

Empfehlung zur

Präanalytik in der Bestimmung von HLA-Antikörpern mittels Festphasenassays basierend auf dem Luminex-Prinzip

Vorbemerkung: Diese Empfehlungen basieren auf dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik und können zur Anwendung gebracht werden soweit die individuellen Herstellerangaben dem nicht widersprechen. Ferner entbinden diese Empfehlungen nicht von der Verantwortung zur eingehenden Validierung in jedem Labor.

1. Serumvorbehandlung

Teil der Präanalytik zur Vermeidung/ Minimierung störender Interferenzen im Rahmen des/r Nachweises/ Spezifizierung von HLA-Antikörpern¹.

Die konsequente Hitzeinaktivierung oder EDTA-Vorbehandlung wird empfohlen, um das Risiko von Komplementinterferenzen zu minimieren.

Die Serumfiltration/-zentrifugation vor Durchführung o.g. Tests wird optional empfohlen, um unerwünschte Aggregate zu eliminieren und wird der Hitzeinaktivierung nach- bzw. der EDTA-Vorbehandlung vorgeschaltet.

1.1. Hitzeinaktivierung²

Specimen: humanes Serum (unfiltriert)

Geräte: Wasserbad, Thermocycler oder Wärmeschrank

Materialien: für Wasserbad und Wärmeschrank → 96Well-Platte, V-Boden
→ Reaktionsgefäß (1,5ml, PP), ggf. Schwimmer
für Thermocycler → PCR-Einzeltube oder -Platte

Durchführung:

- Hitzeinaktivierung erfolgt bei 56°C Serumkerntemperatur für 30 min
- Temperierung im Wasserbad, alternativ im Thermocycler oder Wärmeschrank
- anschließend erfolgt die Serumfiltration/-zentrifugation, s. Punkt 1.2

1.2. Serumfiltration/-zentrifugation

1.2.1 Serumfiltration

Specimen: humanes Serum (unfiltriert)

Geräte: Zentrifuge

Materialien: z.B. 96Well-Serumfilterplatte AcroPrep® mit 3µm Glasfaser/0,2µm Supor-Filter der Fa. Pall (Art.Nr. 8075) oder äquivalent (o.ä.)
alternativ für Einzelbehandlung z.B. Ultrafree® Centrifugal Filters 0,22µm Durapore Filter der Fa. Merck Millipore (Art.Nr. UFC30GV25) o.ä.

Durchführung:

- 96Well-Serumfilterplatten: Zentrifugation 800 - 1500 x g für mind. 5 min
- Ultrafree® Centrifugal Filters: Zentrifugation ≥7.200 x g für mind. 5 min
- Prozedur ggf. wiederholen bis gewünschte Menge an Filtrat für nachfolgende Ansätze gewonnen werden konnte

1.2.2 Serumzentrifugation

- Specimen:* humanes Serum, unfiltriert
Geräte: Zentrifuge
Materialien: Reaktionsgefäß (1,5ml, PP) o.ä.
Durchführung:
- Zentrifugation 8,000 – 10,000 x *g* für 10 min
 - Überstand vorsichtig abheben und weiterverwenden

1.3. EDTA-Vorbehandlung³

- Specimen:* humanes Serum, filtriert, unbehandelt oder hitzebehandelt
Reagenzien: EDTA-Lösung pH8.0
Geräte: Zentrifuge
Materialien: Reaktionsgefäß (1,5ml, PP) oder 96Well-Mikrotiterplatte (PP)
Durchführung:
- EDTA mit Serum auf eine Endkonzentration von 0,01M verdünnen und gut durchmischen

2. Literatur

1. Weinstock C, Schnaidt M. The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera. *Int J Immunogenet.* 2013;40(3): 171-177.
2. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads-a technical solution for the prozone effect. *Transplantation.* 2011;92(5): 510-515.
3. Visentin J, Vigata M, Daburon S, et al. Deciphering complement interference in anti-human leukocyte antigen antibody detection with flow beads assays. *Transplantation.* 2014;98(6): 625-631.