2. Treffen der Arbeitsgruppe «Durchflußzytometrie» der DGTI-Sektion «Monoklonale Antikörper, Gentechnik» am 23.8.1995 in Frankfurt/Main

Infusionsther Transfusionsmed 1996;23:114

Quantitative Durchflußzytometrie: Absolutzellzahlmessungen in Vollblut und Blutkomponenten

H.		Radtke
----	--	--------

Institut für Transfusionsmedizin und Immun-hämatologie, Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

Dr. med. H. Radtke, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinikum Charité, Schumannstraße 20/21, D-10039 Berlin (Deutschland)

Im Rahmen der Qualitätskontrolle von Blutprodukten stellt sich das Problem der Messung von niedrigen Zellkonzentrationen in Blutkomponenten, etwa zur Bestimmung der Effizienz von Leukozytendepletionsverfahren. Die «critical immunologic load of leucocytes» liegt nach dem derzeitigen Stand des Wissens bei etwa 106 Leukozyten pro Transfusions-einheit, das entspricht einer Leukozytenkonzentration von etwa 3 bis 5/µl. Dieser Konzentrationsbereich liegt außerhalb des Meßbereichs von Blutbildautomaten. Das Standardverfahren zur Quantifizierung von niedrigen Leukozytenkonzentrationen ist die mikroskopische Zählung in der Nageotte-Kammer, die jedoch zeitaufwendig ist und eine schlechte Präzision aufweist. Als Alternativverfahren bietet sich die Durchflußzytometrie an. Da die Messung nicht nach einem vordefinierten Volumen beendet wird, ist es möglich, auch niedrige Zellkonzentrationen bei entsprechender Verlängerung der Meßdauer zu quantifizieren. Das wesentliche Problem dabei ist die genaue Erfassung des während des Meßzeit-raums durch die Meßkapillare geflossenen Volumens, da der Fluß nicht mit ausreichender Genauigkeit vorgegeben bzw. konstant gehalten werden kann. Eine Möglichkeit ist die Zugabe von gut identifizierbaren Eichpartikeln in definierter Konzentration. Die seit kurzem kommerziell verfügbaren FACSCount-Controls™-Eichpartikel (Becton-Dickinson) sind in exakt vordefinierten Konzentrationen erhältlich. Ihre Eigen-fluoreszenz ist sehr stark, so daß eine einfache Unterscheidung auch von fluoreszenzmarkierten Leukozyten möglich ist. Die Konzentration beliebiger Zellpopulationen läßt sich aus dem Verhältnis der durchflußzytometrisch erfaßten Ereignisse einfach berechnen. Leukozyten im Vollblut sind aufgrund ihres charakteristischen Streulichtverhaltens bei der Auswertung einer Messung bereits im FSC-SSC-Diagramm einfach zu identifizieren. Eine weitere Differenzierung in Leukozytensubpopulationen ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da sich die einzelnen Subpopulationen im FSC-SSC-Diagramm überlappen. Durch zusätzlichen Einsatz der fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper gegen CD45/CD14 können auch die normalen Subpopulationen in Vollblut differenziert werden. Bei niedrigen Zellkonzentrationen ergibt sich als zusätzliche Schwierigkeit bei der Auswertung die eindeutige Zuordnung einzelner Ereignisse als Zelle oder Debris, da manche Debris-Partikel eine deutliche Fluoreszenz, vergleichbar mit der Fluoreszenz von Granulozyten, aufweisen.

Dieses Problem läßt sich durch den Einsatz der Analyse-Software Attractors™ (Becton-Dickinson) weitgehend lösen: Bei der Auswertung mit diesem Programm werden ein oder meh-

rere Zellpopulationen multidimensional in beliebigen Parameterkombinationen definiert. Bei der Auswertung wird für jedes Ereignis geprüft, welcher der definierten Populationen das Ereignis zuzuordnen ist. Der Vorteil dieser Software liegt darin, daß auch Zellpopulationen mit ähnlichen Eigenschaften, wie etwa Monozyten und Lymphozyten oder Granulozyten und Debris, gut voneinander zu differenzieren sind, solange sie sich in mindestens einem der erfaßten Parameter unterscheiden.

Bei der Validierung der FACS-Methode im Vergleich zum Blutbildautomaten findet sich in Kontrollbluten und in Vollblutproben eine gute Korrelation zwischen beiden Verfahren bezüglich der Leukozytenkonzentration und des Differentialblutbildes. In Verdünnungsreihen zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen erwartetem und gemessenem Wert bis in einen Bereich von etwa 1 Leukozyt/ μ l. Auch der Vergleich zwischen der Messung in der Nageotte-Kammer und im Durchflußzytometer weist eine zufriedenstellende Korrelation auf. Die Präzision der Methode läßt sich durch wiederholtes Ansetzen derselben Probe bestimmen. Der Variationskoeffizient liegt bei Kontrollbluten um 3%, bei normalen Blutproben um 5-6% und steigt bei niedrigen Leukozytenkonzentrationen auf maximal 20-25%.

KAHGEIL

© 1996 S. Karger GmbH, Freiburg Fax (0761) 4520714