

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Strahlenbiologie
- Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Göhde -

**Durchflußzytometrische Zellzahlbestimmungen von CD 4- und CD 8- positiven
Lymphozyten anhand von zwei unterschiedlichen Lasertechniken und
drei unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Claus Westerberg
aus Bochum
2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Göhde

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Strahlenbiologie
- Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Göhde -
Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Göhde
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. W. Sibrowski

ZUSAMMENFASSUNG

Durchflußzytometrische Zellzahlbestimmung von CD 4- und CD 8- positiven Lymphozyten anhand von zwei unterschiedlichen Lasertechniken und drei unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren

Claus Westerberg

In den letzten Jahren hat die durchflußzytometrische Bestimmung von Leukozytensubpopulationen, wie den CD 4- und CD 8-positiven Lymphozyten, große diagnostische Bedeutung erlangt. Durch das wachsende AIDS-Problem in den Entwicklungsländern besteht in diesen Regionen vermehrter Bedarf an geeigneten Analysegeräten.

In dieser Studie wurden an 110 Vollblutproben sowohl ein neues Durchflußzytometer mit neuer Lasertechnik (CyFlow[®]) erprobt, welches volumetrisch Zellkonzentrationen bestimmt, als auch ein neues Messprinzip, bei dem zwei unterschiedliche Zellpopulationen (CD 4, CD 8) mit gleichem Fluoreszenzspektrum in einer Messung quantifiziert werden. Die Kosten konnten dadurch auf 0,5 € pro Analyse reduziert werden. Zum Vergleich: Nach Erhebungen der WHO betragen die durchschnittlichen Kosten für die CD 4-Zellzahlbestimmung derzeit noch 30-40 €.

In der Gegenüberstellung zweier Laser war die grüne Laserdiode mit einer Wellenlänge von 532 nm geeigneter als die blaue.

Der Vergleich dreier unterschiedlicher Aufbereitungsmethoden für Blutproben (CyLyse, PBS Dest und PBS Fix) nach dem „No-wash“-Verfahren ergab, dass bei einem Verzicht auf Lyse und Fixierung (PBS Dest) die Zellverluste am geringsten waren.

Insgesamt wird die Genauigkeit der Ergebnisse durch lysebedingte Zellverluste und durch die wegen der Einfarben-Methode bestehenden Schwierigkeiten in der Differenzierung der beiden Lymphozyten-Subpopulationen beeinflusst.

Die mit dem CyFlow[®] ermittelten Messwerte stimmen bei der Verwendung von PBS Dest mit denen als Standard festgelegten Werten der TQ-Prep Coulter Workstation gut überein.

Die erstmals beschriebene neue volumetrische Methode der CD 4-/ CD 8-Zellzahlbestimmung mit dem CyFlow[®] kommt mit sehr viel weniger apparativem, personellem und finanziellem Aufwand aus als bisherige Verfahren. Ihr Einsatz für die oben beschriebene Anwendung ist deshalb gerechtfertigt.

DIESE DISSERTATION IST
MEINEN GELIEBTEN ELTERN
GEWIDMET.

"Finis coronat opus."

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	AIDS (acquired immunodeficiency syndrome).....	2
1.2	Zellen der Immunabwehr	5
1.2.1	B-Lymphozyten	6
1.2.2	T- Lymphozyten	6
1.2.3	Natürliche Killerzellen/ Non-T-, Non-B-Zellen	8
1.3	Befall der Immunzellen durch HIV	9
1.3.1	Rezeptoren der T-Lymphozyten	9
1.3.2	Struktur des HIV.....	9
1.3.3	Virusinfektion.....	11
1.3.4	Verlauf der HIV-Infektion	12
1.4	Durchflußzytometrie	15
1.4.1	Lichtquelle.....	15
1.4.2	Fluoreszenz.....	16
1.4.3	Streulicht.....	17
1.4.4	Bauteile eines Durchflußzytometers.....	18
1.5	Verschiedene Methoden der CD 4-Zellbestimmung	20
1.5.1	Zwei-Plattform-Methode	20
1.5.2	Ein-Plattform-Methode.....	21
1.6	Zielsetzung und Fragestellung.....	22
2	MATERIAL UND METHODE.....	23
2.1	Auswahl der Blutproben.....	23
2.2	Hämatologie-Counter Sysmex K-1000	24
2.2.1	Aufbau des Geräts	24
2.2.2	Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl (WBC).....	24
2.3	EPICS XL mit der TQ-Prep Coulter Workstation	26
2.4	FACS Calibur®	28
2.5	CyFlow®	29
2.5.1	Darstellung der Messergebnisse	29
2.5.2	Vorversuche.....	32
2.5.2.1	Antikörper	32
2.5.2.2	Aufbereitungsverfahren.....	32
2.5.2.3	Abgrenzung von CD 4 und CD 8/ Dimzellen	34
2.5.2.4	Vergleich zwischen grünem und blauem Laser.....	35

2.5.3	Auswertung.....	36
2.6	Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl mithilfe von DAPI	38
2.7	Reproduzierbarkeit	39
3	ERGEBNISSE.....	40
3.1	Vorversuche zur Optimierung der Nachweismethoden.....	40
3.1.1	Auswahl der Antikörper	40
3.1.2	Auswahl des Aufbereitungsverfahrens.....	41
3.1.3	Abgrenzung von CD 4- und schwach positiven CD 8- Zellen (Dimzellen)	44
3.2	Messergebnisse.....	46
3.2.1	Präzisionsversuche: Vergleichende Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl am SYSMEX und CyFlow® mithilfe der Kernfärbung	46
3.2.2	Reproduzierbarkeit der CD 4-Messungen	47
3.2.3	CD 4- / 8-Messungen mit dem blauen Laser im CyFlow®	49
3.2.4	CD 4- / 8-Messungen mit dem grünen Laser im CyFlow®	50
3.2.4.1	Vergleich der CD 4-Werte unter Verwendung zweier monoklonaler Antikörper.....	50
3.2.4.2	CD 8-Werte.....	52
3.2.4.3	Quotient aus CD 4- und CD 8-Werten	55
3.2.4.4	Vergleich der Quadrantenbestimmung von CD 4 und CD 8 mit den Ergebnissen der TQ-Prep Workstation.....	57
3.2.4.5	Vergleich der CD 4-Werte unter Verwendung eines einzigen monoklonalen Antikörpers	59
3.2.5	Lyseverfahren	60
4	DISKUSSION	61
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	70
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	LEBENS LAUF	85
8	DANKSAGUNG	86
9	ANHANG	I
9.1	Abbildungs-Verzeichnis.....	I
9.2	Tabellen-Verzeichnis.....	II

1 Einleitung

In den letzten Jahren hat die durchflußzytometrische Bestimmung von Leukozyten-Subpopulationen große diagnostische Bedeutung erlangt. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen werden heutzutage als Zusatzinformation bei der Diagnose von Krankheiten wie zum Beispiel der HIV-Infektion [42] einbezogen oder zum Therapie-Monitoring verwendet. HIV-Positive sollten alle 3 – 6 Monate auf ihren CD 4⁺ T-Zellstatus untersucht werden [15]. Fällt dieser Wert bei einem Erwachsenen unter 200 CD 4/ μl , so kann laut WHO und CDC (Centers for Disease Control) von einer AIDS-Erkrankung ausgegangen werden [2, 46].

Gerade in der sogenannten „Dritten Welt“ breiten sich Erkrankungen wie AIDS aus, jedoch erweisen sich bisherige Methoden der Durchflußzytometrie als unerschwinglich teuer und untauglich in einer unterentwickelten Umgebung. Allein in Afrika gibt es über 33.000.000 infizierte Menschen, von denen nur ca. 30.000 behandelt werden. Vorhandene Durchflußzytometer können aufgrund der hohen Kosten (laut WHO 30 - 40 US \$ pro Messung) nicht in der erforderlichen Breite eingesetzt werden. Es wird vermutet, dass der finanzielle Aufwand für die Behandlung von AIDS bis 2005 einen Anteil von 35 – 75 % der gesamten Gesundheitsaufwendungen in den betroffenen Ländern ausmachen wird [71].

Langfristiges Ziel ist daher die Entwicklung eines in jeder Hinsicht einfachen Testverfahrens für das Therapie-Monitoring. Diese Überlegungen beginnen bei der Größe und den Anschaffungs- oder Unterhaltskosten des Gerätes und der Lichtquelle, bei den Kosten für Reagenzien und enden bei dem Zeitaufwand und den Anforderungen an das Bedienpersonal, zum Beispiel im Hinblick auf zusätzliche Arbeitsschritte bei der Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe. Andererseits ist es besonders wichtig, methodisch bedingte Abweichungen im Analysenergebnis zu minimieren und laborbedingte Fehlermöglichkeiten zu reduzieren.

1.1 AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*)

AIDS ist die Bezeichnung für den virusbedingten erworbenen Immundefizit (engl. = **acquired immunodeficiency syndrome**), das heißt eine Störung des zellulären Immunsystems mit einer ausgeprägten Verminderung der T-Helferzellen.

Die Arbeitsgruppe Aids des Centers für Disease Control (CDC) definiert diese Schädigung als „erworbenes Immundefizit, charakterisiert durch das Auftreten von persistierenden oder rezidivierenden Krankheiten, welche auf Defekte im zellulären Immunsystem hinweisen, wobei keine anderen bekannten Ursachen dieser Immundefekt-Symptomatik nachzuweisen sind“.

In den USA wurde diese Krankheit erstmals 1981 beschrieben und seit 1982 auch in Europa bekannt. Seitdem breitet sie sich infolge fehlender spezifischer Therapiemöglichkeiten rasch aus. Die Krankheit führt zu einer hohen Sterblichkeit [67].

AIDS wird durch zum Typ C gehörende Retroviren verursacht. MONTAGNIER et al. beschrieben 1984 erstmals das LAV (**L**ymphadenopathie-**a**ssoziiertes **V**irus) [54]. GALLO et al. berichteten 1985 vom HTLV III (**h**umanes **T**-Zell **L**eukämie-**V**irus III) [24], LEVY vom ARV (**A**IDS-assoziertes **R**etrovirus) [44]. Die gemäß dem internationalen Nomenklaturkomitee gültige Bezeichnung ist heute HIV (**h**uman **i**mmunodeficiency virus).

Die HI-Viren zeichnen sich durch geringe Kontagiosität und große Empfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen oder Desinfektionsmitteln aus; dies unterscheidet sie von den meisten anderen sexuell oder durch Blut übertragenen Viren.

Die Übertragung erfolgt über kleine Haut- oder Schleimhautverletzungen, sowie über Blut- oder Blutprodukte. Das HI-Virus vermehrt sich in denjenigen Zellen, die den CD 4-Rezeptor tragen, also vor allem T-Helferzellen und Makrophagen.

Das HI-Virus bewirkt über Befall und langsam fortschreitende Elimination der CD 4⁺-T-Lymphozyten eine Immundefizienz, die die Patienten empfänglicher für Sekundär-Infektionen macht [23].

Als Antwort auf die fortwährende Zerstörung der T-Helferzellen kommt es zur Proliferation des lymphatischen Systems.

Typischerweise ist der Krankheitsverlauf durch vier Phasen gekennzeichnet:

1. Phase:

Symptome ähnlich der infektiösen Mononukleose

2. Phase:

Latenzphase für circa 2 – 5 Jahre (die HIV-spezifischen Antikörper sind weiterhin nachweisbar)

3. Phase:

Proliferation des lymphatischen Systems (Lymphadenopathie-Syndrom, LAS), entweder als lokalisierte Form (v. a. Hals-Nacken-Bereich) oder als generalisierte Form, genannt Prä-AIDS oder ARC (AIDS-related Complex)

4. Phase:

Vollbild von AIDS

Die klinische Symptomatik des Vollbilds von Aids ist gekennzeichnet durch Leistungsabfall, Fieberschübe unklarer Ursache sowie Hyperhidrosis und Nachtschweiß.

Neben Gewichtsverlust und Durchfällen treten meist neurologische Symptome (AIDS-Encephalopathie) auf.

Rezidivierende Infektionen der Haut und Schleimhaut werden durch opportunistische Erreger wie zum Beispiel Viren der Herpesgruppe, Candida, Zytomegalieviren (CD 4 < 50 – 100/ µl), Pneumocystis carinii (CD 4 < 200/ µl), Mykobakterien (CD 4 < 75/ µl), Toxoplasma (CD 4 < 100/ µl) oder Aspergillus verursacht; diese Infektionen korrelieren mit der CD 4-Konzentration im Blut [31, 56, 75].

Als weitere Komplikationen treten Neoplasien wie zum Beispiel das Kaposi-Sarkom auf, das sonst üblicherweise erst nach dem 60. Lebensjahr erscheint. Diese zunächst linsengroßen, knötchenförmigen braunen bis lividen Gebilde finden sich vielerorts,

vor allem in Hautspaltlinien, aber auch im Bereich des Gaumens, des Magen-Darm-Traktes und der Lymphknoten.

Gelegentlich kommt es zur Ausbildung von Hirn- oder Non-Hodgkin-Lymphomen.

Nach Ausbildung des AIDS-Vollbildes überleben nur 60-70 % der Patienten das nächste Jahr.

In der Diagnostik finden heute als Screening Test der Anti-HIV-EIA oder –ELISA (= enzyme-linked-immunosorbent-assay) Verwendung, wobei spezifische Antikörper im Patientenserum nachgewiesen werden. Hierbei sollten positive Proben durch Immunfluoreszenz oder durch den Immunoblot (Western-Blot) abgesichert werden.

Auch Radioimmunopräzipitations-Assays (=RIPA) und der direkte Virusnachweis, also der Nachweis der viruseigenen reversen Transkriptase sind möglich.

Als weitere Untersuchungen kommen Blutbild, Blutsenkung, Enzymbestimmungen (alkalische Phosphatase, Transaminasen), Serumelektrophorese, quantitative Bestimmung der Immunglobuline oder Intrakutan-Teste auf zellvermittelte Immunität in Frage.

Die Untersuchung der Lymphozyten-Subpopulationen im Frischblut, also die quantitative Bestimmung der T-Helfer- und der T-Supressorzellen findet in der Diagnostik von AIDS Verwendung.

1.2 Zellen der Immunabwehr

Leukozyten, weiße Blutkörperchen, sind Blutzellen im Dienst der Infekt- und Fremdkörperabwehr. Die Zahl der Leukozyten beträgt bei einem gesunden Erwachsenen 5000-10000 pro mm^3 (μl) Blut.

Nach lichtmikroskopischen Kriterien lassen sich im Blutausstrich folgende Leukozyten unterscheiden:

	<u>Mittelwert</u>	<u>Streuung</u>
Granulozyten		
neutrophile	60 %	(55 – 65 %)
eosinophile	3,5 %	(2 – 4 %)
basophile	0,5 %	(0,5 – 1 %)
Monozyten	6 %	(4 – 7 %)
Lymphozyten	30 %	(20 – 40 %)

Tabelle 1: Normalwerte des weißen Differentialblutbildes in Prozent

Ihr jeweiliger prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Leukozyten ist trotz physiologischer Schwankungen recht charakteristisch.

Die Lymphozyten sind keine einheitliche Population. Nach dem Erscheinungsbild in Blutausstrichen wird folgendermaßen unterschieden:

- 1) kleine Lymphozyten
- 2) große Lymphozyten

1) Die kleinen Lymphozyten stellen ca. 80 % der Lymphozyten im peripheren Blut dar und sind ungranulierte Zellen von etwa Erythrozytengröße. Funktionell und immunhistochemisch werden die kleinen Lymphozyten in zytotoxische T-Lymphozyten und in antikörperproduzierende B-Lymphozyten unterteilt.

2) Große Lymphozyten sind granulierte Lymphozyten; sie stellen bis zu 20 % der Lymphozyten im Blutausstrich dar. Sie weisen mehrheitlich weder die für T- noch

für B-Lymphozyten typischen Zelloberflächenmoleküle auf. Deshalb werden sie auch als Non-T, Non-B-Zellen oder natürliche Killerzellen bezeichnet. Sie wirken zytotoxisch auf bestimmte Tumor- oder virusinfizierte Zellen.

1.2.1 B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten machen etwa 5 – 10 % der im Blut zirkulierenden Lymphozyten aus. Überwiegend finden sie sich im Knochenmark und in den peripheren lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz). In der Ruhephase tragen B-Lymphozyten an der Zelloberfläche spezifisch gegen Fremdproteine gerichtete Rezeptoren, die auf den Kontakt mit dem zugehörigen Antigen warten. Nach Aktivierung durch das entsprechende Antigen wandeln sich viele von ihnen in Plasmazellen um und geben spezifische Antikörper in das Blutplasma, in die Lymphe oder die interstitielle Flüssigkeit ab. Die Plasmazellen bewirken die humorale Immunität. Die übrigen, nicht zu Plasmazellen umgewandelten B-Lymphozyten bleiben als B-Gedächtniszellen zum Teil in den Keimzentren und warten als eine Art Reserve auf den nächsten Kontakt mit dem gleichen Antigen.

Bei jedem erneuten Antigenkontakt mit einem bereits bekannten Antigen (Immunantwort) werden umgehend die entsprechenden B-Lymphozyten (B-Gedächtniszellen) in den Keimzentren der Lymphfollikel von den antigenpräsentierenden follikulären Zellen und von T-Helferzellen zur Proliferation angeregt. Einige der entstehenden Tochterzellen bleiben wiederum als teilungsfähige Reserve (B-Gedächtniszellen) erhalten, die anderen differenzieren zu Plasmazellen und produzieren Antikörper.

1.2.2 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten sind die Träger der zellulären Immunität. Ihre antigenspezifischen Rezeptoren weisen eine ähnliche Vielfalt wie die Immunglobuline (Antikörper) der B-Lymphozyten auf. Die T-Lymphozyten werden bei Kontakt mit dem entsprechenden Antigen durch Proliferation zahlenmäßig verstärkt (klonale Selektion).

T-Zellen zirkulieren nach Erwerb ihrer Immunkompetenz im Thymus jeweils für kurze Zeit in der Blutbahn. Dort machen sie 65 – 75 % der Lymphozyten aus. Meist halten sie sich jedoch in den lymphatischen Organen und Geweben auf.

Es werden vier verschiedene T- Lymphozyten unterschieden:

- T-Gedächtniszelle
- T-Helferzelle
- T-Suppressorzelle
- T-Killerzelle

T-Gedächtniszellen stellen eine proliferationsfähige Reserve von T-Zellklonen dar, von denen jeder bereits über die DNS für spezifische Rezeptoren verfügt. Bei entsprechendem Antigenangebot durch antigenpräsentierende Zellen wandeln sie sich in proliferierende T-Lymphoblasten um. Einige Tochterzellen bleiben im Gedächtniszellpool, die anderen differenzieren zu den entsprechenden Effektorzellen (Helferzelle, Suppressorzelle oder Killerzelle)

T-Helferzellen haben eine regulatorische Funktion. Sie erkennen nur Antigene, die ihnen zusammen mit MHC-II-Proteinen (**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex) an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen angeboten werden. Hierdurch werden sie aktiviert und stimulieren ihrerseits die entsprechenden antigenspezifischen B-Lymphozyten- und T-Killerzellklone.

T-Suppressorzellen wirken auf die gleichen Teile des Immunsystems wie die T-Helferzellen, aber jeweils hemmend. Sie sorgen damit für die negative Rückkopplung im System und verhindern eine Endlosstimulation.

T-Killerzellen (zytotoxische Zellen) sind die eigentlichen Effektorzellen der T-Zellreihe. Sie erkennen entweder körperfremde MHC-I-Proteine an Zelloberflächen, d. h. Fremdzellen, oder Zellen, die neben körpereigenen MHC-I-Proteinen daran gebundene fremde Antigenfragmente exprimieren. Hierbei handelt es sich z. B. um virusinfizierte Körperzellen, die vom Virus gezwungen werden, Virusproteine zu

exprimieren. Die T-Killerzellen binden mit ihren Rezeptoren an Zellen dieser beiden Gruppen und vernichten sie. Killerzellen spielen bei Infektionen mit Viren, Pilzen, Einzellern und Parasiten eine Rolle.

1.2.3 Natürliche Killerzellen/ Non-T-, Non-B-Zellen

Diese Zellen weisen weder die spezifischen Oberflächenrezeptoren der T-Lymphozyten auf, noch bilden sie Antikörper wie die B-Lymphozyten. Sie werden deshalb auch als Third-Population-Cells bezeichnet. Sie sind eine Subpopulation der großen Lymphozyten des Blutbildes. Diese Zellen sind unspezifische (sog. natürliche) Killerzellen (Non-T-, Non-B-Lymphozyten), deren Aktionen sich als erste, noch unspezifische Abwehrmaßnahme gegen Tumorzellen und virusinfizierte Zellen richten. Sie sind in der Lage, diese Zielzellen zu lysieren. Zusätzlich produzieren die natürlichen Killerzellen Zytokine, z. B. Interferon γ , das neben anderen immunregulatorischen Wirkungen die Expression von MHC II auf verschiedenen Körperzellen stimuliert.

1.3 Befall der Immunzellen durch HIV

1.3.1 Rezeptoren der T-Lymphozyten

T-Lymphozyten besitzen charakteristische Rezeptoren auf der Zellmembran. Ein wichtiges Rezeptormolekül ist der Antigenrezeptor, der als T-Zell-Rezeptor (TCR) bezeichnet wird. Mit dem T-Zell-Rezeptor ist das membranständige CD 3-Molekül direkt assoziiert und an der antigenspezifischen Signalvermittlung in die Zelle beteiligt.

Das CD 3-Molekül (CD = cluster of differentiation) ist das charakteristische Antigen der reifen T-Lymphozyten. Die Population der reifen T-Zellen (CD 3⁺-Lymphozyten) wird durch weitere Differenzierungsantigene (Hilfsrezeptoren) in zwei Subpopulationen unterteilt:

1. Die CD 4⁺-T-Lymphozyten besitzen Helfer-/Induktorfunktion
2. Die CD 8⁺-T-Lymphozyten haben meist zytolytische oder Supressor-Funktion

Sie unterscheiden sich in der Art, wie sie Fremdartigene erkennen.

Eigene Epitope können T- Lymphozyten aber nur im Zusammenhang mit Genprodukten des MHC (**M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex) erkennen. Die entsprechenden Genregionen werden durch die Bezeichnung „Klasse I“ und „Klasse II“ unterschieden.

Fremdartigene, die von CD 8⁺-T-Zellen erkannt werden, müssen mit Klasse-I-Strukturen assoziiert sein. CD 4⁺-T-Zellen erkennen dagegen nur Fremdartigene, die in Beziehung zu Klasse-II-Strukturen stehen. Träger der Klasse-II-Strukturen beim Menschen sind die Genprodukte HLA (**H**umanes **L**eukozyten-**A**ntigen)-D, der Klasse-I-Strukturen HLA-A, HLA-B und HLA-C.

1.3.2 Struktur des HIV

Das HI-Virion ist ein fast kugelförmiges Teilchen mit einem Durchmesser von ungefähr 0,1 µm. Seine äußere Hülle besteht aus einer Doppelschicht von Lipidmolekülen, die dem Membransystem der menschlichen Wirtszelle ähnelt. Die

Lipiddoppelschicht ist mit Proteinen, den Histokompatibilitäts-Antigenen (MHC-Moleküle) der Klassen I und II bestückt.

Aus der Hülle ragen zahlreiche Stacheln, so genannte Spikes, aus viruseigenen Proteinen. Jeder dieser Stacheln wird wahrscheinlich aus vier Molekülen eines Proteins mit der Bezeichnung *gp120*, die sich auf der Außenseite befinden, und vier weiteren in die Membran eingelagerten Molekülen *gp41* gebildet (gp = Glykoprotein; die Zahl entspricht dem jeweiligen Molekulargewicht in Kilo-Dalton). Diese Proteine der Virushülle spielen bei der Adsorption des Virus und der Penetration in die Zielzelle eine entscheidende Rolle.

Direkt an die Hülle schließt sich eine Schicht aus Matrixprotein *p17* an. Sie umschließt den Kernbereich (das Kapsid), der die Form eines Kegelstumpfes hat und aus dem Protein *p24* besteht.

Im Zentrum des Virus befindet sich das genetische Material. HIV gehört zur Familie der Retroviren. Im Gegensatz zu den meisten Retroviren weisen die Coreproteine (Kernproteine) des HIV eine sehr konstante Primärstruktur auf. Wie bei allen Retroviren beinhaltet das Genom des HI-Virus beidseitig je eine kontrollierend fungierende Sequenz (= long-terminal repeat = LTR). Außerdem sind die drei typischen Strukturgene „gag“ (für die Kernproteine), „env“ (für Hüllen- bzw. Membranproteine) und „pol“ für die Reverse Transkriptase enthalten.

Das Genom liegt also nicht als DNA, sondern in Form zweier Ribonukleinsäure-(RNA)-Stränge mit jeweils 9200 Nukleotiden vor. Diese beiden Stränge sind mit Molekülen des Enzyms Reverse Transkriptase besetzt. Die Reverse Transkriptase beginnt die RNA in DNA umzuschreiben, sobald das Virus in eine Zelle eingedrungen ist

Weiterhin enthält das Kapsid eine Integrase, eine Protease und eine Ribonuklease. Mit Hilfe der Integrase des Virions werden die von der Reversen Transkriptase gebildeten DNA-Stränge in die Chromosomen der Wirtszelle eingebaut. Die Folge ist die permanente Infektion mit HIV. Das Enzym wirkt als Endonuklease und kann

die aus der HIV-RNA gebildete DNA in jeden Abschnitt des menschlichen Genoms einbauen.

Die Protease wird bei der Neubildung von Viren aktiv. Sie zerschneidet die Vorläufermoleküle zu fertigen Proteinen. Nach Umschreibung der Virus-RNA in DNA wird die RNA durch die Ribonuklease zerstört. Außer Integrase, Protease und Ribonuklease findet man im Kapsid noch die weniger genau untersuchten Proteine *p6* und *p7*.

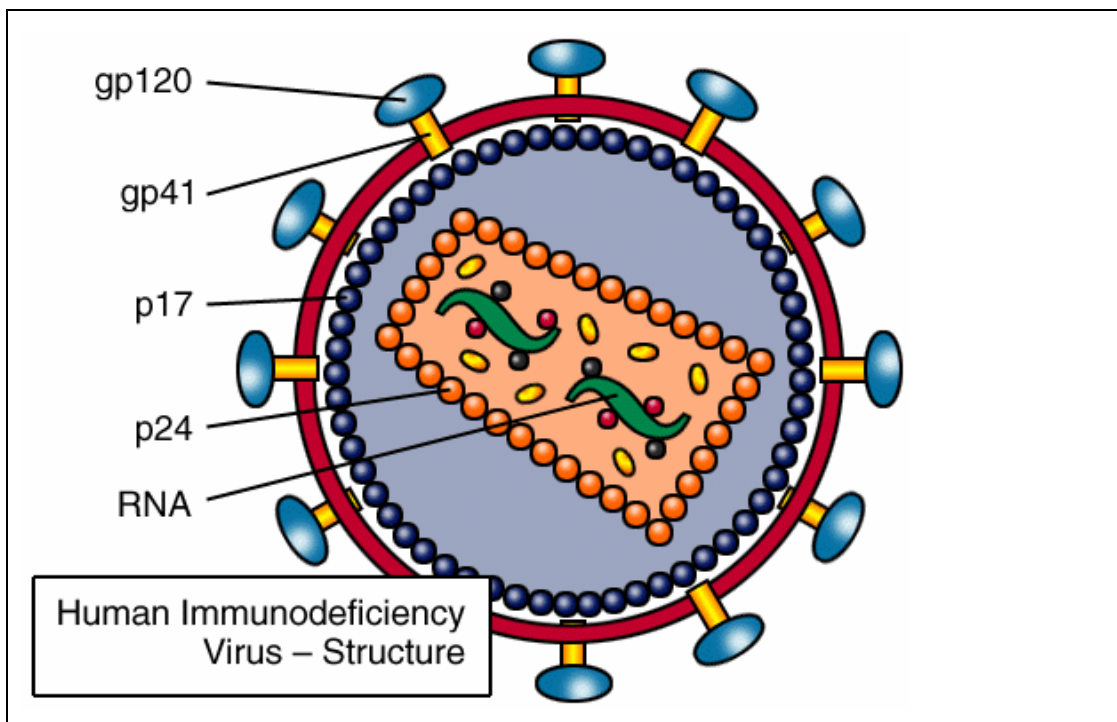


Abbildung 1: Struktur des Humanen Immundefizienz Virus [32]

1.3.3 Virusinfektion

Das Hüllprotein *gp120* kann sich an das Protein CD 4 anlagern, das Bestandteil der Membran verschiedener Immunzell-Typen ist. Wenn sich *gp120* an CD 4 gebunden hat, verschmelzen die Membranen von Virus und Wirtszelle unter dem Einfluss des Hüllproteins *gp41*. Auf diese Weise gelangt das Kapsid mit seinem Inhalt in das Zellinnere.

Ebenso wie T-Lymphozyten werden die CD 4-spezifischen Makrophagen und die CD 4-Monozyten von dem Virus befallen. Vor allem Makrophagen können HIV vom Infektionsort in andere Körperregionen einschließlich des Gehirns verschleppen.

Damit bricht die T-Zell-abhängige Antikörperbildung und die zelluläre Immunität zusammen [64].

1.3.4 Verlauf der HIV-Infektion

Die Infektion mit dem HI-Virus resultiert in einem Absinken der CD 4-T-Lymphozyten sowie einem Anstieg von CD 8-Zellen und somit einem fortschreitenden Ungleichgewicht der Immunfunktion. Die CD3- (gesamte T-Zell-) Anzahl bleibt konstant [30, 43, 55].

Der Hauptanstieg der CD 8-T-Zellzahl findet während der ersten Monate der HIV-Infektion statt. Danach bleibt die CD 8-T-Zellzahl stabil. Der Mittelwert liegt bei asymptomatischen HIV-positiven Erwachsenen bei etwa 1000/mm³ [25].

Hat die klinische Manifestation von AIDS begonnen, so fallen die absoluten Lymphozytenzahlen [15], woraus ebenfalls ein Abfall der absoluten CD 8-T-Lymphozyten resultiert. In der Zwischenzeit steigt der prozentuale Anteil der CD 8-T-Lymphozyten. Im Endstadium von AIDS sind fast alle verbliebenen T-Zellen CD 8-positiv [78].

Die Tabelle 2 verdeutlicht die vier Stadien der CD 4-Zellzahlverminderung während der HIV-Erkrankung.

- 1) rapider Abfall während der ersten 6 bis 18 Monate ab Beginn der Infektion
- 2) Plateauphase, die sich zumindest über mehrere Jahre der asymptomatischen Phase erstrecken kann
- 3) noch deutlicherer Abfall für einige Monate, kurz bevor sich Aids manifestiert
- 4) kontinuierliche CD 4-Zellabnahme bis hin zum Tod

Stadium	Klinischer Status	CD 4-Level	Dauer
1	Postserokonversion	Abfall der CD 4-Zellen von 1000/ mm ³ bis hin zu 600/ mm ³ (45-50 % bis 30 %)	6-18 Monate
2	asymptomatische Phase	stabile CD 4-Phase mit langsamen Abfall, zwischen 600 und 200/ mm ³ (15-30 %)	einige Monate bis Jahre
3	erste Manifestation von AIDS	rasanter Abstieg bis hin zu 100 /mm ³	mehrere Monate
4	Vollbild von AIDS	kontinuierlicher Abfall bis hin zu 50/ mm ³ , bei CD 4-Leveln von < 50 /mm ³ (< 5 %) tritt der Tod ein	wenige Monate bis mehrere Jahre

Tabelle 2: Stadien der CD 4-Zell-Werte während der HIV-Erkrankung [25]

Im Zeitraum zwischen der HIV-Infektion und der Ausbildung von AIDS bleiben die absolute Leukozytenzahl, der prozentuale Lymphozytenanteil, die absolute Lymphozytenzahl und das absolute CD3-T-Zellniveau (1600/mm³) relativ konstant. Diese Werte sind denen von Gesunden ähnlich [51]. Im späteren Stadium der HIV-Infektion fallen die Leukozyten- und Lymphozytenzahlen und eine Panleukopenie, Lymphopenie und manchmal abnormal niedrige CD3-Werte von 30 – 50 % leiten die letzten Stadien der fortschreitenden Erkrankung ein .

Zur Dokumentation des Fortschreitens der Immundefizienz wurden im Verlauf der Jahre verschiedene humorale Parameter vorgeschlagen: selektive IgA-Erhöhung, Messung von β_2 -Mikroglobulin oder Neopterin, Anti-HIV-Antikörper-Muster oder Antigenämie [40, 70].

Jedoch ist die Messung der CD 4-positiven T-Zellen wohl der prognostisch bedeutendste Faktor, da die Immundefizienz durch das fast völlige Verschwinden der CD 4⁺-T-Lymphozyten charakterisiert ist [18, 73]. Aufgrund der sehr großen

Affinität des HI-Virus für die CD 4-Struktur wird selektiv diese T-Zell-Subpopulation eliminiert [20].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass CD 4-Zählungen in folgenden Aufgabenkreisen Verwendung finden:

- 1) in der AIDS Überwachung, also zur Dokumentation des Fortschreitens von AIDS [28]
- 2) bei der Prognosebestimmung
- 3) als Hilfe bei der Entscheidung, wann Therapiemaßnahmen erforderlich werden, um opportunistische Infektionen zu verhindern
- 4) zur Überwachung von antiretroviraler Therapie und Impfungen

Es wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung der CD 4-Lymphozyten vorgeschlagen [27, 48], heute jedoch basieren fast alle gängigen Messverfahren zur Quantifizierung der CD 4-Lymphozyten auf durchflußzytometrischen Methoden. Als „Gold-Standard“ ist laut WHO die Durchflußzytometrie für die Quantifizierung von CD 4-Zellen zu sehen.

1.4 Durchflußzytometrie

Ihren Anfang nahm die auf der Fluoreszenzmessung beruhende Flowzytometrie vor ca. 30 Jahren durch DITTRICH und GÖHDE [17], und wurde anfangs als Forschungsinstrument in der Immunologie, Hämatologie, Onkologie und Biochemie eingesetzt. Heutzutage hat diese Methode Einzug in alle Bereiche der klinischen Zelldiagnostik gefunden und ist aus einem modernen Labor nicht mehr wegzudenken [7].

Im Gegensatz zu einem Mikroskop, mit dem verschiedenartige Zellen in einer Art statischem System untersucht werden, beruht das Durchflußzytometer auf einem dynamischen Prinzip, da es Zellen in Bewegung, also im „Fluss“, erfasst.

Einfach ausgedrückt ist ein Durchflußzytometer ein optisches Meßsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale von in einem Flüssigkeitsstrom fokussierten Partikel analysiert [6, 37, 76, 77].

Um optische Signale unterschiedlicher Qualität, wie Fluoreszenz, messen zu können, werden die Zellen zunächst mit einem fluoreszierenden Stoff versetzt, der die eigentliche Zählung erst möglich macht.

Die Zellen, die sich in einer Suspension befinden, werden einzeln zu einem Analysepunkt, der Messkammer, geleitet. Mit Hilfe eines Pumpensystems werden die Zellen in die Messkammer geleitet und in einer Kapillare einzeln nacheinander von einem fokussierten Lichtstrahl (Laser- oder UV-Lampe) beleuchtet und erfasst.

Diese beleuchteten Zellen strahlen ein für das Fluorochrom charakteristisches Licht einer bestimmten Wellenlänge aus, das in elektrische Impulse umgewandelt wird. Diese elektrischen Impulse werden gemessen und von einem Computer klassifiziert und in Form eines Histogramms auf dem Bildschirm wiedergegeben.

1.4.1 Lichtquelle

Entscheidend für die Auswahl der Fluorochrome ist die Lichtquelle. Diese muss in der Durchflußzytometrie verschiedene Voraussetzungen erfüllen:

Zum einen muss eine hohe Intensität erbracht werden, um ausreichende Fluoreszenz und Streulichtsignale zu erzeugen. Zum anderen muss ihr Emissionsspektrum im Absorptionsbereich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe liegen. Schließlich muss eine konstante Strahlungsleistung gewährleistet sein.

All diese Anforderungen werden durch einen Laser (oder auch UV-Lampe) erfüllt. Das Wort Laser steht für **L**ight **A**mplification by **S**timulated **E**mission of **R**adiation. Charakteristisch für eine Laserlichtquelle ist, daß sie Licht aussendet, das monochromatisch, von hoher Energiedichte, gerichtet und kohärent ist.

Der Laser emittiert nur einzelne Wellenlängen des Lichtspektrums in Abhängigkeit von seiner Gasfüllung (Gaslaser) oder dem verwendeten festen Substrat (Festkörperlaser). Diese Gasfüllung kann z.B. aus Argon, Helium-Neon, Krypton oder Helium-Cadmium bestehen. Daher ist die Auswahl des jeweiligen Fluorochroms immer an die Emissionslinien des eingesetzten Lasers gebunden.

1.4.2 Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie für jeweils einen charakteristischen Wellenlängenbereich. Diese Energie hebt die Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim Rücksprung zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. „Fluoreszenz“ ist die Bezeichnung dieses Strahlungsübergangs. Der Frequenzbereich, der eine fluoreszierende Verbindung anregen kann, ist das für den Farbstoff charakteristische Anregungs- bzw. Exzitationsspektrum. Dies stimmt weitgehend mit dem Absorptionsspektrum überein.

In der Durchflußzytometrie findet überwiegend die 488 nm-Emissionslinie des luftgekühlten Argonlasers Verwendung. Das bedeutet also, dass Fluorochrome mit einem Exzitationsbereich um 488 nm geeignet sind. Die Absorptionsmaxima der Farbstoffe sollten, müssen aber nicht exakt bei diesem Wert liegen. Wird ein Fluorochrom außerhalb seines Absorptionsmaximums, aber noch innerhalb eines Absorptionsspektrums angeregt, äußert sich das in einer Intensitätsverminderung, nicht aber in der Farbänderung der Fluoreszenz.

Für die Mehrfarbenfluoreszenzanalyse ergeben sich wichtige Anwendungsmöglichkeiten, wie zum Beispiel eine Charakterisierung der heterogenen Population der natürlichen Killerzellen. Messtechnisch kann auf eine Anregung mit zwei oder mehr verschiedenen Wellenlängen verzichtet werden (was unter Umständen mehrere Laser als Lichtquelle erfordert). Man muss dann Fluoreszenzfarbstoffe wählen, die sich zwar in der Fluoreszenzfarbe unterscheiden, deren Fluoreszenz aber mit derselben Wellenlänge anregbar ist. Das heißt, diese Farbstoffe weisen einen unterschiedlichen Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge auf.

Für die Mehrfarbenfluoreszenzmessung mit nur einer Anregungswellenlänge bei 488 nm könnte man beispielsweise Phycoerythrin (PE) und Fluorescein (FITC) verwenden.

1.4.3 Streulicht

Neben den oben erwähnten Fluoreszenzintensitäten werden vom Durchflußzytometer noch weitere Parameter erfasst und ausgewertet.

Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften Licht mit unterschiedlicher Qualität und Quantität. Diese Lichtstreuung (Scatter) wird durch folgende Zelleigenschaften beeinflusst:

- 1) Querschnittsfläche
- 2) Refraktionsindex
- 3) Struktur der Membran (Faltung)
- 4) Intrazelluläre Bestandteile (Granula und Vakuolen)

Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Die Lichtstreuung ist im Bereich von $0 - 10^\circ$ des einfallenden Lichtstrahls am größten (Vorwärtsstreulicht oder Forward Scatter [FSC]). Nur ein geringer Teil des Lichtes streut seitwärts (90°) dazu (Seitwärtsstreulicht oder Side Scatter [SSC]).

Die Bildung der Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung beruht auf unterschiedlichen physikalischen Gegebenheiten der Zellen und liefert dadurch auch unterschiedliche Informationen: Anhand von beiden Lichtstreuparametern lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen, wie Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten unterscheiden.

Die wichtigste Bedeutung des Streulichts als physikalischer Parameter liegt in der Eingrenzung von Lymphozyten unter den verschiedenen Leukozytenuntergruppen bei der Immunfluoreszenzanalyse. Auf dieses Eingrenzen in einem Fenster (Gating) wird in Abschnitt 2.5.1 näher eingegangen.

1.4.4 Bauteile eines Durchflußzytometers

Ein Durchflußzytometer gliedert sich grob in folgende drei Bauteile:

- 1) Flüssigkeitssystem
- 2) Optisches System
- 3) Signalverarbeitung

Flüssigkeitssystem

Es besteht, vereinfacht ausgedrückt, aus zwei Leitungen. Über eine Zuleitung drückt eine Pumpe kontinuierlich Hüllstromflüssigkeit (sheath fluid) durch die Messkammer und weiter in den Abfallbehälter. Eine zweite Leitung dient dem Transport der Zellen vom Probenröhrchen zur Messkammer, in der sich beide Leitungen vereinen. Die Zellsuspension wird mittels Überdruck in die Messkammer (Quarzküvette) transportiert [**Abbildung 2**]. Das Ende der Platinkapillare (zweite Leitung) ist auf das Zentrum des Lumens der Küvette gerichtet. Nach dem Verlassen der Kapillare erfasst die durch die Küvette strömende Hüllstromflüssigkeit die Zellsuspension. Dadurch verengt sich der Probenstrom auf das Zentrum der Küvette und erfährt eine Beschleunigung von wenigen Zentimetern in der Sekunde auf etwa 1 m/sec. Durch diesen Vorgang, der auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet wird, wird gewährleistet, dass die Zellen einzeln nacheinander den Messpunkt an einer definierten Stelle passieren. Der Messpunkt ist der Ort, an dem der fokussierte Lichtstrahl auf die Zelle trifft.

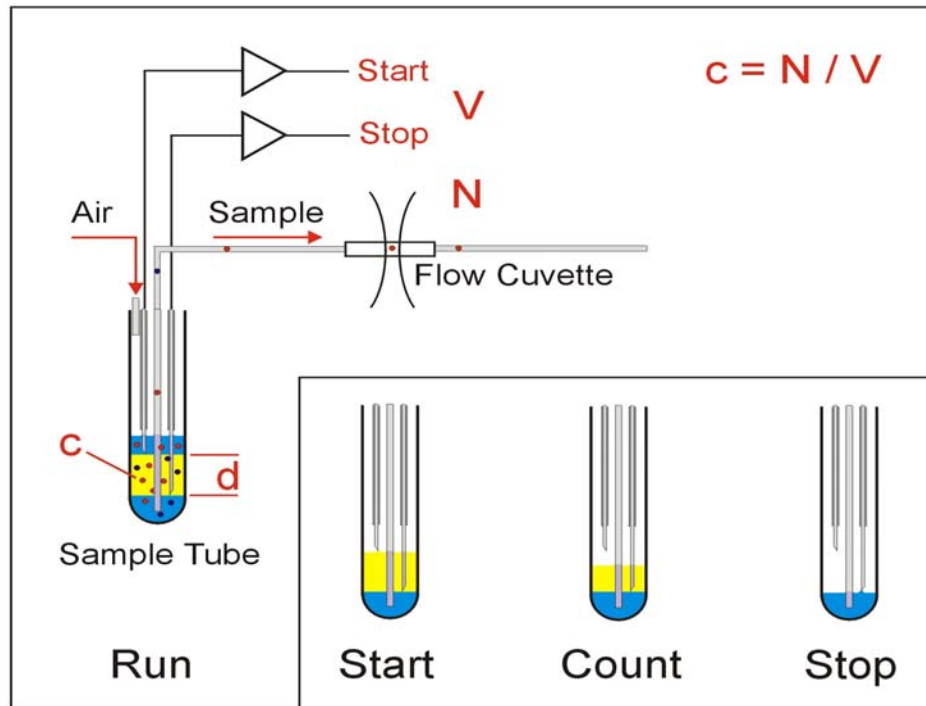


Abbildung 2: Messprinzip des verwendeten Durchflußzytometers

Mithilfe der Definition einer Konzentration ($c = N/V$) werden die absoluten Zellzahlen bestimmt. Hierbei ist N die Zellzahl in dem genau definierten Suspensionsvolumen V , welches rein mechanisch durch zwei Elektroden abgemessen wird. Dazu sind keine beads als Referenz nötig.

Optisches System

Das optische System wird eingeteilt in einen Anregungs- und einen Detektionsteil.

Der Anregungsteil dient der Formung des Laserlichtstrahles, welcher einen Durchmesser von etwa $20 \times 60 \mu\text{m}$ besitzt.

Der Detektionsteil besteht aus zwei Untereinheiten, zum einem zur Messung des Vorwärtstreulichts, zum anderen für die Messung des Seitwärtstreulichts und der Fluoreszenz.

Signalverarbeitung

Photodetektoren konvertieren die optischen Signale in elektrische Pulse, deren Höhe mit den Intensitäten der von den Zellen ausgehenden Lichtsignale korreliert. Es finden hierbei zwei verschiedene Systeme von Photodetektoren Verwendung: Photovervielfacherröhren (PMT = **ph**otom**u**ltipler **t**ube) und Photodioden. Durch die

Benutzung dieser Photodetektoren wird eine Vervielfachung der Elektronen erzielt, die von Photonen aus der Photokathode abgelöst werden.

1.5 Verschiedene Methoden der CD 4-Zellbestimmung

Derzeit werden in der Regel zwei Verfahren zur Quantifizierung von Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen eingesetzt. Hierbei handelt es sich um die „Zwei-Plattform-Methode“ und eine auf synthetischen Mikropartikeln (beads) basierende Methode („Einplattform-Methode“). Hinzu kommt die in dieser Arbeit vorgestellte volumetrische Methode.

1.5.1 Zwei-Plattform-Methode

Bei der Zwei-Plattform-Methode kommen zwei aufeinander abgestimmte Geräte zum Einsatz. Dabei handelt es sich zum einen um einen Hämatologie-Counter und zum anderen um ein Durchflußzytometer. Beide analysieren parallel dieselbe Vollblutprobe, einmal nach dem „No Wash-Verfahren“ (Hämatologie-Counter), also ohne Zentrifugierung und Entfernung ungebundener Antikörper, zum anderen nach dem Lyse-Wash-Prinzip (TQ-Prep Workstation, Flow Cytometer).

Als erste Plattform wird das Durchflußzytometer verwendet. Die Blutproben werden mit monoklonalen Antikörpern versetzt und der prozentuale Anteil der untersuchten Subklassen an der Gesamtzahl der CD 45-positiven Leukozyten berechnet [5].

Auf der zweiten Plattform, dem Hämatologie-Counter, wird die Konzentration aller Leukozyten im Blut ermittelt.

Besondere Beachtung ist der Tatsache zu schenken, dass die beiden Geräte einen gemeinsamen Parameter zählen müssen, um die einzeln erzielten Ergebnisse genau miteinander korrelieren zu können. Hierzu können Lymphozytenzählungen verwendet werden, besser noch sollen sich dazu Leukozytenzählungen eignen [26].

Die exakten absoluten CD 4-Werte können also anhand der Leukozytenzahlen (Hämatologie-Counter) und dem prozentualen CD 4-Anteil an den Gesamt-leukozyten CD 45 (Durchflußzytometer) errechnet werden.

1.5.2 Ein-Plattform-Methode

Im Gegensatz zu der Zwei-Plattform-Methode werden bei diesem Verfahren Fehler bei der Abstimmung des gemeinsamen Parameters - zum Beispiel den Leukozyten - vermieden, da die absoluten Zahlen direkt an nur einem Gerät bestimmt werden können.

Bei der Bestimmung absoluter Zellzahlen mit nur einem Gerät werden sogenannte „beads“ verwendet. Den zu untersuchenden Proben werden Beads in einer definierten Konzentration zugesetzt. Hierüber lassen sich dann das gemessene Volumen und die Konzentration der zu untersuchenden Subklasse bestimmen. Auf der Beads-Methode basierende Durchflußzytometer sind zum Beispiel das BD FACSCalibur[®] oder Coulter XL[®].

Volumetrische Methode	Beads - Methode
Keine Zugabe von beads	Keine Messung des Volumens
Zählung der Zellen	Zugabe von beads in bekannter Konzentration
Exakte Messung des Volumens	Zählung von beads und Zellen
Ergebnisse in Zellen/ μ l	Ergebnisse in Zellen/ beads und Berechnung der absoluten Zellzahlen

Tabelle 3: Verschiedene Single-Plattform-Methoden

Sowohl die volumetrische als auch die auf beads basierende Methode stimmen sehr exakt überein [34].

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiges Durchflußzytometer mit einem grünen Laser (532 nm) als Lichtquelle (CyFlow[®]) einem konventionellen Durchflußzytometer mit blauem Licht (488 nm) emitierendem Argon-Laser gegenübergestellt. Zum anderen wurde dieser Gerätetyp, der die CD 4-Zellen volumetrisch bestimmt, einer etablierten Zwei-Plattform-Methode zusammen mit der TQ-Prep Coulter Workstation/EPICS XL, gegenübergestellt.

Im Gegensatz zu der routinemäßig durchgeführten 3-Farb-Durchflußzytometrie wurde mit nur einem Farbstoff, dem R-Phycoerythrin (R-PE), gearbeitet.

In einem weiteren Versuch wurde geklärt, ob durch die Verwendung eines No-Lyse-Verfahrens Lyseverluste [29] bei der Quantifizierung der CD 4-Zellen vermieden werden können. Hierzu wurden die Vollblutproben mit PBS (**p**hosphate **b**uffered **s**aline) mit Fixierung (6 %ige Paraformaldehyd-Lösung) (PBS-Fix), mit der Lyse-Reagenz CyLyse oder mit einem PBS-Puffer ohne Fixierung (PBS-Dest) aufbereitet.

2 Material und Methode

2.1 Auswahl der Blutproben

Es wurden 110 Blutproben aus dem Zentrallabor des Universitätsklinikums der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster hinsichtlich ihres CD 4 und CD 8 Gehaltes untersucht.

Diese Blutproben stammen von üblichen Routineuntersuchungen stationärer und ambulanter Patienten. Dabei wurde Probenmaterial unterschiedlicher Stationen, wie zum Beispiel der Transplantationsambulanz, Thorax-Herz-Gefäßchirurgie oder der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin verwendet.

Das verwendete Vollblut wurde jeweils am Entnahmetag sowohl im Zentrallabor der Universitätsklinik als auch im Institut für Strahlenbiologie analysiert. Dabei ist darauf geachtet worden, dass ein möglichst kurzes Zeitintervall zwischen Entnahme und den Messungen entstand [38]. Zwischen Entnahme und Messung der Blutproben vergingen maximal sechs Stunden.

Im Zentrallabor wurde die Gesamtleukozytenzahl (WBC, white blood count) mit dem Hämatologiecounter (Sysmex K-1000) bestimmt. Außerdem wurden die CD 4- und CD 8-Werte am Coulter Epics XL ermittelt. Im Anschluss daran wurden im Institut für Strahlenbiologie dieselben Parameter gemessen. Hier wurde die Gesamtleukozytenzahl mit dem Durchflußzytometer nach einer DAPI-Kernfärbung festgestellt. Die CD 4- und CD 8-Werte wurden an zwei Durchflußzytometern mit Lasern unterschiedlicher Anregungs-Wellenlänge bestimmt. Zusätzlich wurden die Proben für jedes der beiden Geräte nach drei verschiedenartigen Verfahren aufbereitet.

2.2 Hämatologie-Counter Sysmex K-1000

2.2.1 Aufbau des Geräts

Das SYSMEX K-1000 (SYSMEX, Tokyo, Japan) im Zentrallabor des Universitätsklinikums ist ein vollautomatisches Hämatologie-Analysegerät, das in klinischen Laboratorien für die quantitative in vitro-Diagnostik eingesetzt wird.

Das Gerät besteht aus einer Haupteinheit und einer Druck/ Vakuum-Versorgung. Die Haupteinheit umfasst ein hydraulisches und elektrisches System, sowie den eingebauten Thermodrucker. Mit Hilfe des hydraulischen Systems wird angesaugt, pipettiert, verdünnt, gemischt und lysiert. Das elektronische System analysiert und errechnet aus den Messsignalen des hydraulischen Systems die Ergebnisse. Neben den Leukozyten (WBC) können ebenfalls Erythrozyten (RBC), Hämoglobin, Hämatokrit, mittleres Zellvolumen, mittleres korpuskuläres Hämoglobingewicht, mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten und Thrombozyten bestimmt werden.

2.2.2 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl (WBC)

Das Sysmex K-1000 zählt und misst die weißen Blutkörperchen (WBC = **W**hite **B**lood **C**ells) nach dem elektrischen Widerstandsmessprinzip. Dazu werden Proben angesaugt, Verdünnungen hergestellt, hämolysiert, in die Messkammern überführt und ein abgemessener Teil dieser Verdünnungen durch die Messöffnung geführt. Wenn Blutzellen diese enge Öffnung passieren, durch die ein schwacher Gleichstrom von der inneren zur äußeren Elektrode fließt, erzeugen sie durch Verdrängen der leitenden Verdünnungslösung Widerstandsänderungen. Diese werden als positive Spannungssignale zwischen den beiden Elektroden registriert und sind den Volumina der auslösenden Partikel proportional.

Die Spannungsänderungen werden verstärkt und über einen Diskriminator geschickt, um elektronisches Rauschen herauszufiltern. Die den Schwellenwert übersteigenden Impulse werden der Zählleinrichtung zugeführt. Die Impulse werden gezählt und weiterverarbeitet.

Zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl werden verschiedene Reagenzien benötigt:

Als Diulent wird das SYSMEX CELLPACK verwendet. Hierbei handelt es sich um eine isotone Salzlösung, die zum Verdünnen der Blutprobe, zur Messung des Hämoglobins sowie zur Zellzählung (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) verwendet wird. SYSMEX CELLPACK ist eine azidfreie, farblose, wasserklare Lösung, deren wichtigste Bestandteile sind:

Natriumchlorid	6,38 g/l
Borsäure	1,00 g/l
Natriumtetraborat	0,20 g/l
EDTA-2K	0,20 g/l

Als WBC-Lysemittel wird der STOMATOLYSER-3WP eingesetzt, um eine korrekte Leukozytenzählung zu gewährleisten. Es dient zum Lysieren der Erythrozyten, deren Membranen soweit zerstört werden, dass sie keinen Einfluss mehr auf die WBC-Messung haben. Die Hauptbestandteile des Stomatolyser-3WP sind:

Organisches quaternäres Ammoniumsalz	10,2 g/l
Natriumchlorid	2,0 g/l

Als Detergenz wird CELLCLEAN, eine stark alkalische Lösung zum Entfernen von Lysemittelverunreinigungen, zellulären Bestandteilen und Blutproteinen innerhalb des hydraulischen Systems verwendet. Der Hauptbestandteil der hellgelben Flüssigkeit ist Natriumhypochlorid (5 %).

Im Probenflusssystem wird das mit EDTA durchmischte Blut durch die Ansaugpipette in das Probendosierventil gesaugt. Aus der angesaugten Probe werden 12 µl entnommen und mit ca. 2 ml Verdünnungsmittel CELLPACK und ca. 1 ml STOMATOLYSER 3-WP direkt in der Messkammer verdünnt. Exakt 0,4 ml der verdünnten Probe (1:250) werden aus der Messkammer durch die Messkapillare gesaugt und die Partikel gezählt.

2.3 EPICS XL mit der TQ-Prep Coulter Workstation

Bei der TQ-Prep Coulter Workstation [*Abbildung 3*] handelt es sich um ein automatisches Probenaufbereitungssystem, das bei der Bestimmung des zellulären Immunstatus, also zur quantitativen Erfassung der relevanten Lymphozyten-Subsets eingesetzt wird.



Abbildung 3: TQ-Prep Coulter Workstation[®] der Firma Beckman Coulter [74]

Zur Bestimmung von absoluten Lymphozytenzahlen aus Vollblut wird die Erythrozytenlyse-Methode verwendet.

Die TQ-Prep Coulter Workstation arbeitet nach dem No Wash-Verfahren, also ohne Zentrifugierung und Entfernung ungebundener Antikörper, so dass Zellverluste minimiert werden.

100 μ l antikoaguliertes Vollblut wird mit 10 μ l monoklonalen Antikörpern (Cytostat[®]/Coulter Clone[®]) versetzt und gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur werden die Proben in der Workstation automatisch mit einem Lysereagenz, einem Stabilisierer und einer Fixierlösung vermennt.

Dabei verursacht das Lysereagenz eine schnelle Zerstörung der Erythrozyten wobei die Leukozyten unangetastet bleiben sollen. Der Stabilisierer unterbricht diesen Vorgang.

Die Fixierlösung fixiert die Zellmembranen, so dass die Form und Struktur der Leukozyten erhalten bleibt.

Nachdem die Erythrozyten vollständig lysiert sind, werden die Proben in einem separaten Durchflußzytometer (Coulter EPICS XL[®] [**Abbildung 4**]) nach Zugabe einer definierten Konzentration von Beads analysiert, um so die Konzentration der zu untersuchenden Subklasse zu bestimmen.



Abbildung 4: EPICS XL[®] der Firma Firma Beckman Coulter [74]

2.4 FACS Calibur®

Bei dem FACS Calibur® [Abbildung 5] handelt es sich um ein Vier-Farben Dual-Laser-Durchflußzytometer, das durch die Verwendung von zwei Laserlinien den Einsatz der gängigsten Farbstoffe ermöglicht.

Über einen zusätzlich eingebauten Diodenlaser lassen sich Farbstoffe verwenden, deren Anregung nicht bei den üblichen 488nm (blau), sondern bei 635nm (rot) liegt. Die Detektion der so angeregten roten bis ultraroten Fluoreszenzen erfolgt räumlich und zeitlich getrennt von den mit dem ersten Laser angeregten Fluoreszenzen.



Abbildung 5: FACS Calibur® der Firma Becton Dickinson [19]

2.5 CyFlow®

Volumetrische Messungen wurden mit dem CyFlow® [Abbildung 6] der Firma Partec durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein portables Durchflußzytometer mit 5 Parametern (FSC, SSC und drei Fluoreszenzparameter FL1 – FL3).



Abbildung 6: CyFlow® der Firma Partec

2.5.1 Darstellung der Messergebnisse

Angeschlossen an das CyFlow® wird ein Pentium-Rechner mit mehr als 1000 MHz und mindestens 128 MB RAM. Mithilfe des Betriebssystems Windows™ und der FloMax® Software wird es ermöglicht, die Zellzählung in Echtzeit auf dem Display zu verfolgen und graphisch aufzuarbeiten.

Die Fluoreszenzsignale werden in Form von Histogrammen und Dotplot-Diagrammen dargestellt:

1-Parameter Histogramme:

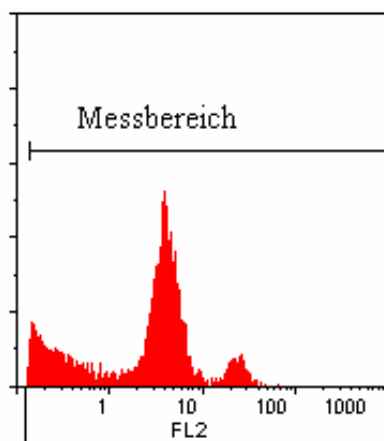
In diesen Histogrammen oder Häufigkeitsverteilungen werden die Messdaten auf eine sehr einfache Art dargestellt. Die Lichtintensität einzelner Parameter und somit die

Menge der zu untersuchenden Substanz wird einer Quantitätsklasse („Channel“) zugewiesen. Diese Klassifizierung erfolgt, während die Zellen analysiert werden.

Die bei einer Messung gewonnenen digitalisierten Werte können zum Beispiel bei einer Auflösung von 1024 Klassen Werte von 0 bis 1023 einnehmen. In einem Histogramm sind die Zellzahl auf der Y-Achse gegen die Klassen („Channels“) auf der X-Achse aufgetragen. Somit kann man sich die Messwerte als Kugeln, die in einzelne Register fallen, vorstellen.

Dabei entstehen sogenannte „peaks“ (Höhepunkte). Alle Zellen, die zu einem solchen Peak gehören, weisen die gleiche Fluoreszenz – Intensität auf.

Als Rauschen („Noise“) bezeichnet man unerwartete Signale in den niedrigeren Channels. Diese können von Zellfragmenten oder anderen Partikeln herrühren. Um zu vermeiden, dass zu hohe Anteile an „Noise“-Signalen gemessen werden, wird ein „Lower Level“ festgelegt. Der „L-L“ stellt einen Wert dar, unter dem Signale nicht mehr im Histogramm dargestellt werden. In der folgenden Abbildung werden diese Begriffe verdeutlicht.



Lower level

Abbildung 7: Beispiel für ein 1-Parameter-Histogramm

Korrelierte 2-Parameter Dotplots

Die korrelierte 2-Parameterdarstellung zeigt die Relation von zwei Eigenschaften einer Zelle zueinander an. Zum Beispiel werden der X-Achse der FSC (forward scatter = Vorwärtsstreulicht) und der Y-Achse der SSC (side scatter = Seitwärtsstreulicht) zugeordnet. Jede Zelle mit einer bestimmten FSC- und SSC-Intensität stellt einen Punkt

(„dot“) im Dotplot dar. Aus der gegenseitigen Auftragung der Klassenwerte von zwei Parametern entsteht eine Matrix. Ihre Struktur oder Auflösung entspricht der Klassifizierungsbreite der Parameter.

Verschiedene Zellen mit den gleichen FCS- und SSC-Werten nehmen im Diagramm die gleiche Stelle, also den gleichen „dot“ ein. Somit wird die visuelle Abschätzung der Quantität der Populationen in den einzelnen Punktwolken („Clusters“) schwierig. Die Anzahl der Zellen in einer Klasse („channel“) werden dann durch unterschiedliche Farbabstufungen kenntlich gemacht.

Gating:

In einem 2-Parameter-Dotplot erscheinen Zellsubpopulationen mit annähernd ähnlichen Eigenschaften als Punktwolken. Diese Cluster können genauer analysiert werden, indem man sie durch Linien einkreist und somit Auswertefenster definiert. Dieser Vorgang, eine Subpopulation genauer zu untersuchen, nennt sich „gating“.

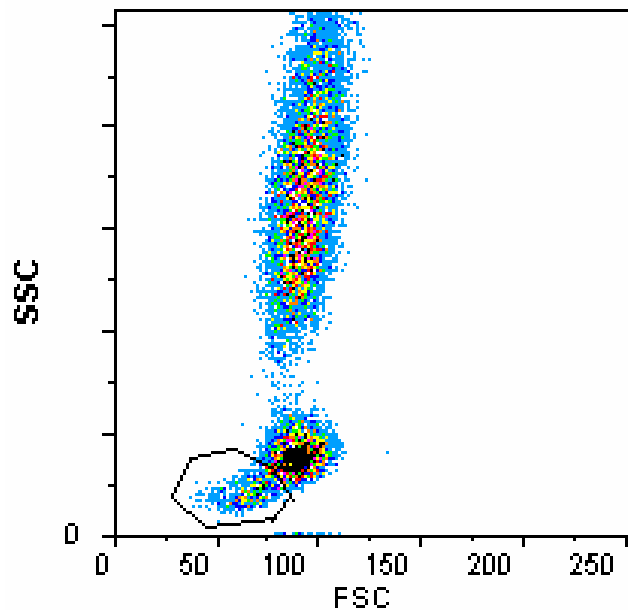


Abbildung 8: Beispiel für ein korreliertes 2-Paramete-Dotplot nach dem Gating

2.5.2 Vorversuche

2.5.2.1 Antikörper

Um optische Signale mithilfe eines Durchflußzytometers messen zu können, werden die zu analysierenden Zellen zunächst mit einem fluoreszierenden Stoff versetzt. Hierzu werden an einen Farbstoff gekoppelte monoklonale Maus-Antikörper, die gegen humane CD 4- oder CD 8-Zellen gerichtet sind, benutzt. Bei dem jeweiligen Farbstoff handelt es sich um R-Phycoerythrin (R-PE).

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden monoklonale Mäuse-Antikörper (Anti-Human T-Cell, CD 4 und CD 8) von zwei unterschiedlichen Herstellern verglichen.

Die Antikörper stammten von:

- 1) BIO-D (Valenzano, Italien)
- 2) BD Biosciences (San Jose, USA)

Von einem Patienten wurde eine Blutprobe entnommen und unter sonst gleichen Präparationsbedingungen mit den unterschiedlichen Antikörpern gemäß den Herstellerangaben inkubiert:

100 µl Vollblut wurde mit jeweils 10 µl CD 4- und CD 8-Antikörpern für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen von 100 µl Fixierlösung (6 %ige Paraformaldehyd-Lösung) und 10 minütiger Inkubationszeit wurde jede Probe mit 2500 µl CyLyse-Lösung versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die durchflußzytometrische Bestimmung der Zellzahlen.

2.5.2.2 Aufbereitungsverfahren

Neben den geeigneten Antikörpern wurde auch ein geeignetes Lyseprotokoll gesucht, um eine optimale Datenauswertung zu gewährleisten. Zur Auswahl standen folgende kommerziell erhältlichen Lösungen, die im „No Wash-Verfahren“, also ohne Zentrifugation und Entfernung ungebundener Antikörper verwendet wurden:

- 1) DAKO[®] Uti-Lyse[™] (DAKO Corporation, Carpinteria, CA 93013 USA)

- 2) FACS Lysing Solution (Becton Dickinson and Co Biosciences, San Jose, CA, USA)
- 3) Ortho-mune[®] Lysing Reagent (Ortho Clinical Diagnostics GmbH, Neckargemünd, Deutschland)
- 4) CyLyse[®] (Partec GmbH, Münster, Deutschland)

Die Blutproben wurden gemäß den Herstellerangaben folgendermaßen verarbeitet:

1. DAKO[®] Uti-Lyse[™]

100 µl antikoaguliertes Vollblut wurden mit je 10 µl monoklonalen Antikörpern CD 4 und CD 8 versetzt und durchmischt. Nachdem jeder Probe 100 µl DAKO[®] Uti-Lyse[™] Reagenz A zugesetzt worden war, wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 1000 µl DAKO[®] Uti-Lyse[™] Reagenz B zugefügt und für weiter 10 Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Messung im Durchflußzytometer.

2. FACS Lysing Solution

Jeweils 10 µl monoklonale Antikörper CD 4 und CD 8 wurden zu 100 µl Vollblut gegeben, durchmischt und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nachdem 900 µl der FACS-Lysing Lösung hinzugefügt wurde, musste erneut durchmischt und für weitere 15 – 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert werden.

3. Ortho-Lyse

100 µl Vollblut wurden mit jeweils 10 µl CD 4- und CD 8-Antikörpern versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden 2000 µl Ortho-Lyse zugefügt, durchmischt und für weitere 10 Minuten im Dunkeln inkubiert, bis die Hämolyse abgeschlossen war. Erst dann konnte mit der Messung begonnen werden.

4. CyLyse

Eine Blutprobe von 100 µl Vollblut wurde mit jeweils 10 µl CD 4- und CD 8-Antikörpern für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen von 100 µl Fixierlösung (6 %ige Paraformaldehyd-Lösung) und 10-minütiger Inkubationszeit konnte die Probe mit 2500 µl CyLyse-Lösung versetzt werden. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte die durchflußzytometrische Bestimmung der Zellzahlen.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Lyseprotokollen wurde die Probe beim NoLyse-Verfahren mit zwei unterschiedlichen Reagenzien aufbereitet:

1. PBS (phosphate buffered saline) mit Fixierung (6 %ige Paraformaldehyd-Lösung):

100 µl Vollblut wurde mit jeweils 10 µl CD 4- und CD 8-Antikörpern für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen von 100 µl Fixierlösung und 10-minütiger Inkubationszeit wurde die Probe mit 2500 µl PBS-Lösung versetzt. Die durchflußzytometrische Bestimmung der Zellzahlen konnte sofort oder innerhalb von 24 Stunden erfolgen.

2. PBS (phosphate buffered saline) mit destilliertem Wasser:

100 µl Vollblut wurde mit jeweils 10 µl CD 4- und CD 8-Antikörpern für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen von 2600 µl PBS-Dest konnte die durchflußzytometrische Bestimmung der Zellzahlen sofort erfolgen.

2.5.2.3 Abgrenzung von CD 4 und CD 8/ Dimzellen

Für die durchflußzytometrische Messung wurden die zu analysierenden Zellen mit R-Phycoerythrin (R-PE) markierten Antikörpern versetzt. Hierzu wurden gegen die CD 4- bzw. CD 8-Zellen gerichtete monoklonale Mäuse-Antikörper benutzt, die beide Zellsubpopulationen in einem Probenröhrchen gleichzeitig färbten. Somit war es möglich, sowohl CD 4- als auch CD 8-positive Lymphozyten in einem einzigen Dotplot-Diagramm darzustellen und zu analysieren (s. Abb. 9).

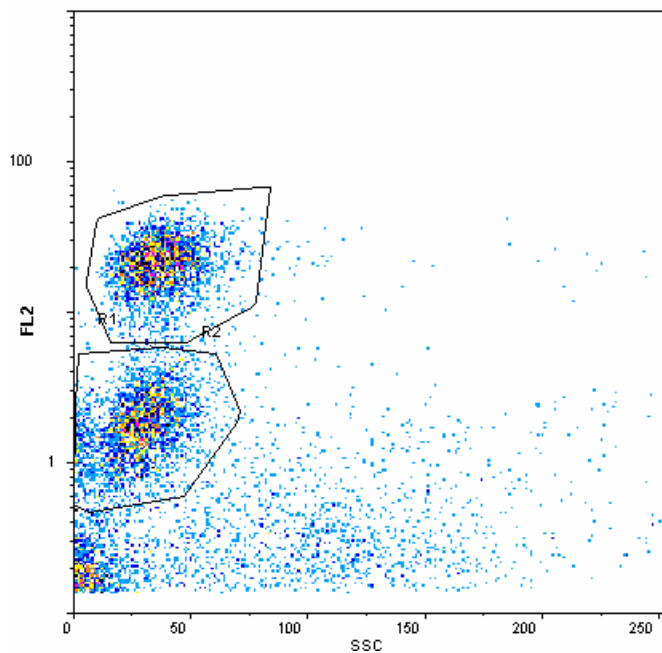


Abbildung 9: Beispiel für ein korreliertes 2-Parameter-Dotplot nach dem Gating

Um das Ausmaß der möglichen Überlagerung der CD 4- und CD 8-Meßsignale zu beurteilen, wurden CD 4- und CD 8-Markierungen getrennt ausgeführt. Nur so kann ein möglicher Fehler bei der Festlegung von Auswertefenstern, dem Gaten, festgestellt werden.

Zu diesem Zweck wurden zwanzig Blutproben mit CyLyse aufbereitet und im ersten Ansatz nur mit CD 4-, im zweiten Ansatz nur mit CD 8- und im dritten Ansatz mit beiden Antikörpern versetzt und ausgezählt.

2.5.2.4 Vergleich zwischen grünem und blauem Laser

Die Auswahl der geeigneten Antikörper und der optimalen Lyse wurde am CyFlow[®] mit einem blauen extern vorgeschalteten Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm durchgeführt.

Zum anderen wurden alle Proben an einem CyFlow[®] mit einer internen grünen Laserdiode der Wellenlänge 532 nm untersucht und verglichen.

Daher wurden aus jeder Blutprobe insgesamt sechs Ansätze hergestellt, die nach den drei unterschiedlichen Verfahren (CyLyse[®], PBS mit destilliertem Wasser, PBS mit

Fixierung) aufgearbeitet wurden. Jedes Präparationsverfahren wurde an beiden Geräten ausgewertet.

CyFlow[®] - grüner Laser	CyFlow[®] - blauer Laser
PBS mit Fixierung	PBS mit Fixierung
PBS mit destilliertem Wasser	PBS mit destilliertem Wasser
CyLyse [®]	CyLyse [®]

Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet:

Ein Probenröhrchen wurde mit 900 µl der aufbereiteten Probe gefüllt. Dabei war darauf zu achten, dass es nicht mit mehr als 2/3 seines Volumens gefüllt wurde und Luftblasen vermieden wurden. Nach dem Einrasten des Probenröhrchens in die Halterung erfolgt automatisch die Messung. Die FloMax Software zeigt folgende Mess-Stadien an:

In der „Prerun-Phase“ werden die Zellen mit hoher Geschwindigkeit zur Messküvette transportiert. Während der „Stabilize-Phase“ wird die Geschwindigkeit deutlich gedrosselt. In der „Run-Phase“ werden die Zellen analysiert und in Echtzeit in Histogrammen auf dem Display dargestellt. Erst in der „Count-Phase“ erfolgt dann die Zellzählung in einem definierten Volumen.

2.5.3 Auswertung

Nach abgeschlossener Zählung und Darstellung in Form von Dotplots und Histogrammen, können bestimmte Subpopulationen von Zellen durch „Gaten“ einzeln analysiert werden. Die Anzeige und statistische Auszählung kann durch das Definieren von Auswertefenstern, sogenannten „Gates“, auf bestimmte Zellcluster reduziert werden. Dazu wurde ein Polygon in das Dotplot eingezeichnet. Die FloMax Software errechnete direkt die Zellzahlen, die sich in den einzeln definierten Bereichen befanden.

In einem ersten Schritt wurden die CD 4- und CD 8-Cluster einzeln gated. Danach wurden zusätzlich alle Zellen durch einen Quadranten, also ein großes Auswertefenster,

umrahmt. Die somit errechnete Gesamtzahl der CD 4- und CD 8-Zellen konnte auf diese Weise mit den Zellzahlen des TQ-Prep Workstation verglichen werden.

Dieses Prüfverfahren sollte zusätzlich garantieren, dass unabhängig von der in unseren Versuchen verwendeten Einfarbenmethode das Gerät selbst genau zählte.

2.6 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl mithilfe von DAPI

Zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl wurden die Vollblutproben mit DAPI gefärbt [9]. Der Farbstoff DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol, bindet an DNA-Moleküle. Wenn die so vorbereiteten Proben mit Licht der Wellenlänge um 350 nm angeregt werden, fluoreszieren die Zellkerne in kräftigem Hellblau (450 nm).

100 µl Vollblut wurden mit 9,9 ml DAPI-Farbstofflösung [1:100] versetzt.

Da die Leukozyten nur ca. 10 min im Färbepuffer stabil waren, wurde die Messung direkt nach der Färbung durchgeführt.

Auch diese Messung erfolgte mit dem CyFlow[®] der Firma Partec, wobei zur UV-Anregung eine HBO-Lampe (Quecksilber) eingesetzt wurde.

2.7 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu untersuchen, wurde das Blut eines Normalprobanden 20-fach auf die gleiche Weise nach dem oben beschriebenen Verfahren mit CyLyse aufbereitet und durchflußzytometrisch quantifiziert.

In einer zweiten Versuchsreihe sollte – unabhängig von möglichen Aufbereitungsfehlern – ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden.

Dafür wurde eine einzige große Vollblutprobe von 1 ml für vier Durchläufe mit unterschiedlichen Lysen vorbereitet. Jeder dieser vier Durchläufe wurde ebenfalls fünffach gemessen.

Hierzu wurde Ortho Lyse, Utilyse und CyLyse verwendet; im vierten Durchlauf wurde ohne Lyse gearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Optimierung der Nachweismethoden

Zur Darstellung und Quantifizierung von Leukozyten und Leukozytensubpopulationen werden die unterschiedlichsten Antikörper und Lysereagenzien angeboten. In einigen Vorversuchen wurden Antikörper und Lysen verschiedener Anbieter getestet.

3.1.1 Auswahl der Antikörper

Bei der Gegenüberstellung der Antikörper der Firmen BIO-D und BD wurden deutliche Unterschiede in der Fluoreszenzausbeute sichtbar.

Eine graphische Auswertung der Dotplot war nur dann möglich, wenn die Lymphozytensubpopulationen CD 4 und CD 8 sich nicht überlagerten, daher wurde eine deutliche Abgrenzung der einzelnen Cluster angestrebt.

Die folgende Abbildung zeigt eine gut abgegrenzte Darstellung der CD 4- und CD 8-Cluster, die mit Antikörpern der Firma BIO-D gewonnen wurde.

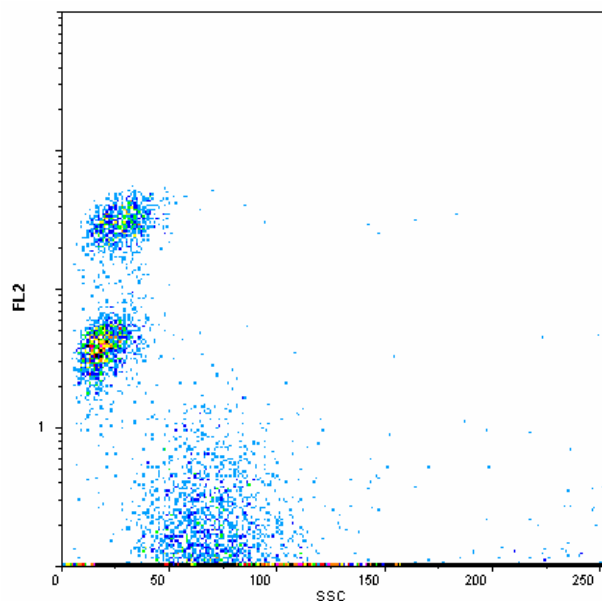


Abbildung 10: Dotplot bei Verwendung von BIO-D-Antikörpern

Hier wurden die Seitwärtsstreuungseigenschaften (SSC) gegen die PE-Fluoreszenz (FL2) aufgetragen. Die Punktwolke in FL-2 zwischen Kanal 20 und 50 zeigt die CD 8-positiven und die Punktwolke zwischen Kanal 2 und 7 die CD 4-positiven Zellen. Zwischen Kanal 0,1 und 1 sind die Signale der schwach CD 4-positiven Monozyten und dendritische Zellen dargestellt.

Im Vergleich dazu ergab die Verwendung von BD-Antikörpern ein deutlich schlechteres Ergebnis. Die beiden Punktwolken für CD 4 und CD 8 liegen nur wenig voneinander getrennt und lassen sich daher schwieriger auswerten (*Abbildung 11*).

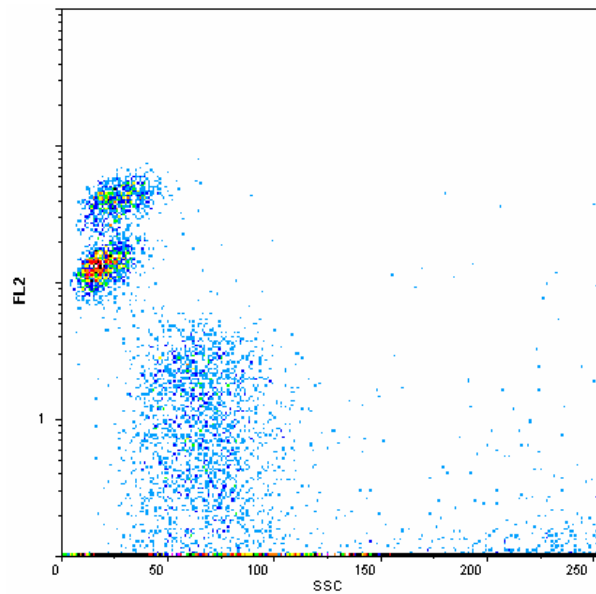


Abbildung 11: Dotplot bei Verwendung von BD-Antikörpern

Die CD 8-positiven Zellen finden sich in derselben Position wie in Abb. 10. Die CD 4-positiven Zellen hingegen sind gegenüber Abb. 10 stärker angefärbt und schlecht von der CD 8-Punktwolke zu trennen.

3.1.2 Auswahl des Aufbereitungsverfahrens

Neben den oben beschriebenen Antikörpern wurden auch verschiedene kommerzielle Lyseverfahren getestet, wobei darauf zu achten war, dass der Anteil von Rauschen („Debris“ oder „Noise“) und Lyseverluste möglichst gering waren.

1) DAKO® Uti-Lyse™:

Die Abbildung 12 zeigt exemplarisch ein Dotplot, bei dem mit DAKO® Uti-Lyse™ gearbeitet wurde. Die Monozyten waren bei dieser Lyse deutlich von den Lymphozyten abgegrenzt. Nachteilig wirkte sich die Tatsache aus, dass bei einigen Proben viel Debris vorhanden war und ein hoher Zellverlust durch die Lyse stattgefunden hatte. Die folgende **Abbildung 12** zeigt ein Beispiel, bei dem nur wenig Debris zu finden ist.

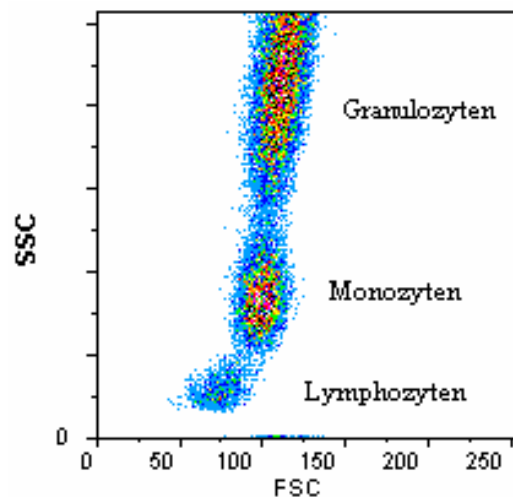


Abbildung 12: Dotplot einer mit DAKO® Uti-Lyse™ behandelten Blutprobe

Es wurden die Streulichteigenschaften (FSC gegen SSC) gegeneinander aufgetragen.

2) FACS Lysing Solution:

Die Abbildung 13 zeigt exemplarisch ein Dotplot, bei dem mit FACS Lysing Solution gearbeitet wurde. Auch bei dieser Lyse findet sich sehr viel Debris. Des Weiteren kann man die einzelnen Cluster nur sehr schlecht abgrenzen. Außerdem sind deutliche Zellzahlverluste durch diese Lyse verursacht worden.

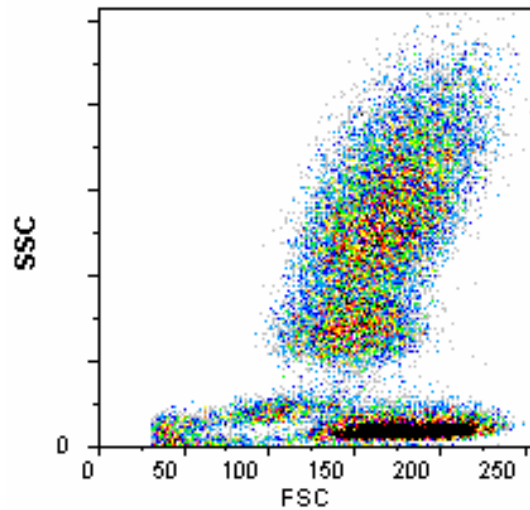


Abbildung 13: Dotplot bei Verwendung von FACS Lysing Solution

Eine klare Abgrenzung zwischen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten ist nicht möglich. Der Anteil an Debris ist hoch.

3) Ortho-Lyse:

Die Abbildung 14 zeigt exemplarisch ein Dotplot, bei dem mit Ortho-Lyse gearbeitet wurde. Bei dieser Lyse zeigt sich ebenfalls sehr viel Debris. Zusätzlich liegt eine sehr ungünstige Anordnung der Cluster vor.

Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der nur kurzen Stabilität, so dass in einem kurzen Zeitintervall nach Zugabe der Lyselösung gemessen werden muss (ca.10 Minuten).

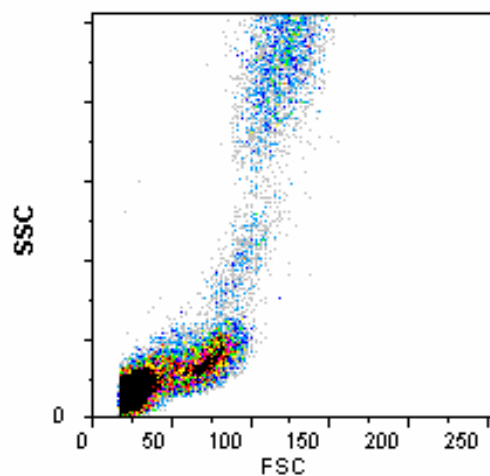


Abbildung 14: Dotplot bei Verwendung von Ortho-Lyse

Auffällig ist der hohe Anteil an Debris und die nur wenig ausgeprägten Punktwolken für Monozyten und Granulozyten.

4) CyLyse:

Diese Abbildung zeigt exemplarisch ein Dotplot, bei dem mit CyLyse gearbeitet wurde. Positiv hervorzuheben ist die gute Abgrenzung der Cluster. Bei dieser Lyse lagen die geringsten Lyseverluste bei optimaler Antikörperbindung vor. Außerdem war sehr wenig Debris vorhanden.

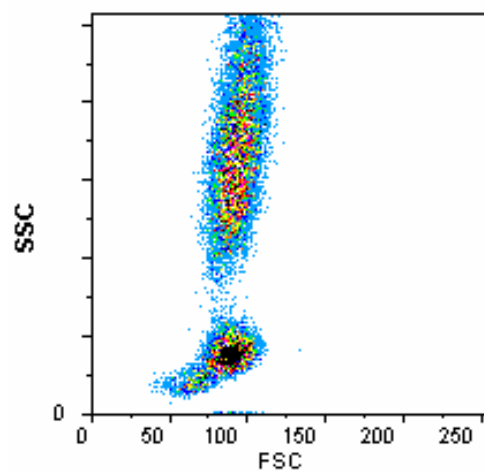


Abbildung 15: Dotplot bei Verwendung von CyLyse

Neben gut abgrenzbaren Subpopulationen findet sich bei der Verwendung dieser Lyse nur wenig Debris und verhältnismäßig wenig Lyseverluste.

Aufgrund der oben beschriebenen Vor- und Nachteile der einzelnen Reagenzien wurde entschieden, die Blutproben neben PBS-fix und PBS-Dest zusätzlich mit der Lyselösung CyLyse aufzubereiten.

3.1.3 Abgrenzung von CD 4- und schwach positiven CD 8- Zellen (Dimzellen)

Ziel dieser Vorversuche war es, beide Lymphozytensubpopulationen einzeln in Dotplots aufzuzeichnen, um Überlagerungen deutlich zu machen. Nur so kann ein möglicher Fehler bei der Festlegung von Auswertefenstern, dem Gaten, erkannt werden.

In der Abbildung 16 wurde beispielhaft eine mit CyLyse aufbereitete und sowohl mit CD 4- als auch mit CD 8-Antikörpern angefärbte Probe dargestellt.

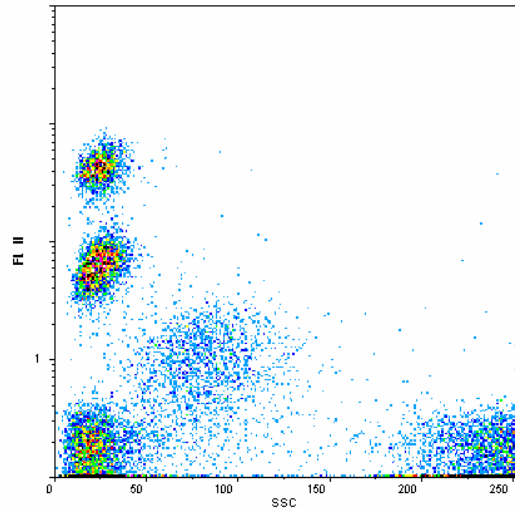


Abbildung 16: Dotplot der mit CD 4- und CD 8-Antikörpern versetzten Blutprobe

Die Antikörper waren an Phycoerythrin gekoppelt. Als Lyse wurde CyLyse eingesetzt. Aufgetragen wurde jeweils das Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen die PE-Fluoreszenz (FL II).

Im Gegensatz dazu zeigen die beiden unten abgebildeten Dotplots (**Abbildung 17 A und B**), die CD 4- und CD 8-Lymphozyten in Form der Einzelmessungen. Im Falle der CD 8-positiven Lymphozyten streuen einige schwach positive Zellen in den Bereich der CD 4-positiven Lymphozyten. Im Einzelfall kann der Anteil solcher Zellen recht hoch sein. Sie werden als „Dimzellen“ bezeichnet.

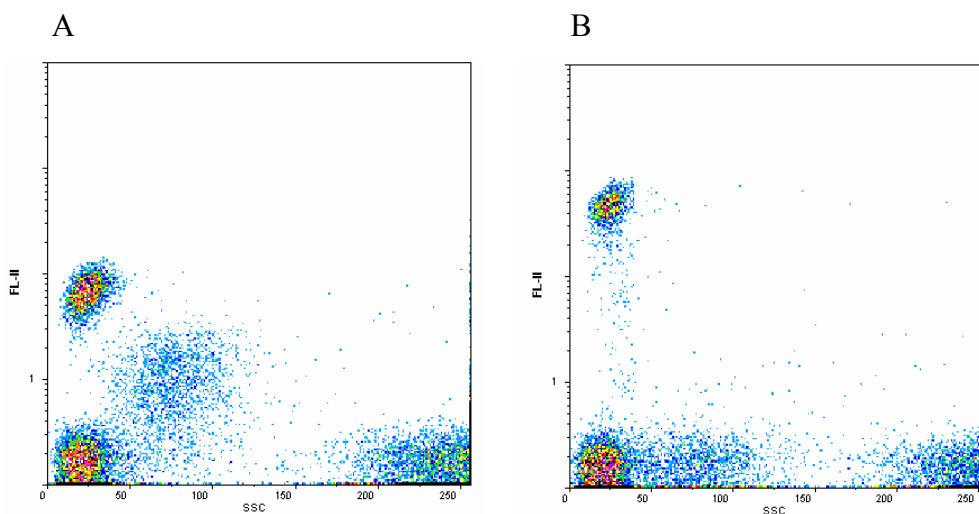


Abbildung 17: Dotplot der mit CD 4- Antikörpern (A, links) und CD 8-Antikörpern (B, rechts) einzeln angefärbten Probe

Aufgetragen wurde jeweils das Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen die PE-Fluoreszenz (FL II).

Beim Gaten der CD 4-Zellen wurden also stets diese Dimzellen, die eigentlich CD 8-positive Lymphozyten sind, mitgezählt. So lässt sich erklären, dass die Werte für die CD 4-Zellen meist relativ zu hoch liegen; die Werte für die CD 8-Zellen hingegen zu niedrig ausfallen, weil bei der hier verwendeten Gatingstrategie die CD 8-Dim-Zellen nicht mit erfasst werden.

3.2 Messergebnisse

3.2.1 Präzisionsversuche: Vergleichende Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl am SYSMEX und CyFlow[®] mithilfe der Kernfärbung

Zur Validierung der durchflußzytometrischen Messung wurde täglich eine vergleichende Kontrollzählung mit dem Hämatologie-Counter durchgeführt.

Der Sysmex-Hämatologie-Counter ist ein zur Messung von Blutparametern allgemein anerkanntes Gerät, dessen Zuverlässigkeit in zahlreichen Multicenterstudien belegt wurde. Deshalb konnten diese Werte als Referenzwerte zur Überprüfung der Zählgenauigkeit des Durchflußzytometers angesehen werden.

Die folgende **Abbildung 18** zeigt die Ergebnisse von Parallelmessungen derselben Blutproben mit dem Hämatologie-Counter und dem Flowzytometer sowie die lineare Regression mit 95,0 % Vorhersageintervall für den Einzelwert.

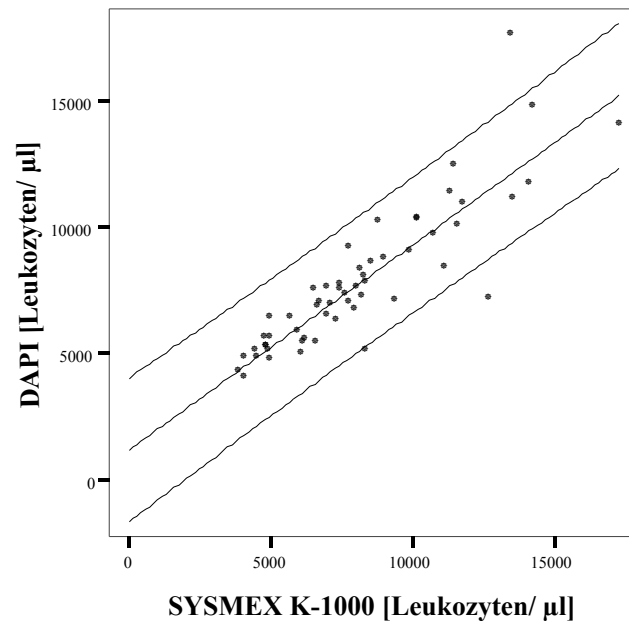


Abbildung 18: Lineare Regression der Leukozytenzahlen bestimmt am SYSMEX und durchflußzytometrisch mithilfe der Kernfärbung

Die Korrelation nach Pearson beträgt $r = 0,882$ und ist auf dem Niveau von $p = 0,01$ (2-seitig) signifikant.

3.2.2 Reproduzierbarkeit der CD 4-Messungen

Um die Reproduzierbarkeit der Messungen des CyFlow[®] zu untersuchen, wurden mit einer CD 4-markierten Blutprobe 20 Einzelmessungen durchgeführt. In **Abbildung 19** sind die Ergebnisse zusammengefasst. Der Mittelwert für die Messungen lag bei 663 CD 4-Zellen/ μl mit einem Variationskoeffizienten von $k = \pm 6,4 \%$. Dieser Fehler beinhaltet den systemischen Fehler (Volumen) sowie mögliche Ungenauigkeiten beim Pipettieren, etc.

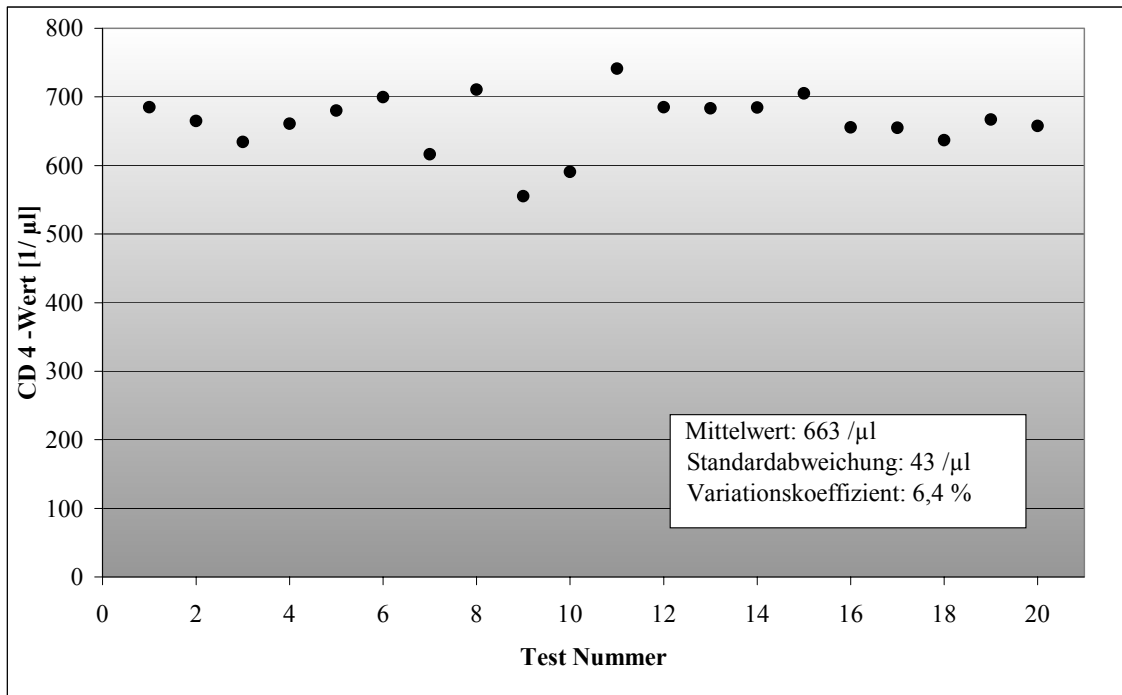


Abbildung 19: Absolute CD 4-Zahlen bei der Verwendung von CyLyse

Eine CD 4-markierte Blutprobe wurde zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit 20mal gemessen.

In der zweiten Versuchsreihe wurden jeweils 20 Parallelmessungen von 20 einzeln präparierten Blutproben desselben Spenders mit den folgenden Lysen durchgeführt: Ortho Lyse, Utilyse, CyLyse und ohne Lyse.

Die Ergebnisse der Messungen sind in **Abbildung 20** dargestellt. Die durchschnittlich höchsten Zellzahlen wurden bei den No Lyse-Versuchen mit 631 CD 4-Zellen/ µl bei einer Standardabweichung von +/- 3,3 % festgestellt, dagegen zeigte die DAKO-Utilyse die niedrigsten Werte mit 514 CD 4-Zellen/ µl mit einer Standardabweichung von +/- 3,0 %.

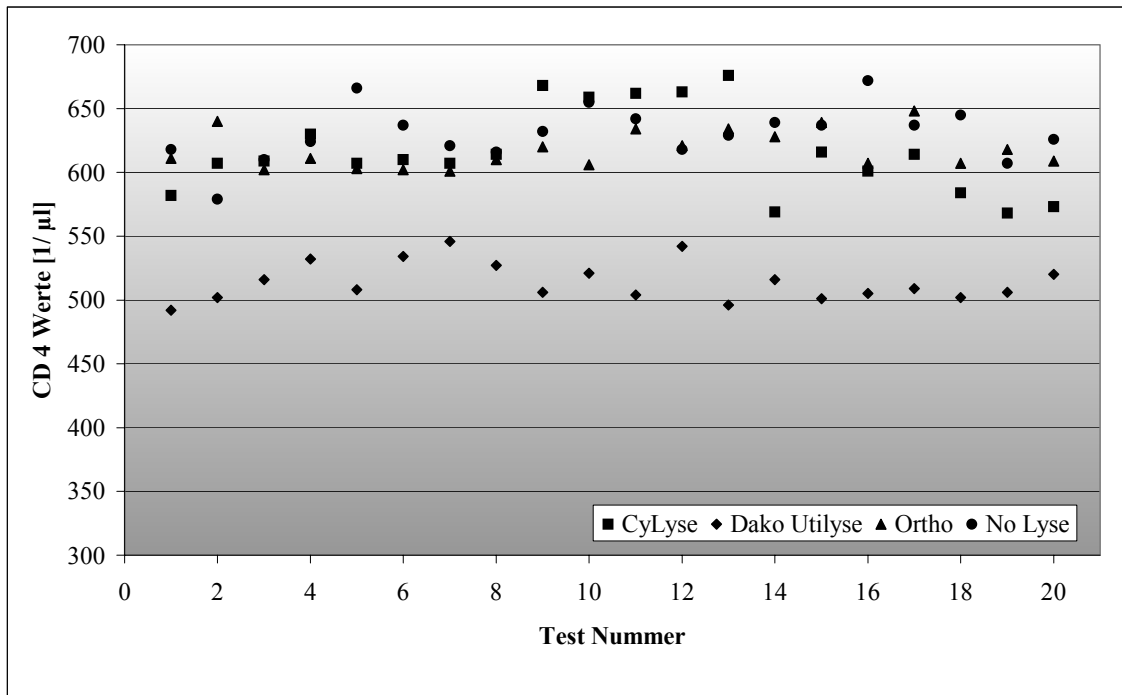


Abbildung 20: Reproduzierbarkeit der absoluten CD 4-Werte bei Verwendung unterschiedlicher Lysen

Dargestellt sind jeweils 20 Einzeluntersuchungen zum CD 4-Gehalt in derselben Blutprobe unter vier unterschiedlichen Lysebedingungen

3.2.3 CD 4- / 8-Messungen mit dem blauen Laser im CyFlow®

Da das Setzen der Gates bei der Einfarbenmarkierung großen Einfluss auf die Zellzählung hatte, war eine deutliche Abgrenzung der einzelnen Zellcluster wichtig. In den vorliegenden Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Dotplotdarstellungen, die mit dem 488 nm-Argon-Laser gewonnen wurden, durchweg weniger brauchbar waren als diejenigen, die mit Hilfe des 532 nm-Lasers erhalten wurden. Aus diesem Grund wurden im Folgenden nur die Ergebnisse mit dem grünen Laser berücksichtigt. Zwar waren die Cluster bei beiden Lasertypen gut getrennt, doch der Abstand vom Hintergrund (nicht markierte Zellen) war im Falle des grünen Lasers größer. Auch waren die Punktwolken bei Verwendung des grünen Lasers besser umgrenzt, so dass die Eingrenzung durch das Setzen der Gates vereinfacht wurde.

Im folgenden ist exemplarisch die Messung derselben Blutprobe mit den beiden Geräten dargestellt.

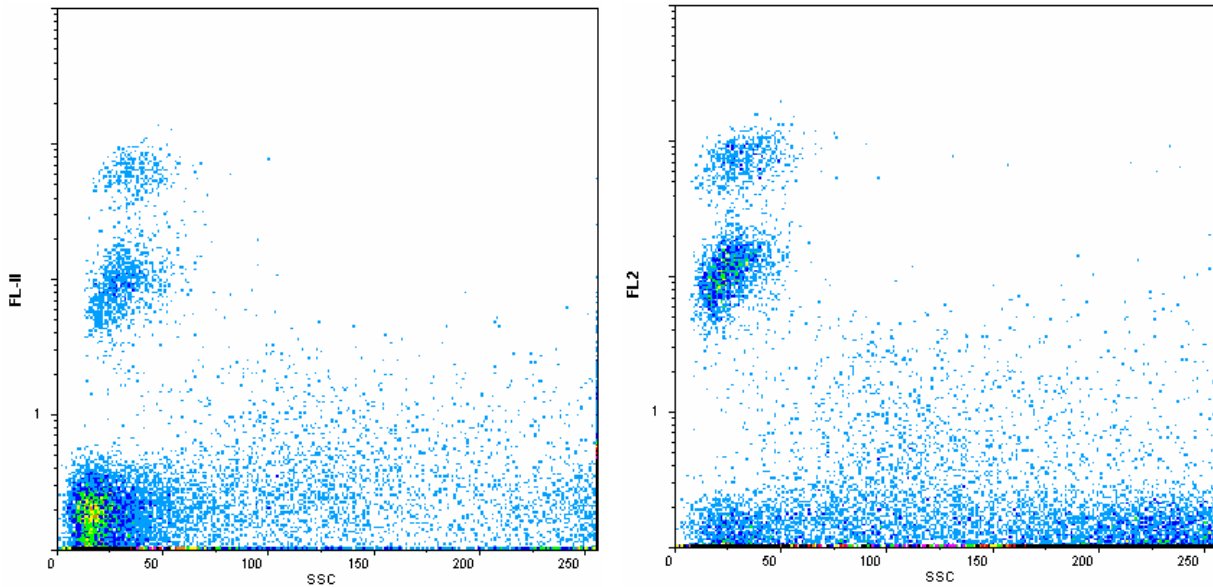


Abbildung 21: Doplodarstellung bei Verwendung des blauen (links) und des grünen Lasers (rechts)

3.2.4 CD 4- / 8-Messungen mit dem grünen Laser im CyFlow®

3.2.4.1 Vergleich der CD 4-Werte unter Verwendung zweier monoklonaler Antikörper

Neben den volumetrischen Messungen mit dem grünen Laser im CyFlow® wurden dieselben Blutproben in der Routinediagnostik mit der TQ-Prep Workstation gemessen. Die Ergebnisse der beiden Methoden wurde in **Abbildung 22**, **Abbildung 23** und **Abbildung 24** gegenübergestellt.

Hierbei wurde jeweils zwischen den einzelnen Aufbereitungsverfahren für die Bestimmung am CyFlow® unterschieden.

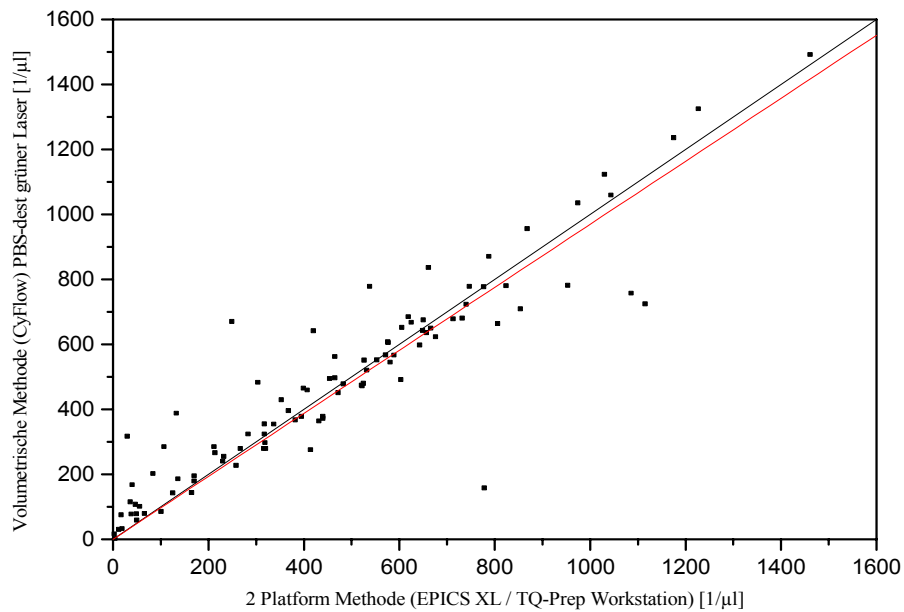


Abbildung 22: CD 4-Werte bei Verwendung von PBS-Dest

Übereinstimmung der Messwerte zwischen CyFlow[®], grüner Laser und TQ-Prep Workstation

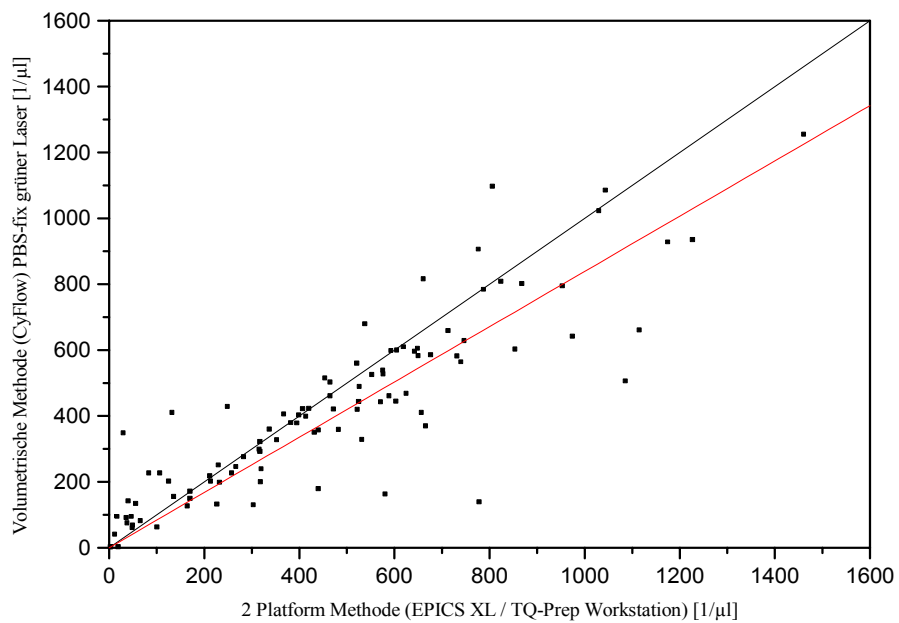


Abbildung 23: CD 4-Werte bei Verwendung von PBS-Fix

Übereinstimmung der Messwerte zwischen CyFlow[®], grüner Laser und TQ-Prep Workstation

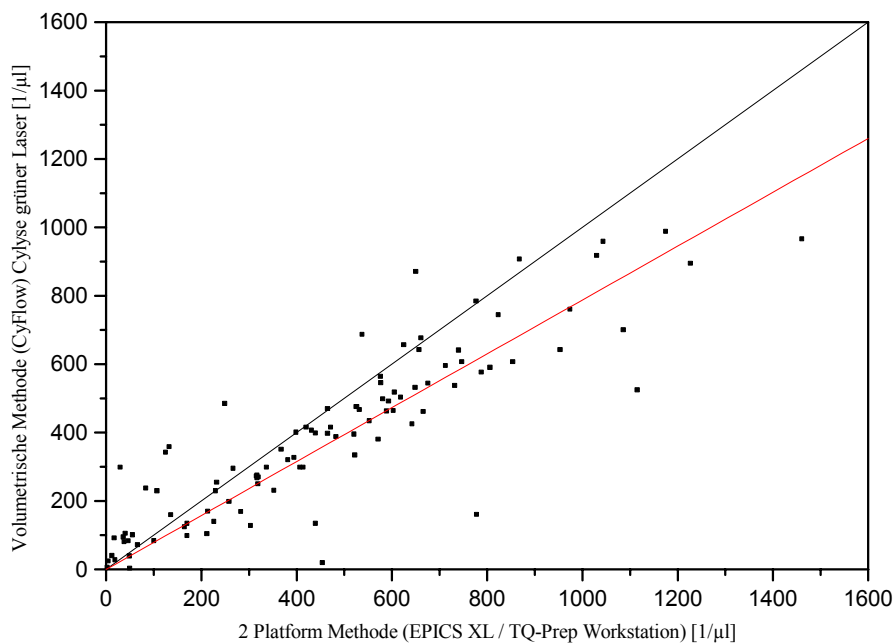


Abbildung 24: CD 4-Werte bei Verwendung von CyLyse

Übereinstimmung der Messwerte zwischen CyFlow[®], grüner Laser und TQ-Prep Workstation

Bei der Verwendung von PBS-Dest konnte eine gute Übereinstimmung der Zellzahlen für beide Methoden festgestellt werden. Die Korrelation zwischen beiden Messverfahren betrug $r = 0,87$ [**Abbildung 22**].

Im Gegensatz dazu sind die Ergebnisse bei der Verwendung von PBS Fix etwas niedriger, als bei der 2 Plattform-Methode (TQ-Prep Workstation). Bei Verwendung von CyLyse liegen die Werte im Mittel etwa 20 % unter denen, die mit der 2-Plattform-Methode gewonnen wurden. Die Korrelationen liegen bei 0,83 (PBS Fix, **Abbildung 23**) bzw. bei 0,80 (CyLyse, **Abbildung 24**).

3.2.4.2 CD 8-Werte

Dieselben Blutproben wurden parallel auf ihren Gehalt an CD 8-positiven Zellen untersucht. Auch hier wurden die Ergebnisse der Routinediagnostik mit der

volumetrischen Methode verglichen. Die Aufbereitungsverfahren waren dieselben wie bei der CD 4-Messung.

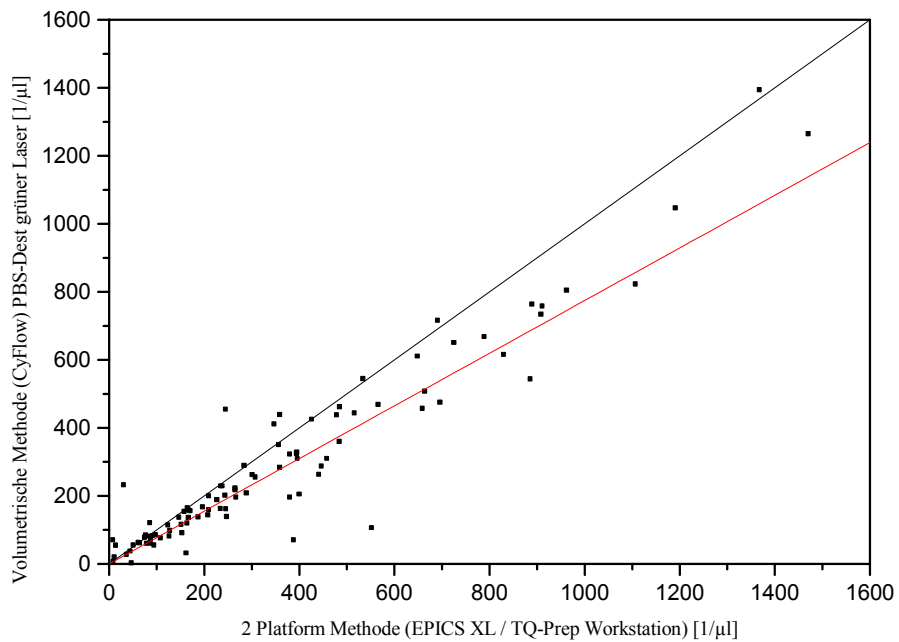


Abbildung 25: CD 8-Werte bei Verwendung von PBS-Dest

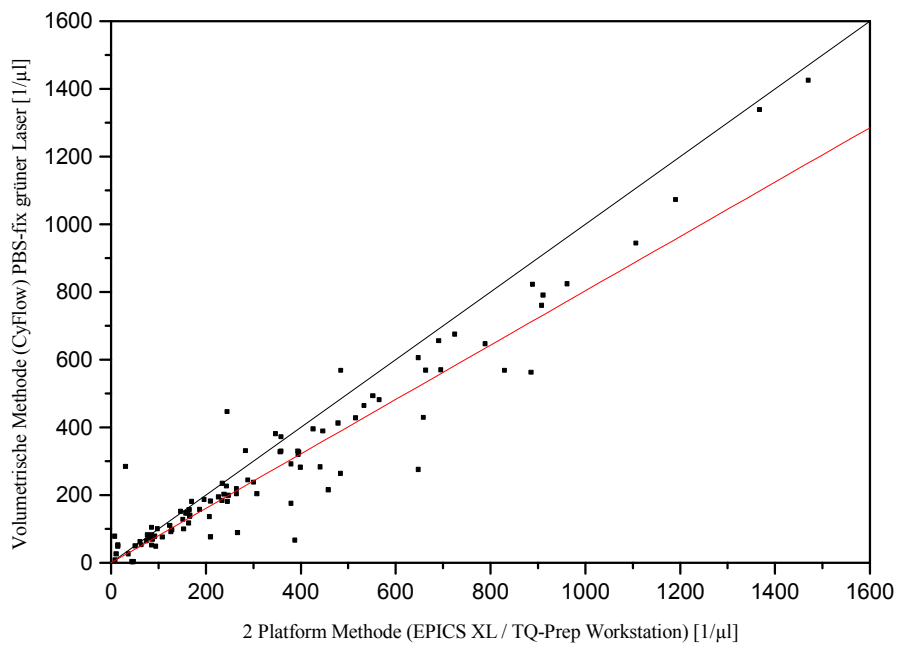


Abbildung 26: CD 8-Werte bei Verwendung von PBS-Fix

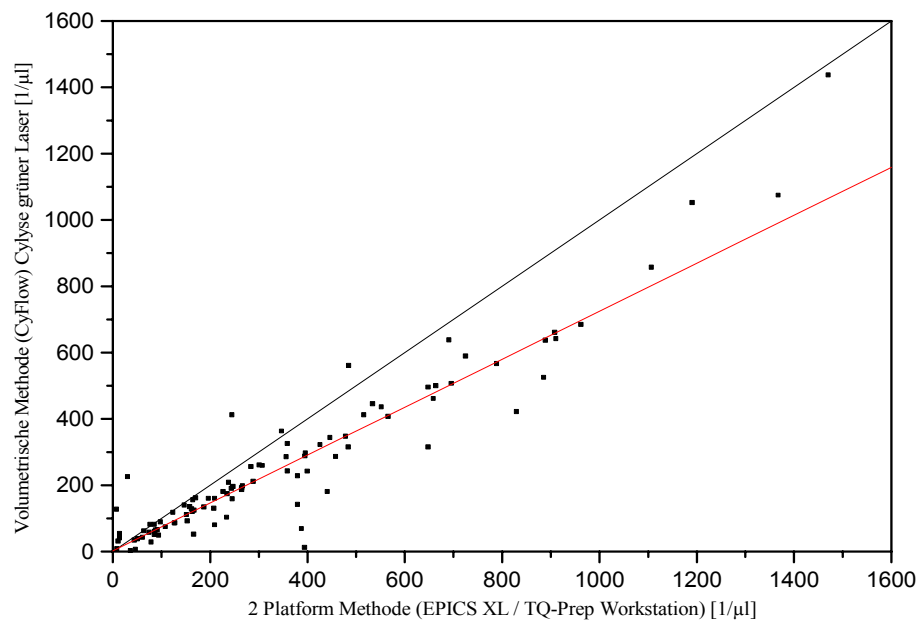


Abbildung 27: CD 8-Werte bei Verwendung von CyLyse

Auffällig bei den CD 8-Werten ist, dass die Messergebnisse des CyFlow[®] bei allen drei Aufbereitungsverfahren im Vergleich zur TQ-Prep Workstation erniedrigt sind. Der Grund dafür ist, dass bei dem verwendeten CD 8-Gate im CyFlow[®] die CD 8-Dim-Zellen nicht gewertet wurden.

Die Korrelation beträgt bei der Verwendung von PBS Dest (**Abbildung 25**) 0,86, für PBS Fix 0,85 (**Abbildung 26**) und für CyLyse bei 0,80 (**Abbildung 27**). Das belegt auch hier den Verlust an Lymphozyten durch die verwendete Lyse-reagenz.

3.2.4.3 Quotient aus CD 4- und CD 8-Werten

Aus den CD 4- und CD 8-Einzelwerten lässt sich ein CD 4-/ CD 8-Quotient ermitteln, der einen wichtigen diagnostischen und prognostischen Parameter darstellt. In den Abbildungen 28-30 wurden die Quotienten aus der CyFlow[®]-Messung mit denen der TQ-Prep Workstation verglichen. Dabei wurde nach den einzelnen Lysetechniken unterschieden.

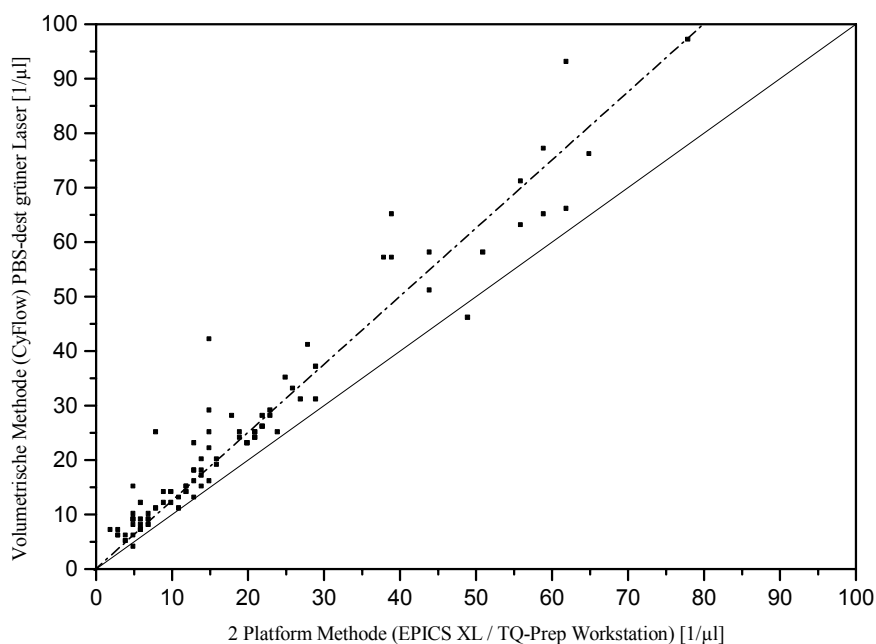


Abbildung 28: CD 4- und CD 8-Ratio bei Verwendung von PBS-Dest

Vergleich der Ergebnisse der volumetrischen Messung mit denen der 2 Platform-Methode

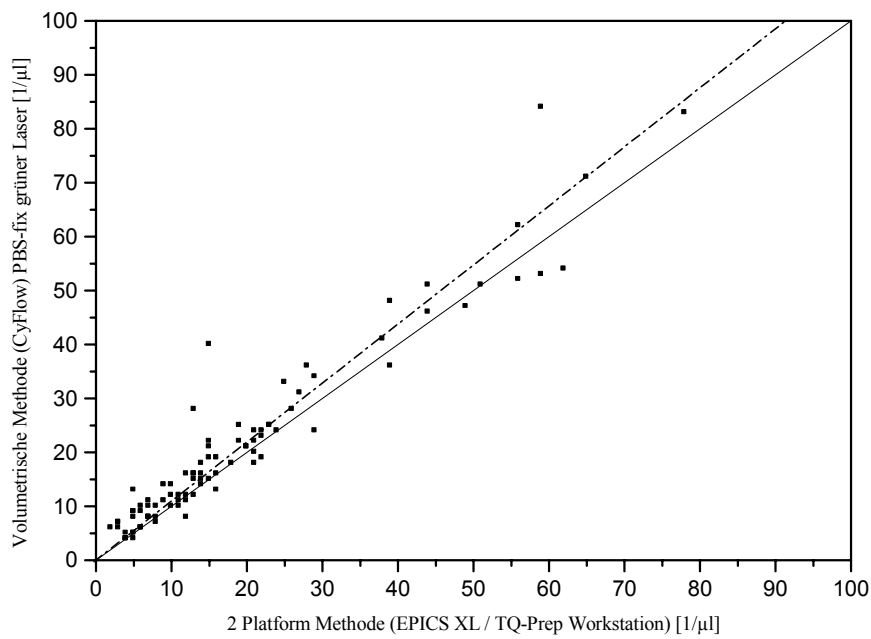


Abbildung 29: CD 4- und CD 8-Ratio bei Verwendung von PBS-Fix

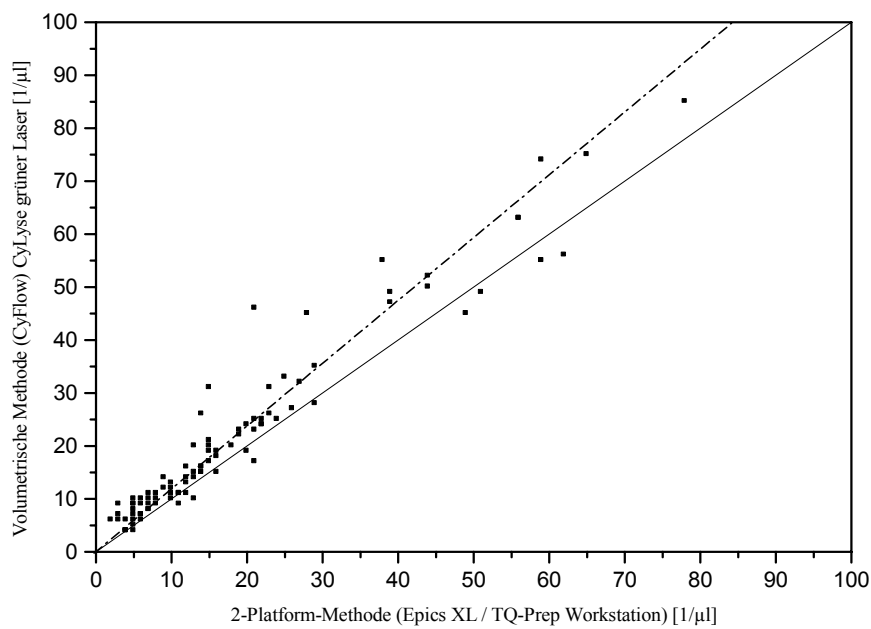


Abbildung 30: CD 4- und CD 8-Ratio bei Verwendung von CyLyse

Die Messergebnisse des CyFlow[®] führen insgesamt zu höheren CD4/ CD8-Quotienten als die der 2 Platform-Methode (TQ-Prep Workstation). Dieses Missverhältnis resultiert aus den erniedrigten CD 8-Werten, die als Divisor verwendet wurden.

Die Korrelation betrug bei der Verwendung von PBS Dest (**Abbildung 28**) 0,66. Bei der Messung mit PBS Fix war eine Korrelation von 0,70 gegeben (**Abbildung 29**). Eine Korrelation von 0,71 konnte bei CyLyse ermittelt werden (**Abbildung 30**).

3.2.4.4 Vergleich der Quadrantenbestimmung von CD 4 und CD 8 mit den Ergebnissen der TQ-Prep Workstation

Um mögliche Ungenauigkeiten durch Fehler beim Gaten auszuschließen, die letzten Endes auf die Einfarbenmethode zurückzuführen sind, haben wir die Gesamtzahl der CD 4- plus CD 8-Zellen durch einen Quadranten, also ein großes Auswertefenster, umrahmt. Hier wurden die auf diese Weise ermittelten Gesamtzellzahlen (CD 4 und CD 8) den Messergebnissen aus der 2 Platform-Methode (TQ-Prep Workstation) gegenübergestellt.

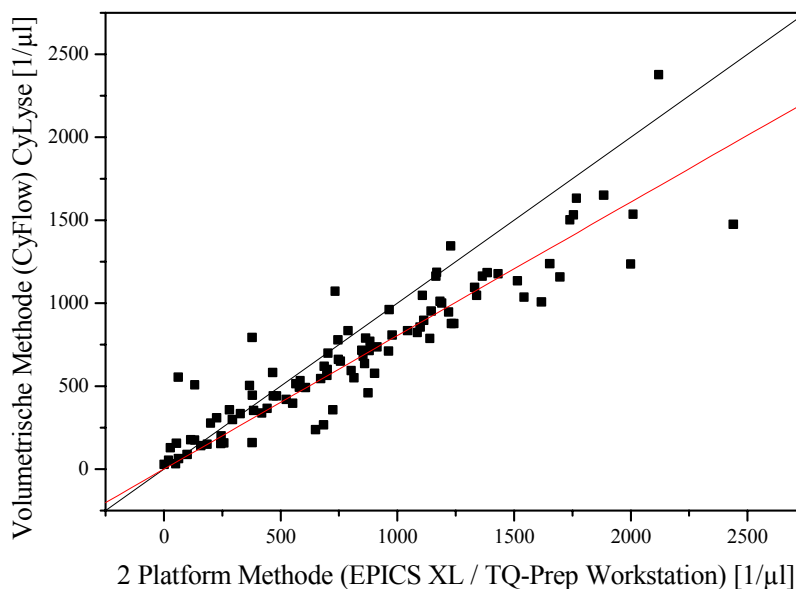


Abbildung 31: Quadrantenbestimmung von CD 4 und CD 8 mit CyLyse

CD 4 und CD 8 wurden zu einem Wert zusammengefasst und der Summe dieser beiden Subklassen aus der 2 Platform-Messung gegenübergestellt.

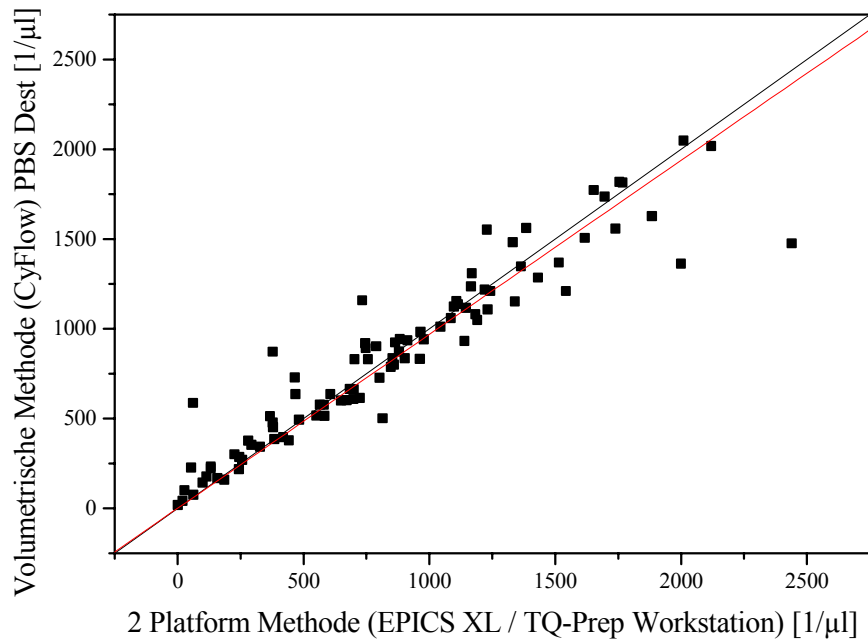


Abbildung 32: *Quadrantenbestimmung von CD 4 und CD 8 mit PBS Dest*

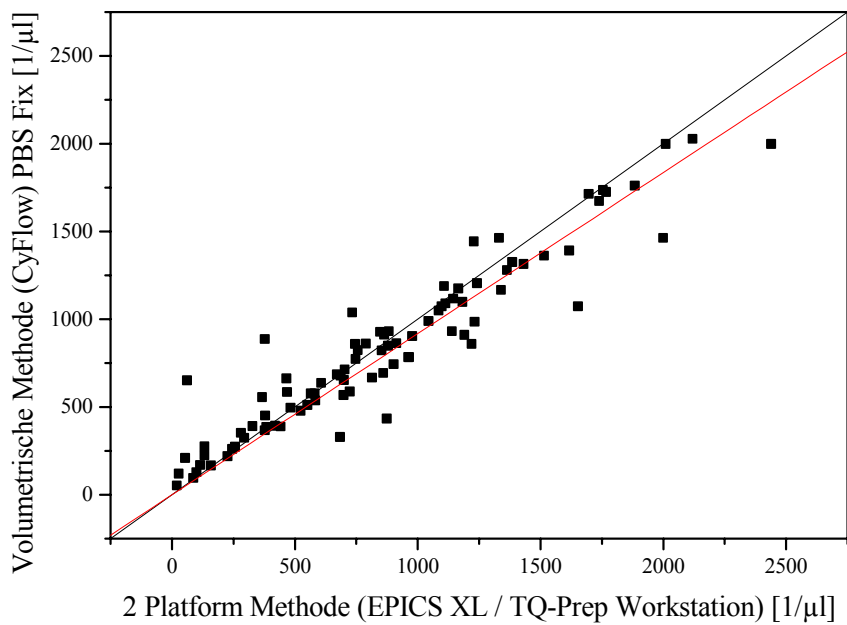


Abbildung 33: *Quadrantenbestimmung von CD 4 und CD 8 mit PBS Fix*

Die Ergebnisse in Abbildung 30 belegen den Zellverlust durch Lyse. Die Korrelation betrug bei der Verwendung von PBS Dest (Abbildung 32) 0,97, von PBS Fix 0,95 (Abbildung 33) und von CyLyse 0,91 (Abbildung 31).

3.2.4.5 Vergleich der CD 4-Werte unter Verwendung eines einzigen monoklonalen Antikörpers

Um mögliche Ungenauigkeiten infolge von Überlagerungen der CD 4-Zellen durch schwach positive CD 8-Zellen (Dimzellen) auszuschließen, wurde in dieser separaten Versuchsreihe mit nur einem monoklonalen Antikörper gearbeitet. Dieser färbt ausschließlich die CD 4-positiven Lymphozyten an; CD 8-positive Zellen werden nicht erfasst.

Die auf diese Weise mit dem CyFlow[®] ermittelten CD 4-Zellzahlen wurden den Messergebnissen aus der 2 Platform-Methode (FACS-Calibur) gegenübergestellt.

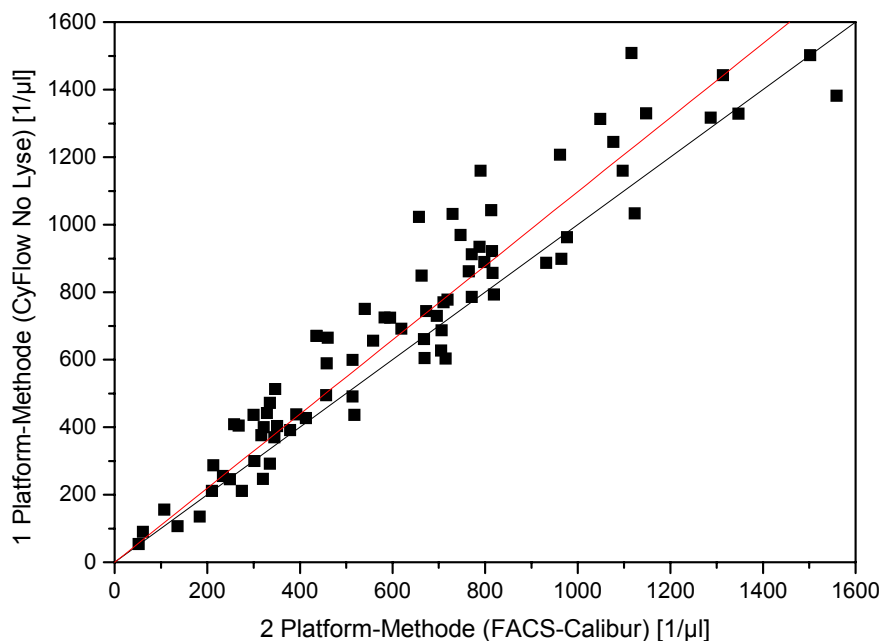


Abbildung 34: CD 4-Werte bei Verwendung von No Lyse mit nur einem monoklonalen Antikörper

Die Absolutwerte der CD 4-Zellen entsprechen sich bei beiden Zählverfahren.

3.2.5 Lyseverfahren

Um zu verdeutlichen, bei welchem Aufbereitungsverfahren welche Lyseeffekte zum Tragen kommen, wurden die durchschnittlichen CD 4- und CD 8-Zahlen gegeneinander aufgetragen. Hierzu wurden die Ergebnisse, die mithilfe der Quadrantenbestimmung ermittelt wurden, verwendet.

Setzt man den Wert aus dem Zentrallabor (Coulter Epics XL-2-Plattform-Methode) als Referenzwert mit 100 % an, so ergeben sich folgende Ergebnisse für die volumetrische Zellzahlbestimmung:

Zentrallabor	CyLyse	PBS Dest	PBS Fix
874	729	923	837
100 %	83 %	106 %	96 %

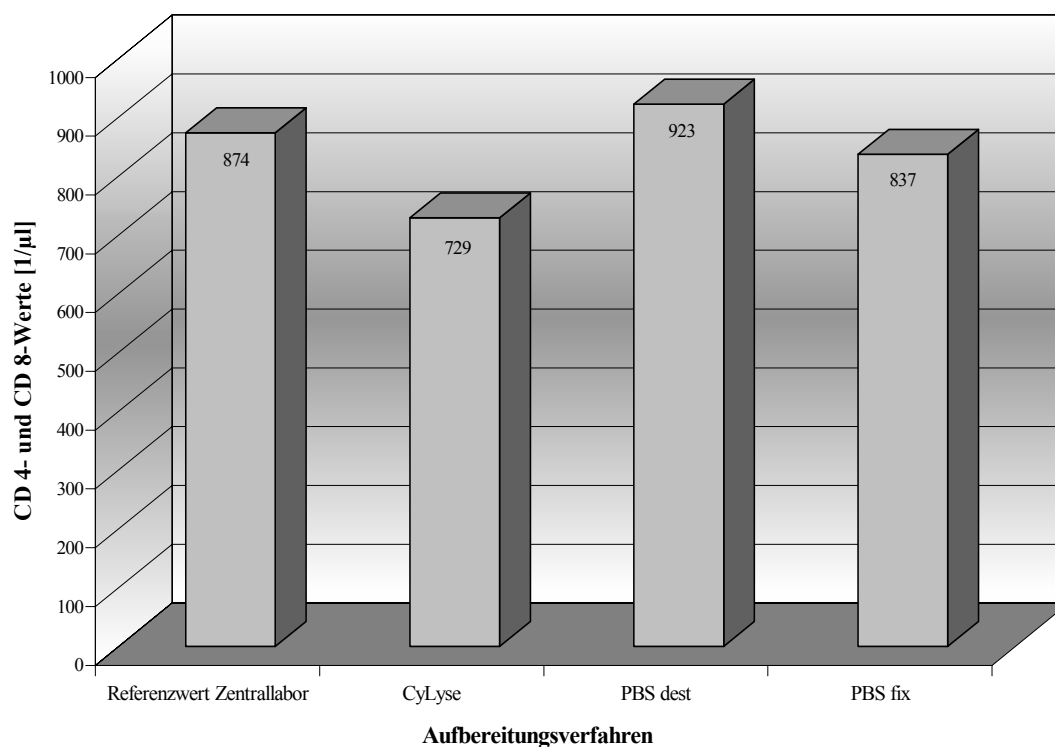


Abbildung 35: Durchschnittliche CD 4- und CD 8-Werte bei Verwendung unterschiedlicher Aufbereitungsverfahren

4 Diskussion

Die durchflußzytometrische Quantifizierung von CD 4- und CD 8-positiven Lymphozyten im peripheren Blut erfordert in der Laborroutine den Einsatz dreier unterschiedlicher fluoreszierender Antikörper und basiert auf zwei separaten Messverfahren [1]. Diese als 2 Platform-Methode bekannte Technik ist wegen des hohen apparativen Aufwandes und kostenintensiver Antikörper für die Anwendung in unterentwickelten Regionen der Welt ungeeignet. Auch die technisch weniger aufwendige beads-Methode ist aufgrund der hohen Kosten von € 13-16 [5] nur eingeschränkt einsetzbar.

In der vorliegenden Studie wurde mit einem neuartigen volumetrischen Durchflußzytometer gearbeitet, dessen Vorzüge in der direkten Volumenmessung und einem niedrigen Anschaffungspreis liegen. Die volumetrische Technik wurde mit den konventionellen flowzytometrischen Methoden zur Bestimmung von Lymphozyten-Subpopulationen aus der Routineanwendung verglichen. Der volumetrischen Messung lagen zwei Lasergeräte zugrunde, eines mit grüner Laserdiode mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm und eines mit blauem Argon-Ionen-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm.

Neben den beschriebenen technischen Parametern wurden unterschiedliche Aufbereitungsprotokolle für die Vollblutproben untersucht, dies waren CyLyse, PBS Fix (**p**hosphate **b**uffered **s**aline mit Fixierung [6 %ige Paraformaldehyd-Lösung]) und PBS Dest (**p**hosphate **b**uffered **s**aline mit destilliertem Wasser).

In den letzten Jahren hat die durchflußzytometrische Bestimmung von Leukozyten-Subpopulationen, wie den CD 4- und CD 8-positiven Lymphozyten, große diagnostische Bedeutung erlangt. Die Ergebnisse durchflußzytometrischer Untersuchungen werden heutzutage als Zusatzinformation bei der Diagnose von Krankheiten wie zum Beispiel HIV-Infektion [42] oder Leukämie [22, 49] einbezogen oder zum Therapie-Monitoring verwendet. Als „Gold-Standard“ gilt laut der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) die Durchflußzytometrie zur Bestimmung der CD 4 –positiven Lymphozyten.

Durch das ständig wachsende Aidsproblem in den Entwicklungsländern besteht ein vermehrter Bedarf, gerade für diese Regionen geeignete Analysegeräte zu schaffen und bezahlbare Testverfahren zu entwickeln.

Die Durchflußzytometer in den Entwicklungsländern entsprachen bisher denjenigen in hochspezialisierten Laboratorien der Industrieländer. In Afrika beispielsweise sind derzeit ca. 100 dieser Geräte installiert, von denen nur einige wenige in privaten Laboratorien betrieben werden. Für die durchschnittliche Bevölkerung sind die Untersuchungen unbezahlbar.

Der technische Aufwand, mit diesen Durchflußzytometern CD 4-Zellen zu zählen, war genau derselbe, wie in einer westeuropäischen Klinik, nämlich aufwendig, hochspezialisiert, ein unhandliches Format, bei hohen Preisen für die Untersuchungen.

Das Problem besteht also darin, dass Standards, die für westliche Verhältnisse selbstverständlich sind, wie zum Beispiel eine gleichbleibende Stromspannung oder durch Klimaanlage gefilterte staubfreie Luft, in vielen dieser Länder nicht gewährleistet sind. Auch können die hohen Betriebskosten nicht bezahlt werden.

Der Versuch, diese Technik in wenig entwickelten Ländern einzusetzen, scheiterte oft mit der Folge, dass die hoch entwickelten und störanfälligen Durchflußzytometer schon nach kurzer Zeit defekt und nicht mehr einsetzbar waren. Vorwiegend sind es jedoch die Finanzen, an denen die bisherigen Projekte scheiterten.

Bisher kann ein Therapie-Monitoring nach westeuropäischem Standard nur in den Großstädten der Entwicklungsländer stattfinden. Allerdings war dieses „Know how“ so nur einem sehr geringen, wohlhabenden Teil der Bevölkerung zugänglich. Die Kosten für eine CD 4-/ CD 8-Zellzahlbestimmung liegen bisher bei bis zu 80 US \$, die WHO gibt einen Durchschnittspreis von 30-40 US \$ an.

Somit müssen neue Verfahren geschaffen werden, die sowohl kostengünstig, als auch so robust sind, dass sie den unterschiedlichen Witterungsbedingungen standhalten. Portable Geräte hätten den Vorteil, dass sie universell einsetzbar sind. Das CyFlow[®] erfüllt diese Kriterien.

Mit dem CyFlow[®] ist es möglich, ein Therapie-Monitoring außerhalb von Speziallaborräumen durchzuführen, da es all diese Eigenschaften vereint: Es lässt sich von der Größe her gut transportieren, man kann es einfach an einen Laptop anschließen, die Stromzufuhr kann von einer Autobatterie erfolgen und das Gerät ist so robust, dass ein mobiler Einsatz möglich ist.

Ein weiterer großer Vorteil gegenüber anderen konventionellen Geräten ist, dass das CyFlow[®] eine preiswerte Laserdiode anstelle eines konventionellen, luftgekühlten Lasers besitzt, der einen weiteren unhandlichen Baustein bedeutet.

Durch das in dieser Arbeit untersuchte Gerät wird der Grundstein für die oben beschriebenen speziellen Anforderungen gelegt. Mit dem Einsatz der Laserdiode wurde deutlich mehr Platz gewonnen; ein 12 V Anschluss (zum Beispiel eine Autobatterie) ist nun ausreichend und durch den Wegfall der Luftkühlung für den Laser wird eine potentielle Störquelle beseitigt.

Das Gerät benötigt nur vernachlässigbar geringen Service und Unterhaltskosten. Laut Herstellerangaben betragen die Kosten für Material und Reagenzien weniger als 10 % derjenigen, die ein konventionelles Flow Cytometer erfordert.

Abgesehen von den bereits erwähnten Vorteilen des CyFlow[®] zeichnet sich dieses Gerät auch durch das Messprinzip aus, mit dem die CD 4- und CD 8-positiven Lymphozyten bestimmt werden:

Derzeit werden in der Regel zwei Verfahren zur Quantifizierung von Leukozyten und Lymphozytensubpopulationen eingesetzt, die beide auf Referenzmessungen angewiesen sind: die „Dual Platform-Methode“ und die auf Referenzbeads basierende „Single Platform-Methode“. Beide Methoden weisen verschiedene Nachteile auf. Bei der „Single Platform-Methode“ können unvorhersehbare Artefakte durch Verklumpungen der beads [4] auftreten. Außerdem belaufen sich die Kosten für die Analyse einer einzigen Blutprobe auf etwa € 13-16 [5].

Die Dual Platform Methode benötigt neben dem Durchflußzytometer einen Hämatologie-Counter und zumindest einen zusätzlichen monoklonalen Antikörper (CD 45) für jede Probe. Daraus resultieren ebenfalls höhere Kosten pro Analyse und ein zusätzlicher Arbeitsaufwand [34].

Für die CD 4-Zellzählung konnte in einer Untersuchung von 280 Labors [3] gezeigt werden, dass bei der auf beads basierenden „Single Platform-Methode“ ein Variationskoeffizient von +/- 13,7 % und bei der „Dual Platform-Methode“ von +/- 23,4 % festgestellt wurde. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit, neue Verfahren zu entwickeln, die eine höhere Reproduzierbarkeit und Genauigkeit liefern.

In einer Untersuchung von ALEXANDER wurden CD 4-Werte, die mit 3 Fluoreszenzmarkierten Antikörpern versetzt und anschließend durchflusszytometrisch bestimmt wurden, Werten von einem Hämatologie-Counter gegenübergestellt [1]. Dabei zeigte sich, dass die absoluten Werte durchschnittlich um 7-11 % niedriger lagen als die des Hämatologie-Counters, wohingegen die prozentualen Werte gut übereinstimmten. Auch CONNELLY stellte in einer ähnlichen Untersuchung etwa 15 % niedrigere Werte bei den absoluten CD 4-Zahlen fest [12].

In dieser Arbeit wird eine volumetrische Zählmethode vorgestellt, deren Entwicklung auf das Jahr 1968 zurückgeht. DITTRICH und GÖHDE [17] entwickelten damals die erste auf der Fluoreszenzmessung einzelner Zellen basierende Durchflußzytometrie.

Deren Einsatz in der Immunologie, Hämatologie, Biochemie oder Onkologie sind längst nicht mehr die einzigen Anwendungen. Heute wird dieses Gerät routinemäßig in der gesamten klinischen Zelldiagnostik verwendet [7]. Es eignet sich zur Zählung verschiedener immunologisch markierter Zellen sowie für die simultane Zählung von mehreren Zelltypen in einem Durchlauf.

Im Unterschied zu ROEDERER zum Beispiel, der sogar 8 Fluorochrome verwendete, um CD 4-positive Zellen zu identifizieren [68], schlugen JANOSSY et al. 2001 vor, nur einen einzigen Antikörper zu verwenden [33]. Für die hier vorliegenden Untersuchungen wurde im Gegensatz zu der bisherigen routinemäßig durchgeführten Mehrfarben-Zytometrie [16, 35, 39, 45, 52, 58, 60, 72] mit einer einzigen Laserquelle gearbeitet. Diese regt im kurzwelligen Bereich des sichtbaren Lichtspektrums (grün bis rot) nur einen einzigen Farbstoff, das R-Phycoerythrin (R-PE), an. Hingewiesen werden muss

auf die drastische Reduktion der Kosten auf Grund des Bedarfs an nur einem monoklonalen Antikörper [34].

MERCOLINO stellte 1994 erstmals eine Methode vor, mit der volumetrisch CD 4-positive Lymphozyten bestimmt werden konnte. Mithilfe des „Ortho CytoronAbsolute[®]“ und drei Fluorochromen wurden sehr genaue Ergebnisse erzielt [53]. In dieser Arbeit hingegen wurde eine Meßmethode vorgestellt, die es ermöglicht, volumetrisch CD 4-positive Lymphozyten zu bestimmen und gleichzeitig auf mehrere Antikörper oder Fluorochrome zu verzichten, was mit einer, im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden, drastischen Kostenreduktion verbunden ist.

So liegen die Kosten für die Auswertung einer Blutprobe mit dem CyFlow[®] bei etwa 0,5 €. Im Vergleich dazu kostet eine nach dem „Cytosphere assay“ durchgeführte, auf beads basierende Messung 13-16 €, im Gegensatz zur „Double Platform-Methode“ mit 35 € [41]. In anderen Quellen werden für die standardmäßig durchgeführte 2-Farben-Messung nach der „Double Platform-Methode“ sogar etwa 125 – 200 € veranschlagt [36].

Auch der deutlich geringere Zeitaufwand und die einfache Handhabung bei der Verwendung von nur einem Farbstoff sind hervorzuheben.

Neben den beschriebenen Vereinfachungen in der Meßmethode konnte auch die Auswertung der Messdaten vereinfacht werden.

MANDY et al. fassten 1997 die Entwicklung der verschiedenen Gating-Strategien für die CD 4-positiven T-Lymphozyten-Zählungen zusammen. Dabei wurde eindrucksvoll deutlich, auf welcher komplizierten Weise man zu dann aber auch sehr exakten Ergebnissen kommen kann. Allerdings scheinen diese Strategien nicht dem Bedarf an einer einfachen, schnellen und kostengünstigen CD 4-Zellbestimmung in einer unterentwickelten Umgebung zu entsprechen [50].

Die Konzentration der CD 4-Zellen konnte in dieser Arbeit ohne komplizierte Gatingverfahren ermittelt werden.

Der Vergleich der Zahlenwerte aus der hier eingesetzten volumetrischen Messung mit denen des Zentrallabors (Dual-Platform-Methode) zeigte Übereinstimmung. Die CD 4-

Zellzahlergebnisse nach Aufarbeitung ohne Lyse stimmten sehr gut mit den Dual-Platform-Ergebnissen überein [**Abbildung 22**].

Die CD 8-Werte lagen um 18 % niedriger, weil die Dimzellen nicht mit berücksichtigt wurden.

Zellverluste, bedingt durch die Lyse, insbesondere dann, wenn unterschiedliche Subpopulationen in verschiedener Weise beeinflusst werden, schränken flowzytometrische Zählmethoden deutlich ein. Die Auswirkungen unterschiedlicher Lysen auf die Leukozyten wurden bereits beschrieben. So untersuchten CASSENS et al. 1998 und GREVE et al. 2003 dieses Phänomen für Zellverluste bei Progenitorzellen [29, 74]. Aus diesem Grund wurden verschiedenartige Lysen im Hinblick auf die CD 4-Zellzahlergebnisse miteinander verglichen.

Die vier getesteten Lysen verhalten sich unterschiedlich im Bezug auf Lyseverluste, so waren bei der DAKO-Utilyse mit 16 % die höchsten Verluste zu messen, die geringsten Verluste wurden gemessen, wenn CyLyse verwendet wurde [**Abbildung 20**].

In allen weiteren Untersuchungen wurde neben der Lyse (CyLyse) PBS-Puffer für die Probenverdünnung verwendet, der entweder mit Fixativ (6 % Paraformaldehyd) oder mit destilliertem Wasser (1:1) versetzt wurde. Es wurde dabei auf jedwede Lyse verzichtet.

Die durchschnittlichen Zellverluste bei der Bestimmung der Zellzahlen (CD 4 und CD 8) mit Hilfe eines Quadranten waren bei CyLyse im Vergleich zu den Referenzwerten des Zentrallabors ca. 17 %.

Bei der Verwendung von PBS Dest waren die gemessenen Zellzahlen im Durchschnitt um 6 % höher als im Zentrallabor. Da hierbei ohne Lyse gearbeitet wurde, ist davon auszugehen, dass die Referenzwerte bereits Zellverluste aufweisen.

Bei der Verwendung von PBS mit Fixativ wurden nur geringe Unterschiede zu den Dual-Platform-Werten gefunden (4 %). Der Einsatz von 6 % Paraformaldehyd führt zu einer sichtbaren Erythrozytenlyse, der Einfluss auf die Leukozyten ist jedoch nicht bekannt. Somit ist es durchaus möglich, dass durch die Fixierung Leukozyten verloren gehen. Wahrscheinlicher ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass bei der Festlegung der Auswertefenster (Gates) Probleme auftreten, da die Zählergebnisse sehr stark

streuten und nicht eindeutig einem Cluster zuzuordnen waren (siehe **Abbildung 16** und **Abbildung 17**).

Insgesamt wurde festgestellt, dass die verschiedenen Aufbereitungsverfahren die Auswertung beeinflussen.

So war eine sehr deutliche Abgrenzung der Leukozytensubpopulationen bei CyLyse gegeben. Bei PBS Dest und PBS Fix hingegen waren die Cluster nicht so eng umgrenzt wie bei CyLyse. Aus diesem Grund konnten die Auswertefenster nicht mit einer so hohen Sicherheit festgelegt werden.

Auch die Abgrenzung der CD 4- und CD 8-Zellen zu den Monozyten birgt Probleme in sich. So konnte häufig nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob Monozyten fälschlicherweise mit in das Auswertefenster einbezogen wurden. Bei CyLyse trat dieses Problem weniger häufig auf, weil sich die Subpopulationen in der Darstellung klar abgrenzten.

Als weitere Fehlerquelle sind die so genannten Dimzellen zu betrachten:

Einzelne CD 8-positive Lymphozyten streuen in den Bereich der CD 4-positiven Lymphozyten hinein. Diese Zellen werden als „CD 8-Dim-Zellen“ bezeichnet. Beim Gaten der CD 4-Zellen werden also bei einigen Proben diese Dimzellen, die eigentlich den CD 8-positiven Lymphozyten zuzuordnen sind, mitgezählt. So erklärt sich, dass die CD 4-Zellen meist geringere Zählverluste zeigten, die CD 8-Zellen hingegen zu niedrig bestimmt wurden. Hinzu kommt, dass die Zahl der Dimzellen von Blutprobe zu Blutprobe variiert und somit in unterschiedlichem Ausmaß die Zählergebnisse der CD 4-Zellen beeinflussen.

Diese Aspekte galt es bei der Analyse der **Abbildung 22**, **Abbildung 23** und **Abbildung 24** unter Punkt 3.2.4.1 und der **Abbildung 25**, **Abbildung 26** und **Abbildung 27** unter Punkt 3.2.4.2 zu berücksichtigen.

Weniger gute Korrelationen zwischen volumetrischer und 2-Plattform-Messung ergaben sich für die CD 8-positiven Lymphozyten. Hier addierten sich die oben beschriebenen Effekte. Die bei der Verwendung zweier unterschiedlicher Fluorochrome gemessenen CD 8-Zellzahlen beinhalten die CD 8-Dim-Zellen; diese fehlen bei der Verwendung

eines Fluorochroms für beide Subtypen. Hinzu kommt der Verlust an CD 8-Zellen durch die Verwendung von Lyse (CyLyse und PBS-Fix).

Ein weiterer wichtiger prognostischer Parameter ist das Verhältnis von CD 4- und CD 8-Zellen. Hier wurde der additive Effekt auf die Zellzahlen deutlich (Abbildung 24-26). Alle drei Aufbereitungsverfahren zeigten im Vergleich zur Standardmethode niedrigere Quotienten.

Der gegenläufige Einfluss auf die CD 4- und CD 8-Zahlen von Seiten der Dimzellen und der Lyse führt zu einem zu hohen CD 4-Wert dividiert durch einen relativ zu niedrigen CD 8 Wert, so dass der Quotient deutlich über dem Referenzwert lag.

Um diese zwangsläufigen Fehler beim Gaten auszuschließen, die letzten Endes auf die Einfarbenmethode zurückzuführen sind, wurde die Gesamtzahl der CD 4- und CD 8-Zellen durch einen einzigen Quadranten, also ein großes Auswertefenster, bestimmt und mit der 2 Plattform-Methode (TQ-Prep Workstation) verglichen.

Hierbei wurde nun nur noch der durch Lyse bedingte Zellverlust dargestellt; Fehler beim Gaten entfielen bei diesen Auswertefenstern. Jetzt lagen die in **Abbildung 31** dargestellten Werte bei der Verwendung von CyLyse leicht unter den Referenzwerten.

Die Ergebnisse der Aufbereitungsverfahren ohne Lyse, nämlich PBS Dest (**Abbildung 32**) und PBS Fix (**Abbildung 33**), stimmten mit den Werten der Dual-Plattform-Methode sehr gut überein.

Abschließend dürfen folgende Aspekte nicht unerwähnt bleiben: die vorliegenden Ergebnisse unterliegen den üblichen Pipettierfehlern. Weitere Ungenauigkeiten entstehen durch die Zeit, die zwischen den Messungen im Zentrallabor und unseren Messungen verstreicht und ebenfalls Zellverluste mit sich bringt.

All diese möglichen Ungenauigkeiten spielen jedoch nur eine untergeordnete Rolle für die Frage, wann eine HIV-Therapie einzusetzen hat, da man davon ausgeht, dass es hierfür keine fest definierte CD 4-Zellzahl sondern vielmehr einen fließenden Übergangsbereich gibt. Klinische Aspekte werden für die Therapieentscheidung miteinbezogen. CD 4-Konzentrationen unter 200/ μ l Blut gelten oft als Schwelle für die Therapieentscheidung.

Abschließend betrachtet haben wir in unserer Studie ein neuartiges Durchflußzytometer, das CyFlow[®], untersucht, das zum Therapie-Monitoring bei Krankheiten wie zum Beispiel der HIV-Infektion gerade in unterentwickelten Ländern eingesetzt werden kann und diesen besonderen Anforderungen gerecht wird.

Die hiermit ermittelten Messwerte stimmen gut mit den als Standard festgelegten Werten überein. Im Besonderen gilt es zu berücksichtigen, mit wie viel weniger apparativem, personellem und finanziellem Aufwand diese Ergebnisse ermittelt wurden, so dass ein Einsatz für die oben beschriebene Indikation gerechtfertigt ist.

5 Zusammenfassung

Die durchflußzytometrische Bestimmung von Leukozytensubpopulationen, also auch von CD 4- und CD 8-positiven Lymphozyten, hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Die in unterentwickelten Regionen ständig wachsende AIDS-Infektionsrate ist nur ein Grund, weshalb es dringend notwendig ist, neue technische Lösungen zu finden.

In dieser Studie wurde an 110 Vollblutproben ein neuartiges Gerät, das CyFlow[®], erprobt, das sich nicht nur durch Kompaktheit und einfache Handhabung, sondern auch durch sein Messprinzip auszeichnet, mit dem die CD 4- und CD 8-positiven Lymphozyten bestimmt werden.

Derzeit werden in der Regel zwei Verfahren zur Quantifizierung von Leukozyten- und Lymphozyten-Subpopulationen eingesetzt: die „Dual Platform-Methode“ und die auf beads basierende „Single Platform-Methode“.

Beide Methoden sind aus technischen und finanziellen Gründen in unterentwickelten Regionen nur begrenzt einsetzbar.

Im Gegensatz zu den routinemäßig durchgeführten Verfahren wurden mit dem CyFlow[®] die Zellzahlen volumetrisch und unter Verwendung nur eines monoklonalen Antikörpers bestimmt. Neben der Zeitersparnis bei der Messung und der nahezu wartungsfreien Technik zeichnet sich das CyFlow[®] durch die geringen Kosten für eine Analyse (ca. 0,5 € pro Messung) aus.

Bei der Gegenüberstellung zweier Lasergeräte des CyFlow[®] erwies sich die grüne Laserdiode mit einer Wellenlänge von 532 nm geeigneter als der blaue Laser. In den hier vorliegenden Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass die Dotplot-Darstellungen mit dem blauen Laser durchweg weniger gut auswertbar waren, als diejenigen, die unter Verwendung des 532 nm-Diodenlasers gewonnen wurden.

Beim Vergleich dreier unterschiedlicher Aufbereitungsmethoden (CyLyse, PBS Dest und PBS Fix) nach dem No-wash-Verfahren konnte gezeigt werden, dass PBS Dest Zahlenwerte liefert, die gut mit denen der Referenzmethode korrelieren.

Wurden Lyse-Reagenzien verwendet, wurde die Genauigkeit der Ergebnisse durch lysebedingte Zellverluste und durch das schwierige Abgrenzen der Subpopulationen auf Grund der Einfarben-Methode beeinflusst. Werden CD 4- und CD 8-Zellen gleichzeitig mit nur einem Fluorochrom ermittelt, kann es zu Fehlern von bis zu 15 % kommen:

Einzelne CD 8-positive Lymphozyten streuen in den Bereich der CD 4-positiven Lymphozyten hinein. Diese als „Dimzellen“ bezeichnete Zellpopulation variiert von Probe zu Probe und kann in Einzelfällen sehr hohe Werte annehmen.

Bei Abgrenzen der CD 4-Zellen werden also stets diese Dimzellen, die eigentlich den CD 8-positiven Lymphozyten zuzuordnen sind, mitgezählt. So erklärt sich, dass die CD 4-Zellen meist zu hoch, die CD 8-Zellen hingegen zu niedrig bestimmt werden.

Um diese Fehler auszuschließen wurden die CD 4- und CD 8-Zahlen als Summe erfasst. Nun näherten sich Ergebnisse den Referenzwerten und unterschieden sich nur noch durch die lysebedingten Zellverluste. Der Fehler von 15 % bei der gleichzeitigen Zählung von CD 4- und CD 8-Zellen ist vergleichsweise niedrig, gemessen an den mit anderen Zählmethoden erzielten Ergebnissen.

Die in unserer Studie mit dem CyFlow[®] ermittelten Messwerte stimmten gut mit den als Standard festgelegten Werten überein. Es gilt aber zu berücksichtigen, mit wie viel weniger apparativem, personellem und finanziellem Aufwand diese Ergebnisse ermittelt wurden.

Der Einsatz zur Diagnose und zum Therapie-Monitoring bei Krankheiten wie AIDS ist gerade in unterentwickelten Ländern gerechtfertigt.

Von allen hier getesteten Aufbereitungs-, Markierungs-, Meß- und Auswertemethoden erwies sich die „No lyse-No wash“-Präparation der Blutproben mit nur einem monoklonalen Antikörper für CD 4 oder CD 8 als die überlegene Methode. Sie liefert exakte Zellkonzentrationswerte, die denen der Dual-Platform-Methode entsprechen. Die Bestimmung der Konzentration der CD 4- und CD 8-Zellen in einem Arbeitsschritt führt zu einer leichten Unterbewertung der CD 8- und einer leichten Überbewertung der CD 4-Zellkonzentrationen um maximal 15 %; diese Abweichung dürfte aber für die

Therapieentscheidung unerheblich sein. Exakte Werte erhält man, wenn beide Zelltypen aus zwei getrennt aufbereiteten Proben gezählt werden.

Die beschriebene „No lyse-No wash“ - Blutpräparation benötigt nur 15 Minuten, die konventionelle „Lyse-No wash“ - Methode dagegen etwa eine Stunde pro Analyse.

Bei Verwendung des volumetrischen Zählverfahrens (CyFlow[®]) lassen sich die Kosten pro Messung von bisher 35 € auf weniger als 1 € senken. Wegen der Einfachheit der Blutaufbereitung, der Robustheit des volumetrischen Flowzytometers und der extrem niedrigen Kosten pro Messung, sind die Voraussetzungen für eine breitere Anwendung der CD 4-Zellzahlbestimmung in Entwicklungsländern erfüllt.

6 Literaturverzeichnis

1. Alexander, T. S.

Absolute CD 4 counts obtained by three-color flowcytometric method haematology analyser

Clin Diagn Lab Immunol 5, 266-269 (1998)

2. Anglaret, X., Diagbouga, S., Mortier, E., Meda, N., Vergé-Valette, V., Sylla-Koko, F., Cousens, S., Laruche, G., Ledru, E., Bonard, D., Dabis, F., Van de Perre, P.

CD 4⁺ T-lymphocyte counts in HIV infection: Are European standards applicable to African patients?

J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 14 (4), 361-367 (1997)

3. Barnett, D., Granger, V., Whitby., L., Storie, I., Reilly, J. T.

Absolute CD 4⁺ T-lymphocyte and CD 34⁺ stem cell counts by single-platform flow cytometry: the way forward

Br J Haematol 106 (4), 1059-1062 (1999)

4. Brando, B., Göhde, W. Jr., Scarpati, B., D'Avanzo, G.

The "vanishing counting bead" phenomenon: effect on absolute CD34⁺ cell counting in phosphate-buffered saline-diluted leukapheresis samples

Cytometry 43, 154-160 (2001)

5. Brando, B., Scarpati, B., D'Avanzo, G.

Development of simplified, inexpensive flow cytometry for CD 4⁺ cell counting

www.affordCD4.com

6. Braylan, R.

Flow Cytometry

Arch Pathol Lab Med 107, (1983)

7. Byers, C. D.

Clinical applications of flow cytometry

Clin Lab Sci 6, 174-176 (1993)

- 8. Calvelli, T., Denny, T. N., Paxton, H., Gelman, R., Kagan, J.**
Guideline for flow cytometric immunophenotyping: report from the national institute of allergy and infectious diseases, division of AIDS
Cytometry 14, 702-715 (1993)
- 9. Cassens, U., Greve, B., Tapernon, K., Nave, B., Severin, E., Sibrowski, W.**
A novel true volumetric method for the determination of residual leucocytes in blood components.
Vox Sanguis 82 (4), 198-206 (2002)
- 10. Cassens, U., Gutensohn, K., Garritsen, H., Kelsch, R., Kuehn, P., Sibrowski, W.**
The influence of different erythrocyte lysing procedures on flow cytometric determination of CD34+ cells in umbilical cord blood transplants.
Transfus Med 8, 111-118 (1998)
- 11. Chance, J., Larsen, S. A., Pope, V., Measel, J., Cox, D. L.**
Instrument-dependant fluorochrome sensitivity in flow cytometric analyses
Cytometry 22, 232-242 (1995)
- 12. Connelly, M.C., Knight, M., Giorgi, J. V., Kagan, J., Landry, A. L., Parker, J. W., Page, E., Spino, C., Wilkerling, C., Mercolino, T. J.**
Standardisation of absolute CD 4⁺ lymphocyte counts across laboratories: an evaluation on the Ortho CytoronAbsolute Flow Cytometry System on normal donors
Cytometry 22, 200-210 (1995)
- 13. Coulter[®] EPICS XL[™]**
<<http://www.beckman.com/products/instrument/flowcytometry/epicsxl.asp>>
- 14. Coulter[®] TQ-Prep[™] Workstation**
<<http://www.beckman.com/products/instrument/flowcytometry/tqprep.asp>>
- 15. Diagbouga, S., Durand, G., Sanou, P. T., Dahourou, H., Ledru, E.**
Evaluation of a quantitative determination of CD 4 and CD 8 molecules as an

alternative to CD 4+ and CD 8⁺ T lymphocyte counts in Africans.
Trop Med Int Health 4, 79-84 (1999)

16. Dietz, L. J., Dubrow, R. S., Manian, B. S., Sizto, N. L.

Volumetric capillary cytometry: a new method for absolute cell enumeration
Cytometry 23, 177-186 (1996)

17. Dittrich, W., Göhde, W.

Impuls fluorometry of single cells in suspension.
Z Naturforsch B 24, 360-361 (1969)

18. Dwyer, D. E., Adelstein, S. Cunningham, A. L., Merigan T.C.

Managing HIV. Part 4: Primary therapy. 4.3 The laboratory in managing HIV
infection
Med J Aust 164, 301-303 (1996)

19. FACS Calibur

<http://www.bdbiosciences.com/product_spotlights/instruments_and_data_management/FACSCalibur_system>

20. Faucy, A. S., Maucher, A. M., Longo, D. L.

Acquired immunodeficiency syndrome : Epidemiologic, clinical, immunologic and
therapeutic considerations
Ann intern Med 100, 92-106 (1984)

**21. Fink, P. C., Bokelmann, G., Haeckel, R., Burrichter, H., Kaenler, H.,
Trendelenburg, C. H., Hulstaert, F.**

Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes using the FACScan/
SimulSet™ flow cytometer system
Klin Lab 39, 16-24 (1993)

22. Foon, K. A., Todd, R. F.

Immunologic classification of leukaemia and lymphoma
Blood 68, 1-31 (1986)

- 23. Fuchs, M., Stadler, B. M., Malinverni, R., de Weck, A. I., Pichler, W. J.**
Zusammenhang zwischen T-Subpopulationen und Klinik von HIV-assozierten Krankheiten
Schweiz Med Wschr 121, 57-66 (1991)
- 24. Gallo, R. C., Wong-Staal, F.**
A human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) as the cause of the acquired immunodeficiency syndrome
Ann Intern Med 103 (5), 679-689 (1985)
- 25. Giorgi, J. V.**
Characterisation of T lymphocyte subset alterations by flow cytometry in HIV disease
Ann N Y Acad Sci 677, 126-137 (1993)
- 26. Glencross, D., Scott, J., Jani, W., Barnett, D., Janossy, G.**
CD 45 assisted leucogating for accurate affordable dual platform CD 4- T cell enumeration. Submitted for publication.
- 27. Glencross, D., Scott, L., Aggett, H., Sondag, C. S.**
Microvolume fluorimetry for the determination of absolute CD 4 and CD 8 lymphocyte counts in patients with HIV: a comparative evaluation
Clin Lab Haem 21, 391-395 (1999)
- 28. Gratama, J. W., D'hautcourt, J., Mandy, F., Rothe, G., Bernett, D., Janossy, G., Papa, Stefano, Schmitz, G., Lenkei, R.**
Flow cytometric quantization of immunofluorescence intensity: problems and perspectives
Cytometry 33, 166-178 (1998)
- 29. Greve, B., Beller, C., Cassens, U., Sibrowski, W., Severin, E., Göhde, W.**
High grade loss of leukocytes and hematopoietic progenitor cells caused by erythrocyte lysing procedures for flow cytometric analysis
Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research (accepted for publication)

- 30. Grossman, Z., Herberman, R. B., Vatnik, N., Intrator, N.**
Conservation of total T-cell counts during HIV infection. Alternative hypotheses and implications
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 17, 450-457 (1998)
- 31. Helbert, M., Breuer, J.**
Monitoring patients with HIV disease
J Clin Pathol 53, 266-272 (2000)
- 32. HIV Structure Pictures**
AVERT 6.Jul 2001 <<http://www.avert.org>>
- 33. Janossy, G., Jani, I., Barnett, D., Mhalu, F., Biberfeld, G.**
Inexpensive CD 4⁺ T-lymphocyte counting by flow cytometry- relevance to developing countries
XIII International AIDS conference July 2000, Durban, South Africa
- 34. Janossy, G., Jani, I., Göhde, W.**
Affordable CD 4⁺ T-cell counts on "single-platform" flow cytometers I. Primary CD 4 gating
Br J Haematol 111, 1198-1208 (2000)
- 35. Janssen, W. C. M., Hoffmann, J. J.M. L.**
Three-colour, one-tube cytometric method for enumeration of CD 4⁺ and CD 8⁺ lymphocytes
Ann Clin Biochem 36, 196-201 (1999)
- 36. Johnson, D., Hirschorn, D., Busch, M. P.**
Evaluation of four alternative methodologies for determination of absolute CD 4⁺ lymphocyte counts. The National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 10, 522-530 (1995)

- 37. Johnson, K. L.**
Basics of flow cytometry
Clin Lab Sci 5, 22-24 (1992)
- 38. Koepke, J. A., Landay, A. L.**
Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts
Clin Immunol Immunopathol 52, 19-27 (1989)
- 39. Kutok, J. L., Roma, A. O., Lemire, S. J., Dorfman, D., M.**
Four-color flow cytometric immunophenotypic determination of peripheral blood CD 4⁺ T-lymphocyte counts. A comparison of validity and cost-effectiveness with a two-color method
Am J Clin Pathol 110, 465-470 (1998)
- 40. Lambin P., Desjobert, H., Debbia M.**
Serum Neopterin and beta-2-microglobulin in anti-HIV positive blood donors
Lancet 1986/II: 1216
- 41. Landay, A., Ho, J. L., Hom, D., Russell, T., Zwerner, R., Gardy Minuty, J., Kataaha, P., Mmiro, F., Jackson, B.**
A rapid manual method for CD 4⁺ T-cell quantification for use in developing countries
AIDS 7, 1565-1568 (1993)
- 42. Landay, A., Ohlsson-Wilhelm, B., Giorgi, J. V.**
Application of flow cytometry to the study of HIV infection
AIDS 4, 479-497 (1990)
- 43. Laurence, J.**
T-cell subsets in health, infectious disease, and idiopathic CD 4⁺ T lymphocytopenia
Ann Intern Med 119, 55-62 (1993)
- 44. Levy, J. A., Shimabukuro, J., McHugh, T., Casavant, C., Stites, D., Oshiro, L.**
AIDS-associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides

human T helper cells
Virology 147 (2), 441-448 (1985)

45. Lillevang, S. T., Sprogøe-Jakobsen, U., Simonsen, B., Kristensen, T.

Three colour flow cytometric immunophenotyping in HIV-patients; comparison to dual colour protocols
Scand J Immunol 41, 114-120 (1995)

46. Lisse, I. M., Böttiger, B., Christensen, L. B., Knudsen, K., Aaby, P., Gottschau, A., Erassa, W., Mhalu, F., Biberfeld, G., Brattegaard, K., Diallo, K., N'Gom, P. T., Whittle, H.

Evaluation of T cell subsets by an immunocytochemical method compared to flow cytometry in four countries
Scand J Immunol 45, 637-644 (1997)

47. Loken, M. R., Brosnan, J. M., Bach, B. A., Ault, K. A.

Establishing optimal lymphocyte gates for immunophenotyping by flow cytometry
Cytometry 11, 453-459 (1990)

48. Lopez, A., Ciudad, J., Coertero, M., Orfao, A.

CD 4 enumeration in HIV infected individuals
Eur J Histochem 38, 35-40 (1994)

49. Ludwig, W. D., Teichmann, J. V., Thiel, E.

Immunzytologie. In: Boll I, Heller S (Hrsg.) Praktische Blutzell Diagnostik. INSTAND Schriftenreihe Band 7. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, S212-245 (1991)

50. Mandy, F. F., Bergeron, M., Minkus, T.

Evolution of leukocyte immunophenotyping as influenced by the HIV/AIDS pandemic: a short history of the development of gating strategies for CD 4⁺ T-cell enumeration
Cytometry 30, 157-165 (1997)

- 51. Margolic, J. B., Donnenberg, A. D., Muñoz, A., Park, L. P., Bauer, K. D., Giorgi, J. V., Ferbas, J., Saah, A. J.**
Changes in T- and non-T-lymphocyte subsets following seroconversion to HIV-1: stable CD3⁺ and declining CD3⁺-populations suggest regulatory responses linked to loss of CD 4 lymphocytes
J Acquir Immune Defic Syndr (1993)
- 52. McCoy, J. P., Blumstein, L., Donaldson, M. H., Baxter, J. D., Byrne, B. C., Gekowski, K. M.**
Accuracy and cost-effectiveness of a one-tube, three-color method for obtaining absolute CD 4 counts and CD 4: CD 8 ratios
Am J Clin Pathol 101 (3), 279-282 (1994)
- 53. Mercolino, T.J., Connelly, M. C., Meyer, E. J., Knight, M.D., Parker, J. W., Stelzer, G., DeChirico, G.**
Immunologic differentiation of absolute lymphocyte count with an integrated flow cytometric system: a new concept for absolute T-cell subset determinations
Cytometry 22, 48-59 (1995)
- 54. Montagnier, L., Chermann, J. C., Barre-Sinoussi, F., Klatzmann, D., Wain-Hobson, S., Alizon, M., Clavel, F., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C.**
Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS.
Princess Takamatsu Symp. 15, 319-331 (1984)
- 55. Müller, C., Kukel, S., Bauer, A.**
Antibodies against CD 4⁺ lymphocytes in plasma of HIV-infected patients are related to CD 4 cell depletion in vivo
Immunol Lett 41 (2-3), 163-167 (1994)
- 56. Neves, I, Morgado, M.**
Immunological evaluation of human immunodeficiency virus infected individuals by flow cytometry
Mem Inst Oswaldo Cruz 95, 393-400 (2000)

57. Nicholson, J. K. A.

Immunophenotyping specimens from HIV-infected persons: laboratory guidelines from the Centers of Disease Control and Prevention
Cytometry 18, 55-59 (1994)

58. Nicholson, J. K. A., Jones, B. M., Hubbard, M.

CD 4 T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three color assay
Cytometry 14, 685-689 (1993)

59. Nicholson, J. K., Velleca, W. M., Jubert, S., Green, T. A., Bryan, L.

Evaluation of alternative CD 4 technologies for the enumeration of CD 4 lymphocytes
J Immunol Methods 177, 43-54 (1994)

60. Nicholson, J., Kidd, P., Mandy, F. F., Livnat, D., Kagan, J.

Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunphenotyping
Cytometry 26, 227-230 (1996)

61. O’Gorman, M. R., Gelman, R.

Inter- and intrainstitutional evaluation of automated volumetric capillary quantitation of CD 4- and CD 8-positive T lymphocytes in the peripheral blood of persons infected with the human immunodeficiency virus
Clin Diagn Lab Immunol 4, 173-179 (1997)

62. O’Gorman, M. R., Nicholson, J. K.

Adoption of single-platform technologies for enumeration of absolute T-lymphocyte subsets in peripheral blood
Clin Diagn Lab Immunol 7, 333-335 (2000)

63. Partec PAS. Your flow cytometer

Partec GmbH, Münster, Germany

64. Picker, J., Maino, V. C.

The CD 4⁺ T cell response to HIV-1
Curr Opin Immunol 12 (4), 381-386 (2000)

65. Prince, H. E., Kleinman, S., Czaplicki, C., John, J., Williams, A. E.

Interrelationship between serologic markers of immune activation and
T-lymphocyte subsets in HIV infection
J Acquir Immune Defic Syndr 3, 525-530 (1990)

**66. Reimann, K. A., O’Gorman, M. R., Spitzler J., Wilkening, C. L., Sabath, D. E.,
Helm, K., Campbell, D. E.**

Multisite comparison of CD 4 and CD 8 T-lymphocytes counting by single- versus
multiple-platform methodologies: evaluation of Beckman Coulter Flow-Count
Fluorosperes and the tetraONE System
Clin Diagn Lab Immunol 7, 344-351 (2000)

67. Roche-Lexikon Medizin

Boss, N. (Bearb.), Hoffmann-La Roche AG und Urban & Schwarzenberg,
2. neubearb. Aufl., München, Wien, Baltimore (1987)

**68. Roederer, M., De Rosa, S., Gerstein, R., Anderson, M., Bigos, M., Stovel, R.,
Nozaki, T., Parks, D., Herzenberg, L., Herzenberg, L.**

8 color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity
Cytometry 29, 328-339 (1997)

69. Schnitzlein-Bick, C. T., Spitzler J., Wilkening, C. L., Storie, I., Reilly, J. T.

Evaluation of TruCount absolute-count tubes for determining CD 4 and CD 8 cell
numbers in human immunodeficiency virus-positive adults
Clin Diagn Lab Immunol 7, 336-343 (2000)

70. Seligmann, M., Pinching, A. J., Rosen, F. S.

Immunology of human immunodeficiency virus infection and the acquired
immunodeficiency syndrome
Ann intern Med 107, 234-242 (1987)

- 71. Sherman, G., G., Galpin, J. S. , Patel, J. M., Mendelow, B:, V., Glencross, D. K.**
CD 4⁺ T cell enumeration in HIV infection with limited resources
J Immunol Methods 222, 209-217 (1999)
- 72. Storek, J., Dawson, M. A., Maloney, D. G.**
Comparison of two flow cytometric methods enumerating CD 4 T cells and CD 8 T cells
Cytometry 33, 76-82 (1998)
- 73. van der Ryst, E., Kotze, M., Joubert, G., Steyn, M., Pieters, H., van der Westhuizen, M., van Stadem, M., Venter, C.**
Correlation among total lymphocyte count, absolute CD 4⁺ lymphocyte count, and CD 4⁺ percentage in a group of HIV-1-infected South African patients
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 19, 238-244 (1998)
- 74. Van Petegem, M., Cartuyvels, R., De Schouwer, P., Van Duppen, Goossens, W., Van Howe, L.**
Comparative evaluation of three flow cytometers for reticulocyte enumeration
Clin lab Haemat 15, 103-111 (1993)
- 75. Vanhems, P., Allard, R., Toma, E., Cyr, L., Beaulieu, R.**
Prognostic value of the CD 4+ T cell count for HIV-1 infected patients with advanced immunosuppression
Int J STD AIDS 7, 495-501 (1996)
- 76. Villas, B. H.**
Flow cytometry. An overview.
Cell Vis 5, 56-61 (1998)
- 77. Weaver, J. L.**
Introduction to flow cytometry
Methods 21, 199-201 (2000)

- 78. Zolla-Pazner, S., Des Jarlais, D., C., Friedman, S. R., Spira, T. J., Marmor, M., Holzman, R., Mildvan, D., Yancovitz, S., Mathur-Wagh, U., Garber, J., El-Sadr, W., Cohen, H., Smith, D., Kalyanaraman, V. S., Kaplan, J. E., Fishbein, D. B.**
Non random development of immunologic abnormalities after infection with human immunodeficiency virus: implications for immunologic classification of the disease
Proc Natl Acad Sci USA 84, 5404-5408 (1987)

7 Lebenslauf

Name	Claus Westerberg
Geburtsdatum	19. Juli 1976
Geburtsort	Bochum
Eltern	Klaus Wilhelm Hermann Westerberg, Diplom-Ökonom Veronika Maria Westerberg (geb. Dahmen)
Geschwister	Claudia Schulte (geb. Westerberg), Erzieherin
Familienstand	ledig

Schulbildung

1983 bis 1987	Herbeder Grundschule (Witten-Herbede)
1987 bis 1994	Ruhr-Gymnasium Witten
1994 bis 1996	Albert-Einstein-Gymnasium (Bochum)
13.06.1996	Abitur

Praktikum

August 1996 bis März 1997	Creativ-Zahntechnik (Bochum)
--------------------------------------	------------------------------

Studium

1997 bis 2002	Studium der Zahnmedizin an der Universität Münster
13.08.1998	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
28.09.1999	Zahnärztliche Vorprüfung
25.06.2002	Zahnärztliches Staatsexamen
08.07.2002	Approbation
01.10.2002	Studium der Humanmedizin an der Universität Münster

Beruflicher Werdegang

01.09.2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Poliklinik für Zahnerhaltung (Direktor: Prof. Dr. K. Ott)
-------------------	--

8 Danksagung

Herrn Professor Dr. W. Göhde danke ich, dass ich an diesem großartigen Projekt teilhaben durfte.

Ich bedanke mich bei Dr. Burkhard Greve für die sehr gute Betreuung und Hilfestellung bei allen aufgetretenen Problemen.

Auch der Landwirtschaftlich-Technischen Assistentin Petra Berkes und der Biologisch-Technischen Assistentin Gerlind Bellmann gilt mein ausdrücklicher Dank.

Ein großer Dank geht auch an Sonia Bortolussi, die mich mit dem Institut für Strahlenbiologie vertraut gemacht hat.

Ein weiteres Dankeschön gilt meiner Freundin, Dr. Bianca Bortolussi, für die tatkräftige Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit.

9 Anhang

9.1 Abbildungs-Verzeichnis

<i>Abbildung 1: Struktur des Humanen Immundefizienz Virus [32]</i>	11
<i>Abbildung 2: Messprinzip des verwendeten Durchflußzytometers</i>	19
<i>Abbildung 3: TQ-Prep Coulter Workstation® der Firma Beckman Coulter [74]</i>	26
<i>Abbildung 4: EPICS XL® der Firma Firma Beckman Coulter [74]</i>	27
<i>Abbildung 5: FACS Calibur® der Firma Becton Dickinson [19]</i>	28
<i>Abbildung 6: CyFlow® der Firma Partec</i>	29
<i>Abbildung 7: Beispiel für ein 1-Parameter-Histogramm</i>	30
<i>Abbildung 8: Beispiel für ein korreliertes 2-Paramete-Dotplot nach dem Gating</i>	31
<i>Abbildung 9: Beispiel für ein korreliertes 2-Parameter-Dotplot nach dem Gating</i>	35
<i>Abbildung 10: Dotplot bei Verwendung von BIO-D-Antikörpern</i>	40
<i>Abbildung 11: Dotplot bei Verwendung von BD-Antikörpern</i>	41
<i>Abbildung 12: Dotplot einer mit DAKO® Uti-Lyse™ behandelten Blutprobe</i>	42
<i>Abbildung 13: Dotplot bei Verwendung von FACS Lysing Solution</i>	43
<i>Abbildung 14: Dotplot bei Verwendung von Ortho-Lyse</i>	43
<i>Abbildung 15: Dotplot bei Verwendung von CyLyse</i>	44
<i>Abbildung 16: Dotplot der mit CD 4- und CD 8-Antikörpern versetzten Blutprobe</i>	45
<i>Abbildung 17: Dotplot der mit CD 4- Antikörpern (A, links) und CD 8-Antikörpern (B, rechts) einzeln angefärbten Probe</i>	46
<i>Abbildung 18: Lineare Regression der Leukozytenzahlen bestimmt am SYSMEX und durchflußzytometrisch mithilfe der Kernfärbung</i>	47
<i>Abbildung 19: Absolute CD 4-Zahlen bei der Verwendung von CyLyse</i>	48
<i>Abbildung 20: Reproduzierbarkeit der absoluten CD 4-Werte bei Verwendung unterschiedlicher Lysen</i>	49
<i>Abbildung 21: Doplotdarstellung bei Verwendung des blauen (links) und des grünen Lasers (rechts)</i>	50
<i>Abbildung 22: CD 4-Werte bei Verwendung von PBS-Dest</i>	51
<i>Abbildung 23: CD 4-Werte bei Verwendung von PBS-Fix</i>	51
<i>Abbildung 24: CD 4-Werte bei Verwendung von CyLyse</i>	52

<i>Abbildung 25: CD 8-Werte bei Verwendung von PBS-Dest.....</i>	53
<i>Abbildung 26: CD 8-Werte bei Verwendung von PBS-Fix.....</i>	54
<i>Abbildung 27: CD 8-Werte bei Verwendung von CyLyse</i>	54
<i>Abbildung 28: CD 4- und CD 8-Ratio bei Verwendung von PBS-Dest.....</i>	55
<i>Abbildung 29: CD 4- und CD 8-Ratio bei Verwendung von PBS-Fix.....</i>	56
<i>Abbildung 30: CD 4- und CD 8-Ratio bei Verwendung von CyLyse</i>	56
<i>Abbildung 31: Quadrantenbestimmung von CD 4 und CD 8 mit CyLyse</i>	57
<i>Abbildung 32: Quadrantenbestimmung von CD 4 und CD 8 mit PBS Dest.....</i>	58
<i>Abbildung 33: Quadrantenbestimmung von CD 4 und CD 8 mit PBS Fix.....</i>	58
<i>Abbildung 34: CD 4-Werte bei Verwendung von No Lyse mit nur einem monoklonalen Antikörper.....</i>	59
<i>Abbildung 35: Durchschnittliche CD 4- und CD 8-Werte bei Verwendung unterschiedlicher Aufbereitungsverfahren</i>	60

9.2 Tabellen-Verzeichnis

<i>Tabelle 1: Normalwerte des weißen Differentialblutbildes in Prozent.....</i>	5
<i>Tabelle 2: Stadien der CD 4-Zell-Werte während der HIV-Erkrankung [25]</i>	13
<i>Tabelle 3: Verschiedene Single-Platform-Methoden</i>	21