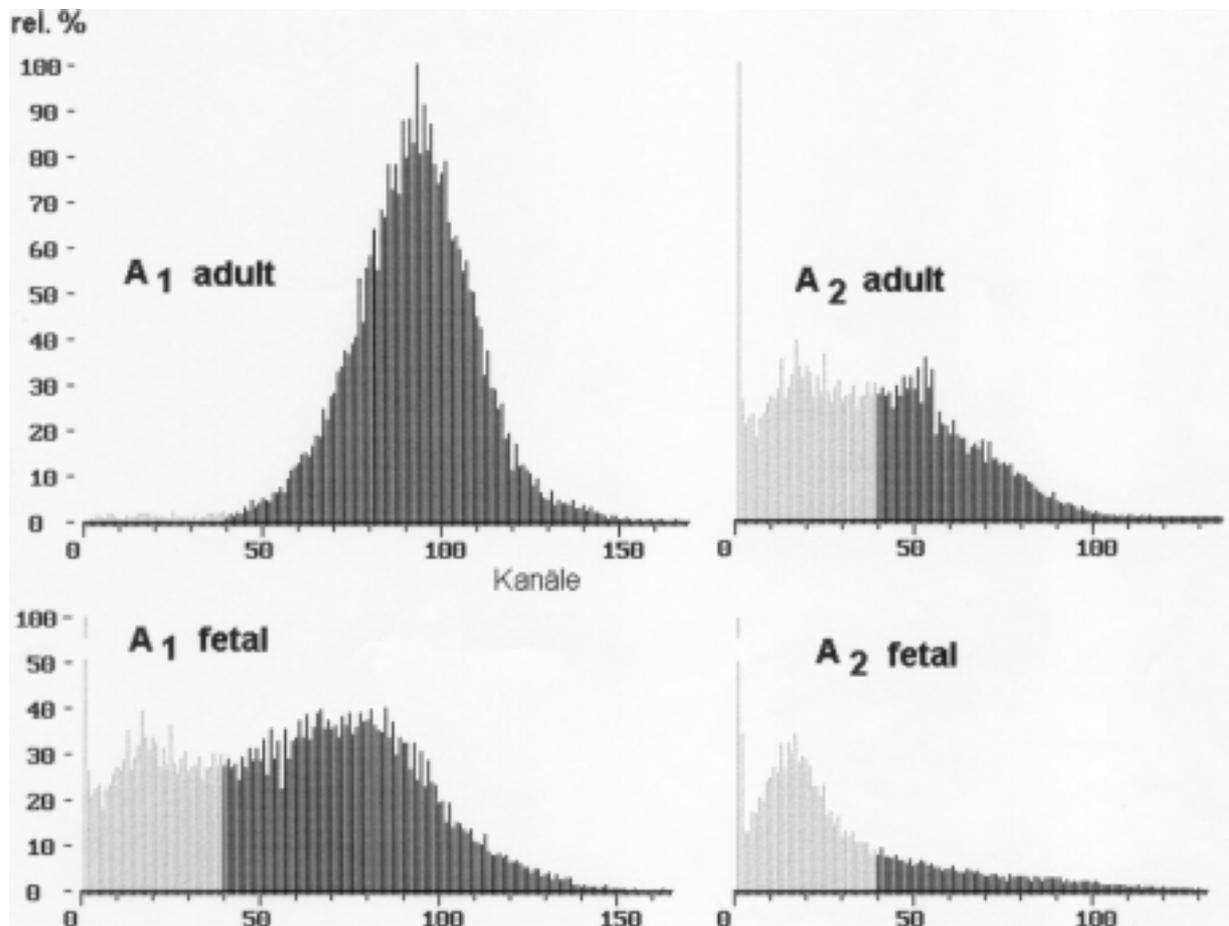


Abb. 14. Fluoreszenzintensität adulter und fetaler Erythrozyten der Blutgruppen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> nach Inkubation mit IgG-anti-A und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment.

Die dunklen Säulen stellen den Bereich der x-Achse zwischen Kanal 40 und 160 dar, in dem sich die A<sub>1</sub>-Erythrozyten von Erwachsenen befinden. Im Gegensatz hierzu zeigen adulte A<sub>2</sub>-Erythrozyten sowie fetale A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Erythrozyten relativ viele Erythrozyten mit weniger A-Rezeptoren (hellgraue Säulen).

Bei adulten A<sub>2</sub>-Erythrozyten und fetalen A<sub>1</sub>-Erythrozyten lassen sich angedeutet zwei Populationen erkennen.

Die A-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten, gemessen an der IgG-anti-A-Bindung, zeigt im FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramm unterschiedliche Kurven.

Nur adulte A<sub>1</sub>-Erythrozyten zeigen ein nahezu normalverteiltes Kollektiv nur einer Population, während die Proben adulter und fetaler Erythrozyten mit schwachen A-Eigenschaften (A<sub>2</sub>-adult, A<sub>1</sub>-fetal und A<sub>2</sub>-fetal) ein Gemisch unterschiedlich stark fluoreszierender Populationen zeigen.

Insbesondere bei fetalen Erythrozyten der Blutgruppe A<sub>1</sub> lassen sich im FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramm angedeutet zwei Populationen erkennen: Eine Population im Bereich von Kanal 40 bis 160 (x-Achse), in dem sich auch die Population adulter A<sub>1</sub>-Erythrozyten befindet, und eine weitere Population im Bereich von Kanal 1-39 mit Erythrozyten, die weniger IgG-anti-A binden.

Die Impulsverteilung fetaler A<sub>1</sub>-Erythrozyten (zwischen 80%-Kanal und 20%-Kanal) ist mit 55,73 Kanälen erheblich breiter als bei adulten A<sub>1</sub>-Erythrozyten mit 26,60 Kanälen.

Bei Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der A-Eigenschaft läßt sich, gemessen am 50%-Kanal, für adulte und fetale Erythrozyten folgende Abstufungen der A-Eigenschaft ermitteln: A<sub>1</sub> > A<sub>1</sub>B > A<sub>2</sub> > A<sub>2</sub>B (s. Tab. 15).

Dabei zeigen A<sub>1</sub>-Nabelerythrozyten eine deutlich geringere Fluoreszenz (Differenz - 42,41 Kanäle) als adulte A<sub>1</sub>-Erythrozyten. In ihrer Fluoreszenzintensität liegen fetale A<sub>1</sub>-Erythrozyten etwa auf dem Fluoreszenzniveau adulter A<sub>1</sub>B-Erythrozyten.

### 3.4.1. A-Eigenschaft fetaler A<sub>1</sub>-Erythrozyten bei Mutter/ Kind-Konstellationen 0/A<sub>1</sub> und A/A<sub>1</sub>

Wie bereits dargestellt, zeigen fetale A<sub>1</sub>-Erythrozyten unterschiedlich stark streuende Verlaufskurven.

Untersucht wurde, welchen Einfluß die Mutter/Kind-Konstellationen 0/A<sub>1</sub> bzw. A/A<sub>1</sub> auf die Ausprägung der A-Eigenschaft fetaler A<sub>1</sub>-Erythrozyten hat. Bei den untersuchten reifen, gesunden Neugeborenen ließ sich weder im direkten Coombs-Test noch in der Durchflußzytofluorometrie eine erythrozytäre IgG-Bindung nachweisen.

Tab. 16. Einfluß der Mutter/Kind-Konstellationen 0/A<sub>1</sub> bzw. A/A<sub>1</sub> auf die A-Eigenschaft fetaler A<sub>1</sub>-Erythrozyten

Mutter/Kind	n	Mittelwert (50% Kanal)	max. /min. (50% Kanal)	SD (50% Kanal)	max. / min (SD)	Kanäle >20%- <80%	max. /min (Kanäle)
A / A <sub>1</sub>	8	61,9	79,4 / 45,0	1,45	1,92 / 0,82	60	70 / 49
0 / A <sub>1</sub>	9	38,6	62,1 / 22,6	1,78	3,02 / 0,61	54	70 / 36

Bei Mutter/Kind-Konstellationen 0/A<sub>1</sub> liegt der Mittelwerte (50% Kanal) für fetale A<sub>1</sub>-Erythrozyten deutlich niedriger als bei Mutter/Kind Konstellationen A/A<sub>1</sub> (61,9 vs. 38,6 Kanäle; Differenz 23,3 Kanäle).

Um einen möglichen selektiven Abbau der fetalen A<sub>1</sub>-Erythrozyten mit stärkerer Antikörperbindung nachzuweisen (Mutter/Kind-Konstellation 0/A<sub>1</sub>), wird der prozentuale Anteil der fetalen A<sub>1</sub>-Erythrozyten dargestellt, der im Bereich der Kanäle 40 bis 256 liegt, also im Bereich von adulten A<sub>1</sub>-Erythrozyten (Abb. 15).

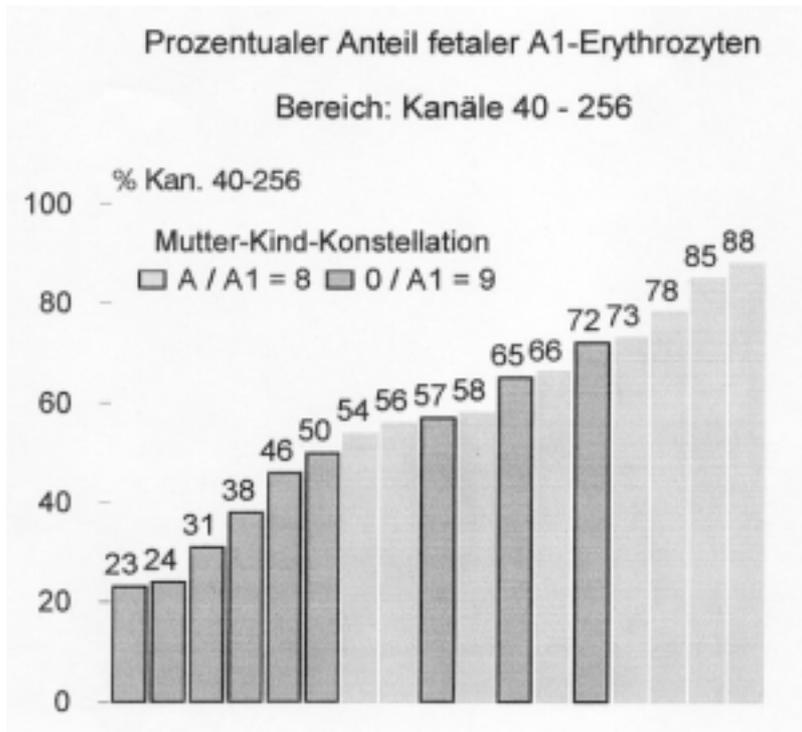


Abb. 15. Prozentualer Anteil der fetalen A<sub>1</sub>-Erythrozyten mit starker IgG-anti-A-Bindung von Müttern der Blutgruppe A bzw. 0 in der Region zwischen Kanal 40 und 256.

Nur drei von neun Proben mit Mutter/Kind-Konstellation 0/A<sub>1</sub> (Abb. 15, dunkelgrau) liegen im Bereich der Proben mit Mutter/Kind-Konstellation A/A<sub>1</sub>. Der prozentuale Anteil der übrigen 6 Werte ist deutlich geringer. Diese Befunde sind mit der Annahme einer unterschiedlichen partiellen Hämolyse auch ohne auffallende klinische Symptome vereinbar.

#### 4. Diskussion

Die fundamentale Entdeckung durch *Landsteiner* [43], daß das Blut eines Individuums gemischt mit dem Blut eines anderen Individuums zu einer sichtbaren Hämagglutination oder zu einer Hämolyse der Erythrozyten führt, war der Grundstein zur Entdeckung der wohl wichtigsten und heute bekanntesten Blutgruppen A, B, AB und 0.

Der Nachweis von erythrozytären Antigenen erfolgt im immunhämatologischen Labor in der Regel durch unterschiedliche Hämagglutinationsreaktionen. Diese Methoden beruhen zum großen Teil auf Arbeiten von *Landsteiner* [43] und *Coombs* [8]. Die Hämagglutinationstechniken sind gut reproduzierbare und ausreichend empfindliche Untersuchungsmethoden. Zur Quantifizierung von Antigenen, Antikörpern und kleinen Populationen können jedoch nur grobe Aussagen gemacht werden.

Insbesondere die Durchflußzytofluorometrie eröffnet Möglichkeiten zur qualitativen Charakterisierung und zur Quantifizierung von Erythrozyten [1, 3, 5, 11, 12, 15, 20, 23, 24, 25, 32, 36, 38, 41, 46, 48, 49, 52, 54, 62, 64, 68, 70, 73].

Eine aktuelle Übersicht zu durchflußzytometrischen Fluoreszenzuntersuchungen von Erythrozyten enthält eine von *Gutensohn, Sonneborn* und *Kühnl* herausgegebene Monographie [30].

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht vor allem die durchflußzytofluorometrische Untersuchung der Blutgruppeneigenschaften A und Rh(D) von fetalen und adulten Erythrozyten sowie der Nachweis kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Rh(D)-negativen Blut.

Zunächst ging es um die Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen für die anschließenden Messungen. Die durchflußzytofluorometrische Phänotypisierung erythrozytärer Antigene durch den Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen führt zu methodischen Problemen, insbesondere durch geringe Fluoreszenzintensitäten bei direkten Markierungsmethoden [68] und die Hämagglutination bei direkten und indirekten Markierungsmethoden [15].

Ein wesentliches Prinzip durchflußzytofluorometrischer Messungen besteht darin, daß es sich um Messungen einzelner Zellen (Erythrozyten) handelt und die Hämagglutination somit verhindert oder zumindest minimiert werden muß.

Es wurden daher folgende Möglichkeiten zur Vermeidung der Hämagglutination untersucht:

- Mechanische Desagglutination.

*Sharon und Fiebach* [66] beschreiben eine Methode der mechanischen Trennung von Hämagglutinen, bei der die Meßproben nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper mehrmals durch eine englumige Nadel (23 Gauge) gezogen werden.

Es zeigt sich, daß mit dieser Methode fragile Agglutinate gelöst werden können, es aber zu einer starken Hämolyse kommt.

Als wirkungsvoller und schonender erweist sich eine bei der Darstellung der A-Eigenschaft benutzte Methode, bei der die Proben nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment) mehrmals durch die Spitze einer Eppendorfpipette gezogen werden.

- Chemische Fixierung der Erythrozyten mit Paraformaldehyd (PFA) und Dimethylsuberimidate (DMS).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Erythrozyten chemisch zu fixieren [26, 27, 42, 44]. Hierbei ist damit zu rechnen, daß es zu strukturellen Veränderungen der Erythrozytenmembran und zur Abnahme der nachweisbaren Rezeptoren kommt [3].

In dieser Arbeit wurde der Einfluß der chemischen Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA) und Dimethylsuberimidate (DMS) am Beispiel der Darstellung der Rh(D)-Eigenschaft untersucht.

Die durchflußzytometrische Untersuchungen zeigen eine teilweise hochgradige Bindung von IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment sowohl an Rh(D)-negative als auch an Rh(D)-positive Erythrozyten nach der Fixierung mit Paraformaldehyd und Dimethylsuberimidate. Diese Reaktionen beruhen jedoch nicht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen, sondern sind vielmehr durch unspezifische, chemische Bindungen von Antikörpern, im Sinne eines "Klebeffekts", an die veränderte Erythrozytenmembran zu erklären. Hieraus resultiert letztendlich eine Abnahme der Meßempfindlichkeit durch die Fixierung mit Dimethylsuberimidate und Paraformaldehyd.

- Verwendung von monoklonalen / monospezifischen Antikörpern und FITC-markiertem Anti-Human-IgG-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment.

Bei Untersuchungen erythrozytärer A-Rezeptoren mit indirekten Immunfluoreszenzmethoden kommt es durch die starke Ausprägung der A-Eigenschaft von adulten Erythrozyten zur starken Hämagglutination, insbesondere bei Verwendung von humanen, polyklonalen Anti-A-Blutgruppenserum und Anti-Human-IgG-FITC-IgG [3].

Die Hämagglutination ließ sich durch Verwendung von selbst hergestelltem humanem IgG-anti-A-Eluat als primärer Antikörper und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment als sekundärer Antikörper soweit minimieren, daß bei Untersuchungen der A-Eigenschaft auf eine chemische Fixierung der Erythrozyten verzichtet wurde. Dies galt insbesondere auch im Hinblick der zuvor geschilderten Auswirkung der chemischen Fixierung von Erythrozyten.

Auch bei Untersuchungen der Rh(D)-Eigenschaft konnte durch Verwendung des monoklonalen, monospezifischen IgG1-anti-D<sub>4</sub> als primärer Antikörper und Anti-Hu-

man-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment als sekundärer Antikörper die Hämagglutination soweit minimiert werden, daß auf die chemische Fixierung der Erythrozyten verzichtet wurde. Die Hämagglutination war durch die benutzte Methode bei den Untersuchungen der Rh(D)-Eigenschaft so schwach, daß sich die entstandenen Agglutinate durch leichtes Schütteln der Meßproben wieder lösen ließen.

Aufbauend auf diesen Untersuchungen wurde eine Methode erstellt, die durch folgende Punkte charakterisiert ist:

- Als primäre Antikörper wurden humane monoklonale, monospezifische Antikörper (IgG1-anti-D<sub>4</sub>) und durch Elution aus Blutgruppentestseren hergestellte humane Antikörper (IgG-anti-A-Eluat) verwendet.
- Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-konjugiertes Anti-Human-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment gleicher Charge benutzt. Die Verwendung von F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten hat den Vorteil, daß diese zu keinem `cross-linking` fähig sind und die Hämagglutination minimiert wird [23].

In der vorliegenden Dissertation steht eine neue Auswertungsmethode mit Darstellung der Ergebnisse als Summenprozentverteilungskurven mit im Vordergrund. Es wird besonderer Wert auf die unterschiedliche Antikörperbindung des einzelnen Erythrozyten gelegt, da die Inhalte der FITC-Grün-Fluoreszenzkanäle differenziert analysiert werden können.

Grundlage hierzu war die Erstellung eines Computerprogrammes, welches aus den Daten des CYTORON ABSOLUTE<sup>®</sup> Durchflußzytofluorometers die für die Auswertung relevanten Daten `heraussucht` und in ein gängiges Datenformat (\*.txt-Dateien) überträgt [53]. Es ist somit möglich, den Inhalt einzelner Fluoreszenzkanäle zu erfassen und mit diesen Kanalinhalt eine differenzierte mathematische Analyse durchzuführen.

Durch ein weiteres Computerprogramm von *Fischer* [21] konnte aus diesen Dateien (\*.txt-Dateien) eine graphische Aufarbeitung der Kanalinhalt mit Darstellung vieler Messungen in einem Diagramm und eine statistische Auswertung der Werte auf allen gängigen Computern erfolgen.

Nach Ausarbeitung der Methode, die die Hämagglutination bei den durchflußzytometrischen Messungen zum Nachweis der erythrozytären Rh(D)- und A-Eigenschaft minimiert und der Verbesserung der Methode zur Datenauswertung, gilt das besondere Interesse dieser Arbeit der durchflußzytofluorometrischen Untersuchung der Rh(D)- und A-Eigenschaften adulter und fetaler Erythrozyten.

Es ist bekannt, daß einige erythrozytäre Blutgruppenantigene, beispielsweise A, B und H, bei fetalen Erythrozyten unvollständig entwickelt sind und erst nach der Geburt zur vollen Ausprägung gelangen [37, 61]. Dagegen scheinen Antigene des Rhesus-Systems bereits vor der Geburt fast vollständig entwickelt zu sein [11,16,57,58,70].

Der Nachweis der Blutgruppeneigenschaften A und Rh(D) bei Feten und Neugeborenen sowie der Nachweis kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Rh(D)-negativem mütterlichem Blut ist von praktischer Bedeutung bei der Abklärung der Pathogenese des Morbus haemolyticus neonatorum (Mhn), woraus sich diagnostische und therapeutische Konsequenzen ergeben können [22].

Insbesondere bei der Anti-D Erythroblastose gibt es sehr verschiedene klinische Verlaufsformen, wobei neben der unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit der IgG-anti-D Immunglobulinsubklassen [69, 74] auch die genetisch bestimmte Anzahl der Rh(D)-Epitope von Bedeutung ist.

Bei eigenen Untersuchungen wurden im Durchflußzytofluorometer pro Messung 40.000 bzw. 65.000 (Nachweis kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten in Gemischen) Erythrozyten erfaßt und durch die Auswertung der einzelnen Kanalinhalt im FITC-Grün-Fluoreszenzhistogramm und Darstellung als Summationskurven analysiert [59].

Es zeigt sich, daß nur adulte A<sub>1</sub>-Erythrozyten eine nahezu normalverteilte, homogene Population aufweisen. Dagegen zeigen adulte A<sub>2</sub>-Erythrozyten und fetale A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Erythrozyten deutlich geringere Fluoreszenzintensitäten mit heterogener Verteilung der Populationen. Die geringere Fluoreszenzintensität fetaler Erythrozyten beruht hierbei nicht auf einer gleichmäßigen Reduzierung der A-Rezeptoren. Dies zeigt sich im Kurvenverlauf der Impulsverteilungen der FITC-Grün-Fluoreszenz. Hier können bei fetalen A<sub>1</sub>-Erythrozyten grob zwei Kollektive unterschieden werden. Ein Bereich erstreckt sich von Kanal 40 bis 150, der Bereich, in dem auch die adulten A<sub>1</sub>-Erythrozyten liegen, und ein weiterer Bereich erstreckt sich von Kanal 1 bis 39 mit fetalen A<sub>1</sub>-Erythrozyten, die weniger IgG-anti-A binden.

Ähnliche Ergebnisse werden von *Fischer* [16] und *Poschmann* [58] berichtet. Sie beschreiben bei Untersuchungen der Immunfluoreszenz im Blutaussstrich unterschiedliche Fluoreszenzverteilungsspektren der A- und B-Rezeptoren von adulten und fetalen Erythrozyten. Die fluoreszenzmikroskopisch gemessenen Werte sind quantitativ jedoch nur von einer sehr kleinen Erythrozytenzahl gewonnen und für eine statistische Aufarbeitung bedingt zu verwenden.

Vor dem Hintergrund der Pathogenese der ABO-Erythroblastose ist bekannt, daß nach einem partiellen Abbau der fetalen A-Erythrozyten mit starker IgG-anti-A-Bindung die fetalen A-Erythrozyten mit geringer IgG-anti-A-Bindung zurückbleiben, worauf der direkte Coombstest nur schwach positiv oder gar negativ ausfällt. In diesem Zusammenhang hat *Lynen* [45] bei Neugeborenen mit positivem direkten Coombstest infolge erythrozytärer Bindung von mütterlichem IgG-anti-A, im Vergleich zu Neugeborenen mit IgG-anti-D-Bindung, eine sehr geringe IgG-anti-A-Bindung ermittelt.

*Brouwers* [6] hält indessen den diagnostischen Wert der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC-Reaktion) mit Monozyten für die Diagnose der ABO-Erythroblastose für relevant und lehnt danach die Hämolyse durch komplementbindende Antikörper bei dieser Erkrankung ab.

Der Nachweis von mütterlichen Hämolysinen im Serum von Neugeborenen der Blutgruppe 0 [18] und die selektive Zerstörung des Neugeborenenblutes mit Kugelzellbildung sprechen jedoch für eine Lysinwirkung.

Es war daher von Interesse, ob IgG-anti-A eine partielle Hämolyse, bei negativem Nachweis einer IgG-Beladung der fetalen A-Erythrozyten, bewirkt.

Untersucht wurde, ob sich hinsichtlich der mütterlichen Blutgruppe A bzw. 0 Unterschiede in der Ausprägung der A-Eigenschaft von A<sub>1</sub>-Erythrozyten reifer, gesunder Neugeborenen bei Mutter/Kind Konstellationen 0/A<sub>1</sub> bzw. A/A<sub>1</sub> ergeben.

Es zeigte sich, daß die A-Eigenschaft fetaler A<sub>1</sub>-Erythrozyten einer Mutter/Kind Konstellation 0/A<sub>1</sub> deutlich geringer ausgeprägt ist als bei fetalen A<sub>1</sub>-Erythrozyten einer Mutter/Kind Konstellation A/A<sub>1</sub>.

Diese Befunde sind mit der Annahme einer unterschiedlichen partiellen Hämolyse auch ohne auffallende klinische Symptome vereinbar. Inwieweit ein genetischer Einfluß (A<sub>1</sub>/A<sub>1</sub>-, A<sub>1</sub>/A<sub>2</sub>- oder A<sub>1</sub>/0-Eigenschaft der fetalen A<sub>1</sub>-Erythrozyten von Müttern mit der Blutgruppe A) diese Differenz bestimmt, wurde hier nicht untersucht.

Weitere Untersuchungen befaßten sich mit der Rh(D)-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten.

Mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik und dem IgG<sub>1</sub>-anti-D<sub>4</sub> ist es möglich, auch schwache D-Varianten (D<sup>weak</sup>) nachzuweisen und von Rh-D-negativen Erythrozyten zu unterscheiden. Hierbei zeigte sich, daß sich mit Abnahme der Rezeptordichte quantitativ, nicht jedoch qualitativ die Verteilung zu normalen Rh(D)-Erythrozyten ändert. *Van Bockstaele* [68] berichtet, daß ihm mit direkt markierten polyklonalen, humanen Rh-(D)-Antikörpern der Nachweis von adulten Rh(D)<sup>weak</sup>-Erythrozyten nicht gelang, da die schwache Immunfluoreszenz keine Unterscheidung zu Rh(D)-negativen Erythrozyten zuließ. Hier zeigen sich die Vorteile einer indirekten Fluoreszenztechnik und der daraus resultierenden Verstärkung der Immunfluoreszenz.

Die Untersuchungsergebnisse der Ausprägung der Rh(D)-Eigenschaft verschiedener Rhesus-Untergruppen adulter Erythrozyten stimmen im Prinzip mit den Befunden von *Jones* [38] und *Hughes-Jones* [36] überein, wenn man die Reaktion verschiedener (monoklonaler) Antikörper berücksichtigt.

Die Werte der Rh(D)-Immunfluoreszenz fetaler Erythrozyten der Rhesusuntergruppen CcD.Ee, cc.D.Ee und ccD.EE liegen im Vergleich mit adulten Erythrozyten gleicher Rhesusuntergruppen eng beieinander.

Im Gegensatz hierzu liegen die Werte der Rh(D)-Immunfluoreszenz der Neugeborenen mit den Rh-Formeln CcD.ee, CCD.ee und ccD.ee, von Überschneidungen abgesehen, teilweise deutlich niedriger als adulte Erythrozyten. *Wagner* [70] fand indessen bei Verwendung von polyklonalem Anti-D-Serum und einer anderen angewandten Methode keinen signifikanten Unterschied der Rh(D)-Immunfluoreszenz

bei fetalen Erythrozyten der Rh-Formel CcD.ee im Vergleich mit adulten Erythrozyten der gleichen Rh-Formel.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit die unterschiedlich starke Ausprägung der Rh(D)-Epitope der verschiedenen Rhesusuntergruppen sowohl bei fetalen und adulten Erythrozyten durchflußzytofluorometrisch differenziert nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung der Rh(D)-Eigenschaft fetaler Erythrozyten zeigte sich eine besonders starke Ausprägung der Rhesusuntergruppen ccD.EE und CcD.Ee. Dagegen weisen fetale Erythrozyten der Rhesusuntergruppen CcD.ee eine geringere Ausprägung der Rh(D)-Eigenschaft auf. Dies ist mit der klinisch bekannten Beobachtung eines meist leichteren Verlaufs der Anti-D-Erythroblastose bei Neugeborenen der Rhesus-Untergruppe CcD.ee im Vergleich zu ccD.Ee-Kindern auch bei gleichen Anti-D-Titern der Mütter vereinbar.

Zum Nachweis und zur Quantifizierung fetaler Erythrozyten bei Verdacht einer fetomaternalen Transfusion wird heutzutage zumeist die HbF-Zellfärbemethode nach *Kleihauer* und *Bethke* [4, 40] angewendet. Diese Methode hat sich für Routineuntersuchungen durchgesetzt, da sie ohne großen technischen Aufwand durchzuführen ist. Doch nicht nur die geringere Anzahl der ausgewerteten Erythrozyten, sondern auch methodische Fehler, wie beispielsweise pH-Wert-, Temperatur- und Zeitänderungen bei der Färbung, sowie die subjektive Auswertung durch den Untersucher selbst, sind für die schlechtere Reproduzierbarkeit der HbF-Zellbestimmung mitverantwortlich [2, 55, 56]. Neben diesen technischen Fehlerquellen können auch physiologische Umstände (persistierende HbF-Zellenbildung, Erhöhung von mütterlichen HbF-Zellen bei normalem Schwangerschaftsverlauf) die Ergebnisse der HbF-Zellfärbung beeinflussen [60, 71].

Entwicklungen zum Nachweis kleiner Zellpopulationen, wie beispielsweise der Enzyme-Linked-Antiglobulin-Test (ELAT) [26, 63] und die Durchflußzytofluorometrie, finden langsam Eingang in die klinische Routinediagnostik.

Insbesondere die Durchflußzytofluorometrie hat sich als außerordentlich objektives, sensitives und reproduzierbares Verfahren zum Nachweis kleiner Populationen fetaler Erythrozyten im mütterlichen Blut erwiesen [2, 7, 10, 28, 29, 34, 47, 51].

In dieser Arbeit geführte Untersuchungen zur Quantifizierung fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten durch Nachweis der Rh(D)-Eigenschaft im Durchflußzytofluorometer und durch HbF-Zellfärbung zeigen teilweise deutliche Unterschiede.

Durchflußzytofluorometrisch ist neben einer wesentlich exakteren Quantifizierung der fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten auch eine weitaus geringere Streuung der Meßergebnisse festzustellen. Ähnliche Ergebnisse werden auch von anderen Autoren berichtet [2, 47]. Im Vergleich dieser Methoden (HbF-Zellfärbung vs. Durchflußzytofluorometrie) zeigt sich der Vorteil der Auswertung einer großen Zellzahl bei durchflußzytofluorometrischen Untersuchungen.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß sich etwa 1 ‰ fetale Rh(D)-positive Erythrozyten in Gemischen mit adulten Rh(D)-negativen Erythrozyten sicher und reproduzierbar nachweisen lassen. Diese Nachweisgrenze ließ sich insbesondere durch die verbesserte Methode mit Darstellung der Ergebnisse als Summationskurven erreichen. Durch diese Darstellung können die Verlaufswerte direkt auf der Skala der y-Achse (Einteilung in ‰) beurteilt werden. Das Minimum der quantitativ erfaßbaren fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten liegt mit 1 ‰ deutlich unter der Nachweisgrenze von mindestens 5 ‰ fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten, was einer klinisch bedeutsamen feto-maternalen Makrotransfusion entspricht.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Durchflußzytofluorometer CYTORON ABSOLUTE<sup>®</sup> der Firma ORTHO-Diagnostics GmbH vergleichende Untersuchungen der erythrozytären Bindung von humanem monoklonalem IgG1-anti-D<sub>4</sub> und eluiertem humanem polyklonalem IgG-anti-A an fetalen und adulten Rh(D)- und A-Erythrozyten durchgeführt.

Die durchflußzytofluorometrische Phänotypisierung der Rh(D)- bzw. A-Eigenschaft führt zu methodischen Problemen, insbesondere durch die störende Hämagglutination mit der dadurch bedingten Verfälschung der Meßergebnisse.

Um die störende Hämagglutination zu umgehen, wurden Methoden zur Verhinderung der Hämagglutination durch chemische Fixierung von Erythrozyten mit Paraformaldehyd und Dimethylsuberimidate untersucht.

Durch die Fixierung humaner Erythrozyten konnte einerseits die Hämagglutination wirksam verhindert werden. Andererseits kam es durch diese Behandlung der Erythrozyten zu Bindungen, die nicht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen. Dabei konnten wir eine Abnahme der Meßempfindlichkeit feststellen.

In Anbetracht dieser Untersuchungen wurde auf die Fixierung verzichtet.

Das Problem der Hämagglutination läßt sich durch folgendes Vorgehen auch ohne Fixierung der Erythrozyten minimieren:

Zum Vergleich der humanen Rh(D)-Eigenschaft adulter und fetaler Erythrozyten wurde als primärer Antikörper ein monoklonales IgG1-anti-D benutzt, der spezifisch mit dem Epitop 4 des Rh(D)-Antigens reagiert.

Für die Untersuchungen der A-Eigenschaft wurde als primärer Antikörper ein eluiertes polyklonales IgG-anti-A benutzt, da ein monoklonaler humaner IgG-anti-A-Antikörper nicht zur Verfügung stand.

Die Erythrozyten wurden mit IgG1-anti-D<sub>4</sub> bzw. IgG-anti-A und anschließend mit einem FITC-markierten Anti-Human-IgG-F(ab)<sub>2</sub>-Fragement gleicher Charge als sekundärer Antikörper inkubiert.

Im Vordergrund stand vor allem eine verbesserte Auswertungsmethode der Meßdaten, mit der die Inhalte der 256 Kanäle des FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramms differenziert analysiert werden können.

Es wurden zwei Computerprogramme entwickelt, mit denen die Inhalte der Kanäle des FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramms ohne Informationsverlust mathematisch ausgewertet und graphisch dargestellt werden können.

Mit dem ersten Computerprogramm werden aus den sehr großen '\*.fcs-Dateien' die Kanalinhalt des FITC-Grün-Fluoreszenz-Histogramms ausgelesen und als '\*.txt-Dateien' gespeichert.

Nach Speicherung der Daten (\*.txt-Dateien) stehen diese Kanalinhalt für vergleichende Untersuchungen und Verlaufskontrollen zur Verfügung. Ein wesentlicher Vorteil besteht darin, daß die Meßwerte nun in einer auf jedem Computer spei-

cher- und abrufbaren Form vorliegen. Hierbei können die Werte von etwa 1000 Messungen auf einer einzigen 1,4 MB Diskette gespeichert werden.

Mit einem zweiten Computerprogramm kann aus dem Inhalt der 256 Kanäle (256 Befunde pro Messung !) eine exakte statistische Auswertung mit vergleichender graphischer Darstellung vieler Einzelbefunde in einem Diagramm (Summationskurven) vorgenommen werden.

Mit diesen Methoden wurden daraufhin durchflußzytometrische vergleichende Untersuchungen der erythrozytären Bindung von IgG1-anti-D<sub>4</sub> bzw. IgG-anti-A an fetalen und adulten Erythrozyten durchgeführt. Hierbei ging es um die unterschiedliche Ausprägung der Rh(D)- bzw. A-Eigenschaft der verschiedenen Rhesus- bzw. A-Unterguppen.

Diese Untersuchungen sind im Hinblick auf die Pathogenese der Anti-D- bzw. AB0-Erythroblastose mit den unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen dieser Erkrankungen von Interesse.

Diese Methode wurde weiterhin benutzt, um kleine Populationen Rh(D)-positiver fetaler Erythrozyten bei der feto-maternalen Transfusion nachzuweisen.

Die in der Einleitung gestellten Fragen lassen sich danach folgendermaßen beantworten:

1. Bei chemischer Fixierung mit **Paraformaldehyd (PFA)** kommt es zu einer teilweise hochgradigen, unspezifischen Verstärkung der FITC-Grün-Fluoreszenz im Vergleich zu unbehandelten Erythrozyten. Sowohl Rh(D)-negative als auch Rh(D)-positive Erythrozyten zeigen unspezifische Reaktionen mit IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment.

Mit **Dimethylsuberimidate (DMS)** fixierte Rh(D)-negative und auch Rh(D)-positive Erythrozyten zeigen gegenüber den unbehandelten Erythrozyten ebenfalls, wenn auch weitaus geringere, unspezifische Reaktionen mit IgG1-anti-D<sub>4</sub> und Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment.

Durch die Fixierung mit PFA und DMS wird die Hämagglutination wirksam verhindert, dies geht jedoch zu Lasten von Bindungen die nicht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen. Die Fixierung führt zu einer Abnahme der Meßempfindlichkeit.

2. Durch die Verwendung von monoklonalen bzw. monospezifischen primären humanen Antikörpern (IgG1-anti-D<sub>4</sub> bzw. eluiertes IgG-anti-A) sowie Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment als sekundärer Antikörper wurde die Hämagglutination wirksam minimiert.

Die Hämagglutinate ließen sich durch leichtes Schütteln der Probe auflösen.

3. Die unterschiedliche Ausprägung der Rh(D)-Eigenschaft verschiedener Rh-Untergruppen stimmen im Prinzip mit vorhergehenden Untersuchungen der Literatur überein und lassen sich im Durchflußfluorozytometer mit hoher Auflösung bestätigen.

Die unterschiedlich starke Ausprägung der Rh(D)-Eigenschaft der Rhesusuntergruppen CcD.ee bzw. ccD.Ee unterstützt die Beobachtung eines meist leichteren klinischen Verlaufs einer Anti-D-Erythroblastose bei Neugeborenen mit der Rh-Formel CcD.ee im Vergleich zu Neugeborenen mit der Rhesus-Formel ccD.Ee.

Die bisherige Vorstellung, daß der Rh(D)-Rezeptor auf allen Nabelerythrozyten nahezu vollständig ausgereift ist, ließ sich erweitern.

Die Werte der Rh(D)-Eigenschaft fetaler Erythrozyten der Rhesusuntergruppen CcD.Ee, cc.D.Ee und ccD.EE zeigen eine unterschiedlich starke Rh(D)-Ausprägung, liegen aber im Vergleich mit adulten Erythrozyten der gleichen Rhesusuntergruppe eng beieinander. Erwartungsgemäß findet man die stärkste Rh(D)-Ausprägung fetaler und adulter Erythrozyten bei der Rhesusuntergruppe ccD.EE. Im Gegensatz hierzu liegen die Werte der Rh(D)-Eigenschaft von reifen Neugeborenen mit den Rh-Formeln CcD.ee, CCD.ee und ccD.ee, von Überschneidungen abgesehen, niedriger als adulte Erythrozyten (s. Abb. 6).

Mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik ist es möglich, auch schwache Rh(D)-Varianten ( $D^{weak}$ ) nachzuweisen. Diese unterscheiden sich in ihrer Fluoreszenz quantitativ, nicht jedoch qualitativ von normalen Rh(D)-Erythrozyten.

Leider standen hier nur Erwachsenen-Erythrozyten zur Verfügung.

Die Untersuchungen der A-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten zeigen, daß nur adulte  $A_1$ -Erythrozyten ein nahezu normalverteiltes Kollektiv einer einzelnen Population aufweisen, wogegen adulte  $A_2$ -Erythrozyten und fetale  $A_1$ - und  $A_2$ -Erythrozyten eine deutlich geringere Ausprägung der A-Eigenschaft und eine heterogene Verteilung der Populationen zeigen. Im Verlauf der Summationskurven fetaler  $A_1$ -Erythrozyten zeigt sich, daß die geringere Ausprägung der A-Eigenschaft nicht auf einer gleichmäßigen Reduzierung der A-Rezeptoren beruht. Bei fetalen  $A_1$ -Erythrozyten und adulten  $A_2$ -Erythrozyten können grob zwei Kollektive unterschieden werden.

Das Nebeneinander von Erythrozytenpopulationen mit unterschiedlicher A-Rezeptorzahl hat Auswirkungen bei der ABO-Erythroblastose Neugeborener. Hier bleiben nach einem partiellen Abbau der Erythrozyten mit starker IgG-anti-A-Bindung die Erythrozyten mit geringer IgG-anti-A-Bindung zurück, worauf der direkte Coombstest nur schwach positiv oder gar negativ ausfällt.

4. Fetale A<sub>1</sub>-Erythrozyten einer Mutter/Kind Konstellation O/A<sub>1</sub> weisen eine deutlich geringere Ausprägung der A-Eigenschaft auf als fetale A<sub>1</sub>-Erythrozyten einer Mutter/Kind Konstellation A/A<sub>1</sub>.

Die Befunde sind mit der Annahme einer unterschiedlichen partiellen Hämolyse auch ohne auffallende klinische Symptome vereinbar.

5. Die Quantifizierung fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten zeigen nach Messung im Durchflußzytofluorometer (Nachweis der Rh(D)-Eigenschaft) und nach HbF-Zellfärbung deutlich unterschiedliche Ergebnisse.

Bei durchflußzytofluorometrischer Analyse der Proben ist neben der exakteren Quantifizierung fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten auch eine weitaus geringere Streuung der Meßergebnisse festzustellen.

Gerade im Vergleich dieser Methoden zeigt sich der Vorteil der Auswertung einer großen Zellzahl bei den durchflußzytofluorometrischen Untersuchungen.

Als Verbesserung der Methode erweist sich insbesondere die Darstellung der Ergebnisse als Summationskurven, bei der die Verlaufswerte direkt auf der y-Achse (Promille-Einteilung) beurteilt werden können (s. Abb. 11).

Mit dieser Auswertung liegt das Minimum der quantitativ erfaßbaren fetalen Rh(D)-positiven Erythrozyten bei etwa 1 ‰.

Wegen der zwar empfindlichen und zuverlässigen, jedoch bisher aufwendigen durchflußzytofluorometrischen Verfahren wird ein Schnelltest zum Nachweis Rh(D)-positiver fetaler Erythrozyten gefordert, den man parallel und in Kontrolle mit der Durchflußzytofluorometrie entwickeln könnte.

## 6. Literaturverzeichnis

- Arndt, P.; Garratty, G. (1987). Variation of C antigen strength on r' r RBCs demonstrated by flow cytometry. *Transfusion* 27, 514-519.
2. Bayliss, K. M.; Kueck, B. D.; Johnson, S. T.; Fueger, J. T.; McFadden, P. W.; Mikulski, D.; Gottschall, J.L. (1991). Detecting fetomaternal hemorrhage: a comparison of five methods. *Transfusion* 31, 303-307.
3. Berneman, Z. N.; van Bockstaele, D. R.; Uyttenbroeck, W. M.; Van Zaelen, C.; Cole-Dergent, J.; Muylle, L.; Peetermans, M. E. (1991). Flow cytometric analysis of erythrocytic blood group A antigen density profile. *Vox Sang.* 61, 265-274.
4. Bethke, K.; Nierhaus, K. (1968). Fetales Hämoglobin und fetale Erythrozyten im mütterlichen Blut. *Münchener Med. Wochenschr.* 110, 509-516.
5. Bigbee, W. L.; Langlois, R. G.; Stanker, L. H.; Vanderlaan, M.; Jensen, R.H. (1990). Flow cytometric analysis of erythrocyte populations in Tn syndrome blood using monoclonal antibodies to glycophorin A and the Tn antigen. *Cytometry* 11, 261-271.
6. Brouwers, H. A. A.; Overbeeke, M. A. M.; Ouwehand, W.H.; Keunung, K; van Ertbruggen, I.; van Leeuwen, E. F.; Stoop, J. W.; Engelfriet, C. P. (1988). Maternal antibodies against fetal blood group antigens A or B: lytic activity of IgG subclasses in monocyte-driven cytotoxicity and correlation with ABO haemolytic disease of the newborn. *Br. J. Haematol.* 70, 465-469.
7. Chen, J.C.; Marcheai, J.; Poulik, D. (1989). Determination of hemoglobin F<sup>+</sup>(HBF<sup>+</sup>) cells by flow cytometry (FC). *FASEB* 3, 268-272.
8. Coombs, R. R. A.; Mourant, A. E.; Race, R. R. (1945). A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *Br. J. Ex. Pathol.* 26, 255-259.
9. Coulter, W. H. (1956). High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc. Natl. Electronics Conf.* 12, 1034-1040.
10. Cupp, J. E.; Leary, J. F.; Cernichiari, E.; Wood, J. C. S.; Doherty, R. A. (1984). Rare-event analysis methods for detection of fetal red blood cells in maternal blood. *Cytometry* 5, 138-144.
11. De Palma, L. (1992). Expression of red cell Antigens C and c on neonatal and adult erythrocytes. *Vox Sang.* 63, 53-55.
12. De Villartay, J. P.; Rouger, P.; Muller, Y. J.; Salmon, C. (1985). HLA antigens on peripheral red blood cells: analysis by flow cytofluorometry using monoclonal antibodies. *Tissue Antigens* 26, 12-19.
13. Engelfriet, C. P.; Reesink, H. W. (1995). What is the best technique for the detection of red cell antibodies ? International Forum. *Vox Sang.* 69, 292-300.
14. Evans, D. (Hrsg.) (1970). Cytology Automation. Livingstone, London.
15. Fibach, E.; Sharon, R. (1994). Changes in antigen expression on red cells during in vivo aging: a flow cytometric analysis. *Transfusion* 34, 328-332.

16. Fischer, K.; Stege, N. (1967). On the pathogenesis of ABO erythroblastosis: demonstration of quantitative variations in the power of neonatal erythrocytes to combine with antibody, using the immunofluorescent technique. *Vox Sang.* 12: 145-150.
17. Fischer, K.; Poschmann, A.; Grundmann, A. (1977). Hämolytische Neugeborenen-erkrankungen infolge ABO-Unverträglichkeit. *Z. Geburtshilfe Perinatol.* 181, 227-240.
18. Fischer, K.; Poschmann, A.; Grundmann, A.; Assmussen, S. (1992). Neue Möglichkeiten bei der Diagnose von hämolytischen Neugeborenen-erkrankungen. *Infusionstherapie* 19, 208-213.
19. Fischer, K. (1993). Pränatale Diagnostik und Prophylaxe hämolytischer Neugeborenen-erkrankungen. *Infusionsther. Transfusionsmed.* 20, 64-69.
20. Fischer, K.; Wester, S.; Grundmann, A.; Poschmann, A. (1995). Durchflußzytofluorometrischer Nachweis von erythrozytären Antigenen und Antikörpern. Technische Aspekte und neue klinische Anwendungen. *Infusionsther. Transfusionsmed.* 22, 344-349.
21. Fischer, K.; Poschmann, A.; Niesytto, C.; Wester, S.; Grundmann, A. (1997). Application of flow cytometry to the detection of erythrocyte membran changes in microbial infections. In: Gutensohn, K.; Sonneborn, H.-H.; Kühnl, P. (Hrsg.). Aspects of the Flow-Cytometric Analysis of Red Blood Cells. Clin. Lab. Publications, Heidelberg, 1-17.
22. Fischer, K.; Schellong, G. (1997). Hyperbilirubinämie, Blutgruppeninkompatibilität. In: D. Reinhard (Hrsg.). Therapie der Krankheiten des Kindesalters. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 12-23.
23. Garratty, G.; Arndt, P. (1995). Applications of flow cytometry to transfusion science. *Transfusion* 35, 157-178.
24. Garratty, G.; Nance, S. (1990). Correlation between in vivo hemolysis and the amount of red cell-bound IgG measured by flow cytometry. *Transfusion* 31, 617- 621.
25. Gorick, B.; McDougall, D. C. J.; Ouwehand, W. H.; Overbeeke, M. A. M.; Tippet, P.; Hughes-Jones, N. C.; van Rhenen, D. J. (1993). Quantitation of D Sites on selected 'weak D' and 'partial D' red cells. *Vox Sang.* 65, 136-140.
26. Greenwalt, T.J.; Dumaswala, U. J.; Domino, M. M. (1992). The quantification of fetomaternal hemorrhage by an enzyme-linked antibody test with glutaraldehyde fixation. *Vox Sang.* 63, 268-271.
27. Greenwalt, T.J.; Dumaswala, U. J.; Siongco, A.; Domino, M. M. (1992). An enzyme-linked antiglobulin test to detect red cell globulins after glutaraldehyde fixation. *Vox Sang.* 63, 262-267.
28. Griffin, G. D.; Lippert, N. S.; Dow, N. S.; Berger, M. R.; Hickman, M. R.; Salata, K. F. (1994). A flow cytometric method for phenotyping recipient red cells after following transfusion. *Transfusion* 34, 233-237.
29. Gross, H-J.; Verwer, B.; Houck, D.; Rechtenwald, D. (1993). Detection of rare cells at a frequency of one per million by flow cytometry. *Cytometry* 14, 519-526.

30. Gutensohn, K.; Sonneborn, H.-H.; Kühnl, P. (Hrsg.) (1987). Aspects of the Flow-Cytometric Analysis of Red Blood Cells. Clin. Lab. Publications, Heidelberg
31. Hansmann, M.; Fischer, K.; Gembruch, U.; Ulbrich, R. (1986). Pränatale Bluts substitution - Transfusion und Austausch bei Pseudo-anti-A-Erythroblastose infolge fetomaternalen Blutung. *Ultraschal. Klin. Prax.* 1, 35-40.
32. Hasekura, H.; Ota, M.; Hasegawa, A.; Ichinose, A.; Fukushima, H.; Ogata, H. (1990). Flow cytometric studies of the D antigen of various Rh phenotypes with particular reference to D<sup>u</sup> and D<sub>e</sub>l. *Transfusion* 30, 236-238.
33. Herzenberg, L.A.; Sweet, R.G. (1976). Fluorescence-activated cell sorting. *Sc. Amer.* 234 (3), 108-115.
34. Herzenberg, L. A.; Bianchi, D. W.; Schröder, J.; Cann, H. M.; Iverson, G. M. (1979). Fetal cells in the blood of pregnant women: Detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1453-1455.
35. Hughes, G. G.; Craig, J. I. O.; Murphy, W. G.; Greer, I. A. (1994). Causes and clinical consequences of Rhesus (D) haemolytic disease of the newborn: a study of a Scottish population, 1985-1990. *Br. J. of Ob. and Gynaecology* 101, 297-300.
36. Hughes-Jones, N. C; Gardner, B.; Lincoln, P. J. (1971). Observation of the number of available C, D and E antigen sites on red cells. *Vox Sang.* 21, 210-216.
37. Issit, P.D (Hrsg.) (1985). Applied Blood Group Serology. Montgomery Scientific Publications, Miami.
38. Jones, J. W.; Lloyd-Evans, P.; Kumpel, B. M. (1996). Quantitation of Rh D antigen sites on weak D and D variant red cells by flow cytometry. *Vox Sang.* 71, 176-183.
39. Kamentsky, L. A.; Melamed, M. R. (1969). Instrumentation for automated examinations of cellular specimens. *Proc. IEEE* 57, 2007-2012.
40. Kleihauer, E.; Braun, H.; Bethke, K. (1957). Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrozyten eines Blutaussstrichs. *Klin. Wochenschr.* 35, 637-639.
41. Kornprost, M.; Rouger, P. H.; Goossens, D.; Champomier, F.; Salmon, C. H. (1986). Determination of Rh(D) genotype: use of human monoklonal antibodies in flow cytometry. *J. Clin. Pathol.* 39, 1039-1040.
42. Langlois, R.G.; Bigbee, W. L.; Jensen, R. H. (1985). Flow cytometric characterisation of normal and variant cells with monoclonal antibodies specific for glycoprotein A. *J. Immunol.* 134, 4009-4017.
43. Landsteiner, K. (1931). Individual differences in human blood. *Science* 73, 405-407.
44. Lanier, L. L.; Warner, N.L. (1981). Paraformaldehyde fixation of haematopoietic cells for quantitative flow cytometry (FACS) analysis. *J. of Immunological Methods* 47, 25-30.

45. Lynen, R.; Neuhaus, R.; Schwarz, D. W. M.; Simson, G.; Riggert, J.; Mayr, W. R.; Köhler, M. (1995). Flow cytometric analyses of the subclasses of red cell IgG antibodies. *Vox Sang.* 69, 126-130.
46. McHugh, M.; Reid, M. E.; Stites, D. P.; Chase, E. S.; Casavant, C. H. (1987). Detection of human erythrocyte surface antigen gerbich by flow cytometry using human antibodies and phycoerythrin for extreme immunofluorescence sensitivity. *Vox Sang.* 53, 231-234.
47. Medearis, A. L.; Hensligh, P. A.; Parks, D. R.; Herzenberg, L. A. (1984). Detection of fetal erythrocytes in maternal blood post partum with the fluorescence-activated cell sorter. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 148, 290-295.
48. Murai, J.; Naka, K.; Shimojo, N.; Katakami, T.; Nakagishi, M.; Kuroki, T.; Okuda, K. (1994). Quantitative analysis of Lewis antigens on erythrocytes by flow cytometry. *Clinica. Chemica. Acta* 226, 21-28.
49. Nance, S.; Garratty, G (1984). Correlates between in vivo flow cytofluorometrie. *Blood* 64, 88-90.
50. Nance, S.; Garratty, G.(1987). Application of flow cytometry to immunohaematology. *J. Immunol. Methods* 101, 127-131.
51. Nance, S.; Nelson, J. M.; Arndt, P. A.; Lam, H. T. C.; Garratty, G. (1989). Quantitation of fetal-maternal hemorrhage by flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* 91, 288-292.
52. Neagu, C.; van der Werf, K. O.; Putman, C. A. J.; Kraan, Y. M. ; de Grooth, N. F.; van Hulst, N. F.; Greve, J. (1994). Analysis of immunolabeled cells by atomic force microscopy, optical microscopy and flow cytometry. *J. of Structural Biology* 2, 32- 40.
53. Niesyto, C. Zum Nachweis von thrombozytären Immunreaktionen mit dem Durchflußfluorozytometer. Diss. med., Hamburg (in Vorbereitung).
54. Pallavicini, M. G.; Langlois, R. G.; Reitsma, M.; Gonzalgo, M.; Sudar, D.; Montoya, T.; Weier, H.U.; Haendel S. (1992). Comparison of strategies to detect and quantitate uniquely marked cells in intra- and interspecies haemopoietic chimeras. *Cytometry* 13, 356-367.
55. Polesky, H.F. (1991). Detection of fetomaternal hemorrhage: how,when and why. *Transfusion* 31, 288-289.
56. Polesky, H.F.; Sebring, B. S. (1981). Evaluation of methods for detection and quantitation of fetal cells and their effect on Rh IgG usage. *Am. J. Clin. Pathol.* 76, 525-529.
57. Poschmann, A. (1974). Immunfluoreszenzdarstellung erythrozytärer Rezeptoren. Habilitationsschrift, Universität Hamburg.
58. Poschmann, A. (1976). Immunfluoreszenzdarstellung erythrozytärer Rezeptoren. *Der Kinderarzt* 6, 643-655.

59. Poschmann, A.; Fischer, K.; Kluxen, M. (1997). The detection of A and Rhesus (D) antigens on fetal erythrocytes. In: Gutensohn, K.; Sonneborn, H.-H.; Kühnl, P. (Hrsg.). *Aspects of the Flow-Cytometric Analysis of Red Blood Cells*. Clin. Lab. Publications, Heidelberg, 19-30.
60. Propat, N.; Wood, W. G.; Weatherall, D. J.; Turnbull, A. C. (1977). Patern of maternal F-cell production during pregnancy. *The Lancet* 20, 377-379.
61. Race, R. R.; Sanger, R. (Hrsg.) (1975). *Blood Groups in Men*. Blackwell Scientific Publication, New York.
62. Read, E. J.; Cardine, L. L.; Yu, M. Y. (1991). Flow cytometric detection of human red cells labeled with a fluorescent membrane label: potential application to in vivo survival studies. *Transfusion* 31, 502-508.
63. Riley, J. Z.; Ness, P. M.; Taddie, S. J.; Barrasso, C.; Baldwin, M. L. (1982). Detection and quantification of fetal maternal hemorrhage utilizing an enzyme-linked antiglobulin test. *Transfusion* 22, 472-476.
64. Rivera, R.; Scornik, J. C. (1986). HLA antigens on red cells. *Transfusion* 26, 375-381.
65. Shapiro, H.M. (Hrsg.) (1988). *Practical Flow Cytometry*, Alan R. Liss. Inc., New York
66. Sharon, R.; Fibach, E. (1991). Quantitative flow cytometric analysis of ABO red cell antigens. *Cytometry* 1, 545-549.
67. Sharpless, D.; Traganos, M. A.; Darzynkiewicz, Z.; Melamed, R. (1975). Flow cytofluorometry: Discrimination between single cells and cell aggregates by direct size measurements. *Acta cytologica* 19 (6), 577-581.
68. van Bockstaele, D. R.; Berneman, Z. N. ; Muylle, L.; Cole-Dergent, J.; Peetermans, M. E. (1986). Flow cytometric analysis of erythrocytic D antigen desity profile. *Vox Sang.* 51, 40- 46 (1986).
69. van der Meulen, F. W.; De Bruin, H. G.; Goosen, P. C. M.; Bruynes, E. C. E.; Joustra-Maas, C. J.; Telkamp, H. G.; van dem Borne, A. E. G.; Engelfriet, C. P. (1980). Quantitative aspects of the destruction of red cells with IgG1 antibodies: An application of flow cytometry. *Br. J. Haematol.* 46, 47-56.
70. Wagner, F. F. (1994). Influence of rh phenotype on the antigen density of C, c and D: flow cytometric study using a frozen standard red cell. *Transfusion* 3, 676-671.
71. Weaver, D. L.; Barthold, J. C.; Hamill, B.; Sharp, G. H. (1990). Hereditary persistence of fetal hemoglobin presenting in fetal-maternal hemorrhage. *Am. J. Clin. Pathol.* 39, 277-280.
72. Wester, S. (1997). Alteration der Erythrozytenmembran durch mikrobielle Antigene und Enzyme - Experimentelle Untersuchungen mt der Durchflußcytofluorometrie. Diss. med., Hamburg.
73. Wong, C.; Sasseti, R. J.; McLeod, B. C. (1989). Flow cytometric determination of mixed red blood cell populations in transfused patients. *Labmedica* 15, 19-21.

74. Zupanska, B.; Thompson, E.; Brojer, E; Merry, A. H. (1987). Phagocytosis of erythrocytes sensitized with known amounts of IgG1 and IgG3 anti-Rh-antibodies. *Vox Sang.* 53, 96-101.
75. Zupanska, B.; Brojer, E.; Thompson, E.; Merry, A. H.; Seyfried, H. (1987). Monocyte-erythrocyte interaction in autoimmune haemolytic anaemia in relation to the number of erythrocyte-bound IgG molecules and subclass specificity of autoantibodies. *Vox Sang.* 52, 212-218.

## 7. Anhang

Im Anhang werden die Einzelwerte der Versuche tabellarisch zusammengestellt.

### A. Fixierung mit Dimethylsuberimidate (DMS) und Paraformaldehyd (PFA) (s. Ergebnisse Seite 19 - 24)

Fluoreszenz nativer, unmarkierter Erythrozyten der Blutgruppe 0 ccddee; (n=9)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
4	10	0,995	7,235	0,125
2	11	0,996	7,568	0,254
3	10	0,996	7,124	0,235
3	11	0,997	6,987	0,345
2	10	0,994	7,568	0,256
2	10	0,993	7,357	0,298
3	11	0,994	6,688	0,244
2	10	0,993	7,125	0,384
3	11	0,995	7,15	0,247

Fluoreszenz mit PFA fixierter, unmarkierter Erythrozyten der Blutgruppe 0 ccddee; (n=8)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
6	11	0,987	9,658	0,124
7	12	0,986	9,235	0,245
7	14	0,999	10,124	0,254
6	13	0,984	9,451	0,114
8	12	0,998	9,415	0,177
6	13	0,997	10,245	0,254
7	12	0,954	10,124	0,145
7	12	0,999	9,554	0,111

Fluoreszenz mit DMS fixierter, unmarkierter Erythrozyten der Blutgruppe 0 ccddee; (n=9)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
3	10	0,995	7,54	0,235
2	10	0,954	7,894	0,324
2	11	0,954	7,124	0,125
3	11	0,936	7,654	0,321
3	11	0,995	7,125	0,345
3	10	0,994	7,235	0,314
3	11	0,995	7,541	0,289
2	10	0,987	7,568	0,245
3	11	0,923	7,687	0,312

Fluoreszenz nativer, unmarkierter Erythrozyten der Blutgruppe 0 CcD.Ee; (n=10)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
4	11	0,998	7,739	0,184
3	11	0,995	7,481	0,286
3	11	0,996	7,290	0,258
3	11	0,994	7,494	0,311
3	11	0,994	7,560	0,311
2	10	0,992	6,567	0,358
2	10	0,992	6,567	0,358
2	10	0,993	6,516	0,355
2	11	0,993	6,954	0,369
2	11	0,993	6,756	0,369

Fluoreszenz mit PFA fixierter, unmarkierter Erythrozyten der Blutgruppe 0 CcD.Ee; (n=10)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
7	12	0,999	9,875	0,085
7	12	0,999	9,936	0,097
7	13	0,999	10,018	0,099
7	13	0,999	9,967	0,094
8	13	0,998	9,715	0,177
8	13	0,997	10,229	0,032
7	12	0,999	9,750	0,095
7	12	0,999	10,018	0,113
7	13	0,999	9,995	0,104
8	14	0,998	10,445	0,105

Fluoreszenz mit DMS fixierter, unmarkierter Erythrozyten der Blutgruppe 0 CcD.Ee; (n=9)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
3	11	0,994	7,435	0,311
3	11	0,993	7,708	0,339
2	11	0,992	7,175	0,416
3	11	0,994	7,348	0,325
2	11	0,990	7,198	0,463
3	11	0,994	7,613	0,314
3	11	0,995	7,349	0,288
3	11	0,994	7,770	0,322
3	11	0,993	7,555	0,341

Unbehandelte Erythrozyten + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment der Blutgruppe 0 ccddee; (n=10)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
2	10	0,956	7,891	0,214
3	11	0,996	7,562	0,321
2	10	0,996	7,154	0,124
3	11	0,989	7,256	0,311
2	10	0,985	7,458	0,321
2	10	0,992	7,214	0,382
3	11	0,986	7,124	0,254
2	10	0,993	7,125	0,268
3	10	0,989	7,147	0,298
2	11	0,995	7,421	0,312

PFA fixierte Erythrozyten + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment der Blutgruppe 0 ccddee;  
(n=11)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
6	19	0,986	13,245	0,235
7	20	0,995	14,125	0,214
6	18	0,996	13,547	0,198
7	19	0,992	14,125	0,245
5	20	0,994	13,245	0,265
7	21	0,995	13,481	0,274
8	19	0,993	14,526	0,312
7	16	0,986	12,154	0,287
7	21	0,996	13,145	0,249
7	21	0,987	13,784	0,341
6	20	0,997	14,95	0,287

DMS fixierte Erythrozyten + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment der Blutgruppe 0 ccddee;  
(n=11)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
3	16	0,996	8,456	0,323
2	16	0,995	9,174	0,324
3	17	0,987	8,963	0,412
2	16	0,995	8,154	0,398
2	16	0,989	9,045	0,258
3	17	0,996	9,145	0,415
2	16	0,996	8,965	0,354
2	16	0,995	9,147	0,399
3	17	0,996	9,045	0,463
2	16	0,994	9,012	0,401
3	16	0,996	8,895	0,389

Unbehandelte Erythrozyten + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment der Blutgruppe 0 CcD.Ee;  
(n=10)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
3	11	0,998	7,739	0,184
3	11	0,995	7,481	0,286
3	11	0,996	7,290	0,258
3	11	0,994	7,494	0,311
3	11	0,994	7,560	0,311
2	10	0,992	6,567	0,358
2	10	0,992	6,567	0,358
2	10	0,993	6,516	0,355
2	11	0,993	6,954	0,369
2	11	0,993	6,756	0,369

PFA fixierte Erythrozyten + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment der Blutgruppe 0 CcD.Ee;  
(n=11)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
7	21	0,992	14,527	0,309
7	20	0,995	13,735	0,221
7	20	0,996	14,215	0,319
7	21	0,992	14,437	0,262
7	20	0,994	14,146	0,287
7	21	0,996	14,216	0,260
7	21	0,993	14,264	0,296
7	20	0,994	13,964	0,263
7	21	0,996	14,224	0,257
7	21	0,995	14,158	0,260
8	22	0,997	15,018	0,227

DMS fixierte Erythrozyten + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment der Blutgruppe 0 CcD.Ee;  
(n=11)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
2	17	0,996	8,805	0,446
2	16	0,995	9,396	0,473
2	16	0,996	9,263	0,437
2	16	0,995	8,679	0,477
2	16	0,995	9,078	0,443
2	16	0,996	8,695	0,440
2	16	0,996	8,728	0,400
2	16	0,996	8,812	0,415
2	16	0,996	9,095	0,426
2	16	0,996	9,095	0,426
2	15	0,996	8,451	0,399

Unbehandelte Erythrozyten (0 ccddeee)+ IgG1-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-  
Fragment; (n=6)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
2	11	0,993	6,811	0,369
2	11	0,994	6,878	0,363
3	11	0,997	7,196	0,241
2	11	0,994	6,718	0,349
2	11	0,994	6,803	0,360
2	10	0,993	6,524	0,349

PFA fixierte Erythrozyten (0 ccddeee)+ IgG1-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment;  
(n=3)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
40	55	0,999	47,840	0,238
41	57	0,999	48,984	0,218
35	52	0,999	43,817	0,224

DMS fixierte Erythrozyten (0 ccddeee)+ IgG1-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment;  
(n=5)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
5	19	0,998	12,252	0,322
7	23	0,999	15,372	0,278
6	22	0,998	14,269	0,314
7	23	0,999	15,372	0,278
8	24	0,999	16,030	0,254

Unbehandelte Erythrozyten (0 CcD.Ee)+ IgG1-anti-D<sub>4</sub> + Anti Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-  
Fragment; (n=9)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
76	91	0,999	83,100	0,199
71	89	0,997	79,852	0,149
75	88	0,999	81,416	0,165
83	97	0,999	89,747	0,194
82	97	0,999	89,507	0,163
76	91	0,999	83,914	0,206
69	89	0,996	86,800	0,170
66	81	0,999	73,764	0,160
76	91	0,999	83,100	0,199

PFA fixierte Erythrozyten (0 CcD.Ee)+ IgG1-anti-D<sub>4</sub> + Anti Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment;  
(n=7)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
64	76	0,999	70,072	0,192
64	76	0,998	70,334	0,230
73	86	0,998	79,711	0,25
66	78	0,999	72,128	0,167
65	77	0,998	71,451	0,237
66	78	0,999	72,047	0,164
62	75	0,999	68,641	0,185

DMS fixierte Erythrozyten (0 CcD.Ee)+ IgG1-anti-D<sub>4</sub> + Anti Human-IgG-FITC-F(ab)<sub>2</sub>-Fragment;  
(n=8)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
87	101	0,998	94,465	0,291
80	95	0,997	88,111	0,353
86	101	0,998	93,932	0,310
88	103	0,998	96,054	0,342
90	104	0,998	97,508	0,291
86	99	0,999	92,852	0,232
86	106	0,999	105,921	0,271
73	94	0,998	83,861	0,412

**B. Rh(D)-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten (s. Ergebnisse Seite 25)**

**B I. Rh(D)-Eigenschaft adulter Erythrozyten**

Adulte Erythrozyten ccddee + IgG1-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub> Fragment; (n=30)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
4	17	0,998	11,41	0,27
3	16	0,997	10,871	0,33
4	16	0,997	11,049	0,295
4	17	0,997	11,577	0,315
4	16	0,997	11,072	0,292
4	17	0,998	11,528	0,275
3	16	0,996	10,710	0,351
3	17	0,996	11,367	0,400
4	17	0,997	11,456	0,303
4	17	0,997	11,297	0,298
4	17	0,998	11,385	0,276
3	17	0,996	11,131	0,404
4	18	0,998	13,064	0,251
4	18	0,998	12,435	0,279
3	18	0,999	13,191	0,173
5	18	0,998	12,905	0,219
4	18	0,999	13,094	0,181
4	19	0,998	13,319	0,245
4	18	0,998	12,871	0,228
3	19	0,998	13,283	0,251
5	16	0,998	11,661	0,225
3	17	0,999	11,661	0,197
3	17	0,998	11,887	0,211
3	17	0,999	11,803	0,194
3	17	0,997	11,748	0,298
4	17	0,998	11,877	0,232
4	17	0,999	11,871	0,174
4	17	0,998	11,69	0,222
4	18	0,998	12,198	0,265
3	17	0,997	11,72	0,308

Adulte Erythrozyten CcD.ee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=23)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
52	76	0,996	65,122	0,708
57	74	0,998	65,96	0,315
56	76	0,998	66,421	0,441
57	75	0,998	66,511	0,349
59	75	0,999	67,26	0,234
58	77	0,998	68,222	0,379
58	77	0,996	68,644	0,527
62	77	0,999	69,672	0,194
61	78	0,999	69,893	0,280
62	78	0,999	70,217	0,233
63	79	0,999	70,992	0,220
64	79	0,999	71,659	0,234
66	80	0,999	73,419	0,221
66	81	0,999	73,700	0,204
66	81	0,998	73,900	0,278
69	83	0,999	76,195	0,187
68	84	0,998	76,500	0,350
69	85	0,999	77,100	0,239
65	89	0,999	77,296	0,379
70	87	0,999	78,500	0,232
72	89	0,999	80,800	0,289
73	88	0,998	81,000	0,279
77	90	0,999	83,616	0,183

Adulte Erythrozyten ccD.Ee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=23)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
63	74	0,996	68,742	0,328
66	79	0,998	72,374	0,272
75	88	0,998	81,937	0,191
63	76	0,998	69,781	0,415
59	70	0,999	64,372	0,169
67	79	0,998	72,965	0,233
78	88	0,996	83,322	0,274
76	86	0,999	80,945	0,157
78	88	0,999	82,860	0,200
69	79	0,999	74,166	0,243
71	80	0,999	75,522	0,205
58	72	0,999	64,925	0,317
62	71	0,999	66,516	0,307
69	81	0,999	74,978	0,348
65	75	0,998	69,910	0,271
61	71	0,999	65,987	0,297
71	80	0,998	75,470	0,280
78	88	0,999	83,115	0,145
71	83	0,999	77,172	0,221
67	76	0,999	71,433	0,175
67	75	0,999	71,105	0,214
64	77	0,998	70,535	0,224
69	83	0,999	76,093	0,247

Adulte Erythrozyten CCD.ee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=30)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
48	72	0,998	60,766	0,486
65	79	0,993	72,938	0,539
79	95	0,999	87,329	0,244
74	91	0,999	82,693	0,203
68	85	0,999	76,583	0,200
73	90	0,999	81,642	0,230
70	89	0,999	80,106	0,229
72	90	0,999	80,900	0,186
70	88	0,999	79,382	0,210
68	87	0,999	77,584	0,274
58	74	0,999	65,842	0,211
83	100	0,999	91,658	0,183
73	90	0,999	81,652	0,201
72	90	0,999	80,581	0,214
70	81	0,998	76,006	0,227
77	88	0,999	83,045	0,181
65	77	0,999	70,838	0,181
70	81	0,999	75,896	0,194
70	80	0,999	75,144	0,128
76	88	0,997	82,903	0,318
68	79	0,999	73,721	0,144
68	81	0,999	74,849	0,237
69	81	0,999	74,787	0,121
64	76	0,999	70,365	0,184
58	70	0,999	64,543	0,201
67	78	0,999	72,691	0,136
65	76	0,999	70,794	0,149
68	79	0,999	73,563	0,146
75	86	0,999	80,623	0,159
67	78	0,999	72,856	0,170

Adulte Erythrozyten ccD.ee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=25)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
77	90	0,998	84,025	0,301
65	81	0,999	73,476	0,273
75	89	0,999	82,255	0,194
80	96	0,997	88,736	0,408
77	88	0,999	82,431	0,163
73	85	0,998	79,336	0,238
76	88	0,998	82,651	0,273
78	88	0,999	83,431	0,150
71	85	0,999	78,092	0,205
70	83	0,998	76,977	0,249
66	80	0,999	73,420	0,169
75	87	0,999	81,153	0,187
74	88	0,999	80,843	0,308
75	86	0,999	80,548	0,290
79	93	0,997	85,642	0,323
67	80	0,999	73,517	0,241
76	86	0,998	81,025	0,263
72	83	0,998	77,496	0,297
71	82	0,997	76,559	0,256
74	87	0,999	80,352	0,133
69	83	0,998	76,140	0,205
78	88	0,998	82,777	0,173
71	82	0,999	76,587	0,210
72	85	0,999	78,396	0,223
69	83	0,998	76,093	0,207

Adulte Erythrozyten CcD.Ee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=25)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
79	94	0,999	86,783	0,222
78	94	0,999	85,784	0,205
66	80	0,999	73,419	0,221
76	94	0,999	84,941	0,216
81	95	0,997	87,927	0,146
75	89	0,999	82,103	0,184
75	91	0,997	83,210	0,152
75	86	0,999	80,623	0,159
69	84	0,999	76,596	0,209
71	85	0,999	77,681	0,217
72	86	0,997	79,142	0,176
77	88	0,999	82,753	0,211
79	93	0,997	85,965	0,154
69	84	0,999	76,408	0,170
78	94	0,998	85,985	0,186
69	82	0,999	75,763	0,184
78	89	0,997	83,481	0,262
80	91	0,999	85,627	0,214
82	96	0,998	89,094	0,154
80	94	0,999	87,374	0,157
77	92	0,999	84,263	0,193
75	90	0,999	82,393	0,261
79	92	0,999	85,241	0,235
81	94	0,997	87,296	0,203
75	86	0,999	80,627	0,187

Adulte Erythrozyten ccD.EE + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=30)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
75	87	0,999	81,196	0,215
76	88	0,999	82,418	0,217
84	95	0,999	89,595	0,163
81	95	0,999	87,706	0,165
75	91	0,998	83,550	0,294
86	101	0,999	94,102	0,245
86	99	0,998	93,220	0,299
86	101	0,999	93,679	0,187
80	92	0,999	86,321	0,215
81	93	0,999	87,470	0,217
86	96	0,999	91,188	0,133
83	93	0,999	88,386	0,177
79	90	0,999	84,607	0,137
80	93	0,999	86,416	0,157
74	88	0,999	80,683	0,205
81	96	0,999	88,985	0,227
79	96	0,999	87,422	0,143
80	96	0,999	87,872	0,155
75	91	0,999	83,210	0,152
85	98	0,999	91,549	0,173
86	98	0,999	92,033	0,131
89	104	0,999	96,472	0,109
85	98	0,999	91,285	0,128
81	95	0,999	87,927	0,146
84	98	0,999	91,405	0,152
88	102	0,999	95,057	0,161
75	89	0,999	82,103	0,184
90	100	0,999	95,114	0,129
76	90	0,999	83,199	0,222
76	90	0,999	83,565	0,244

## B II. Rh(D)-Eigenschaft fetaler Erythrozyten

Fetale Erythrozyten ccddee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=19)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
2	17	0,995	9,160	0,472
2	16	0,994	9,223	0,494
2	17	0,995	9,276	0,482
2	17	0,995	9,416	0,487
2	17	0,995	9,634	0,491
2	17	0,995	9,718	0,511
2	17	0,995	9,724	0,504
2	16	0,993	9,768	0,545
2	17	0,995	9,834	0,487
2	17	0,995	9,855	0,488
2	17	0,994	9,880	0,555
2	19	0,997	9,962	0,463
2	17	0,994	9,966	0,529
2	18	0,995	9,995	0,508
2	17	0,994	10,085	0,544
2	18	0,994	10,354	0,553
2	17	0,994	10,356	0,537
2	18	0,994	10,676	0,567
2	20	0,993	12,042	0,669

Fetale Erythrozyten CcD.ee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=12)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
45	66	0,999	55,817	0,363
47	66	0,997	57,514	0,492
49	70	0,998	59,962	0,365
51	70	0,998	60,973	0,337
52	70	0,998	61,480	0,360
51	70	0,997	61,601	0,472
52	72	0,998	62,320	0,374
54	71	0,999	62,621	0,250
55	72	0,999	63,597	0,264
56	72	0,999	64,380	0,247
53	74	0,998	64,544	0,458
55	73	0,998	64,770	0,382

Fetale Erythrozyten ccD.Ee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=7)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
55	75	0,997	65,953	0,457
60	76	0,999	68,384	0,223
60	76	0,999	68,384	0,223
66	80	0,999	73,419	0,221
69	84	0,998	76,938	0,302
73	87	0,999	79,911	0,187
73	89	0,999	81,400	0,278

Fetale Erythrozyten CCD.ee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=10)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
52	71	0,999	61,616	0,307
54	77	0,997	66,604	0,564
58	83	0,999	70,773	0,363
60	80	0,998	70,778	0,380
63	80	0,999	71,670	0,279
63	81	0,999	72,219	0,291
64	82	0,997	73,838	0,422
66	89	0,998	77,929	0,425
70	88	0,999	78,900	0,272
72	89	0,999	80,435	0,225

Fetale Erythrozyten ccD.ee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=11)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
63	80	0,999	71,700	0,242
64	80	0,999	72,832	0,275
65	80	0,998	73,100	0,320
65	81	0,999	73,384	0,241
73	89	0,999	80,994	0,194
80	96	0,999	88,100	0,219
65	81	0,999	73,062	0,254
63	80	0,998	71,641	0,236
63	79	0,999	71,021	0,198
70	87	0,999	78,360	0,284
74	90	0,999	82,083	0,247

Fetale Erythrozyten CcD.Ee + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=13)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
64	81	0,999	72,933	0,252
65	82	0,999	73,752	0,199
68	84	0,998	76,915	0,333
69	85	0,998	77,722	0,299
76	90	0,999	82,981	0,181
76	92	0,999	83,967	0,226
76	94	0,999	84,941	0,216
78	94	0,999	85,784	0,205
79	94	0,999	86,783	0,222
80	95	0,999	87,800	0,233
83	96	0,999	90,051	0,223
85	99	0,998	92,355	0,255
85	100	0,999	93,000	0,228

Fetale Erythrozyten ccD.EE + IgG-anti-D<sub>4</sub> + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=8)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
76	97	0,999	86,847	0,286
72	96	0,995	82,560	0,775
85	100	0,998	92,800	0,282
77	97	0,999	87,141	0,354
77	96	0,999	86,371	0,245
80	100	0,999	89,979	0,547
74	94	0,999	84,052	0,654
78	97	0,999	87,515	0,254

**C. Nachweis kleiner Populationen fetaler Rh(D)-positiver Erythrozyten  
(s. Ergebnisse Seite 37)**

"Leerwerte" (ccddee); (n=100)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
2	16	0,996	8,104	0,414
2	16	0,996	8,977	0,449
2	16	0,995	9,070	0,453
2	16	0,996	8,962	0,466
2	16	0,996	8,886	0,434
2	16	0,996	8,732	0,425
2	16	0,995	8,987	0,465
2	17	0,997	8,735	0,432
2	16	0,997	8,247	0,411
2	16	0,995	9,000	0,471
2	17	0,995	9,502	0,478
2	16	0,996	8,340	0,423

Leerwerte (ccddee); Fortsetzung

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
2	17	0,996	9,238	0,451
2	16	0,996	8,274	0,414
2	16	0,996	8,594	0,418
2	16	0,994	9,436	0,507
2	16	0,994	9,177	0,487
2	16	0,996	8,618	0,431
2	15	0,995	8,125	0,425
2	16	0,995	8,692	0,461
2	16	0,995	9,009	0,463
2	16	0,995	8,788	0,459
2	16	0,995	9,276	0,474
2	16	0,995	8,894	0,453
2	16	0,996	8,491	0,436
2	16	0,995	8,945	0,468
2	16	0,995	8,548	0,453
2	16	0,996	8,462	0,417
2	17	0,994	9,750	0,53
2	16	0,996	8,487	0,433
2	15	0,995	8,879	0,453
2	16	0,995	8,715	0,447
2	17	0,992	10,649	0,611
2	16	0,995	9,011	0,452
2	16	0,996	8,597	0,427
2	16	0,994	9,683	0,522
2	16	0,995	9,138	0,494
2	16	0,995	9,306	0,481
2	16	0,995	9,151	0,460
2	16	0,995	9,195	0,487
2	16	0,995	9,073	0,470
2	16	0,995	9,172	0,475
2	16	0,995	9,384	0,490
2	16	0,995	9,110	0,479
2	17	0,995	9,182	0,465
2	16	0,994	9,174	0,481
2	16	0,995	9,248	0,477
2	16	0,995	9,165	0,467
2	16	0,995	9,301	0,472
2	16	0,995	9,034	0,470
2	16	0,995	9,030	0,457
2	16	0,995	8,994	0,458
2	16	0,995	9,056	0,466
2	17	0,995	9,218	0,461
2	16	0,995	8,976	0,476
2	16	0,995	8,969	0,480
2	16	0,995	9,136	0,486
2	16	0,994	9,038	0,469
2	16	0,995	9,138	0,478
2	16	0,995	9,254	0,479
2	17	0,995	9,066	0,478

Leerwerte (ccddee); Fortsetzung

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
2	16	0,995	8,954	0,462
2	16	0,995	9,022	0,479
2	16	0,995	9,143	0,464
2	16	0,995	8,931	0,470
2	16	0,995	9,094	0,485
2	16	0,995	9,229	0,474
2	16	0,995	9,274	0,469
2	16	0,995	9,333	0,476
2	16	0,995	8,971	0,487
2	16	0,995	9,365	0,463
2	16	0,995	9,310	0,489
2	16	0,995	8,954	0,459
2	16	0,995	8,970	0,477
2	17	0,995	9,056	0,464
2	16	0,995	9,089	0,470
2	16	0,994	9,196	0,479
2	16	0,995	9,261	0,457
2	16	0,995	9,18	0,461
2	16	0,995	9,021	0,462
2	16	0,995	9,140	0,488
2	16	0,995	9,100	0,484
2	16	0,995	9,329	0,470
2	16	0,995	9,127	0,495
2	17	0,995	8,976	0,471
2	16	0,995	9,028	0,459
2	16	0,995	8,971	0,477
2	16	0,995	8,889	0,494
2	16	0,995	9,012	0,468
2	16	0,995	8,921	0,493
2	17	0,995	8,9	0,472
2	16	0,994	9,337	0,491
2	16	0,995	9,293	0,489
2	17	0,995	9,215	0,477
2	16	0,994	8,981	0,458
2	16	0,995	9,083	0,487
2	16	0,994	9,208	0,479
2	16	0,995	9,371	0,468
2	16	0,994	9,216	0,483
2	17	0,995	9,312	0,479

## D. A-Eigenschaft fetaler und adulter Erythrozyten (s. Ergebnisse Seite 41)

### D I. A-Eigenschaft adulter Erythrozyten

Adulte A<sub>1</sub> Erythrozyten + IgG-anti-A-Eluat + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub> Fragment; (n=28)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
64	96	0,998	79,957	0,539
82	108	0,999	95,269	0,323
73	97	0,999	85,235	0,381
77	103	0,999	89,915	0,328
87	113	0,999	100,107	0,334
73	103	0,997	89,344	0,737
79	105	0,999	91,864	0,354
83	109	0,999	96,357	0,337
77	103	0,999	89,983	0,259
86	110	0,998	98,745	0,413
66	93	0,999	79,743	0,388
91	122	0,994	104,646	1,083
73	102	0,997	88,772	0,690
92	116	0,998	104,866	0,434
76	104	0,999	90,833	0,445
85	108	0,997	97,220	0,536
68	98	0,999	82,890	0,431
71	98	0,999	84,808	0,342
77	104	0,999	90,753	0,342
89	114	0,999	101,933	0,359
87	111	0,999	99,407	0,320
87	115	0,999	101,346	0,282
87	115	0,997	101,218	0,239
75	102	0,998	89,340	0,465
73	104	0,999	88,463	0,465
91	114	0,999	102,430	0,294
89	114	0,999	101,675	0,317
95	117	0,999	106,124	0,276

Adulte A<sub>2</sub> Erythrozyten + IgG-anti-A-Eluat + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=18)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
16	65	0,980	39,331	0,429
18	63	0,999	38,693	0,619
13	53	0,994	30,234	1,293
15	60	0,998	35,875	0,808
16	63	0,999	38,163	0,658
14	58	0,995	32,983	1,286
22	69	0,980	44,842	0,313
12	50	0,994	28,406	1,314
15	58	0,998	34,452	0,911
14	61	0,998	35,764	0,935
11	59	0,999	34,639	0,526
13	58	0,994	33,553	0,622
9	55	0,998	34,819	0,396
7	61	0,999	33,614	0,750
13	59	0,995	32,355	0,608
10	59	0,999	32,781	0,378
7	61	0,995	33,651	0,623
10	58	0,980	34,985	0,569

Adulte A<sub>1</sub>B Erythrozyten + IgG-anti-A-Eluat + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=12)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
81	112	0,997	97,921	0,764
57	94	0,997	77,050	0,890
47	83	0,997	66,436	0,778
61	106	0,992	86,514	1,733
57	97	0,996	79,382	1,106
79	106	0,997	93,403	0,653
82	112	0,995	97,248	0,845
64	102	0,998	83,087	0,984
64	100	0,995	82,298	0,862
64	102	0,994	83,063	0,756
74	107	0,998	90,509	0,625
57	86	0,996	71,251	0,874

Adulte A<sub>2</sub>B Erythrozyten + IgG-anti-A-Eluat + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=7)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
5	25	0,996	14,323	0,532
2	22	0,996	12,354	0,522
4	24	0,998	13,851	0,514
5	22	0,994	13,563	0,358
4	23	0,998	13,517	0,541
5	24	0,996	14,493	0,514
8	27	0,994	17,701	0,456

## D II. A-Eigenschaft fetaler Erythrozyten

Fetale A<sub>1</sub> Erythrozyten + IgG-anti-A-Eluat + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=30)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
9	54	0,975	26,200	3,030
10	62	0,984	30,200	2,810
17	79	0,999	46,000	0,818
16	78	0,999	44,500	0,961
13	69	0,994	36,700	1,810
14	74	0,997	40,800	1,340
37	95	0,992	70,100	2,190
21	82	0,997	51,900	0,388
13	62	0,984	31,800	2,590
8	43	0,977	21,600	2,300
8	44	0,974	21,900	2,500
18	80	0,997	48,000	0,582
29	90	0,999	61,100	0,895
6	24	0,978	13,000	1,200
17	86	0,999	49,800	0,890
23	92	0,997	57,300	0,607
13	79	0,987	39,100	3,110
54	102	0,987	81,878	2,356
28	95	0,997	61,446	0,522
48	101	0,993	78,443	1,924
38	107	0,995	76,886	2,104
60	105	0,988	86,272	2,120
54	102	0,987	81,878	2,356
28	95	0,997	61,446	0,522
48	101	0,993	78,443	1,924
26	93	0,999	60,719	0,945
23	86	0,998	56,500	1,210
30	87	0,998	60,800	1,150
16	77	0,998	43,900	1,060
10	63	0,983	30,300	2,930

Fetale A<sub>2</sub> Erythrozyten + IgG-anti-A-Eluat + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n= 10)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
9	51	0,978	25,200	2,650
8	48	0,962	21,100	3,300
16	80	0,999	46,400	0,753
7	26	0,981	14,600	1,180
3	29	0,994	15,100	0,909
8	48	0,974	23,000	2,740
9	58	0,977	27,600	3,120
30	99	0,991	69,800	2,780
15	36	0,995	24,294	0,638
15	36	0,995	24,341	0,632

Fetale A<sub>1</sub>B Erythrozyten + IgG-anti-A-Eluat + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=9)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
7	51	0,969	23,500	3,280
19	82	0,997	49,700	0,514
19	89	0,999	53,408	0,986
14	81	0,990	40,640	2,814
14	70	0,995	38,100	1,750
27	86	0,999	56,653	1,456
24	85	0,994	54,244	2,456
24	86	0,981	55,146	0,946
26	86	0,976	56,016	1,156

Fetale A<sub>2</sub>B Erythrozyten + IgG-anti-A-Eluat + Anti-Human-IgG-FITC-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment; (n=6)

80%-Kanal	20%-Kanal	Korell.-koef.	50%-Kanal	SD des 50%-Kanals
2	18	0,996	10,400	0,454
3	19	0,989	10,683	0,447
4	21	0,995	10,237	0,512
4	22	0,983	11,917	0,455
4	21	0,996	11,418	0,646
6	21	0,945	13,384	0,545

## 8. Danksagung

Ich danke

Herrn Professor Dr. med. K. Fischer für mein Dissertationsthema, die anregenden Diskussionen sowie die exzellente Betreuung bei der experimentellen Bearbeitung und Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. A. Poschmann für seine fachliche Unterstützung und die Überlassung der Laboratorien und sämtlicher Hilfsmittel.

Frau Grundmann, Frau Politschke und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentralinstituts für Transfusionsmedizin, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Frau Wester und Herrn Niesytto für den Erfahrungsaustausch und die fruchtbare Zusammenarbeit.

## 9. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Martin Kluxen  
Wohnort: Rellinger Str. 7  
20257 Hamburg  
Geburtstag und -ort: 7.10.1967, Hamburg  
Familienstand: ledig, zwei Kinder (geb. am 15.07.94 und 17. 03. 96)  
Nationalität: deutsch

### Schulbildung

1974 - 1978 Grundschule  
1978 - 1987 Gymnasium Borgfelde, Hamburg  
02.06.1987 Abitur mit der Note 1,9

### Zivildienst

08/ 1987 - 03/ 1989 Deutsches Rotes Kreuz, Sozialstation Bergedorf

### Berufsausbildung

10/ 1989 - 03/ 1996 Humanmedizinisches Studium an der Universität  
Hamburg  
04/ 1996 - 04/ 1997 Praktisches Jahr  
23.03.1993 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0  
19.03.1996 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Note 2,6  
14.05.1997 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Note 1,0  
28.05.1997 Teil-Approbation durch das Landesprüfungsamt für  
Heilberufe in Hamburg  
09/ 1997- 02/ 1999 Arzt im Praktikum am Institut für Pathologie der  
Medizinischen Universität zu Lübeck (Direktor : Prof. Dr.  
med. A. C. Feller)  
seit 01.03.1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathologie  
der Medizinischen Universität zu Lübeck.

## **Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 28.2.99

Martin Kluxen