

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

**Durchflusszytometrische Zählungen von CD3-, CD4- und CD8-positiven Lympho-
zyten nach einer Aufbereitung ohne Erythrozytenlyse -
Vergleich der Ergebnisse eines mobilen und Standard-Labors**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
Lulic, Nicola
aus Dortmund
2006

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

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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 11. September 2006

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. Dr. med. W. Sibrowski

Zusammenfassung

Lulic, Nicola

Durchflusszytometrische Zählungen von CD3-, CD4- und CD8-positiven Lymphozyten nach einer Aufbereitung ohne Erythrozytenlyse - Vergleich der Ergebnisse eines mobilen und Standard-Labors

Die volumetrische Bestimmung von Leukozytensubpopulationen nach den no-lyse, no-wash Verfahren hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Im Vergleich zu den etablierten Standardverfahren geht diese Methode mit geringeren Zellverlusten einher, ist einfacher durchzuführen, zeitsparender und kostengünstig.

In Anbetracht des bedrohlichen HIV-Problems mit der ungebremsten Zunahme an Neuinfektionen besonders in den Entwicklungsländern muss eine Möglichkeit zur Therapieüberwachung gesucht werden, die wirtschaftlich und besonders in infrastrukturell weniger gut entwickelten Regionen flächendeckend durchführbar ist.

In dieser Arbeit wurden die Leukozytensubpopulationen CD3, CD4 und CD8 an 101 Vollblutproben mit einem transportablen Durchflusszytometer (CyFlowCounter®) volumetrisch bestimmt.

Zunächst wurde ein Verfahrensprotokoll entwickelt, das neben CD4- auch CD3- und CD8- Lymphozyten ohne Erythrozytenlyse misst. In einem zweiten Schritt wurde ein mobiles Labor einem standardisierten Labor zur Quantifizierung dieser Lymphozytensubpopulationen gegenübergestellt.

Die Untersuchungen zeigten für alle untersuchten Subpopulationen eine sehr gute Korrelation der Messergebnisse mit zufallsbedingten Ungenauigkeiten unter beiden Laboranordnungen.

Die Kombination eines mobilen Labors und die Methode der CD3-, CD4-, CD8- Zellzählung mit dem CyFlowCounter® stellen eine Möglichkeit dar, unter den apparativen, personellen, finanziellen und infrastrukturellen Bedingungen in Entwicklungsländern eine flächendeckende und medizinisch verantwortliche HIV-Therapie zu verwirklichen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	HIV-relevante, zelluläre Komponenten des Immunsystems	2
1.1.1	Leukozyten	2
1.1.2	Lymphozyten	3
1.1.3	B –Lymphozyten	3
1.1.4	T-Lymphozyten	4
1.2	HIV-Infektion	5
1.2.1	Überwachung HIV-infizierter Patienten.....	5
1.3	Verschiedene Methoden zur Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen in Entwicklungsländern	8
1.3.1	Durchflusszytometrische Techniken	8
1.3.2	Alternative Techniken, die nicht auf Durchflusszytometrie beruhen.	9
1.3.3	Bedeutung der CD3-, CD4-, CD8-Zellbestimmung.....	10
1.3.4	Mobile Konzepte	11
1.4	Zielsetzung und Fragestellung.....	13
2	Material und Methode	14
2.1	Auswahl der Blutproben.....	14
2.2	Durchflusszytometrie	14
2.2.1	Lichtquelle	16
2.2.2	Fluoreszenz.....	16
2.2.3	Streulicht.....	17
2.2.4	Flüssigkeitssystem.....	18
2.2.5	Optisches System.....	19
2.2.6	Signalverarbeitung.....	19
2.2.7	CyFlow Counter®	19
2.2.8	CyLab®	21
2.2.9	Antikörper.....	22
2.2.10	Aufbereitung der Blutproben.....	22
2.2.11	Auswertung.....	24
2.2.12	Darstellung in Einparameter-Histogrammen.....	25

2.3	Reproduzierbarkeit	25
2.3.1	Versuche zur Beurteilung des Pipettierfehlers	25
2.4	Statistische Methoden.....	26
2.4.1	Regressionsgerade und Korrelationskoeffizient.....	26
2.4.2	t-Test.....	26
2.4.3	Bland-Altman-Darstellung	27
2.4.4	Gaußverteilung	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Vorversuche zur Optimierung der Probenaufbereitung.....	28
3.1.1	Experiment zur Beurteilung des Pipettierfehlers und der Reproduzierbarkeit eines Messergebnisses	28
3.1.2	Bestimmung der Messgenauigkeit über eine Verdünnungsreihe aus Vollblut in gefiltertem Erythrozytenkonzentrat	30
3.1.3	Bestimmung des Messfehlers	31
3.2	Ergebnisse der Hauptversuche	33
3.2.1	Messung der CD3-positiven T-Lymphozyten	33
3.2.2	Messung der CD4-positiven T-Lymphozyten	37
3.2.3	Messung der CD8-positiven T-Lymphozyten	42
4	Diskussion	46
5	Zusammenfassung	56
6	Literaturverzeichnis	57
7	Lebenslauf	67
8	Danksagung	68
9	Anhang	I
9.1	Abbildungs-Verzeichnis	I
9.2	Tabellen-Verzeichnis.....	II
9.3	Abkürzungs-Verzeichnis	II

1 Einleitung

Weltweit sind derzeit mehr als 39,4 Mio. Menschen mit dem HI-Virus infiziert. Somit ist die Zahl seit dem Jahr 2002 (36,6 Mio.) um 2,8 Mio. gestiegen (AEUD, 2004).

Der größte Zuwachs der Neuinfektionen ist in Ostasien, Osteuropa und Zentralasien zu verzeichnen. In den subsaharischen Ländern Afrikas ist eine Stabilisation der Epidemie eingetreten. Die Prävalenz stagniert mit einem Wert von 7,4% im Jahr 2004 im Vergleich zu 7,5% im Jahr 2002 (Das, 2005). Obwohl sich die Zahl der Neuinfektionen und Todesfälle die Waage halten, gehört Afrika dennoch zu den auf der Welt am schlimmsten betroffenen Gebieten. Dies wird vor allem deutlich, wenn man sich vor Augen hält, dass die Prävalenz von HIV weltweit 1,1% beträgt und dass Afrika mit 1/3 aller HIV-Toten weltweit den Spitzenplatz einnimmt.

Einen besonders dramatischen Verlauf hat in den letzten fünf Jahren die HIV-Verbreitung in der Gruppe der Frauen und jungen Mädchen genommen. Dies ist nach einer UNICEF-Studie darin begründet, dass 50% der jungen Frauen in Ländern mit hoher HIV-Prävalenz die wesentlichen Fakten über AIDS sowie über die Infektionswege nicht kennen.

Es kann anhand dieser Fakten auch nicht verwundern, dass in einigen Regionen Afrikas, zum Beispiel im subsaharischen Raum, wo die HIV-Infektion unter den schwangeren Frauen mehr als 20% ausmacht, auch Kinder betroffen sind. Ohne medizinische Intervention ist davon auszugehen, dass sich bei einem Viertel der Kinder, die von HIV-infizierten Frauen geboren werden, in ihrem ersten Lebensjahr eine HIV-Infektion manifestieren wird (Zijenah et al., 2005).

Im Kampf gegen AIDS haben weltweite Stiftungen die finanziellen Mittel von US \$ 2,1 Mrd. im Jahr 2001 auf US \$ 6,1 Mrd. aufgestockt. Die Aufklärungsarbeit gegen AIDS hat sich verdreifacht, die Zahl der Patienten, die sich testen lassen, hat sich verdoppelt, die Zahl derer, die eine antiretrovirale Therapie erhalten, ist um 56% gestiegen. Trotz zahlreicher Verbesserungen im Umgang mit HIV/AIDS wird die von der Erkrankung ausgehende globale Bedrohung weiterhin unterschätzt.

Nach derzeitigen Schätzungen stellen 73 Länder mit niedrigem und mittlerem Einkommen 90% aller HIV-Infizierten (ca. 35,5 Mio.), von denen im Juni 2004 lediglich 440.000 eine antiretrovirale Therapie (ART) erhalten. Derzeit benötigen 6 Mio. Men-

schen dringend ART. Es bleibt also neun von zehn Patienten die lebensnotwendige Therapie verwehrt. Basierend auf diesen Zahlen ist mit 5- 6 Mio. weiteren HIV-Opfern in den nächsten zwei Jahren zu rechnen.

Ausgelöst wird diese Pandemie durch ein Virus, das sich in bestimmten Zellen des peripheren Blutes vermehrt. Diese Zellpopulation ist entscheidend an der Immunabwehr des Körpers beteiligt, Zellverluste durch die Virusinfektion haben daher fatale Folgen.

Die Weltgesundheitsorganisation hat angesichts dieser Zahlen eine Initiative mit dem Namen „3 by 5“ gestartet, die zum Ziel hat, am Ende des Jahres 2005 drei Mio. Menschen in 50 Entwicklungsländern zu behandeln (<http://www.who.int/3by5/publications/documents/en/whoprogressreportfinal.pdf>, 2004). Um dieses Ziel zu erreichen, müssen Arzneimitteln und Diagnoseverfahren bereitgestellt sowie einheitliche und standardisierte Richtlinien für die Durchführung von ART gefunden werden. Die Forschung sollte also verstärkt und Erfolg versprechende Strategien sollten schnell weiter entwickelt und angewendet werden. Durch massive Aufklärungskampagnen, besonders für Frauen, sollten diese Maßnahmen Unterstützung erfahren (Alfsen, 2004).

Eine weitere große Herausforderung bei der Verwirklichung des von der WHO angestrebten Zieles besteht in den demographischen Gegebenheiten der Entwicklungsländer, wo die dezentralisierte Besiedlung riesiger Areale eine Krankheitsbekämpfung erschwert.

1.1 HIV-relevante, zelluläre Komponenten des Immunsystems

1.1.1 Leukozyten

Leukozyten (weiße Blutzellen) sind an der zellulären und humoralen Abwehr des Körpers gegen Fremdstoffe beteiligt und bilden die Gesamtheit der kernhaltigen Zellen, zu denen auch die für die HIV-Infektion relevanten Zellen gehören.

Die Zahl der Leukozyten im Blut eines gesunden Erwachsenen beträgt 4.000 –11.000 Zellen pro Mikroliter.

1.1.2 Lymphozyten

Für die Funktion der körpereigenen Abwehr sind die B- und T-Lymphozyten von großer Bedeutung. Die Abnahme einer bestimmten Untergruppe der T-Lymphozyten im Rahmen einer HIV-Infektion ist besonders fatal für das Immunsystem. Mit immunchemischen Verfahren lassen sich die immunkompetenten Zellen nach Differenzierungsstadien und Aktivierungszuständen unterscheiden. Dadurch wird die Quantifizierung einzelner zellulärer Subpopulationen- auch der Zielzellen der HI-Viren im Blut möglich.

Allerdings ist diese Methode sehr aufwendig, daher beschreiben einige Autoren die Zählung der Gesamtlymphozyten (TLC = Total Lymphocyte Count) als prädiktiven Test für das HIV-Monitoring (Florence et al., 2004). Zwar kann sich die Zahl der Lymphozyten während einer HIV-Infektion ändern, doch lässt sich dieser Wert nicht immer hinreichend für das Monitoring der Krankheit verwerten. Eine bessere Aussagekraft für den Krankheitsverlauf bietet die Zählung der Subgruppen der Lymphozyten, die nach ihren antigenen Eigenschaften und nach der Detektierbarkeit mit monoklonalen Antikörpern in so genannte CD-Klassen (Cluster of Differentiation) eingeteilt werden. Für die Therapie begleitenden Untersuchungen haben sich bestimmte Lymphozyten, die CD4-T-Zellen und die CD8-T-Zellen als besonders wichtig herausgestellt.

CD-Antigen	Zelltyp
CD3	T-Lymphozyt
CD4	T-Helfer-Zelle
CD8	Zytotoxische T-Zelle
CD19	B-Lymphozyt

Tabelle 1: Diagnostisch wichtige CD-Antigene

1.1.3 B-Lymphozyten

Die B-Lymphozyten sind für die humorale Immunität verantwortlich und sind vor allem für die Abwehr bakterieller und viraler Infekte verantwortlich. Für die therapiebegleitende Untersuchung der HIV-Infektion gehen auch sie in die Gesamtzahl der Lympho-

zyten ein, die für die Berechnung des prozentualen CD4-Wertes wichtig ist. Sie besitzen nur eine indirekte Funktion im Monitoring der HIV-Patienten.

1.1.4 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten können Antigene nicht in nativer Form erkennen. Sie benötigen zur Aktivierung Antigen präsentierende Zellen, die ihnen die Antigene in prozessierter Form (Peptidfragmente) über HLA- oder MHC- Moleküle darstellen. Im Blut überwiegt ihr Anteil den der B-Lymphozyten bei weitem. T-Lymphozyten verfügen über den T-Zell-Rezeptor (TZR), der stets mit CD3 assoziiert ist. Somit sind alle reifen T-Lymphozyten CD3-positiv. Der TZR zusammen mit dem Membranmolekül CD3 werden auch als CD3-Komplex bezeichnet. Die T-Lymphozyten lassen sich funktionell in T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen unterscheiden.

Die T-Helfer-Zellen sind CD4-positiv und erkennen HLA-Moleküle der Klasse II mit daran gebundenen Oligopeptiden. Das CD4-Molekül ist ein Glykoprotein, das sich auf der Zelloberfläche befindet und sowohl die Bindung zwischen TZR und HLA-Molekül zu verstärken als auch die Signalweiterleitung im Inneren der T-Helferzelle zu unterstützen vermag. Die so aktivierte T-Helferzelle produziert und sezerniert Zytokine. Der CD4-Rezeptor ist die Bindungsstelle für das HI-Virus.

Die zytotoxischen T-Zellen tragen auf ihrer Plasmamembran das CD8-Molekül, das die Bindung des Antigenrezeptors an HLA-Moleküle der Klasse I verstärkt. Der TZR der zytotoxischen T-Zellen erkennt Fremdpeptide nur, wenn sie von Zielzellen durch ein HLA-Molekül der Klasse I präsentiert werden. Zytotoxische T-Zellen können durch die Freisetzung Poren bildender Proteine, der Perforine oder Granzyme, die Zellmembranen virusinfizierter Körperzellen zerstören oder deren Apoptose einleiten. Die Zahl der zytotoxischen T-Zellen nimmt im Verlauf der HIV-Infektion zu. Die Messung der Zunahme gilt aber allgemein nicht als zuverlässiger Parameter zur Beschreibung des Krankheitsverlaufes von HIV-Infizierten.

Weitere Untergruppen der Lymphozyten wie die T-Suppressorzellen und die T-Gedächtniszellen spielen für das HIV-Monitoring nur im Zusammenhang mit der Gesamtlymphozytenzahl eine Rolle.

1.2 HIV-Infektion

Um in eine Zelle eindringen und sich in ihr vermehren zu können, benötigt das HI-Virus Zellen, die den CD4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen (Klatzmann et al., 1984). Das sind vor allem die T4-Helferzellen, sowie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen.

Im Zuge der HIV-Infektion kommt es zu einem langsamen, aber stetig fortschreitenden Untergang der CD4-positiven T-Lymphozyten, wohingegen bei den CD8-positiven T-Lymphozyten, besonders in den ersten 18 Monaten nach der Infektion, ein Anstieg zu verzeichnen ist (Margolick et al., 1993). Danach bleibt die Zahl der CD8-positiven Lymphozyten annähernd konstant und liegt bei einem symptomlosen Erwachsenen im Mittel bei 1000/mm³. Folglich bleibt die Zahl aller reifen T-Lymphozyten (CD3-positiv) nahezu konstant (Giorgi, 1993; Spira et al., 1989).

Diese gegensätzliche Entwicklung der T-Lymphozytensubpopulationen wird besonders deutlich, wenn man den Quotienten aus CD4/CD8 bildet, der im Verlauf der HIV-Infektion drastisch abnimmt.

Mit der klinischen Ausprägung von AIDS geht ein Abfall der absoluten Lymphozytenzahlen und damit auch der CD8-positiven Lymphozyten einher. Der prozentuale Anteil der CD8-positiven Lymphozyten erhöht sich dennoch weiter, so dass im Endstadium von AIDS nahezu alle T-Zellen CD8-positiv sind (Zolla-Pazner et al., 1987)

1.2.1 Überwachung HIV-infizierter Patienten

Das Monitoring von HIV-Infektion soll den optimalen Zeitpunkt für den Beginn der antiretroviralen Therapie (ART) abzusichern, die Therapiewirkung/den Therapieerfolg in definierten Zeitabständen zu kontrollieren und das individuelle Risiko des Patienten für opportunistische Infektionen einzuschätzen.

In den ressourcenarmen Ländern existieren, anders als in den Industrienationen, keine einheitlichen Leitlinien, die Laborparameter für das HIV-Monitoring definieren und so eine Qualitätssicherung ermöglichen. Es vollzieht sich vielmehr eine Gratwanderung zwischen dem absolut Erforderlichen und dem wirtschaftlich Möglichen. Im Folgenden werden einige Konzepte exemplarisch dargestellt.

Die Verlaufskontrollen zur Einschätzung der Immunsituation der Patienten können ohne apparative Hilfsmittel im einfachsten Fall anhand klinischer Parameter erfolgen, indem Gewicht, Körpertemperatur und Allgemeinzustand untersucht werden (Wheeler et al., 1998).

Damit lässt sich jedoch nur ein sehr grober Überblick gewinnen, so dass einige Laborwerte unumgänglich sind. Im Zuge der HIV-Infektion kommt es zu einem nachweisbaren Anstieg von Neopterin, β 2-Mikroglobulin und p24, einem virusspezifischen Protein, im Serum des Patienten (Hakim, Giorgi, 1993). Die Zuverlässigkeit dieser Testverfahren, deren Aussagekraft ursprünglich der Viruslasttestung gleichwertig sein sollte, wird in der Literatur gegenwärtig noch kontrovers diskutiert. Die CD4-Bestimmung wird mit der höchsten prognostischen Aussagekraft bemessen und kann aber sinnvoll im Therapiemonitoring durch die Bestimmung von Neopterin oder β 2-Mikroglobulin ergänzt werden (Fahey et al., 1990).

Ein in den Industrieländern etablierter und für Entwicklungsländer häufig propagierter Prognosefaktor ist die absolute Anzahl der CD4-Zellen. Diese Zellpopulation ist durch die HIV-Infektion unmittelbar betroffen. Dieser Parameter eignet sich besonders für die kostenbewusste Routineversorgung von Patienten unter antiretroviraler Therapie (Janossy et al., 2000). Unter der unüberschaubaren Anzahl verschiedener Messmethoden existieren bereits solche, die einen Test zu einem Preis von weniger als 2 € anbieten, so dass der wirtschaftliche Gesichtspunkt erfüllt ist. Dies gilt besonders für ressourcenarme Länder, in denen eine kombinierte Bestimmung von absoluter CD4-Zahl und Neopterin/ β 2-Mikroglobulin, die bezüglich der Prognose eine gute Korrelation zeigen, unbezahlbar ist (Fahey et al., 1990).

Anstelle der Bestimmung der CD4-positiven Lymphozyten kann auch auf die Gesamtleukozytenzählung (TLC) ausgewichen werden. Dies ist mit vermindertem apparativen Aufwand und geringeren Kosten verbunden, sodass diese Stufe der Versorgung flächendeckend möglich ist. Allerdings bereitet es Schwierigkeiten, von der Gesamtleuko-

zytenzahl auf den CD4-Anteil zu schließen. Eine annehmbare Korrelation dieser Parameter zeigt sich bei einem TLC unter 1200 Zellen/ μl , so dass dann auch der CD4-Wert unter 200 Zellen/ μl liegt und die Indikation für den Beginn einer antiretroviralen Therapie gestellt ist. Dieses Verhältnis konnte in zahlreichen Studien aus den USA (Blatt et al., 1993; Fournier et al., 1992), dem UK (Beck et al., 1996) und Südafrika (van der Ryst et al., 1998) gezeigt werden. Als besonders schwierig gestaltet sich bei diesem Verfahren die Angabe der Sensitivität und Spezifität, da sie maßgeblich von dem TLC-Wert abhängt. Basierend auf dem Messergebnis der Gesamtleukozytenzahl kann ein Wert der CD4-positiven Lymphozyten von unter 200 Zellen/ μl angenommen werden. Wird ein relativ niedriger Wert für TLC zugrunde gelegt, so steigert sich die Spezifität und verringert sich die Sensitivität. Mit einem hohen Wert für TLC ergibt sich das Gegenteil (Schreibman et al., 2004). In einer exemplarisch herausgegriffenen Studie wird bei einem TLC-Richtwert von <1200 Zellen/ μl , die Sensitivität mit 71% und die Spezifität mit 82% angegeben. Es konnte in derselben Studie noch gezeigt werden, dass eine Steigerung der Sensitivität bei Männern auf 78% (Spezifität 80%) und bei Frauen auf 86% (Spezifität 73%) erreicht wird, wenn der TLC-Wert zusätzlich mit dem Hämoglobinwert kombiniert wird (Spacek et al., 2003).

Auch die Kombination der Laborparameter TLC, Hämoglobinkonzentration und Thrombozytenzahl mit dem Geschlecht des Patienten lässt Rückschlüsse auf einen CD4-Wert < 200 Zellen/ μl zu. Die Sensitivität dieses Modells ist mit 91% und Spezifität mit 73% angegeben (Chen et al., 2003).

Ein weiterer Parameter, der vor allem eine gute Langzeitprognose für die Progression der HIV-Erkrankung zulässt, ist die Viruslast. Sie ist definiert durch die Zahl der HIV-Genomkopien pro Milliliter Blutplasma (Einheit: HIV-RNA-Kopien/ml) und ist anzusehen als das Resultat der Virusneubildung im infizierten Organismus. Besonders für Patienten, die bereits HAART erhalten, zeigt eine Viruslast unter 10^5 Kopien/ml eine deutlich verlangsamte Progression mit Steigerung der Überlebenschancen (Helbert et al., 2000; Hammer et al., 1996) und wurde daher auch in die Richtlinien für den Therapiebeginn und die Therapieüberwachung aufgenommen (Saag et al., 1996). Es ist bedauerlicherweise anzumerken, dass die Bestimmung der Viruslast, die durch diverse Nukleinsäuretests erfolgen kann, üblicherweise durch eine RT-Polymerasekettenreaktion (PCR), in armen Ländern zu teuer ist. Ein derartiger Test

kostet zwischen US \$ 60-100 (Hakim, 1996) und wird damit auch mittelfristig in armen Ländern nicht verfügbar sein.

1.3 Verschiedene Methoden zur Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen in Entwicklungsländern

In den letzten Jahren sind zahlreiche Verfahren für den Einsatz in Entwicklungsländern vorgestellt worden, die eine kostengünstige Analyse von Lymphozytensubpopulationen mit vereinfachten Protokollen ermöglichen. Dabei handelt es sich um verschiedene Techniken auf der Grundlage der Durchflusszytometrie, sowie um andere Verfahren.

Im Folgenden sollen einige Verfahren näher dargestellt werden:

1.3.1 Durchflusszytometrische Techniken

Das Standardverfahren zur CD4-T-Lymphozytenzählung stellt derzeit die Multiparameter-Durchflusszytometrie mit Computer-unterstützter Analyse dar. Die Ausrüstung stellen verschiedene Firmen her.

Die meisten Tests mit Durchflusszytometern funktionieren nach der Zwei-Plattform-Methode. Das bedeutet, dass für die Messung zwei Geräte (Durchflusszytometer plus Hämatologiecounter) benötigt werden. Zunächst wird die Blutprobe mit monoklonalen Antikörpern spezifisch markiert, die beispielsweise gegen CD45, CD3/CD4 und CD3/CD8 gerichtet sind und jeweils mit unterschiedlichen Farbstoffen konjugiert sind (FITC, PE und PerCp). Bei der durchflusszytometrischen Messung werden die Lymphozytensubpopulationen entsprechend ihrer Fluoreszenz als Cluster in einem Histogramm abgebildet. Mit dem Hämatologiecounter wird die Gesamtleukozytenzahl, als erforderlicher Messwert beider Geräte, bestimmt. Die absolute Zahl der Lymphozytensubpopulation (CD4 oder CD8) kann aus der Leukozytenzahl (Hämatologiecounter) und dem prozentualen CD4/CD8-Anteil an den Gesamtleukozyten CD45 (Durchflusszytometer) errechnet werden.

Alternativ existiert auch die Möglichkeit die Lymphozytensubpopulation mit einer Ein-Plattform-Methode zu quantifizieren, so dass eine mögliche Fehlerquelle bei der Be-

stimmung des gemeinsamen Parameters entfällt. Grundsätzlich gibt es bei den Ein-Plattform-Methoden zwei unterschiedliche Techniken:

Die volumetrischen Durchflusszytometer messen über zwei Elektroden ein definiertes Volumen der Probe und bestimmen die Zellzahl der darin befindlichen Antikörper-markierten Zellen. Auch hierbei muss der Antikörper mit einem Farbstoff versehen sein. Über das tatsächlich gemessene Volumen und die Anzahl der Partikel oder Zellen hierin ist die Konzentration definiert.

Die zweite Variante verwendet Mikropartikel, so genannte „beads“, als Referenz, die der zu untersuchenden Probe in einer bekannten Konzentration beigefügt werden. Aus deren Messwert kann man das gemessene Volumen und die Konzentration der entsprechenden Subklasse bestimmen.

1.3.2 Alternative Techniken, die nicht auf Durchflusszytometrie beruhen

Mikropartikel bilden die Basis für das Dynabeads-T4-T8-System (DynaL Biotech ASA). Die zu quantifizierende Zellpopulation wird über magnetische Partikel isoliert, die mit Antikörpern gegen CD4 oder CD8 belegt sind. Zuvor werden die Monozyten, die ja auch das CD4-Antigen tragen und damit stören würden, durch die Verwendung von Mikropartikeln entfernt, die mit Antikörpern gegen CD14 belegt sind. Erst danach erfolgt die Isolierung der entsprechenden T-Lymphozyten mit einem Magneten und die Lyse. Nach einer Kernfärbung werden die Nuclei mit einem Hämozytometer gezählt. Die Proben müssen binnen einer Stunde gemessen werden, so dass nicht mehr als sechs Proben zur selben Zeit präpariert werden können. Über diese Methode ist von verschiedenen Arbeitsgruppen von einer guten Korrelation mit durchflusszytometrischen Verfahren ($r = 0,900$) berichtet worden (Carella et al., 1995; Didier et al., 2001; Lymuya et al., 1996).

Auch die „cytosphere“ Technik stellt ein alternatives Verfahren zur CD4-Bestimmung dar. Hier binden Mikropartikel auf Latex-Basis, die mit CD4-Antikörpern belegt sind, an die CD4-T-Lymphozyten und bilden eine Zellrosette aus, die lichtmikroskopisch erfasst werden kann. Ebenfalls CD4-exprimierende Monozyten können so identifiziert werden, indem sie an kleinere „cytosperes“ binden, die mit Antikörpern gegen CD14 belegt sind. Da eine Erythrozytenlyse erforderlich ist, sind die Proben nach Zugabe der lysierenden Substanz und des Farbstoffes nur etwa 15 Minuten stabil. Parallel können

somit lediglich zwei Proben bearbeitet werden. Einige Gruppen haben eine gute Korrelation zwischen CD4-Messungen mit dieser Methode und der Durchflusszytometrie festgestellt ($r = 0,910-0,930$) (Landay et al., 1993; Ferreira et al., 1994; Carella et al., 1995). Für einen Fall jedoch war eine schlechte Übereinstimmung ($r = 0,450$) zu vermerken, aber auch der Probenumfang von zehn Proben pro Tag war sehr gering (Didier et al., 2001).

Die Capcellia-Technik ist ein Beispiel für ein immunhistochemisches Verfahren. Sie beruht auf der Separation von T-Zellen aus in EDTA-Vollblut mit Hilfe magnetischer beads, die mit CD2-Antikörpern belegt sind. Die Zellen werden danach mit monoklonalen, Peroxidase gekoppelten Antikörpern versetzt und mit einem ELISA-Gerät gemessen, wobei es möglich ist, 43 Proben in einem Durchlauf zu analysieren. Die Berechnung der absoluten CD4- und CD8-Werte basiert auf einer Kalibrierungskurve. Ein Vergleich der Messergebnisse mit einem Durchflusszytometer in einem europäischen Labor zeigte eine gute Übereinstimmung ($r = 0,810$) (Carriere et al., 1999), hingegen fiel ein anderer Vergleich in Afrika deutlich schlechter aus ($r = 0,610$) (Diagbouga et al., 1999).

1.3.3 Bedeutung der CD3-, CD4-, CD8-Zellbestimmung

Die Zählung der drei genannten Lymphozytensubpopulationen, besonders die der CD4-positiven Lymphozyten, hat einen herausragenden Stellenwert für die Festlegung des Therapiebeginns und später, nach begonnener antiretroviraler Therapie, für ihre Überwachung und die Beurteilung ihrer Effizienz. Ebenso stellt die CD4-Anzahl einen prognostischen Indikator dar, hilft bei der Entscheidung, wann prophylaktische Maßnahmen gegen opportunistische Infektionen eingeleitet werden sollten, und ermöglicht die Einteilung der infizierten Patienten in die von der CDC festgelegten Stadien. Besonders in Regionen mit limitierten finanziellen Kapazitäten zur Diagnosestellung und Therapie von HIV/AIDS hat sich die Bestimmung von CD4-positiven Lymphozyten als alleiniger, essentieller Parameter bewährt, anstelle der Drei- oder Vier-Farbmessung, wobei stark vereinfachte Protokolle zur Zählung zum Einsatz kommen (Janossy et al., 2000). Die Bestimmung der Viruslast als optionalem Parameter ist weitgehend in den Hintergrund getreten (Sherman et al., 1999; Jacobson et al., 2003; Anglaret et al., 1997; Crowe et al., 2003). Bei HIV-infizierten Patienten sollte das Intervall zwischen den CD4-

Untersuchungen mit zwei bis drei Monaten gewählt werden (How technologies are used on the ground: CD4 count and viral load, www.who.int/3by5/amds/en/monitoring5.pdf). Durch zusätzliche Quantifizierung der CD3- und CD8- T-Lymphozyten kann eine genauere Einschätzung des Immunstatus des infizierten Patienten geschehen. Darunter fällt die Bestimmung des Quotienten aus CD4/CD8, der die bereits oben erwähnten Schlüsse zulässt.

Bei HIV-infizierten Kindern hat sich die Bestimmung der CD4/CD8-Ratio als besonders hilfreicher Parameter herauskristallisiert. Sie nimmt bei gesunden Kindern stets einen Wert >1 an, wohingegen bei HIV-infizierten Kindern durch einen Abfall der CD4-Zellen und einen stetigen Anstieg der CD8-Zellen sich das Verhältnis von CD4 zu CD8 umkehrt und auf einen Wert <1 abfällt. Zur Überwachung der CD4- und CD8-Werte eignen sich bei Kindern die prozentualen Anteile der jeweiligen Lymphozyten-subpopulation an den Gesamtlymphozyten besser als die Absolutwerte (Zijenah et al., 2005).

1.3.4 Mobile Konzepte

Einem mobilen Konzept liegt die Idee zu Grunde, eine an einem bestimmten Ort konzentrierte Gruppe von Menschen in kurzer Zeit zu erreichen.

Dies kann zum einen die Praktikabilität eines Projekts erleichtern, wie es zum Beispiel in Deutschland gelegentlich von Organisationen zur Blutspende genutzt wird oder auch, um bei diesem Beispiel zu bleiben, in Krisengebieten, wenn schnell eine große Menge Spenderblut benötigt wird, wie erst in jüngster Zeit in der Tsunamiregion deutlich wurde.

Ein anderes Anwendungsgebiet für ein mobiles Konzept stellen Regionen dar, in denen spezialisierte Zentren zwar vorhanden sind, aber von einem Großteil der Bevölkerung aufgrund infrastruktureller Gegebenheiten nicht erreichbar sind. Dies ist in Afrika ein großes Problem, weil AIDS allgemein sehr stark verbreitet ist, die Kliniken aber, in denen eine gezielte Überwachung und Therapie der Patienten möglich sind, sich auf die größeren Städte beschränken. Die zahlreichen ländlichen Gebiete können nur durch mobile Laboreinheiten erreicht werden.

In der Literatur finden sich schon Ansätze über andere Krankheitsbilder und Fragestellungen, in denen versucht wurde, ein derartiges Konzept durchzusetzen:

Bereits zu Beginn der sechziger Jahre wurde eine mobile Einheit zur Verbesserung der Diagnose und der Therapie von Augenerkrankungen in abgelegenen Regionen in Kenia eingesetzt. Das Problem bestand in der Erblindung vieler Menschen auf Grund eines unerkannten Katarakts. Die Situation spitzte sich deshalb zu, weil auf etwa eine Million Menschen ein Augenspezialist kam, meist in einer stark urbanisierten Gegend. So wurden vom Gesundheitsministerium ländliche Augenkliniken mit mobilen Einheiten ausgestattet. Zunächst wurde von einem Augenarzt, der mit einem Motorrad und einfachem medizinischen Gerät bestückt war, in der Nähe von Nairobi ein Testprogramm gestartet. Dabei wurde die Bedeutung dieses Programms erkannt und mit einer untersuchten Zahl von 35000 Patienten untermauert. Danach wurde das Programm mit einem Auto fortgesetzt. In den nächsten 25 Jahren konnten die finanziellen Mittel und die Prävention der Erblindung stetig gesteigert werden, so dass sich dieses Projekt zu dem Besten im gesamten subsaharischen Afrika entwickelt hat. Die mobilen eye care units sind in der Bevölkerung als „miracles of eye care“ bekannt (McManus, 1993).

Ein ähnliches Projekt, das 1952 in Namibia für die Versorgung von Patienten in isolierten, ländlichen Gegenden gegründet wurde, verlief nicht minder erfolgreich, so dass 1976 und 1981 zwei weitere Einheiten hinzukamen (Hill, 1984).

In Gambia wurde zum Beispiel die Effizienz eines Mutter-Kind-Gesundheitsschutzprogramms untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Kosten für das mobile Konzept zwar fünffach höher lagen als die einer zentralen Station, was aber maßgeblich durch die Ausbildung des Personals zu Stande kam. Es konnte jedoch die Versorgung der Neugeborenen und damit die Mortalitätsrate signifikant verbessert werden (Fox-Rushby, 1995).

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Diese Arbeit hatte zum Ziel, ein Verfahrensprotokoll für die CD3- und CD8- Zellzählung zu entwickeln, das ohne Fixierung und Erythrozytenlyse auskommt. Die Messung sollte mit einem volumetrischen Durchflusszytometer erfolgen, also ohne Referenzmessung durch einen Hämatologiecounter oder mit Mikropartikeln. Ein ähnliches Protokoll existiert bereits für die Messung der CD4-positiven T-Lymphozyten und wird erfolgreich in verschiedenen Ländern des afrikanischen Kontinents eingesetzt. Die besonderen strukturellen Gegebenheiten in den afrikanischen Ländern erfordern den Einsatz mobiler Labors. In dieser Arbeit sollten die oben beschriebenen Protokolle mit einem Durchflusszytometer, welches über ein neuartiges optisches System verfügt, unter standardisierten und mobilen Laborbedingungen hinsichtlich der Übereinstimmung der Messwerte für CD3-, CD4- und CD8-positive Lymphozyten getestet werden.

2 Material und Methode

2.1 Auswahl der Blutproben

Die in dieser Versuchsreihe verwendeten Blutproben stammten aus der Blutspende der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Es wurden ausschließlich in EDTA konservierte Vollblutproben von freiwilligen Spendern verwendet.

80 Blutproben stammten von Spendern, bei denen ein normaler Gehalt der Leukozyten-subpopulationen zu erwarten war. Weitere 21 Blutproben stammten von Patienten, die sich einer Ganzkörperbestrahlung unterziehen mussten, bei denen somit sehr geringe Konzentrationen der CD3-, CD4- und CD8-positiven Lymphozyten anzunehmen waren. Das Probenmaterial gelangte unmittelbar nach der Entnahme zur Aufbereitung und Analyse in das Institut für Strahlenbiologie. Der Zeitraum zwischen Probenentnahme und Analyse wurde gering gehalten und überschritt ein Maximum von sechs Stunden nicht.

Dieser Zeitraum liegt Literaturangaben zufolge durchaus im Rahmen der Empfehlungen, weil ein signifikanter Zelluntergang erst acht Stunden nach der Entnahme zu erwarten ist (Terstappen et al., 1991)

2.2 Durchflusszytometrie

Die auf Fluoreszenz basierende, Computer-unterstützte Durchflusszytometrie wurde vor über 30 Jahren von Dittrich und Göhde entwickelt (Dittrich et al., 1969). Zunächst wurde sie in der Hämatologie (Büchner et al., 1971), Immunologie, Onkologie und Biochemie für Forschungszwecke eingesetzt. Inzwischen haben sich ihre zahlreichen Einsatzmöglichkeiten auf alle Bereiche der klinischen Zelldiagnostik ausgeweitet und sind in einem modernen Labor unverzichtbar (Valet, 2003).

In der Durchflusszytometrie findet eine stetige Weiterentwicklung statt. Die Messung molekularbiologischer Produkte mit dem Durchflusszytometer und die Er-

fassung zellfreier Marker, wie z.B. Zytokine wird in Zukunft eine Schlüsselrolle für verschiedenen Anwendungen einnehmen (McCoy, 2002).

Sogar die Raumfahrtorganisationen NASA und ESA sind wegen der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten dieser Technik an einem für die Raumfahrt geeigneten Durchflusszytrophotometer interessiert. Schon im Jahre 2000 wurden erste Untersuchungen zum Verhalten in der Schwerelosigkeit durchgeführt (Crucian et al., 2000). Dieser Einsatzbereich stellt ähnlich hohe Anforderungen an die Messtechnik und die Methoden wie der mobile Einsatz unter tropischen Bedingungen in entlegenen Gebieten.

Anders als bei einem Mikroskop, bei dem Zellen oder Zellverbände auf einem Objektträger, also einem statischen Medium, untersucht werden, gilt bei einem Durchflusszytrophotometer ein dynamisches Prinzip. Hier findet die Messung, wie der Name schon sagt, im „Fluss“ statt.

Die Analyse der Partikel (z.B. Zellen) erfolgt mit Hilfe einer optischen Einheit, welche die Fluoreszenz- und Streulichtsignale erfasst (Braylan, 1983; Johnson, 1992; Weaver, 2000). Die Partikel werden dazu in einem Flüssigkeitsstrom fokussiert und in dieser Form mit hoher Geschwindigkeit an der Messoptik vorbeigeführt.

Vorraussetzung für eine erfolgreiche Messung ist, dass die Zellen einzeln suspensiert vorliegen. Während des Messvorganges werden diese „perlschnurartig“ zu dem Analysepunkt in der Mitte der Messkammer transportiert. Ein Pumpsystem ermöglicht den Transport zur Messkammer, wo die Zellen von einem fokussierten Lichtstrahl, der entweder von einem Laser oder einer UV-Lampe erzeugt wird, in einer Kapillare einzeln und nacheinander beleuchtet und angeregt werden. Um bei den eingehenden optischen Signalen unterschiedliche Qualitäten und Quantitäten von Fluoreszenz erfassen zu können, müssen die zu zählenden Zellen mit einer fluoreszierenden Substanz spezifisch markiert werden. Die Lichtstreuung erfolgt unabhängig von spezifischen Markierungen durch die granuläre Struktur und die Größe der Zellen.

Die Zellen emittieren dabei ein für das Fluorochrom charakteristisches Licht einer bestimmten Wellenlänge, das durch photosensible, elektronische Komponenten (Photomultiplier) in elektrische Impulse umgewandelt und vielfach verstärkt wird. Diese elektrischen Impulse werden von einem Computer erfasst und klassifiziert, so dass sie auf dem Monitor in Form eines Histogramms dargestellt werden können.

2.2.1 Lichtquelle

Die Auswahl der Lichtquelle spielt eine entscheidende Rolle in der Durchflusszytometrie und muss gerade im Hinblick auf den mobilen Einsatz folgende Voraussetzungen erfüllen:

Die Lichtquelle muss eine ausreichend hohe Lichtintensität erbringen. Das Emissionsspektrum sollte im Absorptionsbereich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe liegen. Eine konstante Strahlenleistung bei niedrigem Stromverbrauch ist ebenfalls obligat.

Laser erfüllen die oben genannten Anforderungen und sind mittlerweile kostengünstig in Form von Laserdioden zu bekommen. Die Auswahl des jeweiligen Fluorochroms muss immer mit den Emissionslinien des eingesetzten Lasers abgestimmt werden.

2.2.2 Fluoreszenz

Die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung wird als Fluoreszenz, die fluoreszierenden Verbindungen als Fluorochrome bezeichnet.

Die Fluorochrome absorbieren Lichtenergie in jeweils einem charakteristischen Wellenlängenbereich. Diese Energie hebt die Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Bei der Rückkehr zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. „Fluoreszenz“ ist die Bezeichnung dieses Energieübergangs. Der Frequenzbereich, der ein Fluorochrom anzuregen vermag, ist das für den Farbstoff charakteristische Anregungs- oder Exzitatorionsspektrum, welches weitgehend mit dem Absorptionsspektrum übereinstimmt.

In der Durchflusszytometrie findet überwiegend der Luft gekühlte Argonlaser Verwendung, dessen Emissionsspektrum bei 488 nm liegt. Die Absorptionsmaxima der Farbstoffe sollten darum in der Nähe dieses Wertes liegen, müssen ihm aber nicht exakt entsprechen. Die Anregung eines Fluorochroms außerhalb des Absorptionsmaximums, aber innerhalb seines Absorptionsspektrums geht mit einer Intensitätsverminderung jedoch nicht mit einer Farbänderung der Fluoreszenz einher.

Die Mehrfarbenfluoreszenzanalyse stellt eine Anwendungsmöglichkeit dar, mit der man z.B. heterogene Populationen der natürlichen Killerzellen charakterisieren kann. Dabei muss man Fluoreszenzfarbstoffe wählen, die sich in der Fluoreszenzfarbe unterscheiden

und trotzdem mit Licht derselben Wellenlänge anzuregen sind. Das bedeutet, dass die Farbstoffe unterschiedliche Emissionen aufweisen müssen.

Für die Mehrfarbenfluoreszenzanalyse mit einer Anregungswellenlänge bei 488 nm kommen beispielsweise Phycoerythrin (PE) und Fluorescein (FITC) in Frage.

2.2.3 Streulicht

Außer den Fluoreszenzen werden von dem Durchflusszytometer noch weitere Parameter erfasst und ausgewertet.

Beim Auftreffen des Lichtstrahls auf eine Zelle streut sie aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften Licht mit unterschiedlicher Qualität und Quantität. Die Lichtstreuung (Scatter) wird durch folgende Zelleigenschaften beeinflusst:

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

Die Lichtstreuung erfolgt nicht gleichmäßig in alle Richtungen. Sie ist im Bereich von 0-10° des einfallenden Lichtstrahls am stärksten (Vorwärtsstreulicht, Forward Scatter [FSC]). Ein wesentlich geringerer Anteil des Lichts streut seitwärts (90°) dazu (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter [SSC]).

Die Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung liefern wichtige Informationen, anhand derer sich die Leukozytensubpopulationen, wie Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten voneinander abgrenzen lassen.

Aufbau eines Durchflusszytometers.

Ein Durchflusszytometer gliedert sich grob in folgende drei Bauteile:

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

2.2.4 Flüssigkeitssystem

Das Flüssigkeitssystem besteht aus zwei getrennten Leitungen. Die eine dient als Zuleitung für die Hüllstromflüssigkeit, die von einer Pumpe kontinuierlich zur Messkammer und schließlich weiter in den Abfallbehälter transportiert wird. Durch die zweite Leitung gelangen die Zellen vom Probenröhrchen zur Messkammer, an deren unterem Ende beide Leitungen zusammentreffen. Die Zellsuspension wird durch Überdruck in das Lumen der Messkammer (Quarzküvette) geleitet [Abbildung 1]. Hier wird die Zellsuspension von der ebenfalls durch die Messkammer strömenden Hüllstromflüssigkeit erfasst und mitgerissen. Dadurch kommt es zu einer Verengung des Probenstroms in der Küvette und somit zu einer Beschleunigung von wenigen Zentimetern in der Sekunde auf etwa 7m/s. Diese Beschleunigung gewährleistet, dass die Zellen einzeln und nacheinander aufgereiht den Messpunkt an einer definierten Stelle passieren und von dem fokussierten Lichtstrahl getroffen werden. Der Vorgang wird auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet.

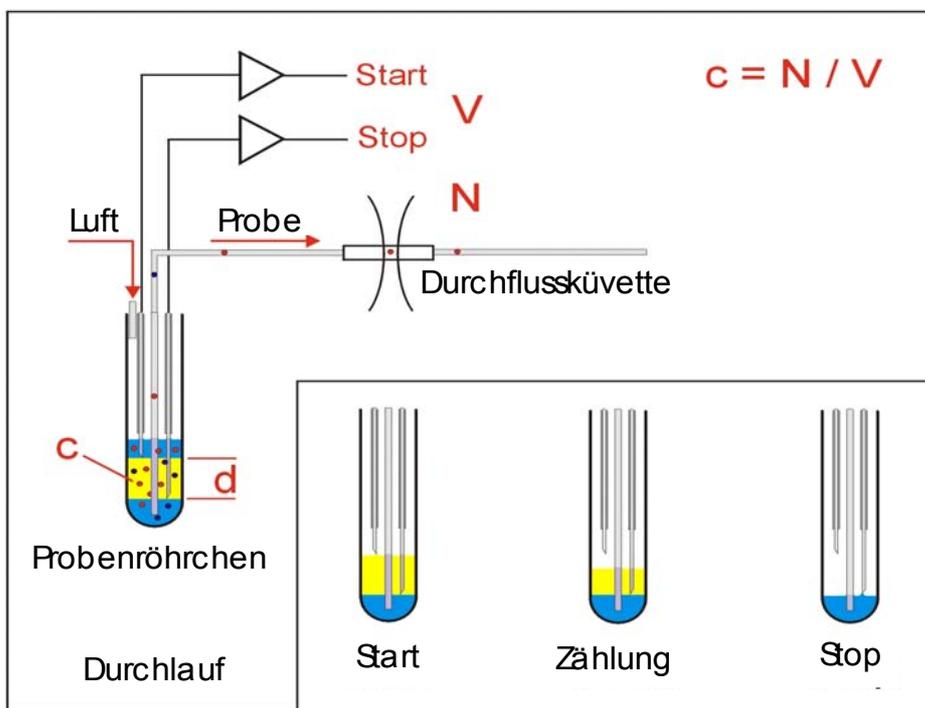


Abbildung 1: Messprinzip des verwendeten Durchflusszytometers

Mithilfe der Konzentration ($c = N/V$) werden die absoluten Zellzahlen bestimmt. Hierbei ist N die Zellzahl in dem definierten Suspensionsvolumen V , welches mechanisch durch zwei Elektroden abgemessen wird. Dazu sind keine Referenzmessungen oder der Einsatz von Mikropartikeln als interner Standard nötig.

2.2.5 Optisches System

Das optische System lässt sich in einen Anregungs- und Detektionsteil gliedern. Im Anregungsteil wird die fokussierte Probe mit einem Durchmesser von $20 \times 60 \mu\text{m}$ durch den Laserstrahl geleitet.

Im Detektionsteil wird das Vorwärtsstreulicht gemessen, und in einer räumlich getrennten Anordnung zusätzlich das Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenzen.

2.2.6 Signalverarbeitung

Durch Photodetektoren werden die optischen Signale in elektrische Pulse konvertiert, deren Höhe mit den Intensitäten der von den Zellen ausgehenden Lichtsignale korreliert. Es werden zur Verstärkung der ursprünglich schwachen Signale zwei verschiedene Systeme von Photodetektoren verwendet: Photoröhren (PMT = photomultiplier tube) und Photodioden.

2.2.7 CyFlow Counter®

Beim CyFlowCounter® (Partec, Münster, Deutschland) handelt es sich um ein portables Durchflusszytrophotometer, das lediglich die Größe eines handelsüblichen Computers aufweist und den Anforderungen von Laboren optimal angepasst ist, die eine große Anzahl von Proben hinsichtlich einer einzigen Fragestellung (= einparametrisch) untersuchen. Es ist in seinem Aufbau dem CyFlow SL von Partec sehr ähnlich. Bei ihm wird auf fokussierende Linsen und Objektive verzichtet. Dadurch ist es möglich, die Kosten für Anschaffung und Unterhalt zu reduzieren. Der größte Vorteil liegt aber wohl darin, dass die „align-free“ Optik die Fluoreszenz in einem weiten Einstellungsbereich konstant erfasst. Konventionelle optische Systeme benötigen eine auf den Mikrometer genaue Abstimmung der optischen Bank (Laseroptik und Detektionsoptik). Schon geringe Veränderungen durch Erschütterungen oder Behinderungen im Probenstrom führen zu

unbrauchbaren Daten. Damit eröffnet diese neue technische Modifikation die Einbindung der Durchflusszytometrie in ein mobiles Konzept.

Das in dieser Arbeit verwendete Gerät ist ausgelegt für absolute, volumetrische Zellzahlbestimmungen aller Leukozyten-Subpopulationen. Dabei erfolgt die Fluoreszenzanregung der markierten Blutzellen mit einem YAG Laser, der Licht einer Wellenlänge von 532nm emittiert (Partec, www.partec.de/products/products.html).

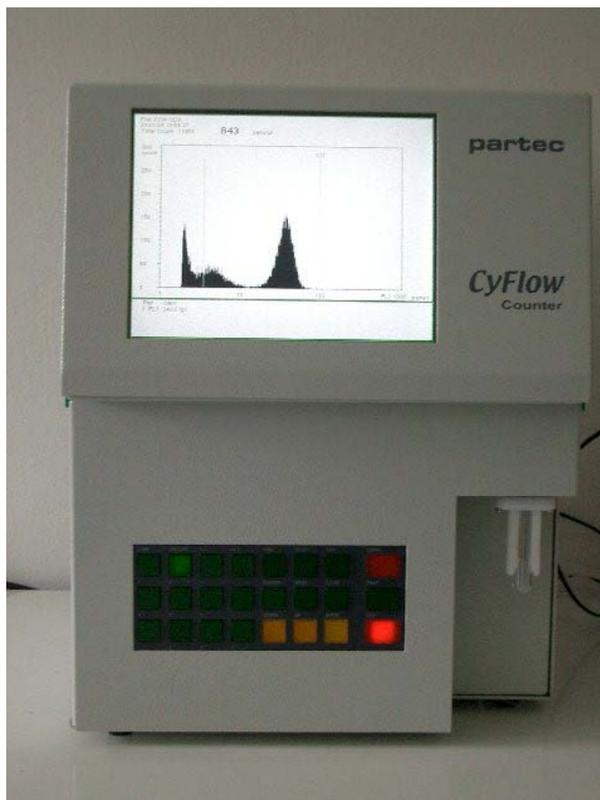


Abbildung 2: CyFlow Counter®

2.2.8 CyLab®

Das CyLab® ist ein zu einem Miniaturlabor umfunktionierter PKW. Auf dem Dach wurden Solarzelleinheiten angebracht, die die Energie liefern für einen eingebauten Kühlschrank, der zur Kühlung der Antikörper und der Blutproben dient und für die 12 V DC Autobatterie, an die das Messgerät angeschlossen wird (Partec, www.partec.de/products/products.html).



Abbildung 3: CyLab® Innenraum



Abbildung 4: CyLab® aus der Vogelperspektive mit Darstellung der Solarzelle

2.2.9 Antikörper

Die in den Experimenten verwendeten Maus-Antikörper Anti-human CD3-, Anti-human CD4- und Anti-human CD8- stammen von der Firma Diatec (Oslo, Norwegen) und werden als monoklonale Antikörper in der Zellkultur gewonnen. Die Antikörper sind mit dem Farbstoff Phycoerythrin konjugiert.

Der CD3-Antikörper ist ein monoklonaler Antikörper des Isotyps IgG1/kappa (Klon UCTH-1). Er reagiert mit Zellen, die den TZR/CD3-Komplex besitzen. Bei einem gesunden Erwachsenen beträgt ihr Anteil im peripheren Blut 60-90 % aller Lymphozyten (McMichael et al., 1987; Kishimoto et al., 1997).

Der CD4-Antikörper ist als IgG2a/kappa typisiert (Klon EDU-2). Er erkennt das CD4-Antigen, das spezifisch für humane T4-Helferzellen ist, die ca. 20-60 % der Leukozyten im peripheren Blut eines Erwachsenen ausmachen. Monozyten besitzen ebenfalls das CD4-Antigen auf ihrer Oberfläche. Allerdings ist die Antigendichte sehr viel geringer, wodurch das Fluoreszenzsignal entsprechend schwächer ist (PROW, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/cd/cd4.htm; Reinherz et al., 1986).

Der CD8-Antikörper ist vom Isotyp IgG2a/kappa (Klon UCTH-4). Er richtet sich gegen das CD8-alpha-Antigen, das von zytotoxischen T-Zellen, T-Supressorzellen und natürlichen Killerzellen exprimiert wird. Der Anteil der CD8-positiven Zellen im peripheren Blut beträgt 14-45% der mononukleären Zellen (PROW, www.ncbi.nlm.nih.gov/prow/cd/cd4.htm; Barclay et al., 1997).

2.2.10 Aufbereitung der Blutproben

Für den Vergleich der Messungen (Labor und Labormobil) wurden 80 Blutproben von gesunden Spendern und 21 leukozytenreduzierte Blutproben von Spendern aus dem Knochenmarktransplantationszentrum verwendet. Die Blutproben wurden für die Zellzählung unter mobilen und standardisierten Laborbedingungen in zwei getrennten Ansätzen für jeweils CD3-, CD4- und CD8-positiv Lymphozyten nach dem "no-lyse no-wash" Protokoll vorbereitet und jeder Probenansatz dreimal quantifiziert. Das ergibt insgesamt 1818 Einzelmessungen. Das Pipettieren der benötigten Reagenzien erfolgte mit halbautomatischen Eppendorf-Pipetten. Dabei kam die Methode des reversen Pipettierens zum Einsatz, bei der stets etwas mehr Blut in die Pipette aufgezogen als danach

in den Ansatz abgegeben wird. Es verbleibt eine geringe Menge Blut in der Pipettenspitze. Der Vorteil dieser Methode ist die Genauigkeit, weil durch die hohe Viskosität des Blutes immer ein Teil der Probe an der Wandung der Pipettenspitze haften bleibt. Auch wird der Volumenverlust durch aspirierte Luftblasen ausgeglichen. In Bezug auf die Reproduzierbarkeit wird dieser Methode die höchste Erfolgswahrscheinlichkeit beigegeben (Greve et al., 2004; Barnett et al., 1999; Brando et al., 2000; Mandy et al., 2003).

Das Probenaufarbeitungs-Protokoll gliedert sich in folgende Einzelschritte:

In ein Probenröhrchen werden 100 µl Vollblut mit 10 µl des jeweiligen Antikörpers gemischt. Nach 10 minütiger Inkubationszeit im Dunklen erfolgt die Zugabe von 2600 µl eines no-lyse Puffers. Die Proben können entweder sofort oder nach einer weiteren Lagerung gemessen werden.

Die gefärbten Blutproben wurden für die Messung folgendermaßen vorbereitet:

In die Probenröhrchen wurden 850 µl des präparierten Ansatzes luftblasenfrei pipettiert. Das Röhrchen sollte mit maximal 2/3 des Volumens befüllt sein und es sollten keine Luftblasen in die Suspension gelangen, da diese die Messung ungünstig beeinflussen können.

Unmittelbar nachdem das Messröhrchen in die Halterung eingerastet ist, beginnt der Messvorgang, der sich in vier Phasen gliedern lässt.

Die Zellen werden in der „Prerun-Phase“ mit hoher Geschwindigkeit zur Messküvette transportiert, wohingegen die Geschwindigkeit in der „Stabilize-Phase“ wieder normalisiert wird. Ab der „Run-Phase“ kann man die Analyse der Zellen in Echtzeit in Form von Histogrammen auf dem Monitor verfolgen. Die eigentliche Zählung erfolgt in der „Count-Phase“ mit einem definierten Volumen von 200µl.

Unmittelbar nach Beendigung der Messung wird das Messergebnis von der Gerätesoftware (Partec DPAC Software) als Zellen pro Mikroliter ermittelt und angezeigt.

Jeder einzelne Probenansatz wurde dreimal gemessen, so dass sich eine Zahl von insgesamt 1818 Einzelmessungen ergibt.

2.2.11 Auswertung

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt in Form von Histogrammen (Abbildung 5, 6, 7). Bei ihnen wird der Parameter FL-II (Fluoreszenz des Phycoerythrins) auf der Abszisse gegen die gezählten Ereignisse auf der Ordinate aufgetragen wird.

Es empfiehlt sich, vor Beginn der Messung für die zu bestimmende Zellpopulation ein Aussagefenster, ein so genanntes „Gate“ anhand der Blutprobe eines Normalprobanden festzulegen, sowie „Lower Level“ und „Gain“ einzustellen.

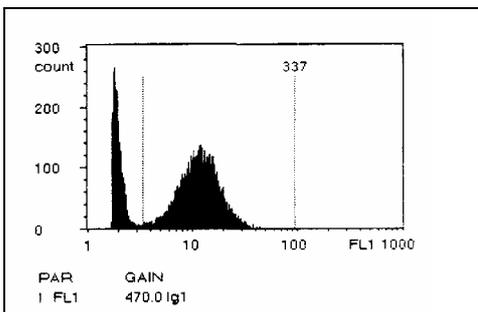


Abbildung 5: Beispiel eines Histogramms für CD3

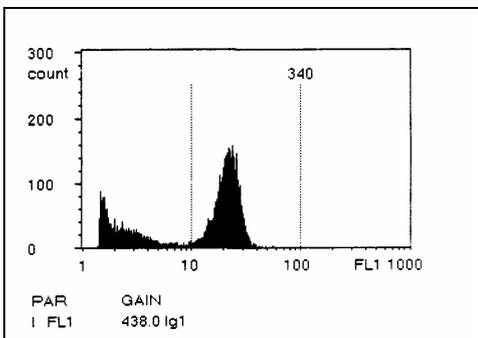


Abbildung 6: Beispiel eines Histogramms für CD4

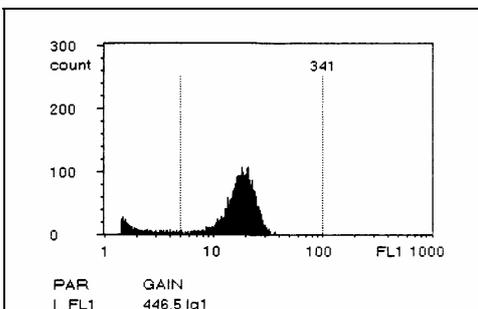


Abbildung 7: Beispiel eines Histogramms für CD8

2.2.12 Darstellung in Einparameter-Histogrammen

Diese Form des Histogramms stellt die einfache Form der Häufigkeitsverteilung der Messergebnisse dar. Die Lichtintensität einzelner Signale und damit die Menge der zu untersuchenden Substanz wird einem Kanal (Qualitätsklasse) zugeordnet. Die Kanäle werden auf der x-Achse gegen die Zellzahl auf der y-Achse aufgetragen. Die Zellen werden bereits während der Analyse klassifiziert. Zellen, die identische Fluoreszenzwerte haben, erscheinen auf demselben Kanal. Eine bestimmte Leukozytensubpopulation nimmt engverteilte Werte für das Fluoreszenzlicht an, so dass diese auf wenigen benachbarten Kanälen dargestellt werden. Daraus ergeben sich die Kurvengipfel (Peaks). Die auf den Kanälen mit kleinen Zahlen erscheinenden Signale stammen von nicht markierten Zellen oder von Erythrozyten und Thrombozyten. Diese Signale können durch die Einstellung des Lower Level ausgeblendet werden, da sie für die eigentliche Messung uninteressant sind. Der Lower Level charakterisiert somit einen Schwellenwert.

2.3 Reproduzierbarkeit

2.3.1 Versuche zur Beurteilung des Pipettierfehlers

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit wurde in Vorversuchen das Blut eines Normalprobanden in oben beschriebener Weise nach dem no-lyse-Verfahren in zehn getrennten Ansätzen aufbereitet und sofort anschließend durchflusszytometrisch quantifiziert.

In einem zweiten Vorversuch wurde eine Verdünnungsreihe aus Vollblut in gefiltertem Erythrozytenkonzentrat hergestellt. Die Verdünnungsstufen wurden mit 1:100, 1:50, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2 und 1:0 gewählt.

Aus jeder Verdünnungsstufe erfolgten jeweils für CD4- und CD8- positive Lymphozyten vier Einzelmessungen aus getrennten Probenansätzen.

CD4- und CD8-positive Lymphozyten waren im Erythrozytenkonzentrat nicht nachweisbar. Über den Ausgangswert (CD4 und CD8) des unverdünnten Blutes konnte

rechnerisch der Erwartungswert der verschiedenen Verdünnungsstufen bestimmt werden.

In einem dritten Vorversuch wurde eine Vollblutprobe in Erythrozytenkonzentrat 1:10 verdünnt, so dass eine theoretisch angenommene CD4-Konzentration von 61 Zellen/ μl vorlag. Dieser Zahlenwert stammt aus der Messung der Vollblutprobe nach dem für alle Messungen dieser Untersuchung verwendeten no-lyse Protokoll. Die Verdünnungsstufe von 1:10 ist anschließend zur Bestimmung des statistischen Fehlers in 20 verschiedenen Ansätzen durchflusszytometrisch gemessen worden.

2.4 Statistische Methoden

2.4.1 Regressionsgerade und Korrelationskoeffizient

Wenn in einer Studie der Zusammenhang zwischen zwei quantitativen Merkmalen nachgewiesen werden soll, bietet sich die Regressionsgerade als anschauliche, graphische Darstellungsweise an.

Es ist sofort zu erkennen, ob ein Zusammenhang besteht, ebenso sind Aussagen über die Stärke dieses Zusammenhangs möglich.

Einen statistischen Zusammenhang beschreibt die Regressionsanalyse, bei der die Regressionsgerade, die dem Gesamttrend aller Punkte am ehesten entspricht, und der Regressionskoeffizient, der die Steigung der Geraden widerspiegelt, ermittelt werden.

Außerdem kann der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt werden.

2.4.2 t-Test

Der t-Test ist ein zuverlässiges statistisches Auswertungsverfahren für den Vergleich zweier Mittelwerte bei ungleichen Stichprobenumfängen. Als Voraussetzung gilt, dass die Prüfgrößen normalverteilt sind.

Durch den t-Test kann beurteilt werden, ob die Messunterschiede zwischen beiden Messreihen zufallsbedingt oder statistisch gesichert sind, da die Streuungen der Messreihen in den Test einfließen. P bezeichnet die Wahrscheinlichkeit dafür, dass beide Messreihen derselben Grundgesamtheit zuzuordnen sind, wobei für die Beurteilung gilt:

$P > 0,05$: Die Unterschiede sind zufallsbedingt.

$0,05 > P > 0,01$: Die Zugehörigkeit beider Messreihen zur derselben Grundgesamtheit ist zweifelhaft.

$0,01 > P > 0,0027$: Die Differenz zwischen beiden Messreihen ist statistisch einigermaßen gesichert.

$P < 0,0027$: Die Differenz zwischen beiden Messreihen ist statistisch gut gesichert.

Als besonders vorteilhaft an diesem Verfahren ist die Tatsache anzusehen, dass auch bei kleinerem Umfang der Messreihen eine exakte Beurteilung des Ergebnisses getroffen werden kann.

2.4.3 Bland-Altman-Darstellung

In einer klinischen Studie, in der zwei verschiedene Messverfahren, z.B. eine bereits etablierte und eine neu entwickelte Technik, miteinander verglichen werden, ist ein statistisches Analyseverfahren gefordert, das Rückschlüsse hinsichtlich der Übereinstimmung zulässt.

Bei der Bland-Altman-Darstellung der Ergebnisse wird auf der x-Achse der Mittelwert der Methoden (in diesem Fall gebildet aus dem gemessenen Wert des standardisierten und des mobilen Labors für die jeweilige Lymphozytensubpopulation) der Differenz der Einzelwerte auf der y-Achse gegenübergestellt.

Darüber hinaus wird die mittlere Abweichung zwischen beiden Verfahren unter Einbeziehung aller Messwerte gebildet und als Referenzlinie in das Diagramm eingezeichnet. Von diesem Wert ausgehend wird danach die zweifache Standardabweichung der Differenz eingezeichnet (Bland et al., 1986).

2.4.4 Gaußverteilung

Zur statistischen Auswertung der Vorversuche zur Genauigkeit des Pipettierens eignet sich die Berechnung der Normalverteilung besonders gut. Diese stellt ein Verteilungsmodell für kontinuierliche Zufallsvariable dar.

In dem durchgeführten Experiment ist die Verteilung der tatsächlich gemessenen Werte um einen theoretisch ermittelten Messwert untersucht worden.

3 Ergebnisse

Für die Quantifizierung von Lymphozytensubpopulationen hat das Institut für Strahlenbiologie ein Protokoll entwickelt, mit dem auf die Lyse von Erythrozyten und das Waschen der Probe verzichtet werden kann. Sowohl die verwendeten Puffer als auch die Fluoreszenz-markierten Antikörper sind exakt auf die Anforderungen abgestimmt, so dass auf Vorversuche zur Optimierung der Nachweismethoden in dieser Arbeit verzichtet und auf die bewährte, sowie mehrfach evaluierte Methode zurückgegriffen werden konnte.

3.1 Vorversuche zur Optimierung der Probenaufbereitung

Da in der eigentlichen Messreihe Vergleichsmessungen zwischen zwei zeitlich getrennt voneinander angesetzten Proben durchgeführt werden sollen, ist das genaue Pipettieren der einzelnen Reagenzien in dieser Arbeit besonders wichtig.

3.1.1 Experiment zur Beurteilung des Pipettierfehlers und der Reproduzierbarkeit eines Messergebnisses

Das Pipettieren ist unabhängig von der zu untersuchenden Subpopulation (CD3-, CD4- oder CD8-positive Lymphozyten) ein kritischer Punkt mit hoher Fehlerquote. Die Viskosität des Blutes führt über Adhäsionskräfte (es bleibt an der Wandung der Pipettenspitze haften) zu Pipettierfehlern. Hinzu kommt, dass kleine Probenvolumina wie z. B. 10 μ l des entsprechenden monoklonalen Antikörpers nur schwierig genau zu pipettieren sind.

Um den Einfluss des Pipettierens auf die Messergebnisse zu untersuchen, wurden aus einer Vollblutprobe zehn getrennte Ansätze hergestellt und bezüglich der Konzentration der CD4-T-Zellen untersucht.

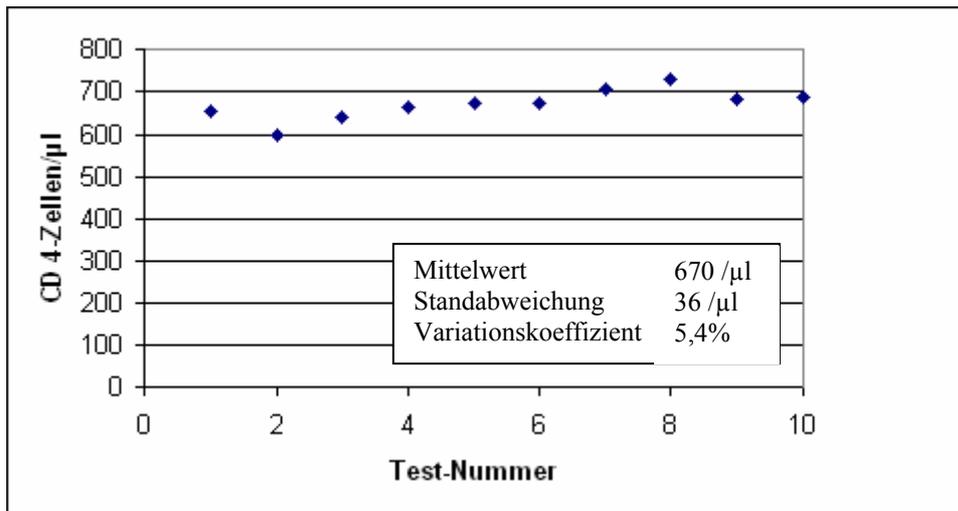


Abbildung 8: Absolute CD4-Zahlen

3.1.2 Bestimmung der Messgenauigkeit über eine Verdünnungsreihe aus Vollblut in gefiltertem Erythrozytenkonzentrat

Die Präzision und Genauigkeit der Messungen über einen breiten Konzentrationsbereich lässt sich am besten über eine Verdünnungsreihe bestimmen. Dazu wurde eine Vollblutprobe in einem kompatiblen Erythrozytenkonzentrat seriell verdünnt und die Anzahl der CD4-T-Zellen durchflusszytometrisch gezählt. Aus dem Ausgangswert im Vollblut ließen sich die Konzentrationen der verschiedenen Verdünnungsstufen errechnen und mit den tatsächlich gemessenen Werten vergleichen. Die folgende Abbildung zeigt graphisch die CD4-Zählungen der Verdünnungsreihe. Jede Probe wurde für die jeweilige Verdünnungsstufe dreimal gemessen. Auf der Abszisse ist die jeweilige Verdünnungsstufe und auf der Ordinate die absoluten CD4-Werte aufgetragen. Die bei der entsprechenden Verdünnungsstufe aufgetretene Streuung der Einzelmessungen wird durch den schmalen Balken, der parallel zur Abszisse verläuft, wiedergegeben. Der Regressionskoeffizient nach Pearson für diesen Versuch beträgt $r = 0,999$.

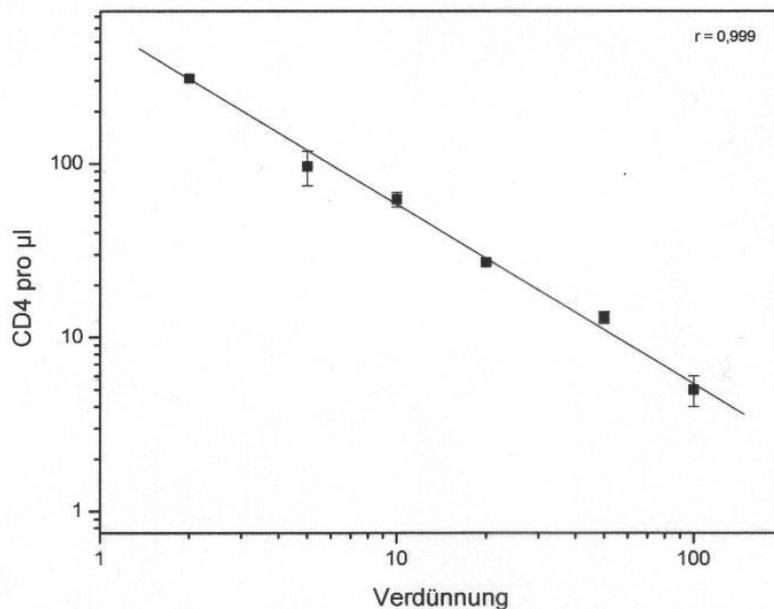


Abbildung 9: Verdünnungsreihe CD4 aus Vollblut in gefiltertem Erythrozytenkonzentrat.

Eine Vollblutprobe wurde seriell in compatiblen Erythrozytenkonzentrat verdünnt und die CD4-Konzentration für die einzelnen Verdünnungsstufen bestimmt. Jede Verdünnungsstufe wurde dreimal gemessen. Die Regression zeigt mit $r = 0,999$ eine sehr gute Korrelation der Ergebnisse.

Die Daten der CD8-Verdünnungsreihe wurden graphisch analog zu den CD4-Messergebnissen dargestellt. Für die einzelnen Verdünnungsstufen ergaben sich bei der Dreifachzählung größere Streuungen als bei der CD4-Messreihe.

In diesem Experiment lässt sich ein Regressionskoeffizient von $r = 0,994$ berechnen.

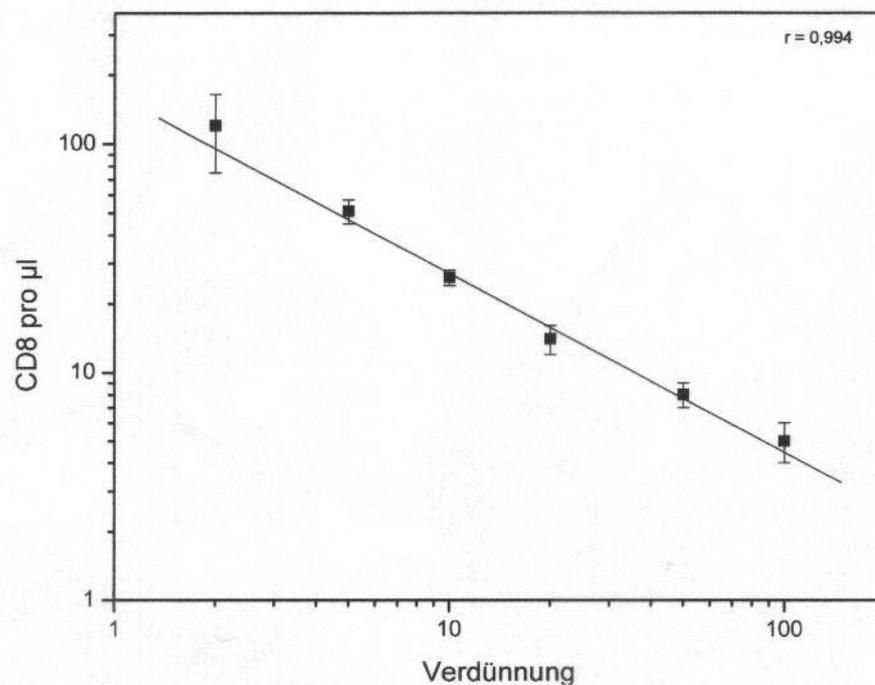


Abbildung 10: Verdünnungsreihe CD8 aus Vollblut in gefiltertem Erythrozytenkonzentrat.

Analog zu der CD4-Verdünnungsreihe wurde eine Vollblutprobe in kompatiblem Erythrozytenkonzentrat seriell verdünnt und die CD8-Werte für jede Verdünnungsstufe in drei Einzelmessungen bestimmt. Die Berechnung des Regressionskoeffizienten ergab den Wert $r = 0,994$.

3.1.3 Bestimmung des Messfehlers

Der statistische Fehler wurde in 20 Einzelmessungen aus getrennten Ansätzen ermittelt. Dazu wurde Vollblut in gefiltertem Erythrozytenkonzentrat im Verhältnis 1:10 eingemischt und die CD4-Zellen mit dem Durchflusszytometer quantifiziert. Aufgrund der bekannten CD4-Zellzahl im Vollblut sollten sich theoretisch 61 CD4-positive Zellen pro Mikroliter in diesem Gemisch befinden. Nach der Zählung der Probenansätze wur-

den Intervalle mit drei Zellen Differenz (z.B. 53-55, 56-58, usw.) festgelegt, solchen Intervallen zugeordnet und schließlich in einer Gaußverteilung dargestellt.

Acht der zwanzig Einzelmessungen fielen in das Intervall von 65-67 Zellen/ μl , weitere fünf Messergebnisse in das Intervall von 62-64 Zellen/ μl und drei Messergebnisse in das Intervall von 68-70 Zellen und je zwei in die Intervalle von 56-58 und 59-61 CD4-positiven Lymphozyten pro Mikroliter Vollblut.

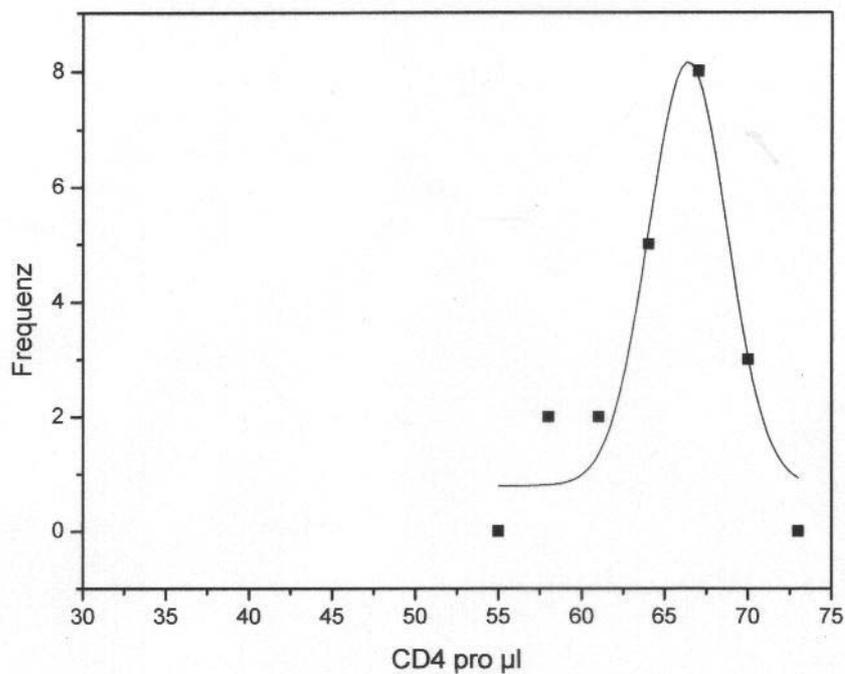


Abbildung 11: Gaußverteilung aus CD4-Einzelmessungen.

Das Probenmaterial stammt aus Vollblut, das in kompatibelem, gefiltertem Erythrozytenkonzentrat 1:10 verdünnt wurde. Die CD4-Werte wurden in 20 getrennt voneinander angesetzten Proben bestimmt in Gruppen mit einem Intervall von drei Zellen eingeteilt und in Form einer Gaußverteilung aufgetragen. Der aus der Messung des Vollblutes zu Grunde liegende theoretische Mittelwert liegt bei 61 Zellen/ μl .

3.2 Ergebnisse der Hauptversuche

Nachdem die angewendete Messmethode in den Vorversuchen sich als präzise und genau erwiesen hatte, wurden Proben von gesunden Spendern und von Patienten nach einer Immunsuppression zur Vorbereitung auf eine Stammzelltransplantation auf ihren CD3-, CD4- und CD8-Gehalt untersucht. Die gleichen Proben wurden sowohl unter standardisierten Laborbedingungen gemessen als auch in dem mobilen Labor mit nur bedingt standardisierbaren Bedingungen. In Gestalt und Aussehen der Histogramme ergaben sich keine Unterschiede.

3.2.1 Messung der CD3-positiven T-Lymphozyten

Das für die Zählung der CD4-T-Zellen in Multi- und Single-Centerstudien validierte Protokoll ohne Erythrozytenlyse wurde für die Konzentrationsbestimmung der CD3-positiven T-Lymphozyten eingesetzt. Jede Probe wurde dreimal im Labor unter Standardbedingungen gezählt anschließend weitere dreimal in dem mobilen Labor. Die Mittelwerte der Einzelmessungen jeder Probe sind graphisch in Form einer Regressionsanalyse wiedergegeben, bei der die Werte, die unter mobilen Bedingungen gemessen wurden auf der y-Achse aufgetragen und mit den Laborwerten auf der x-Achse korreliert wurden. Für die ermittelten Datenpunkte wurde eine Regressionsgerade berechnet, die mit $y = mx + b$ beschrieben werden kann. Der Regressionskoeffizient beträgt $r = 0,986$ und die Signifikanz $p = 0,369$ im zweiseitig gepaarten t-Test.

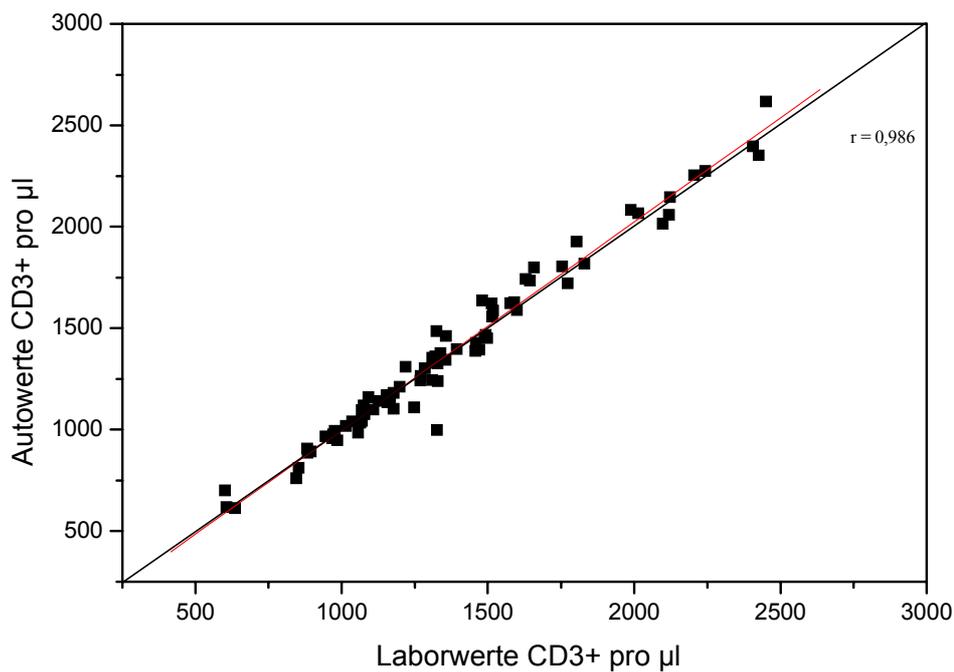


Abbildung 12: Regressionsanalyse für die CD3-Lymphozyten der Normalprobanden.

Der Korrelationskoeffizient entspricht $r = 0,986$.

Dieselben Werte wurden für eine Bland-Altman Analyse eingesetzt, um die Übereinstimmung der Methoden zu zeigen.

Bei dieser Form der graphischen Auswertung werden die Mittelwerte der CD3-, CD4- und CD8-positiven Lymphozyten gegenüber der Differenz der Zählungen Auto (mobiles Labor) und Labor (standardisiertes Labor) dargestellt.

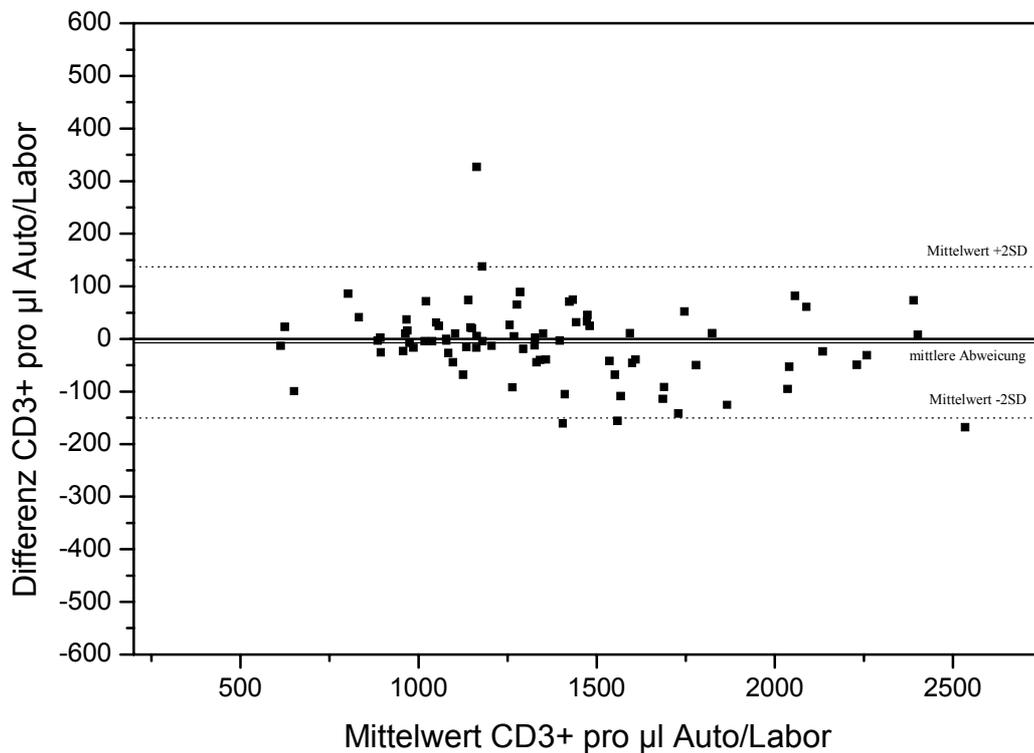


Abbildung 13: Bland-Altman-Plot für CD3-Lymphozyten der Normalprobanden.

Auf der Ordinate finden sich die Differenz der Mittelwerte aller unter mobilen und standardisierten Bedingungen gemessenen CD3-Zählungen. Sie ist als Parallele zur Abszisse abgebildet und als mittlere Abweichung betitelt. Im Idealfall sollte dieser Wert mit der Nulllinie übereinstimmen. Außerdem angegeben wird die mittlere, zweifache Standardabweichung im Intervall von -2 SD bis +2 SD im Diagramm als gestrichelte Linien parallel zur x-Achse. Bei den CD3-Lymphozyten liegen die CD3-Werte der überprüften Normalprobanden zwischen 812 und 2618 Zellen pro Mikroliter Vollblut. Die mittlere Abweichung beträgt -7 CD3-Zellen pro Mikroliter Vollblut, die mittlere zweifache Standardabweichung 144 Zellen pro Mikroliter und das sich daraus ergebende Intervall liegt zwischen $+137$ und -151 .

Die Konzentrationsbestimmung der CD3-Zellzahlen der Leukozyten-reduzierten Spenderproben erfolgte nach demselben Protokoll.

Die strikt getrennte Auswertung soll einen exakten Abgleich der beiden Einzelwerte (mobiles und standardisiertes Labor) in den unterschiedlichen Konzentrationsbereichen (niedrige und hohe Werte) zulassen.

Die Regressionsanalyse für die CD3-Werte der Leukozyten-reduzierten Spenderproben ergibt einen Korrelationskoeffizienten nach Pearson von $r = 0,998$ und eine Signifikanz von $p = 0,190$.

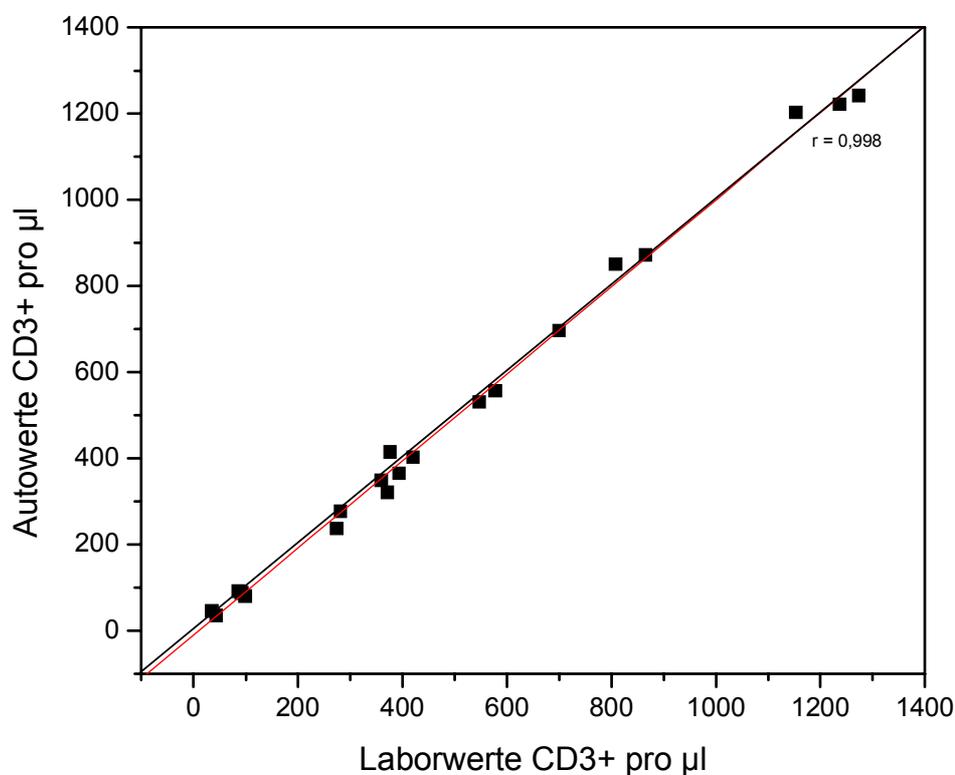


Abbildung 14: Regressionsanalyse für die CD3-Lymphozyten der Leukozyten-reduzierten Probandenproben.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson wurde mit $r = 0,998$ berechnet.

Auch die Erstellung des Bland-Altman-Plots für die CD3-Werte der Leukozyten-reduzierten Spenderproben erfolgte in analoger Weise zu den Normalprobanden.

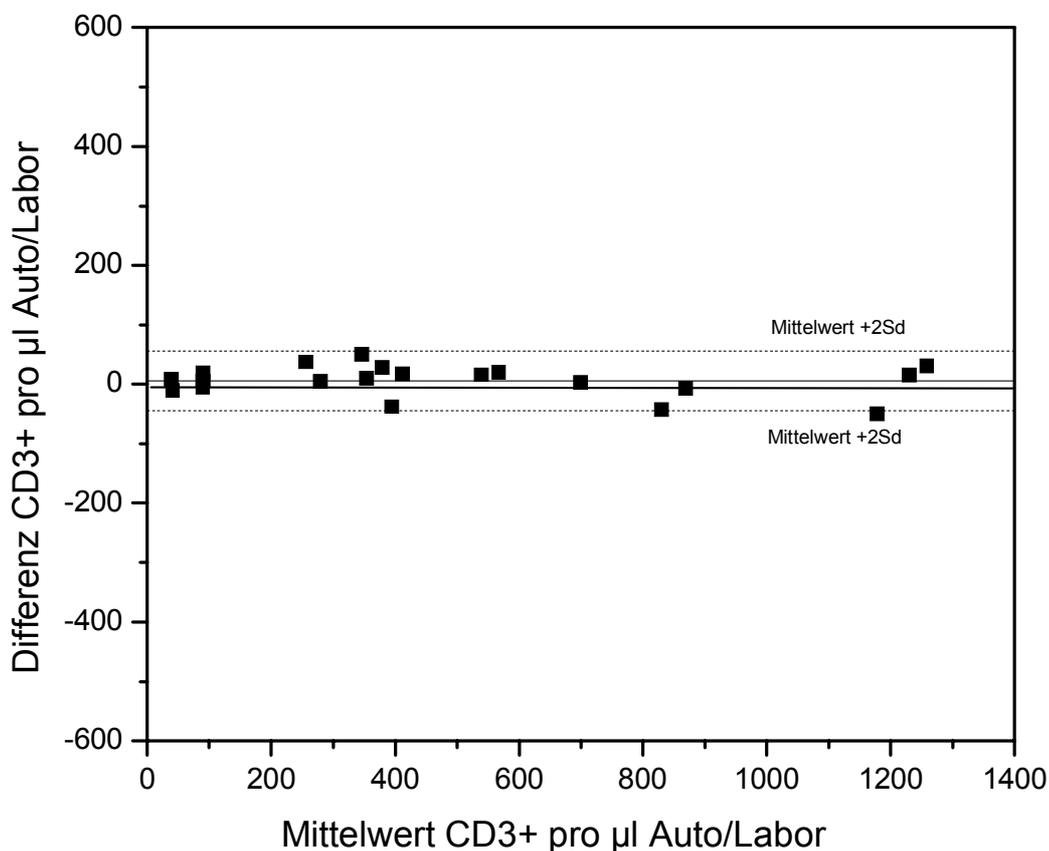


Abbildung 15: Bland-Altman-Analyse für die CD3-Lymphozyten der Leukozyten-reduzierten Probandenproben.

Die mittlere Abweichung der Messwerte beträgt 5 und die sich daraus errechnete zweifache Standardabweichung 50, so dass sich ein Intervall zwischen -45 und +55 ergibt.

3.2.2 Messung der CD4-positiven T-Lymphozyten

Das Verfahrensprotokoll ohne Erythrozytenlyse, wie es auch bei der Bestimmung der CD3-Lymphozyten angewendet wurde, ist für die Zählung der CD4-Lymphozyten bereits mehrfach validiert und in Multicenterstudien evaluiert worden, so dass die Auswertung mit besonderem Augenmerk auf den Vergleich zwischen dem mobilen und

dem standardisierten Labor erfolgen kann. Die Verfahrensweise wurde analog zu der Bestimmung der CD3-Lymphozyten gewählt und auch bei allen noch folgenden Ausführungen beibehalten. Es wurden wiederum die beiden unterschiedlichen Konzentrationsbereiche getrennt voneinander ausgewertet.

In der Regressionsanalyse der Normalprobanden konnte ein Korrelationskoeffizient $r = 0,984$ und im zweiseitig gepaarten t-Test eine Signifikanz von $p = 0,657$ berechnet werden.

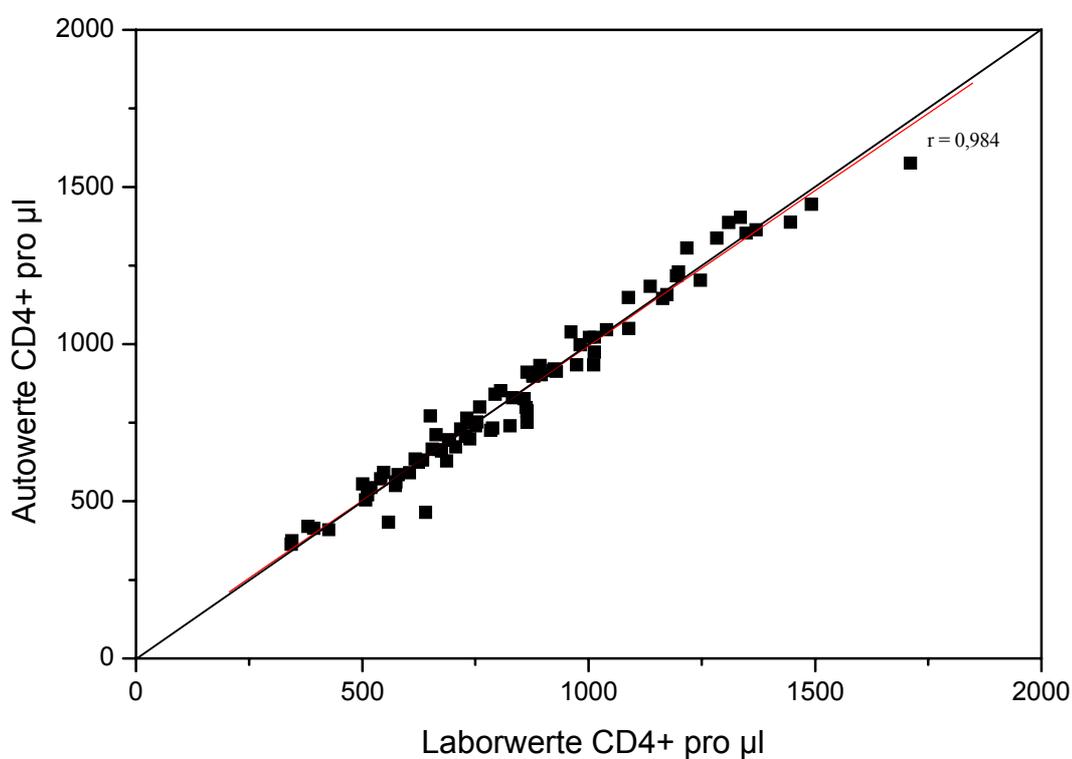


Abbildung 16: Regressionsanalyse für die CD4-Lymphozyten der Normalprobanden.

Der Korrelationskoeffizient liegt bei $r = 0,984$.

Die Bland-Altman-Analyse für die CD4-Lymphozyten der Normalprobanden zeigt folgendes Ergebnis:

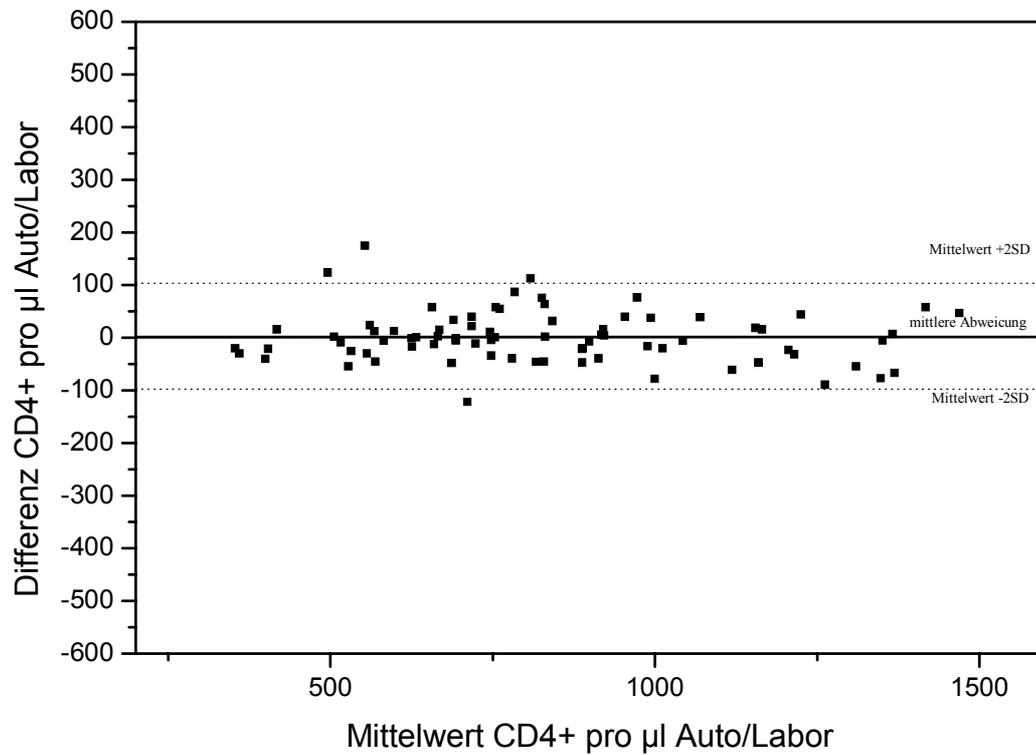


Abbildung 17: Bland-Altman-Plot für CD4-Lymphozyten der Normalprobanden.

Die mittlere Abweichung liegt bei +3 CD4+ Zellen pro Mikroliter, die mittlere, zweifache Standardabweichung beträgt 100 Zellen pro Mikroliter, so dass sich ein Intervall von -97 bis +103 ergibt.

Für den niedrigen Konzentrationsbereich ist das Verfahrensprotokoll für die CD4-Lymphozyten bereits mehrfach validiert und in Multicenterstudien evaluiert worden. Bei der Regressionsanalyse ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,996$ und eine Signifikanz von $p = 0,910$.

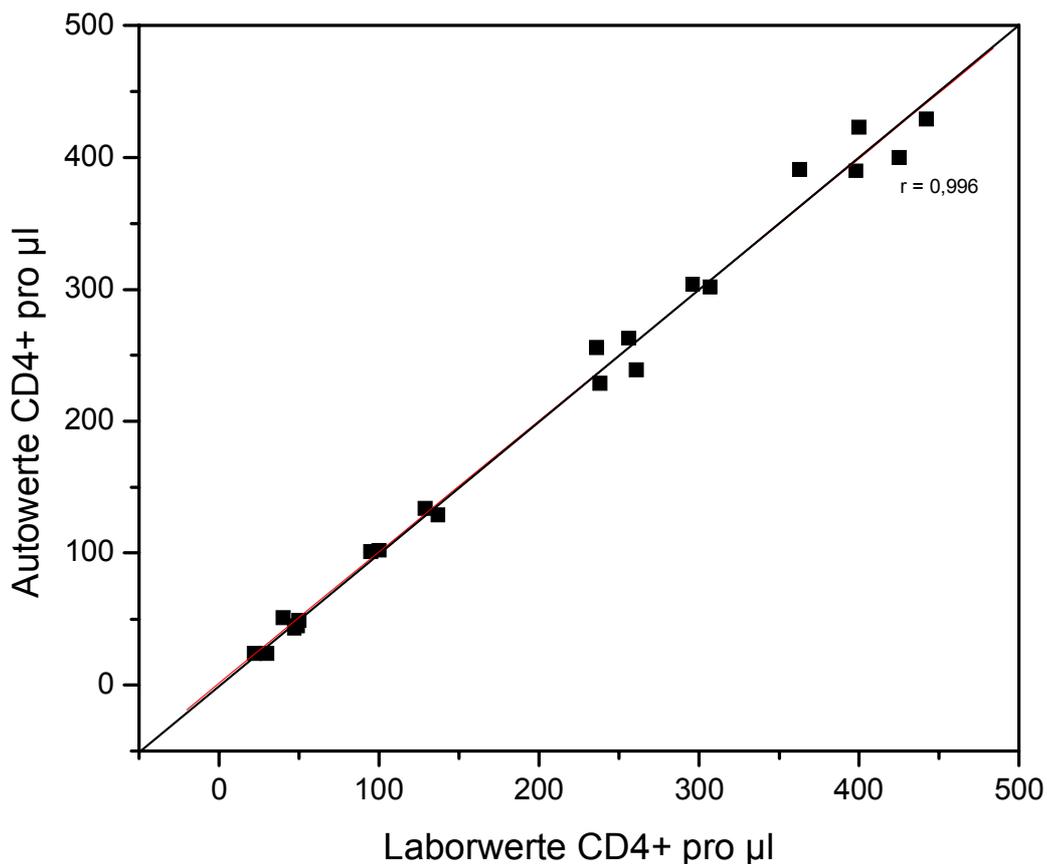


Abbildung 18: Regressionsanalyse für die CD4-Lymphozyten der Leukozyten-reduzierten Probandenproben.

Der lineare Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,996$.

Die Bland-Altman-Analyse für die CD4-Lymphozyten der Leukozyten-reduzierten Probanden sieht folgendermaßen aus:

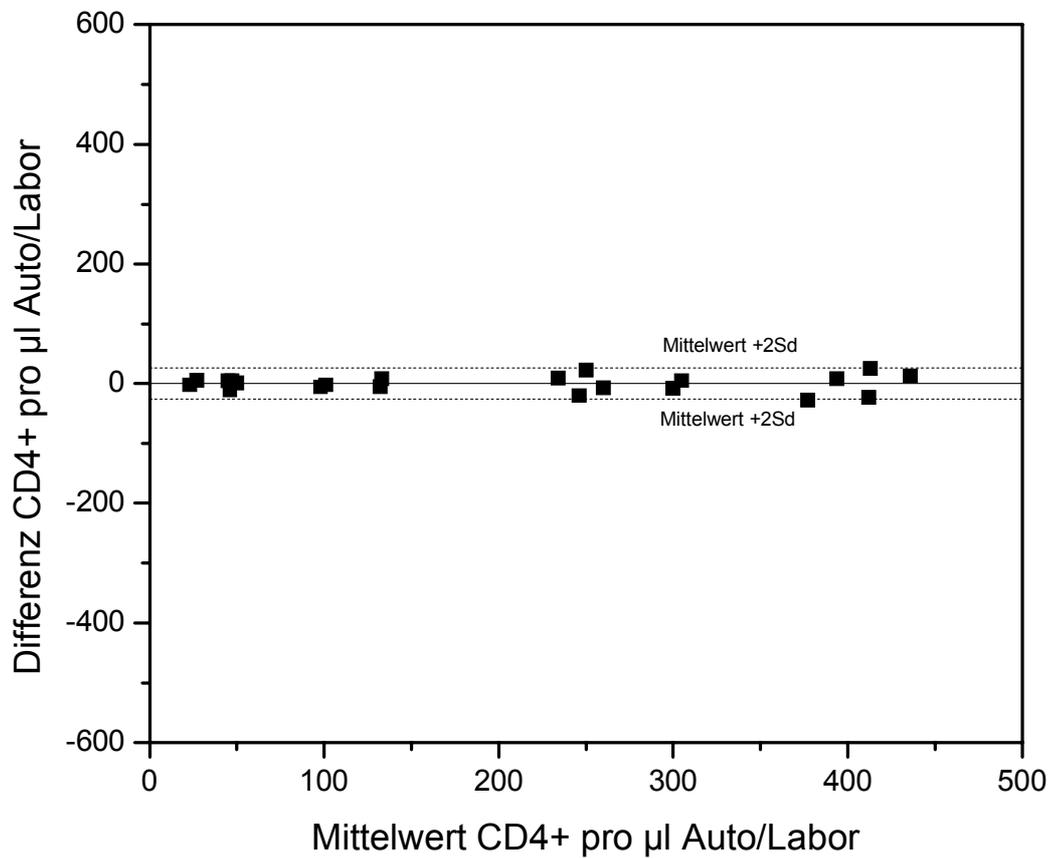


Abbildung 19: Bland-Altman-Analyse für die CD4-Lymphozyten der Leukozyten-reduzierten Probandenproben.

Die mittlere Abweichung ist bei Null eingezeichnet, die mittlere zweifache Standardabweichung beträgt 26. Somit ergibt sich ein Intervall von – 26 bis +26.

3.2.3 Messung der CD8-positiven T-Lymphozyten

Bei der Konzentrationsbestimmung der CD8-Lymphozyten ist in dieser Untersuchung erstmals das für die Zählung der CD4-Lymphozyten bereits existierende Protokoll ohne Erythrozytenlyse übernommen worden. Auch hier wurde jede Probe in getrennten Ansätzen für das mobile und das standardisierte Labor vorbereitet und dort jeweils dreimal gemessen, um die Vergleichbarkeit innerhalb der gesamten Untersuchung aufrecht zu erhalten.

Analog zur Auswertung der CD3- und CD4-Lymphozyten werden auch hier die beiden Konzentrationsbereiche getrennt in Form der Regressions- und Bland-Altman-Analyse dargestellt.

Für die Konzentrationsbestimmung der CD8-Lymphozyten der Normalprobanden ergibt die Regressionsanalyse einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,985$ und eine Signifikanz von $p = 0,331$.

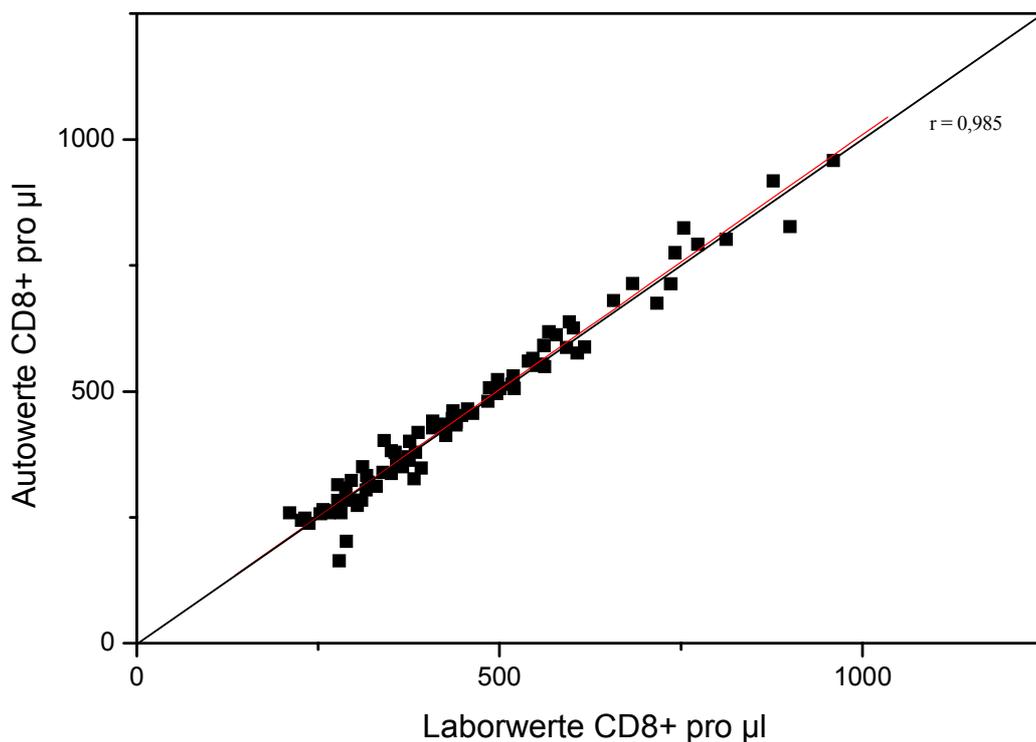


Abbildung 20: Regressionsanalyse für CD8-Lymphozyten der Normalprobanden.

Der Korrelationskoeffizient nimmt den Wert von $r = 0,985$ an.

Bei der Verwendung der Messwerte für die Bland-Altman-Darstellung ergibt sich folgendes Ergebnis:

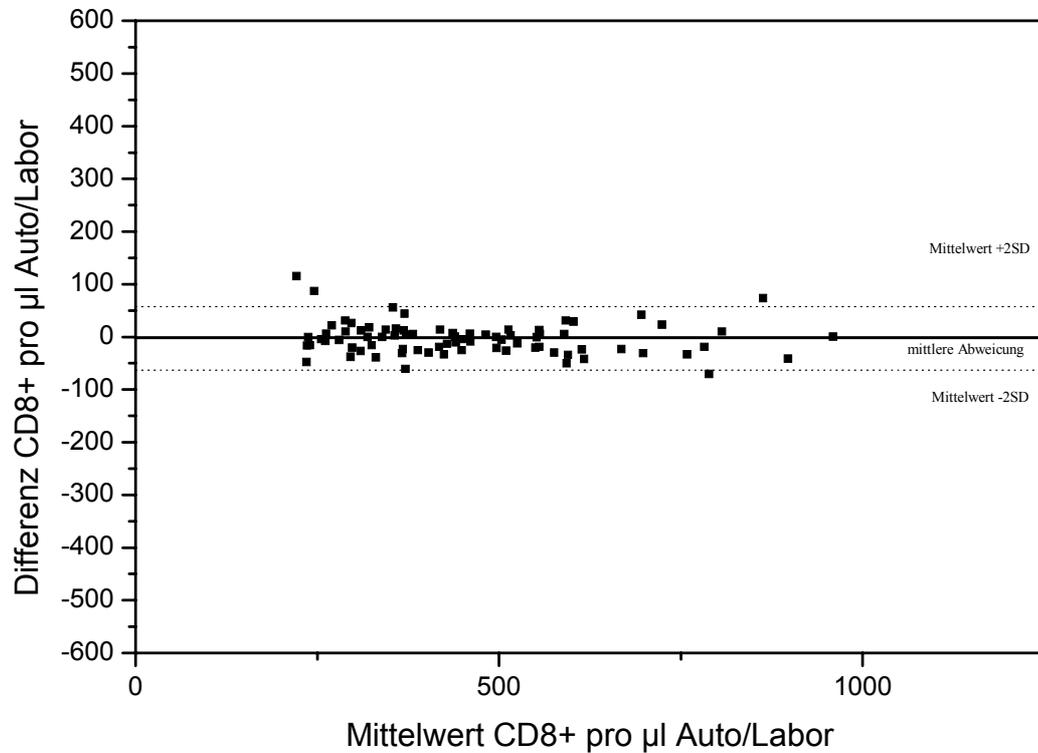


Abbildung 21: Bland-Altman-Plot für die CD8-Lymphozyten der Normalprobanden.

Die mittlere Abweichung liegt bei -3 CD8+ Zellen/ μ l, die mittlere zweifache Standardabweichung bei 60 Zellen pro Mikroliter, so dass sich ein Intervall von -63 bis +57 ergibt.

Die Quantifizierung der CD8-Lymphozyten für die Leukozyten-reduzierten Probanden ergibt in der Regressionsanalyse einen Korrelationskoeffizienten nach Pearson von $r = 0,997$ und eine Signifikanz von $p = 0,896$.

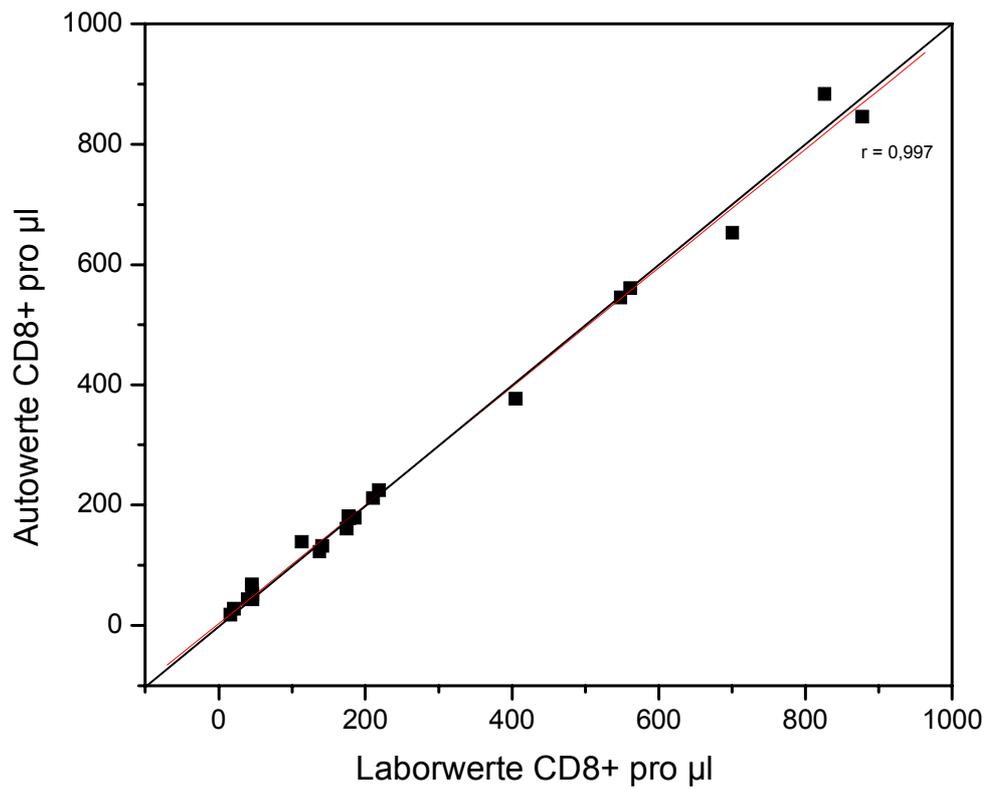


Abbildung 22: Regressionsanalyse für CD8-Lymphozyten der Leukozyten-reduzierten Probandenproben.

Der Korrelationskoeffizient ist mit $r = 0,997$ angegeben.

Diese Werte wurden ebenfalls zur Validierung der beiden Methoden für eine Bland-Altman-Analyse eingesetzt, die folgendes Ergebnis zeigt:

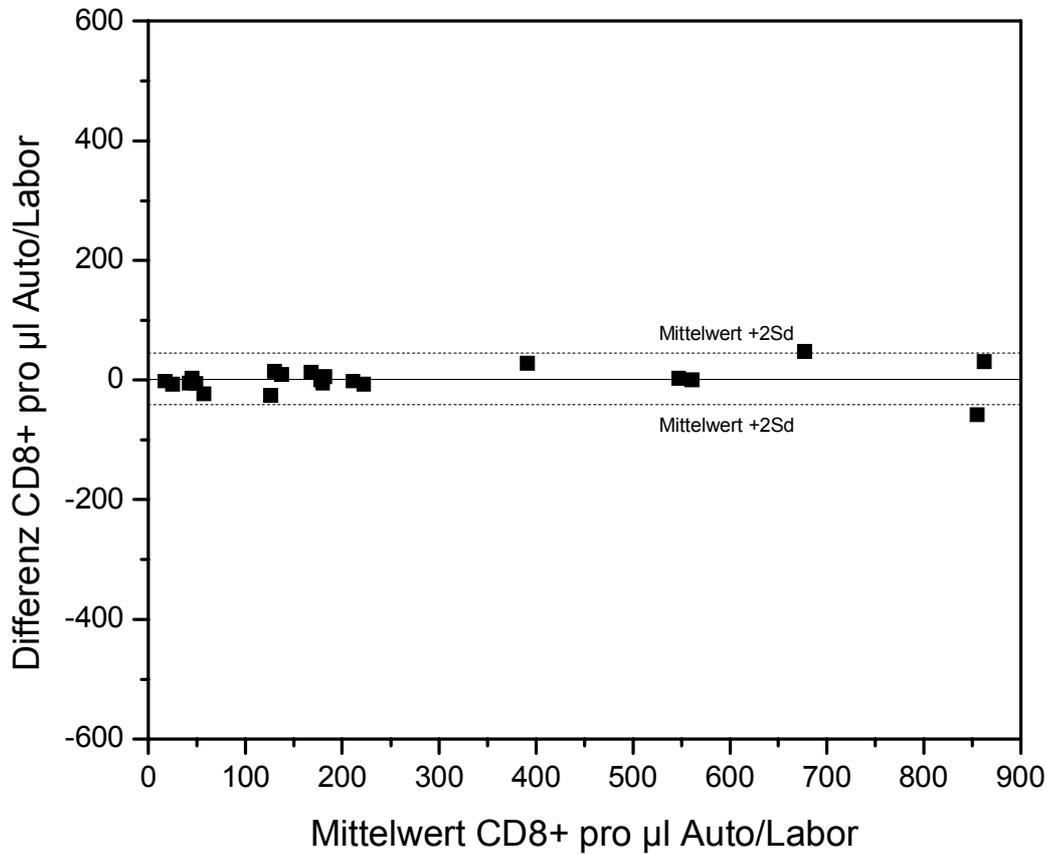


Abbildung 23: Bland-Altman-Analyse für die CD8-Lymphozyten der Leukozyten-reduzierten Probandenproben.

Die mittlere Abweichung beträgt 1 und die mittlere zweifache Standardabweichung 42, so dass sich das Intervall von -2 SD bis +2 SD in Zahlen von -41 bis +43 erstreckt.

Zusammenfassend ist zu den Analysen anzumerken, dass die Übereinstimmung der Messergebnisse für alle gezählten Lymphozytensubpopulationen im hohen und niedrigen Konzentrationsbereich als sehr positiv zu bewerten ist.

4 Diskussion

In den vergangenen Jahren hat die durchflusszytometrische Quantifizierung von Leukozytensubpopulationen große Fortschritte gemacht. In den Industrienationen verwendet man, weitgehend unabhängig von wirtschaftlichen Aspekten, die Multiparameteranalyse in Form der Mehrfarbenanalyse, die sich separater, unterschiedlich fluoreszierender Antikörper bedient (Janssen et al., 1999; Kutok et al., 1998; McCoy et al., 1994).

Diese auch als 2-Plattform-Methode bekannte Technik ist wegen des hohen apparativen Aufwands und der teuren Antikörper nicht ohne weiteres für jede Fragestellung, die die Bestimmung einzelner Lymphozytensubpopulationen erfordert, unter den zur Verfügung stehenden finanziellen Mitteln realisierbar.

Das in der Einleitung bereits ausführlich erläuterte Problem, das hinsichtlich der Infektionserkrankung HIV besonders in den wirtschaftlich schwachen Regionen der Erde zu Schwierigkeiten führt, hat in den Industrienationen die Verantwortung geweckt und finanzielle Hilfen bereit gestellt. Um diese Hilfen hinreichend nutzen zu können, müssen leistungsfähige Verfahren zur Diagnosestellung und Therapieüberwachung eingesetzt werden. Diese Vision, die durch die Weltgesundheitsorganisation mit der Gründung der „3 by 5“-Initiative Gestalt annahm, erfordert die Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen unter standardisierten und evaluierten, möglichst kosteneffizienten Bedingungen ohne besonders hoch qualifiziertes und geschultes Personal.

Einen Meilenstein stellte die Entwicklung des no-lyse, no-wash Protokolls dar, das ohne Reagenzien zur Erythrozytenlyse und daran anknüpfende Waschschriffe auskommt. Das Resultat dessen waren im Mittel etwa 10% höhere Werte für die Lymphozytensubpopulationen, da die Erythrozytenlyse stets auch mit messbaren Zellverlusten unter den Leukozyten einhergeht, wobei die tatsächliche Höhe des Zellverlusts von der jeweiligen Leukozytensubpopulation und der Empfindlichkeit des Individuums abhängt.

Das Phänomen der Zellverluste wird von einzelnen Autoren für die Quantifizierung sowohl von Leukozytensubpopulationen (Brando et al., 2000; Greve, Beller et al., 2003) als auch von Stammzellen beschrieben (Cassens et al., 1998; Greve, Beller et al., 2003).

Darüber hinaus wurde ein neues Auswertungsverfahren zur vereinfachten Zählung CD4-positiver Zellen entwickelt, das mit dem klassischen Verfahren (FACSCalibur) vergleichbar ist ($r = 0,961$) (Greve et al., 2003). Diese Entwicklung, die ohne Lysereagenzien und mit lediglich einem monoklonalen Antikörper in einem vereinfachten Auswertungsverfahren auskommt, ließ die Kosten pro Messung von 30 € auf 2 € fallen. Ebenso ist in der hier beschriebenen Untersuchung versucht worden, das bereits für die Messung von CD4-positiven Lymphozyten existierende no-lyse, no-wash Protokoll auf die CD3- und CD8-positiven Lymphozyten zu übertragen, um weitere Möglichkeiten in der Therapieüberwachung HIV-infizierter Patienten zu eröffnen. Dieses Testverfahren kann auch für andere Fragestellungen eingesetzt werden. Darunter fallen etwa Zusatzinformationen bei der Leukämie und anderen Lymphozytenproliferationsstörungen, die häufig bei Kindern und jungen Erwachsenen nach Organtransplantationen beobachtet werden (LeVasseur et al., 2003) oder bei kindlichen immunologischen und nicht-immunologischen Schilddrüsenerkrankungen, bei denen man Veränderungen unter den B(CD19)- und T(CD3)-Lymphozyten, den T-Lymphozyten die CD4- und CD8-positiven Lymphozyten in ihrer naiven Form (CD45RA) und die Gedächtnisform (CD45RO) festgestellt hat (Bossowski et al., 2003).

Es ist denkbar, dass die Kosten-effektiveren Verfahren ohne die Erythrozytenlyse in den nächsten Jahren sicherlich auch dort Einzug nehmen werden.

Diese Entwicklung ist in den vorausgegangenen Kapiteln dieser Untersuchung als Konzept vorgestellt worden, das besonders den Anforderungen der Entwicklungsländer zur Bewältigung des bestehenden HIV/AIDS-Problems gerecht werden soll und das es im Folgenden zu diskutieren gilt.

Als im Jahre 1969 erstmals die Computer-unterstützte multiparametrische Durchflusszytrophotometrie von Dittrich und Göhde (Dittrich et al., 1969) vorgestellt und mittlerweile auf etliche Bereiche der klinischen Zelldiagnostik ausgedehnt wurde (Valet, 2003), ist der Grundstein für die volumetrische Zähltechnik gelegt worden. Diese eignet sich für die Quantifizierung verschiedenster Zellen, sofern diese mit geeigneten Antikörpern immunologisch markiert sind. Die konventionellen großen Durchflusszytrophotometer erlauben die einzeitige Zählung mehrerer Zelltypen in einem Durchlauf.

Um den unschätzbaren Stellenwert der CD4- und CD8-Zellzählung auch in armen Ländern in der HIV-Therapie und dem Monitoring auszunutzen, bedarf es der Bereitstellung geeigneter Analysegeräte. Dabei ist zu bedenken, dass die Durchflusszytometer in den ärmeren Ländern bislang die identische hochspezialisierte Technik aufweisen wie in den modernen Industrieländern. Das hat zur Konsequenz, dass beispielsweise in Afrika zwar 100 Geräte genutzt werden, was aber angesichts der Größe des Kontinents eine schwindend geringe Dichte darstellt. Außerdem sind nur wenige der Geräte in privaten Laboratorien zu finden, so dass die Untersuchungen nicht bezahlbar sind und für den Mammutanteil der von HIV/AIDS betroffenen Bevölkerung nicht zur Verfügung stehen.

Ein weiteres Problem stellen die allgemeinen Laborbedingungen in diesen Ländern dar. So sind dort etwa eine gesicherte gleich bleibende Netzstromversorgung und auch durch Klimaanlage gefilterte staubfreie Luft keineswegs Standard. Die hochspezialisierten Geräte konnten den Betriebsbedingungen nicht standhalten, so dass sich Defekte häuften. Das aber wohl unumstritten größte Problem ist wirtschaftlicher und finanzieller Art, da die hohen Anschaffungs- und Betriebskosten für den flächendeckenden Gebrauch nicht aufzubringen sind.

Es geht also darum, für die Regionen mit hoher HIV-Prävalenz robuste und preisgünstige Analyseverfahren anzubieten. Dabei kommt es vor allem darauf an, dass die Nutzbarkeit der Geräte sich einzig und allein auf die Diagnose und Therapie der dort am meisten verbreiteten Erkrankung HIV/AIDS beschränkt. Die gleichzeitige Nutzbarkeit für wissenschaftliche Zwecke und Forschung mit ihren vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten ist sekundär.

Nachdem man diese Tatsachen erkannt hatte, etablierten zahlreiche Firmen Methoden und Technologien, die auf diese Anforderungen abgestimmt waren.

So ist beispielsweise das Verfahren mit dem FACSCount®-Gerät zu nennen, welches eine kompaktere Variante des FACSCalibur® darstellt. Die Quantifizierung der CD4- und CD8-positiven Lymphozyten erfolgt dabei auch ohne Erythrozytenlyse, aber mit einem auf der Bead-Methode (Zugabe von fluoreszierenden Mikropartikeln bekannter Konzentration) basierendem Verfahren, das den Quotienten CD3/CD4 und CD3/CD8 misst.

Ein weiteres Gerät, das CyFlow®, wird diesen Anforderungen ebenfalls gerecht, indem es die Lymphozytensubpopulationen kostengünstig quantifiziert und robust genug konstruiert ist, um den Witterungsbedingungen standzuhalten. Seine besonders flexiblen Einsatzmöglichkeiten verdankt es der Tatsache, dass es mit jedem PC, der die Flowmax Software aufweist, kompatibel ist.

Der in dieser Arbeit evaluierte CyFlow Counter® ist eine Weiterentwicklung des CyFlow®, dessen PC wegfällt, da die Betriebssoftware direkt in das Gerät integriert ist und folglich der portable Charakter noch erhöht werden konnte. Dadurch erweitert sich die Einsatzmöglichkeit auf Räume, die mit den Gegebenheiten von Speziallaboren kaum noch etwas gemeinsam haben müssen, wie hier in der absolut flexiblen Variante mit dem CyLab® demonstriert wurde.

Dieser weitere Schritt ist technisch vor allem durch die interne Laserdiode möglich geworden, die nicht vorgeschaltet und mit Luft gekühlt werden muss, und die „align-free“ Optik, durch die das Gerät nicht täglich über spezielle Kalibrierungsbeads adjustiert werden muss.

Dadurch lassen sich Service- und Unterhaltungskosten des Geräts beträchtlich senken. Auch die Materialkosten liegen nach den Angaben des Herstellers lediglich bei der Hälfte eines konventionell einsetzbaren Durchflusszytometers.

Die Bestimmung der CD4⁺-Lymphozyten mit lediglich einem Antikörper geht auf Janossy et al. im Jahr 2001 zurück. Der verwendete Antikörper war mit dem Farbstoff R-Phycoerythrin markiert und konnte mit einem Laser, dessen Lichtspektrum im unteren Bereich des sichtbaren Lichtspektrums (grün bis rot) lag, detektiert werden.

Im Gegensatz zur „Double Plattform Methode“, bei der stets ein Durchflusszytometer und ein Hämatologiecounter benötigt werden, und der auf Beads basierenden „Single Plattform Methode“ des FACSCount lassen sich Präparations- und Verfahrensinmanente Ungenauigkeiten auf ein Minimum reduzieren.

Eine Zwei-Plattform-Methode birgt den Nachteil, dass allein durch den Einsatz zweier unterschiedlicher Analysegeräte eine potentielle Fehlerquelle gegeben ist. Zudem muss das Personal für die Bedienung beider Geräte ausgebildet sein.

Höhere Kosten entstehen durch die Anschaffung, Unterhaltung und Instandhaltung zweier Geräte, sowie dem größeren Arbeitsaufwand des Personals und der Notwendig-

keit mindestens eines zusätzlichen monoklonalen Antikörpers (CD45) für jede Probe (Janossy et al., 2000).

Nachteile im Vergleich mit der auf Beads basierenden „Single Plattform Methode“ bestehen darin, dass es durch die unvorhersehbare Verklumpung der Beads zu Artefakten kommen kann (Brando et al., 2001) und im höheren Preis. Die Kosten einer Analyse mit dem FACSCount® betragen zwischen 20-25 US \$ (Crowe et al., 2003).

Alternativ zu den durchflusszytometrischen Methoden existieren auch Möglichkeiten, die Lymphozytensubpopulationen auf andere Weise zu bestimmen. Einige dieser Verfahren sind in der Einleitung beschrieben worden, wobei auch auf die Widersprüche hinsichtlich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit eingegangen wurde.

Darüber hinaus ist zu diesen Verfahren anzumerken, dass die Proben nach der Vorbereitung nur sehr begrenzt zu lagern sind und sich damit die Praktikabilität deutlich reduziert.

Im Falle des „Coulter Manual CD4 Count kit“-Protokolls ist jeder Probenansatz für lediglich 15 Minuten nach Beenden der Präparation stabil, so dass maximal zwei Proben gleichzeitig von einem Laboranten bearbeitet werden können.

Bei der „Dynabeads“-Methode müssen die Proben innerhalb einer Stunde nach dem Zufügen des Lysereagens weiterverarbeitet werden. Dabei beträgt die maximale Anzahl, die ein Laborant gleichzeitig bearbeiten kann, sechs Proben.

Der Einsatzbereich dieser Verfahren wird daher für Laboratorien mit einem geringen Probenaufkommen empfohlen (Crowe et al., 2003).

Die Capcellia-Methode ist in einigen Laboren bereits etabliert, weil der dazu erforderliche ELISA-Reader dort bereits vorhanden ist. Jedoch ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht gesichert und den durchflusszytometrischen Verfahren unterlegen (Diagbouga et al., 1999).

Da es aber zunächst darum geht, das Ziel der Weltgesundheitsorganisation – im Jahre 2005 drei Millionen an HIV erkrankte Menschen zu behandeln („3 by 5“- Initiative) - zu erreichen, wird schnell klar, dass die nicht auf der Durchflusszytometrie beruhenden Techniken nicht praktikabel sind und somit praktisch ausscheiden, vor allem, wenn man sich nochmals die Zahlen von 40 Millionen HIV-Erkrankten weltweit und

etwa 3,5 Millionen Neuinfektionen pro Jahr vor Augen führt, wobei die Tendenz keineswegs rückläufig ist.

Die Hauptkritik an der durchflusszytometrischen CD4-Zählung bestand darin, dass die Anschaffungskosten zu hoch und die Probenaufbereitung zu komplex sind, so dass geschultes Personal benötigt wird.

Der CyFlow Counter® stellt derzeit auf dem Markt das kosteneffektivste Gerät dar.

Nach einer kurzen Einarbeitungszeit des Personals von 1-2 Tagen könnten nach unserer Erfahrung von zwei Laboranten pro Stunde 60 Proben quantifiziert werden, so dass sich bei einer Betriebszeit von acht Stunden die Anzahl auf 480 Proben pro Gerät summieren lässt.

Das Problem der Probenlagerung nach der Aufbereitung, wie es bezüglich der manuellen Methoden skizziert wurde, ist bei dem verwendeten Protokoll nicht aufgetreten. Bei Einhaltung des Zeitfensters von sechs Stunden zwischen Blutentnahme und Probenpräparation ist eine Lagerung über Stunden problemlos möglich.

Zu den CD4-, CD8-Messungen und denen des Verhältnisses von CD4/CD8 zur HIV-Therapieüberwachung lässt sich feststellen, dass sie ebenso wie die Messung der Viruslast, die zusammen mit der CD4-Zählung in den Industrienationen der Standard sind, auch für Entwicklungsländer das Optimum für die medizinische Versorgung darstellen.

In dieser Untersuchung wurden identische Vollblutproben vergleichsweise gemessen unter den üblichen Laborbedingungen und solchen, die ein denkbares mobiles Konzept für die ärmeren Länder darstellen. Dabei wurden bei jeder Probe die CD3-, CD4- und CD8-Werte jeweils in einer Gruppe von gesunden und einer weiteren Gruppe von erkrankten Patienten getrennt quantifiziert und unabhängig voneinander ausgewertet, um aussagekräftige Ergebnisse für unterschiedliche Konzentrationsbereiche zu erlangen.

Bei der erstmalig nach dem no-lyse, no-wash-Verfahren durchgeführte Quantifizierung der CD3-positiven Lymphozyten stellte sich heraus, dass diese Zellpopulation in den Histogrammen sehr gut von den übrigen in der Suspension enthaltenen Zellen und dem Debris abzugrenzen ist, was zum einen auf eine gute Fluoreszenzausbeute der markier-

ten Zellen schließen lässt und die Kompatibilität der Antikörper und des Analysegerätes unterstreicht (Abbildung 5).

Hinsichtlich der Vergleichsmessungen zeichnet sich in der Gruppe der Normalprobanden eine Konzentration der Messwerte um die mittlere Abweichung ab. In der Bland-Altman-Darstellung liegen vier Wertepaare außerhalb des Intervalls der zweifachen Standardabweichung (Abbildung 13). In der Regressionsanalyse zeigt sich eine gute Korrelation der Wertepaare (Abbildung 12), die statistisch durch die Signifikanz von $p = 0,369$ bestätigt wird. Dieser Wert weist auf einen zufälligen Unterschied der Wertepaare hin, der aber nicht auf die verwendete Methode zurückzuführen ist.

Aus der graphischen Darstellung der Messwerte der leukozytenreduzierten Spender in Form der Regressionsanalyse lässt sich keine systematische Abweichung der Werte feststellen (Abbildung 14). Eine Begründung der Abweichungen zwischen einzelnen Messungen ist nicht in der verwendeten Methodik zu suchen, sondern auch hier zufallsbedingt, wie es auch die Signifikanz von $p = 0,190$ im zweiseitig gepaarten t-Test belegt. In der Bland-Altman-Darstellung lagen alle Wertepaare im vorgegebenen Intervall von -2 SD bis $+2$ SD (Abbildung 15).

Bei den CD4-Lymphozyten der Normalprobanden lässt sich anhand der Verteilung der Wertepaare in der Regressionsanalyse, anders als bei den CD3-Lymphozyten, keine systematische Abweichung der Werte feststellen, so dass es sich hier lediglich um Abweichungen zwischen einzelnen Messungen handeln kann, die aber nicht auf die verwendete Methode zurückzuführen sind, was sich auch durch die Signifikanz von $p = 0,657$ bestätigt (Abbildung 16). Auch in der Bland-Altman-Darstellung wird deutlich, dass sich der überwiegende Anteil der Wertepaare um die mittlere Abweichung konzentriert. Vier Wertepaare liegen außerhalb des Intervalls von -2 SD bis $+2$ SD (Abbildung 17).

Bei den CD4-Werten der leukozytenreduzierten Spender ist die Regressionsanalyse dahingehend zu interpretieren, dass die aus zwei Werten gebildeten Paare eine sehr gute Korrelation erkennen lassen (Abbildung 18), dies wird zusätzlich durch die Signifikanz

$p = 0,910$ untermauert. In dem Bland-Altman-Plot sind alle Wertepaare in dem Intervall von -2 SD bis $+2$ SD wieder zu finden (Abbildung 19).

Die Verteilung der CD8-Werte in der Gruppe der Normalprobanden in Relation zur Regressionsgeraden ist analog zu den Werten der CD4-Lymphozyten. Die Abweichungen beziehen sich auf vereinzelte Messungen, ohne dass sich eine Systematik erkennen lässt (Abbildung 20).

Dies bestätigt die Signifikanz $p = 0,331$. In der Bland-Altman-Darstellung ist die Konzentration der Wertepaare um die mittlere Abweichung sehr stark. Lediglich drei Wertepaare liegen außerhalb des Intervalls von -2 SD bis $+2$ SD (Abbildung 21).

Bei den leukozytenreduzierten Spendern ist in der Regressionsanalyse zu erkennen, dass sich eine sehr dezente Tendenz für höhere Werte unter mobilen als unter standardisierten Bedingungen abzeichnet (Abbildung 22), wobei die ermittelte Signifikanz $p = 0,896$ auf eine zufällige und nicht methodenimmanente Abweichung zwischen den Werten unter standardisierten und mobilen Bedingungen hindeutet. Der Bland-Altman-Darstellung ist zu entnehmen, dass sich mit einer Ausnahme alle Wertepaare in dem Intervall von -2 SD bis $+2$ SD wieder finden (Abbildung 23).

Bezüglich der Versuchsergebnisse muss abschließend noch erwähnt werden, dass die vorliegenden Ergebnisse trotz der Anwendung des reversen Pipettierens den üblichen Pipettierungenauigkeiten unterliegen. Aus der experimentellen Beurteilung der Vorversuche ergab sich, dass die Varianz der Zellzahlen bei einer zehnmal angesetzten Probe bei 5,4% und in absoluten Zahlen bei 36 Zellen/ μl lag. Diese Ungenauigkeiten haben im Therapiemonitoring von HIV/AIDS keine therapeutische Relevanz (Abbildung 8). Auch die bezüglich der CD4- und CD8-positiven Lymphozyten angefertigten Verdünnungsreihen ergaben mit Korrelationskoeffizienten von $r = 0,999$ für CD4- und $r = 0,994$ für CD8-positve Lymphozyten über den gesamten relevanten Konzentrationsbereich gute Messergebnisse (Abbildung 9, Abbildung 10). Eine besonders starke Streuung wurde bei der CD8-Verdünnungsstufe 1:100 gefunden, bei der sich allerdings mit einem Absolutwert von 5 Zellen pro Mikroliter kleine Abweichungen vom Mittelwert stark bemerkbar machten. Bei der Bestimmung des Messfehlers durch die Gaußverteilung lag das Ma-

ximum im Intervall von 65 bis 67 Zellen/ μ l, wobei aus der Messung der Vollblutprobe und der Beachtung der entsprechenden Verdünnungsstufe ein Mittelwert von 61 Zellen/ μ l angenommen wurde (Abbildung 11). Diese Diskrepanz kann durch einen Pipettierfehler beim Ansetzen der Vollblutprobe entstanden sein, die ebenso den statistischen Schwankungen unterliegt. Im ungünstigeren Fall lag ein systematischer Fehler zugrunde, worauf es aber bei allen anderen durchgeführten Messungen keinen Hinweis gibt. Da die Ungenauigkeiten im Bereich von wenigen Zellen pro Mikroliter liegen, hat dies keine diagnostischen und therapeutischen Auswirkungen für das Krankheitsbild HIV/AIDS.

Eine weitere untergeordnete Fehlerquelle ist die zwischen den Messungen verstrichene Zeit.

Hinsichtlich der Fragestellung, wann eine HIV-Therapie begonnen werden soll, sind diese Ungenauigkeiten aber nicht entscheidend, weil inzwischen Einigkeit darüber besteht, dass dies nicht ab einer fest definierten CD4-Zellzahl, sondern innerhalb eines Übergangsbereiches (< 350 CD4-Zellen/ μ l) erfolgen soll.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dahingehend zu interpretieren, dass die Korrelation der Messwerte der untersuchten Lymphozytensubpopulationen sowohl im Bereich hoher Zellkonzentration bei gesunden Probanden, als auch in einem niedrigen Konzentrationsbereich von HIV/AIDS-Patienten sehr gut ist.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen sind in erster Linie durch das zweizeitige Ansetzen der Proben begründet, was die individuellen Abweichungen einzelner Wertepaare unterstreichen. Die gewählten statistischen Auswertungsverfahren sprechen auch eher für einzelne zufällige Abweichungen.

Folglich ergibt die Evaluation der beiden unterschiedlichen Laboranordnungen, dass die mit besonderem Augenmerk betrachtete mobile Methode zur Konzentrationsbestimmung der Lymphozytensubpopulationen CD3, CD4 und CD8 derjenigen eines klassischen standardisierten Labors gleichwertig ist und eine Anwendung in den abgelegenen Regionen der Entwicklungsländer somit befürwortet werden kann.

Auch der hier erstmalig unternommene Versuch, neben den CD4-positiven Lymphozyten auch die CD3- und CD8-positiven Lymphozyten mit dem Zeit- und Kosten einsparenden no-lyse, no-wash-Verfahren zu bestimmen, ist durch die sehr gute Detektierbarkeit und Darstellbarkeit in Histogrammen als erfolgreich zu werten.

In Zukunft scheint es denkbar, dass für weitere Lymphozytensubpopulationen ein no-lyse, no-wash-Verfahren entwickelt werden kann. Dabei ist zum Beispiel an CD45 zu denken. Damit ließe sich ein HIV-Monitoring infizierter Kinder deutlich verbessern, da die relativen CD4-Werte unter den Gesamtlymphozyten für sie eine bessere prognostische Aussagekraft besitzen.

Die Situation bei den Neuinfektionen der Kinder nimmt durch die hohe Prävalenz der HIV-Erkrankung unter den gebärfähigen Frauen dramatische Züge an, so dass auch hier unser Konzept hilfreich wäre.

5 Zusammenfassung

Die volumetrische Bestimmung von Leukozytensubpopulationen nach den no-lyse, no-wash Verfahren hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Im Vergleich zu den etablierten Standardverfahren geht diese Methode mit geringeren Zellverlusten einher, ist einfacher durchzuführen, zeitsparender und kostengünstig.

In Anbetracht des bedrohlichen HIV-Problems mit der ungebremsten Zunahme an Neuinfektionen besonders in den Entwicklungsländern muss eine Möglichkeit zur Therapieüberwachung gesucht werden, die wirtschaftlich und besonders in infrastrukturell weniger gut entwickelten Regionen flächendeckend durchführbar ist.

In dieser Arbeit wurden die Leukozytensubpopulationen CD3, CD4 und CD8 an 101 Vollblutproben mit einem transportablen Durchflusszytrophotometer (CyFlowCounter®) volumetrisch bestimmt.

Zunächst wurde ein Verfahrensprotokoll entwickelt, das neben CD4- auch CD3- und CD8- Lymphozyten ohne Erythrozytenlyse misst. In einem zweiten Schritt wurde ein mobiles Labor einem standardisierten Labor zur Quantifizierung dieser Lymphozytensubpopulationen gegenübergestellt.

Die Untersuchungen zeigten für alle untersuchten Subpopulationen eine sehr gute Korrelation der Messergebnisse mit zufallsbedingten Ungenauigkeiten unter beiden Laboranordnungen.

Die Kombination eines mobilen Labors und die Methode der CD3-, CD4-, CD8- Zellzählung mit dem CyFlowCounter® stellen eine Möglichkeit dar, unter den apparativen, personellen, finanziellen und infrastrukturellen Bedingungen in Entwicklungsländern eine flächendeckende und medizinisch verantwortliche HIV-Therapie zu verwirklichen.

6 Literaturverzeichnis

1. AIDS Epidemic Update (2004) in: www.unaids.org/wad2004/EPI_1204_pdf_en/EpiUpdate04_en.pdf vom 28.12.2004
2. Alfsen A (2004) Environmental factors in HIV/AIDS epidemic development: perspectives for gender equity and global protection against transmission. *Ann N Y Acad Sci* 1023:164-174
3. Angaret X, Diabouga S, Mortier E, Meda N, Verge- Valette V, Sylla- Koko F, Cousens S, Laruche G, Ledru E, Bonard D, Dabis F, Van de Perre P (1997) CD4+ T- lymphocyte counts in HIV infection: are European standards applicable to African patients? *J Acquir. Immune Syndr Hum Retrovirol.* 14(4): 361-367
4. Barclay, Brown et al.(1997) *The Leucocyte Antigen FactsBook*, 2nd edition; Harcourt Brace & Company, London
5. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A, Reilly JT (1999) Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. *Clin Lab Haematol.* 21: 301-308
6. Beck EJ, Kupek EJ, Gompels MM, Pinching AJ (1996) Correlation between total and CD4 lymphocyte counts in HIV infection: not making the good an enemy of the not so perfect. *Int J STD AIDS* 7: 422-428
7. Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1(8476): 307-310
8. Blatt SP, Lucey CR, Butzin CA, Hendrix C, Lucey DR (1993) Total lymphocyte count as a predictor of absolute CD4+ count and CD4+ percentage in HIV-infected persons. *JAMA* 269: 622-626

9. Bogards JA, Weverling GJ, Geskus RB, Miedema F, Lange JM, Bossuyt PM, Goudsmit J (2003) Low versus high CD4 cell count as starting point for introduction of antiretroviral treatment in resource poor settings: a scenario-based analysis. *Antivir Ther* 8(1): 43-50
10. Bossowski A, Urban M, Stasiak- Barmuta A (2003) Analysis of changes in the percentage of B(CD19) and T(CD3) lymphocytes, subsets CD4, CD8 and their memory (CD45RO) and naive (CD45RA) T cells in children with immune and non-immune thyroid diseases. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16(1): 63-70
11. Brando B, Barnett D, Janossy G, Mandy F, Autran B, Rothe G, Scarpati B, D'Avanzo G, D'Hautcourt JL, Lenkei R, Schmitz G, Kunkl A, Chianese R, Papa S, Gratama JW (2000) Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. *Cytometry* 42: 327-346
12. Brando B, Göhde W Jr, Scarpati B, D'Avanzo G (2001) The "vanishing counting bead" phenomenon: effect on absolute CD34+ cell counting in phosphate-buffered saline-diluted leukopheresis samples. *Cytometry* 43: 154-160
13. Braylan R (1983) Flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med* 107, (1983)
14. Büchner T, Dittrich W, Göhde W (1971) Impulse cytophotometry of blood cells and bone marrow cells. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 77: 416-418
15. Carella AV, Moss MW, Provost V, Quinn TC (1995) A manual bead assay for the determination of absolute CD4+ and CD8+ lymphocyte counts in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Clin Diagn Lab Immunol* 2: 623-625
16. Carriere D, Vendrell JP, Fontaine C, Jansen A, Reynes J, Pages I, Holzmann C, Laprade M, Pau B (1999) Whole blood Capcellia CD4/CD8 Immunoassay for enumeration of CD4+ and CD8+ peripheral T lymphocytes. *Clin Chem* 45: 92-97

17. Cassens U, Gutensohn K, Garritsen H, Kelsch P, Kuehnl P, Sibrowski W (1998) The influence of different erythrocyte lysing procedures on flow cytometric determination of CD34+ cells in umbilical cord blood transplants. *Transfusion Medicine* 8: 111-118
18. Cassens U, Göhde W, Kuling, G, Gröning A, Schlenke P, Lehmann LG, Traore Y, Servais J, Henin Y, Reichelt D, Greve B (2004) Simplified volumetric flow cytometry allows feasible and accurate determination of CD4 T lymphocytes in immunodeficient patients worldwide. *Antivir Ther* 9(3): 395-405
19. Chen RY, Westfall AO, Hardin M, et al. (2003) Complete blood count as a surrogate CD4 marker for HIV monitoring in resource-limited settings [abstrat168]. In: Program and abstracts of the 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Boston). Boston: Foundation for Retrovirology and Human Health
20. Crowe S, Turnbull S, Oelrichs R, Dunne A (2003) Monitoring of Human Immunodeficiency Virus Infection in Resource-Constrained Countries. *Clin Infec Dis* 37: 25-35
21. Crucian B, Norman J, Brentz J, Pietrzyk R, Sama C (2000) Laboratory outreach: student assessment of flow cytometer fluidics in zero gravity. *Lab Med* 31(10): 569-573
22. Cylab™ Mobile FCM Laboratory; in: <http://www.partec.de/products/cylab.html>
23. Das P (2005) Few victories in global battle against AIDS. *The Lancet Infec Dis* 5(1): 8
24. Diagbouga S, Durand G, Sanou PT, Dahourou H, Ledru E (1999) Evaluation of a quantitative determination of CD4 and CD8 molecules as an alternative to CD4+ and CD8+ T lymphocyte counts in Africans. *Trop MedInt Health* 4: 79-84

25. Didier JM, Kazatchkine MD, Demouchy C, Moat C, Diagbouga S, Sepulveda C, Di Lonardo AM, Weiss L (2001) Comparative assessment of five alternative methods for CD4+ T lymphocyte enumeration for implementation in developing countries. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26: 193-195
26. Dittrich W, Göhde W (1969) Impulse fluorometry of single cells in suspension. *Z Naturforsch B* 24(3): 360-361
27. Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, Giorgi JV (1990) The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 322(3): 166-172
28. Ferreira OC Jr, Suleiman G, Brites C, Novoa P, Piovesana M, Suleiman J, Kanayama RH, Russel TR, Zwerner R, Harrington W Jr, et al. (1994) A rapid and reliable assay to enumerate CD4+ T lymphocytes in whole blood. *J Acquir Immune Defic Syndr* 7: 1224-1227
29. Florence E, Dreezen C, Schrooten W, Van Esbroeck M, Kestens L, Franssen K, De Roo A, Colebunders R (2004) The role of non-viral load surrogate markers in HIV-positive patient monitoring during antiviral treatment. *Int J STD AIDS* 15(8): 538-542
30. Fournier AM, Sosenko LM (1992) The relationship of total lymphocyte count to CD4 lymphocyte counts in patients infected with human immunodeficiency virus. *Am J Med Sci* 304: 79-82
31. Fox-Rushby JA (1995) The Gambia: cost and effectiveness of mobile maternal health care service, West Kiang. *World health statistics quarterly Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales* 48(1): 23-27
32. Giorgi, JV (1993) Charakterization of T lymphocyte subset alterations by flow cytometry in HIV disease. *Ann N Y Acad Sci* 677: 126-137

33. Greve B, Beller C, Cassens U, Sibrowski W, Severin E, Göhde W (2003) High grade loss of leucocytes and hematopoietic progenitor cells caused by erythrocyte-lysing procedures for flow cytometric analysis. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 12: 321-330
34. Greve B, Cassens U, Westerberg C, Göhde W jun, Sibrowski W, Reichelt D, Göhde W (2003) A new No-Lyse, No-Wash flow-cytometric method for the determination of CD4 T Cells in blood samples. *Transfus Med Hemother* 30: 8-13
35. Greve B, Valet G, Humpe A, Tonn T, Cassens U (2004) Flow cytometry in Transfusion Medicine: Development, Strategies and Applications. *Transfus Med Hemother* 31: 152-161
36. Hakim JG, FRCP University of Zimbabwe, Harare: HIV monitoring technologies for resource-limited settings. Integration of new monitoring technologies into ARV Rollout plans, in: <http://www.who.int/3by5/amds/en/monitoring4.pdf> vom 07.01.2005
37. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, Haubrich RH, Henry WK, Ledermann MM, Phair JP, Niu M, Hirsch MS, Merigan TC (1996) A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med* 126(3): 64-65
38. Hammer SM (1996) Advances in antiretroviral therapy and viral load monitoring. *AIDS* 3: 1-11
39. Helbert M, Breuer J (2000); Monitoring patients with HIV disease; *J Clin Pathol.* 53, 266-272

40. Hill JC (1984) Mobile eye-care teams and rural ophthalmology in southern Africa. *S Afr Med J* 66: 531-535
41. How technologies are used on the ground: CD4 cell count and viral load., in: <http://www.who.int/3by5/amds/en/monitoring5.pdf> vom 07.01.2005
42. Jacobson MA, Liu L, Khayam-Bashi H, Deeks SG, Hecht FM, Kahn J (2003) Absolute or total lymphocyte count as a marker for the CD4 T lymphocyte criterion for initiating antiretroviral therapy. *AIDS* 17(6): 917-919
43. Janossy G, Jani I, Göhde W (2000) Affordable CD4(+) T-cell counts on “single-plattform” flow cytometers. I. Primary CD4 gating. *Br J Haematol* 111(4): 1198-1208
44. Janssen WCM, Hoffmann JJML (1999) Three-color, one-tube cytometric method for enumeration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Ann Clin Biochem* 36: 196-201
45. Johnson KL (1992) Basics of flow cytometry. *Clin Lab Sci* 5: 22-24
46. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckmann JC, Montagnier L (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312(5996): 767-768
47. Kishimoto T, Kikutani H et al.(eds.) (1997) *Leucocyte typing IV*. Garland Publishing Inc. New York & London
48. Kutok JL, Roma AO, Lemire SJ, Dorfman DM (1998) Four-color flow cytometric immunophenotypic determination of peripheral blood CD4+ T-lymphocyte counts. A comparison of validity and cost-effectiveness with a two-color method. *Am J Clin Pathol* 110: 465-470

49. Landay A, Ho JL, Hom D, Russel T, Zwerner R, Minuthy JG, Kataaha P, Mmirio f, Jackson B (1993) A rapid manual method for CD4+ T-cell quantification for use in developing countries. *AIDS* 7: 1565-1568
50. LeVasseur R, Ganjoo J, Green M, Janosky J, Reyes J, Mazariegos G, Sindhi R (2003) Lymphocyte subsets may discern treatment effects in children and young adults with post-tranplant lymphoproliferative disorder. *Pediatr Transplant* 7(5): 370-375
51. Lyamuya EF, Kagoma C, Mbena EC, Urassa WK, Pallangyo K, Mhalu FS, Biberfeld G (1996) Evaluation of the FACSCCount, TRAx CD4 and Dynabeads methods for CD4 lymphocyte determination. *J Immunol Methods* 195: 103-112
52. Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS, CDC (2003) Guidelines for Performing single-plattform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Center for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 52: 1-13
53. Margolick JB, Donnenberg AD, Munoz A, Park LP, Bauer KD, Giorgi JV, Ferbas J, Saah AJ (1993) 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 CD4 lymphocytes. The Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6(2):153-161
54. McCoy JP, Blumstein L, Donaldson MH, Baxter JD, Byrne BC, Gekowski KM (1994) Accuracy and cost-effectiveness of a one-tube, three-color method for obtaining absolute CD4 counts and CD4: CD8 ratios. *Am J Clin Pathol* 101(3): 279-282
55. McCoy JP Jr (2002) Basic principles of flow cytometry. *Hematol Oncol Clin North Am* 16(2): 229-243

56. McManus M (1993) Mobile eye care units in the fight against eye disease in East Africa. *Journal of ophthalmic Nursing & Technology* 12: 19-21
57. McMichael AJ et al. (eds.) (1987) *Leucocyte typing III*. Oxford University Press, Oxford
58. Piatier-Tonneau, D, Protein Reviews On the Web, PROW and IWHLDA present the guide on: CD4, in: http://mpr.nci.nih.gov/prow/guide/1246540099_g.htm vom 05.03.2005
59. Reinherz EL et al. (eds.) (1986) *Leucocyte typing II*. Springer Verlag, New York
60. Van der Ryst E, Kotze M, Joubert G, Steyn M, Pieters H, van der Westhuizen M, et al. (1998) Correlation among total lymphocyte count, absolute CD4+ count, and CD4+ percentage in a group of HIV-1 infected South African Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 19: 238-244
61. Saag MS, Holodniy M, Kuritzkes DR, O'Brien WA, Coombs R, Poscher ME, Jacobsen DM, Shaw GM, Richman DD, Volberding PA (1996) HIV viral load markers in clinical practice. *Nat Med* 2(6): 625-629
62. Sattentau QJ, Atthos J, Deen K, Hanna N, Healey D, Beverley PC, Sweet R, Truneh A (1989) Structural analysis of the human immunodeficiency virus-binding domain of CD4. Epitope mapping with site-directed mutants and anti-idiotypes. *J Exp Med* 170(4): 1319-1334
63. Schreibman T, Friedland G (2004) Use of Total Lymphocyte Count for Monitoring Response to Antiretroviral Therapy. *HIV/AIDS* 38: 257-262

64. Sherman GG, Galpin JS, Patel JM, Mendelow BV, Glencross DK (1999) CD4+ T cell enumeration in HIV infection with limited resources. *Journal of Immunological Methods* 222(1-2): 209-217
65. Spacek L, Griswold M, Quinn T, Moore RD (2003) Total lymphocyte count and hemoglobin combined in an algorithm to initiate the use of highly active antiretroviral therapy in resource-limited settings. *AIDS* 17(9): 1311-1317
66. Spira TJ, Kaplan JE, Holman RC, Bozeman LH, Nicholson JK, Fishbein DB (1989) Deterioration in immunologic status of human immunodeficiency virus (HIV)-infected homosexual men with lymphadenopathy: prognostic implications. *J Clin Immunol* 9(2): 132-138
67. Terstappen LW, Johnson D, Mickaels RA, Chen J, Olds G, Hawkins JT, Loken MR, Levin J (1991) Multidimensional flow cytometric blood cell differentiation without erythrocyte lysis. *Blood Cells* 17(3): 585-602
68. Valet G (2003) Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *J Biol Regul Homeost Agents* 17(3): 213-222
69. Weaver JL (2000) Introduction to flow cytometry. *Methods* 21: 199-201
70. Wheeler DA, Gilbert CL, Launer CA, et al. (1998) Weight loss as a predictor of survival and disease progression in HIV infection. Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 18: 80
71. Zijenah LS, Katzenstein DA, Nathoo KJ, Rusakaniko S, Tobaiwa O, Gwanzura C, Bikoue A, Nhembe M, Matibe P, Janossy G (2005) T lymphocytes among HIV-infected and –uninfected infants: CD4/CD8 ratio as a potential tool in diagnosis of infection in infants under the age of 2 years. *Journal of translational medicine* 3:6, in: www.translational-medicine.com/content/3/1/6 vom 05.03.2005

72. Zolla-Pazner S, Des Jarlais DC, Friedman SR, Spira TJ, Marmor M, Holzmann R, Mildvan D, Yancovitz S, Mathur-Wagh U, Garber J, et al (1987) Nonrandom development of immunologic abnormalities after infection with human immunodeficiency virus: implications for immunologic classification of the disease. Proc Natl Acad Sci USA 84(15): 5404-5408
73. 3by5 December 2003 Progress through Report June 2004 , in: <http://www.who.int/3by5/publications/documents/en/whoprogressreportfinal.pdf> vom 07.01.2005

7 Lebenslauf

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Göhde danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, die Labore des Instituts für Strahlenbiologie genutzt haben zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Burkhard Greve, der mich von Beginn an intensiv betreut hat und mir bei allen aufgetretenen Hürden - sowohl bei den Experimenten als auch bei der schriftlichen Umsetzung der Arbeit - mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand.

Herrn PD Dr. Erhard Severin danke ich für die konstruktive Durchsicht meiner Arbeit, die mir eine große Hilfe war.

Mein Dank für die Unterstützung während der Experimentierphase gilt den Mitarbeiterinnen des Instituts für Strahlenbiologie Petra Berkes und Gerlind Bellmann, die bei allen Problemen überaus hilfsbereit waren.

Besonders bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die mir stets bei der technischen Umsetzung der schriftlichen Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen: Ina Mündelein, Jessica Meschede, Alexander Haarmann, Alexander Simons, Bernd Meyer, Martin Koch und meinem Bruder Martin.

Meiner Familie möchte ich dafür danken, dass sie mich in allen Lebenslagen unterstützt und gefördert hat.

9 Anhang

9.1 Abbildungs-Verzeichnis

Abbildung 1: Messprinzip des verwendeten Durchflusszytometers.....	18
Abbildung 2: CyFlow Counter®	20
Abbildung 3: CyLab® Innenraum.....	21
Abbildung 4: CyLab® aus der Vogelperspektive mit Darstellung der Solarzelle	21
Abbildung 5: Beispiel eines Histogramms für CD3	24
Abbildung 6: Beispiel eines Histogramms für CD4	24
Abbildung 7: Beispiel eines Histogramms für CD8.....	24
Abbildung 8: Absolute CD4-Zahlen.....	29
Abbildung 9: Verdünnungsreihe CD4 aus Vollblut in gefiltertem Erythrozytenkonzentrat.	30
Abbildung 10: Verdünnungsreihe CD8 aus Vollblut in gefiltertem Erythrozytenkonzentrat.	31
Abbildung 11: Gaußverteilung aus CD4-Einzelmessungen.....	32
Abbildung 12: Regressionsanalyse für die CD3-Lymphozyten der Normalprobanden.	34
Abbildung 13: Bland-Altman-Plot für CD3-Lymphozyten der Normalprobanden.....	35
Abbildung 14: Regressionsanalyse für die CD3-Lymphozyten der Leukozyten- reduzierten Probandenproben.....	36
Abbildung 15: Bland-Altman-Analyse für die CD3-Lymphozyten der Leukozyten- reduzierten Probandenproben.....	37
Abbildung 16: Regressionsanalyse für die CD4-Lymphozyten der Normalprobanden.	38
Abbildung 17: Bland-Altman-Plot für CD4-Lymphozyten der Normalprobanden.....	39
Abbildung 18: Regressionsanalyse für die CD4-Lymphozyten der Leukozyten- reduzierten Probandenproben.....	40
Abbildung 19: Bland-Altman-Analyse für die CD4-Lymphozyten der Leukozyten- reduzierten Probandenproben.....	41
Abbildung 20: Regressionsanalyse für CD8-Lymphozyten der Normalprobanden.....	42
Abbildung 21: Bland-Altman-Plot für die CD8-Lymphozyten der Normalprobanden..	43

Abbildung 22: Regressionsanalyse für CD8-Lymphozyten der Leukozyten-reduzierten Probandenproben.....	44
Abbildung 23: Bland-Altman-Analyse für die CD8-Lymphozyten der Leukozyten- reduzierten Probandenproben.....	45

9.2 Tabellen-Verzeichnis

Tabelle 1: Diagnostisch wichtige CD-Antigene.....	3
---	---

9.3 Abkürzungs-Verzeichnis

AEUD	engl.: aids epedemic update
AIDS	engl.: aquired immunodeficiency syndrome
ART	antiretrovirale Therapie
CD	engl.: cluster of differation, Differenzierungscluster
CDC	Centers for Disease Control
DNA	engl.: desoxyribonuceic acid
EDTA	Ethylendiamin-Tetracetat
ESA	engl.: European Space Agency
et al.	lat.: et alia/et alii
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff
FL-1	Fluoreszenz 1
FSC	engl.: forward scatter
HAART	engl.: highly active antiretroviral therapy
HIV	humanes Immunodefizienz Virus
HLA	engl.: human leucocyte antigene
LTR	long terminal repeat
MHC	engl.: major histokompatibility komplex

NASA	engl.: National Aeronautics and Space Administration
PCR	engl.: polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein Complex
PMT	engl.: photomultiplier tube
RNA	engl.: ribonucleic acid
SSC	engl.: side scatter
TLC	engl.: total lymphocyte count
TZR	T-Zellrezeptor
WHO	engl.: world health organization
YAG	Yttrium-Aluminium-Granat