

Vereinfachte Durchflußzytometrie von Liquorzellen mit FACScan*

A Simplified Technique for Flow Cytometry of Cerebrospinal Fluid Cells using FACScan

T. O. Kleine¹, J. Albrecht²

¹ Med. Zentrum für Nervenheilkunde (Funktionsbereich Neurochemie) der Universität Marburg

² Fa. Becton Dickinson GmbH Heidelberg

Zusammenfassung:

Es wird eine einfache reproduzierbare Methode zur durchflußzytometrischen Analyse (FACScan, Becton Dickinson) von sieben Lymphozytensubpopulationen im Liquor cerebrospinalis beschrieben: B-Lymphozyten (CD19⁺), T-Lymphozyten (CD3⁺), aktivierte T-Lymphozyten (CD3⁺, HLA-DR⁺), T-Suppressor/cytotoxische Zellen (CD8⁺), T-Helfer/Inducer (CD4⁺), NK-Zellen (CD16⁺, CD56⁺, CD3⁺) und MHC-nicht-beschränkte cytotoxische T-Zellen (CD16⁺, CD56⁺, CD3⁺). Die Methode beinhaltet die Gewinnung eines Zellsedimentes durch eine einmalige Zentrifugation zellarmer Liquor-Proben (0–5 Leukozyten pro μ l) bei 200 $\times$ g. Liquorproben mit geringer Pleozytose (>10 Leukozyten pro μ l) können mit 0,1 ml Probe pro Antikörperfärbung nativ eingesetzt werden. Durch Anfärbung der Leukozyten mit dem Vital-DNS-Farbstoff LDS-751 können Erythrozyten und zellulärer Debris über den Parameter Fluoreszenz 3 eliminiert werden. Zur Analyse der Lymphozytensubpopulationen werden gleichzeitig Doppelmarkierungen mit Fluorescein-Isothiocyanat(FITC)- bzw. Phycoerythrin(PE)-konjugierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt, deren Bindung über die Geräteparameter Fluoreszenz 1 bzw. Fluoreszenz 2 analysiert wird. Die Messungen erfolgen ohne Waschschritte zur Entfernung von nicht gebundenen Antikörpern, wodurch Zellverluste verhindert werden. Zur Analyse der Messungen ist eine Gesamtlymphozytenpopulation von mindestens 100 Zellen erforderlich. Die Methode ist präzise (VK der intraserialen Impräzision für T-Lymphozytenpopulationen < 5%) und wird durch Plausibilitätstests überprüft. Für die analysierten Lymphozytensubpopulationen im Lumbaliquor werden vorläufige Referenzbereiche aufgestellt.

Schlüsselwörter:

Durchflußzytometrie – Liquor cerebrospinalis – Lymphocyten-subpopulationen – Analyse nativer Liquorproben

Summary:

A simple reproducible technique for the flow cytometric analysis (FACScan, Becton Dickinson) of seven lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid (CSF) is described: B lymphocytes (CD19⁺), T-lymphocytes (CD3⁺), activated T-lymphocytes (CD3⁺, HLA-DR⁺), cytotoxic/suppressor (CD8⁺) and helper/inducer (CD4⁺) T-cell subsets, NK cells (CD16⁺, CD56⁺, CD3⁺) and a subset of cytotoxic T-cells (CD16⁺, CD56⁺, CD3⁺), which mediate non-MHC restricted cytotoxicity. For CSF specimens containing 0–5 leucocytes/ μ l a cell sediment is spun down at 200 $\times$ g, whereas 0,1 ml of CSF samples with > 10 leucocytes/ μ l are stained and analysed without cell enrichment. By staining leucocytes with the vital nucleic acid stain LDS-751, erythrocytes and cellular debris are eliminated via the fluorescence 3 parameter of the instrument. Lymphocyte subsets are analysed using combinations of fluorescein (FITC)- and phycoerythrin(PE)-conjugated monoclonal antibodies. The binding of conjugated antibodies is detected by the parameters fluorescence 1 respectively fluorescence 2. Free unbound antibodies do not interfere with the measurement. Thus a loss of cells by washing steps can be avoided. The technique is precise (CV in intraserial measurements for T-lymphocyte populations < 5%). Probability checks are done for each sample. A minimum population of 100 lymphocytes is required for one analysis. Preliminary reference values for the analysed lymphocyte subsets are established for lumbar CSF samples.

Keywords:

Flow cytometry – cerebrospinal fluid – lymphocyte subsets – analysis of native CSF samples

Einleitung

Die durchflußzytometrische Analyse von Lymphozytensubpopulationen aus zellarmen Liquorproben ist häufig an der geringen Zellzahl (Referenzbereich für Lumbaliquor: 0–5 Leukozyten/ μ l [1]) im Liquor cerebrospinalis gescheitert. In Anbetracht der zunehmenden Bedeutung, Autoimmunvorgänge im Zentralnervensystem zu untersuchen, sind Routinemethoden zur Analyse der an immunologischen Vorgängen beteiligten Zellen im Liquor cerebrospinalis wünschenswert. Deshalb wurde versucht, ein Verfahren zur Analyse von Liquor-Lymphozyten an einem 5parametrischen Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) zu etablieren. In der vorliegenden Arbeit wurden an die Methodik folgende Anforderungen gestellt:

1. Die Lymphozyten sollen in Liquorproben mit 0–5 Leukozyten/ μ l erfassbar sein. Hierzu ist eine schonende Anreicherung aus 3 bis 6 ml Liquorprobe erforderlich, damit zur Gewährleistung einer minimalen statistischen Sicherheit mindestens 100 Lymphozyten pro Ansatz nachweisbar sind.
2. Die Methode sollte einfach, reproduzierbar, präzise und spezifisch sein.
3. In Anbetracht mangelnder externer Kontrollen sollten die Ergebnisse durch interne Plausibilitätskontrollen überprüfbar sein.
4. Die Resultate der Methode sollten mit denen anderer Methoden vergleichbar sein.

Material und Methodik

Frische Liquorproben (Lumbal-, Subokzipital-, Ventrikeldrainage-Liquor) wurden im Eiswasser gelagert. Nach erfolgter Zellzählung (s. u.) wurde der überwiegende Teil in einem gradierten durchsichtigen Spitzbogen-Plastikröhrchen (Fa. Sarstedt No. 62,553.42; 13 ml, UV-bestrahlt) bei 200 $\times$ g in einer Minifuge RF (Heraeus Sepatech GmbH) 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Volumen des zellfreien Überstandes wurde gemessen. Das Zellsediment mit einem definierten Restvolumen an Liquor wurde in gekühlter Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4; Sigma 1000–3) resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung in Eiswasser gelagert.

Simultan zum Liquor entnommenes EDTA-Vollblut wurde bis zur Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Zellzählung in Liquor- und Blut-Proben

Die Zellzählung von Leukozyten und Erythrozyten in nativen Liquorproben bzw. deren Zellsediment erfolgte nach hinreichender Durchmischung in einer geeichten Fuchs-Rosenthal-Zählkammer nach einer Vitalfärbung mit Toluidinblau (2).

Die Analyse der EDTA-Vollblutproben wurde im Cell-Dyn 1600 (Fa. Unipath, Wesel) durchgeführt.

Differenzierung der Leukozyten in der nativen Liquorprobe und im Zellsediment

Aus definierten Mengen der nativen Liquorprobe (0,2–0,4 ml) und des Zellsediments (0,35 ml) wurden Zytozentrifugenpräparate hergestellt (Cytospin I, Shandon Labortechnik, Frankfurt/M.) und nach panoptischer Färbung nach PAPPENHEIM 100 bis 200 Leukozyten differenziert (vgl. 2).

Probenvorbereitung von Liquor- und Blutproben für den FACScan

Zur fluoreszenzoptischen Anfärbung der Lymphozytensubpopulationen wurden die in Tab. 1 beschriebenen, gebrauchsfertigen Kombinationen von Fluorescein-Isothiocyanat(FITC)- und Phycoerythrin(PE)-konjugierten monoklonalen Antikörpern (Simultest IMK Plus, Becton Dickinson) verwendet.

* Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Hilz gewidmet

Tab. 1: Beschreibung der Zusammensetzung der verwendeten Kombinationen monoklonaler Antikörper (Simultest IMK Plus) zur Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen

Reagenz	FITC-konjugierte Antikörper	PE-konjugierte Antikörper
A	Anti-HL6-1 (CD45)	Anti-Leu-M3 (CD14)
B	Maus IgG ₁	Maus IgG ₂
C	Anti-Leu-4 (CD3)	Anti-Leu-12 (CD19)
D	Anti-Leu-3a (CD4)	Anti-Leu-2a (CD8)
E	Anti-Leu-4 (CD3)	Anti-HLA-DR
F	Anti-Leu-4 (CD3)	Anti-Leu-11c (CD16) + Anti-Leu-19 (CD56)

Routine-Ansatz für Liquorproben

Zu 5 µl der jeweiligen Antikörperkombination (Reagenz) wurden 50 µl gut durchmischte Liquorzellsuspension (Nativ-Liquor oder Zellsediment) und 10 µl einer LDS-751 Arbeitslösung (Stammlösung 0,2 mg/ml Methanol 1:100 mit PBS verdünnt (3); LDS-751 von Fa. Exciton, Dayton, OH, USA) pipettiert. Die Ansätze wurden auf einem Mono-Mixer (Fa. Sarstedt) ausreichend gemischt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Unmittelbar vor der Messung am FACScan wurden die Proben mit 250 oder 500 µl PBS (4 °C) verdünnt und gut resuspendiert.

Leerwerte zum Nachweis von kontaminierten Fremdpartikeln in den verwendeten Reagenzien und Lösungen wurden ohne Zugabe von Liquorzellsuspension angesetzt.

Gewaschener Routine-Ansatz für Liquorproben

Der Routine-Ansatz wurde nach Inkubation mit 500 µl PBS verdünnt, bei 200 × g 15 min abzentrifugiert (s. o.) und dekantiert. Der Waschschritt wurde einmal wiederholt. Das finale Zellsediment wurde zur Messung in 250 µl PBS (4 °C) resuspendiert.

Titrationsansätze für die monoklonalen Reagenzienkombinationen

Zur Durchführung von Titrationsexperimenten mit Liquorproben wurden die eingesetzten Mengen der Antikörperkombinationen im Routineansatz variiert (2,5, 5, 10, 15 und 20 µl von Reagenz A–F).

Ansatz für Blutproben

20 µl des jeweiligen Antikörperreagenz wurden mit 100 µl EDTA-Blut gemischt und 20 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml FACS Lysing Solution (Becton Dickinson), die nach Herstellerangaben vorverdünnt worden war, wurden die Erythrozyten während einer 10minütigen Inkubation lysiert. Die Ansätze wurden bei 200 × g wie oben beschrieben zentrifugiert und dekantiert. Das Waschen des Zellsediments erfolgte durch Zugabe von 1 ml PBS und einer erneuten Zentrifugation unter identischen Bedingungen. Das finale Zellsediment wurde in 500 µl PBS (4 °C) resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

Messung und Analyse der Lymphozytensubpopulationen am Durchflußzytometer

Blutproben

Die Blutproben wurden mit Hilfe der Simulset-Software, Version 2.1 (Becton Dickinson), gemessen und ausgewertet.

Liquorproben

Liquorproben wurden mit der FACScan-Research Software (Version 2.1) gemessen und analysiert. Zur Messung wurde am Durchflußzytometer eine Diskriminationsschwelle in der Fluoreszenz 3 definiert (Abb. 1B), die bereits bei der Messung einen Großteil an Erythrozyten und zellulärem Debris (LDS-751 negative Partikel) eliminierte (s. Abb. 1A). Durch Definition eines Analysenfensters im Vorwärtstreulicht (Forward Scatter) / 90°-Streulicht (Side Scatter)-Diagramm konnte die Lymphozytenpopulation zur Auswertung selektiert werden (Abb. 1C und 1D).

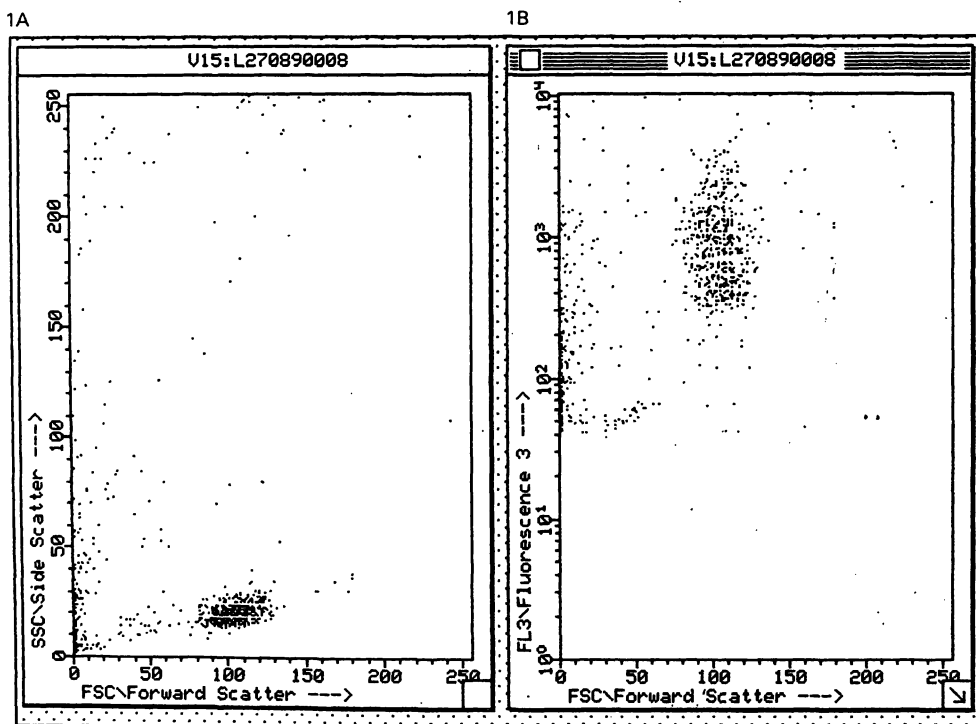


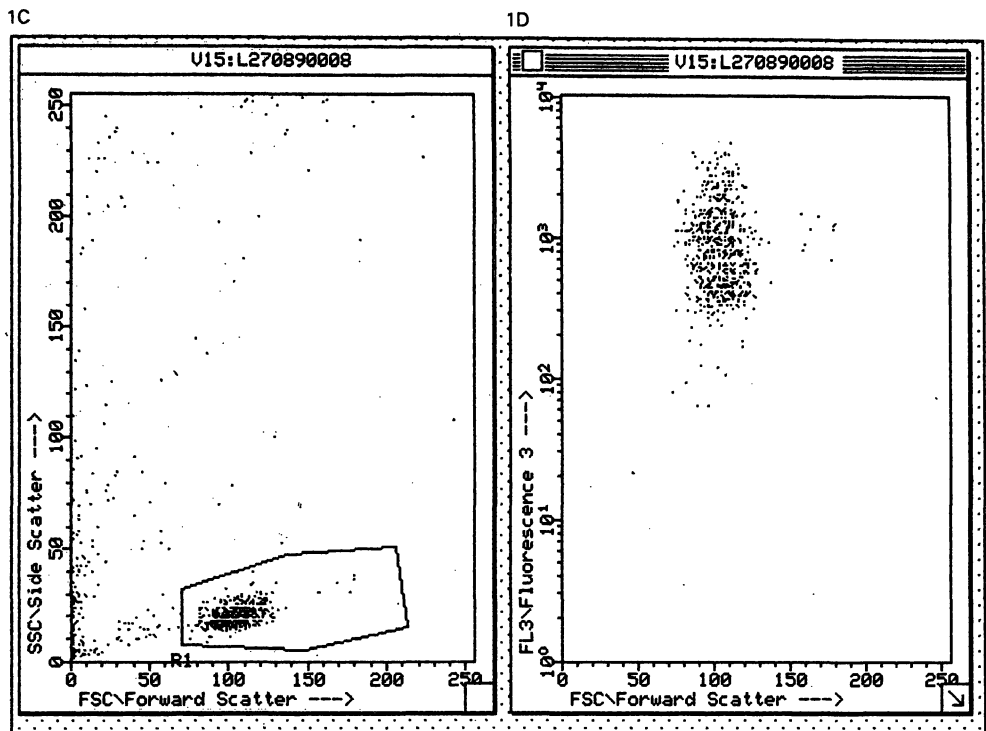
Abb. 1A:
Vorwärtstreulicht
(Forward Scatter,
FSC) / 90°-Streulicht
(Side Scatter,
SSC)-Diagramm

Abb. 1B:
Setzen der
Diskriminations-
schwelle in
Fluoreszenz 3 (FL3)

Abb. 1: Isolierung und Darstellung der Lymphozytenpopulation in einer zellarmen Liquorprobe. Von 5,0 ml einer Lumballiquorprobe mit 1 Leukozyten/µl und 1 Erythrozyten/µl wurde das Zellsediment (bestehend aus 85% lymphozytären Zellen und 15% monozytären Zellen) präpariert und in 0,40 ml Liquor resuspendiert; hiervon wurden 0,05 ml im Routine-Ansatz mit Reagenz A inkubiert und gemessen.

Abb. 1C:
Setzen des
Analysefensters für
die Lymphozytenpo-
pulation im
FSC/SSC-Dia-
gramm, in dem 644
Zeilen gezählt
wurden.

Abb. 1D:
Darstellung der
LDS-751-positiven
Lymphozytenpopu-
lation aus Abb. 1C
im FSC/FL3-Dia-
gramm.
Weitere Einzelheiten
siehe Text.



Da in Abhängigkeit von der Liquorprobe nicht immer eindeutige Forward Scatter / Side Scatter-Verteilungen erhalten werden (vgl. Abb. 2A), wurde die Reinheit des Analysefensters durch Auswertung des Fluoreszenz 1 / Fluoreszenz 2-Diagramms der Reagenzienkombination A beurteilt (Abb. 2B). Die Lymphozyten sind dabei durch eine hohe CD45-Expression (FL1) und keine Expression von CD14 (FL2) charakterisiert.

Zur Bewertung gelangten nur Liquorproben, die im Analysefenster > 100 Lymphozyten bei einer Reinheit > 90% aufwiesen. Im Mittel lag die Reinheit bei 95%.

Die Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen in den verschiedenen Ansätzen erfolgte mit Hilfe einer 4-Felder-Statistik (Abb. 4), wobei die Fluoreszenzgrenzen individuell zu definieren waren.

Abb. 2A:
Setzen des
Analysefensters R₁
für die Lymphozy-
tenpopulation im
Vorwärtstreulicht
(Forward Scatter) /
90°-Streulicht (Side
Scatter)-Diagramm.

Abb. 2B:
Analyse der
Lymphozytenpopu-
lation aus R₁ im
Statistikfenster R₂
im Fluoreszenz 1
(FL1)/Fluoreszenz 2
(FL2)-Diagramm:
Reinheit 93,7% bei
693 analysierten
Zellen.
Weitere Einzelheiten
siehe Text.

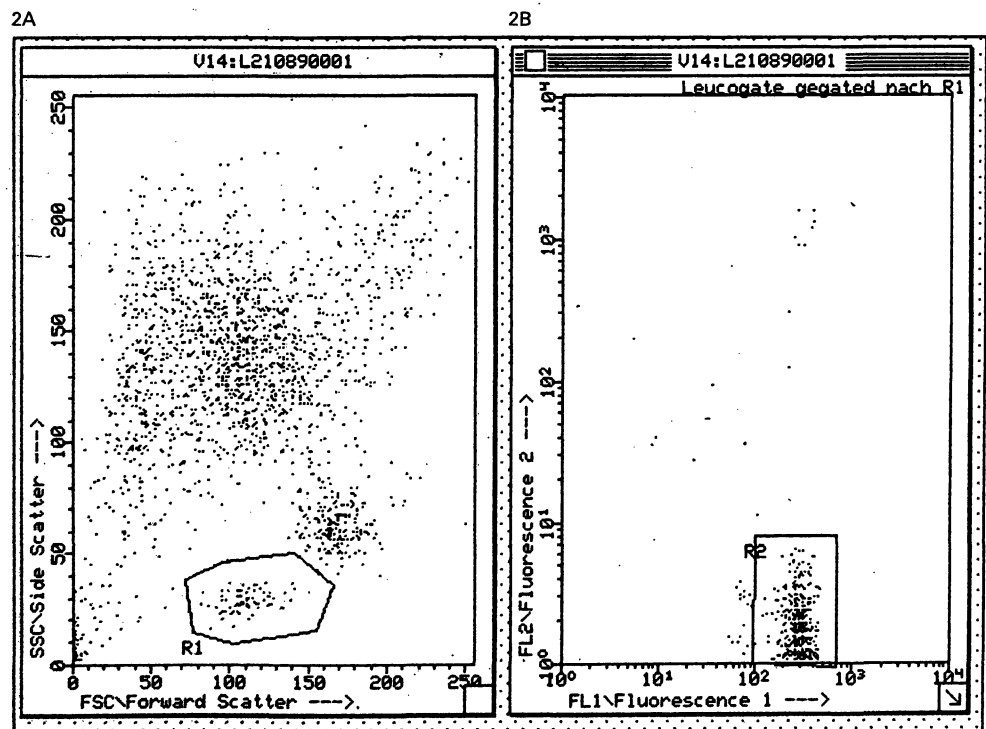


Abb. 2: Markierung der Leukozytenfraktion mit CD45-FITC und CD14-PE in einer zellreichen Liquorprobe. 0,05 ml einer nativen Lumbaliquorprobe mit 2 200 Leukozyten pro μ l und 456 Erythrozyten pro μ l wurden im Routine-Ansatz mit Reagenz A inkubiert und gemessen. (Im Zytozentrifugensediment waren 63% granulozytäre, 10% lymphozytäre und 27% monozytäre Zellen).

Ergebnisse und Diskussion

Anreicherung von zellarmen Liquorproben

Eine Voraussetzung zu dem in dieser Arbeit gesetzten Ziel, die Durchflußzytometrie an zellarme Liquorproben zu adaptieren, ist eine effektive Zellanreicherung durch Sedimentation aus einer ausreichenden Probenmenge (3 bis 6 ml). Hierzu ist eine Zentrifugation in Spitzbogen-Plastikröhrchen bei $200 \times g$ und $4^\circ C$ geeignet. Höhere g-Werte führen zu Artefakten an der Zelloberfläche von Liquorzellen (4).

Bei der hier beschriebenen Präparation zellarmer Liquorproben mit 0-5 Leukozyten pro μl gehen im Mittel 40% der Leukozyten

im Zellsediment verloren. Dabei tritt ein Verlust weitgehend zugunsten monozytärer Zellen auf (im Mittel 80% Verlust, Abb. 3C), während im Mittel 33% lymphozytäre Zellen (Abb. 3A) und 30% granulozytäre Zellen verlorengehen. Daraus resultiert ein Zellsediment mit überwiegend lymphozytären Zellen (Abb. 3B), während die monozytären Zellen im Vergleich zur nativen Liquorprobe im Mittel um 60% vermindert sind (Abb. 3D).

Daraus folgt, daß für eine möglichst vollständige Analyse von Lymphozytensubpopulationen aus Liquor cerebrospinalis eine einmalige Zentrifugation bei $200 \times g$ toleriert werden kann. Weitere Zentrifugationsschritte müssen jedoch vermieden werden.

Abb. 3: Lymphozyten- und Monozytenkonzentration in nativen Liquorproben und ihrem Zellsediment.

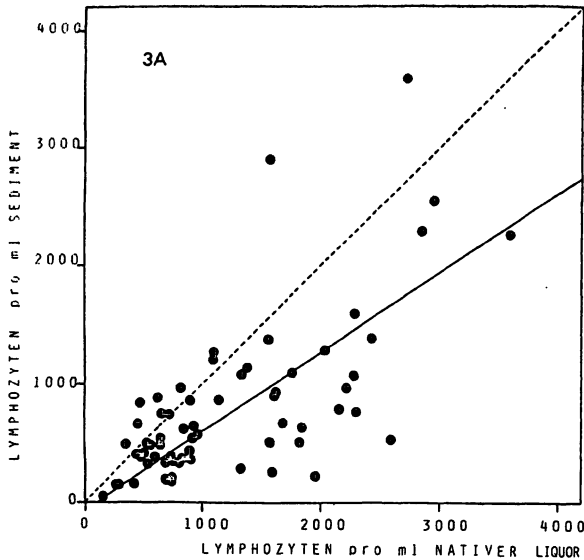


Abb. 3A: Lymphozytäre Zellen (●) in 73 nativen Liquorproben (x) und ihrem Zellsediment (y): $y = -48,7 + 0,67x$. Nach (6) unterscheidet sich der y-Abschnitt nicht signifikant von 0, jedoch ist der Anstieg signifikant kleiner als 1.

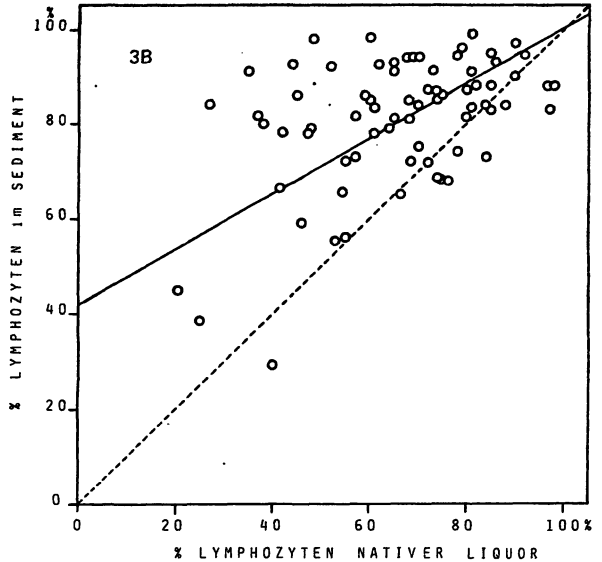


Abb. 3B: Der prozentuale Anteil lymphozytärer Zellen (○) an den gesamten Liquor-Leukozyten von 73 nativen Liquorproben (x) und in ihrem Zellsediment (y): $y = +42,7 + 0,58x$. Nach (6) unterscheidet sich der y-Abschnitt von 0 und der Anstieg von 1 signifikant.

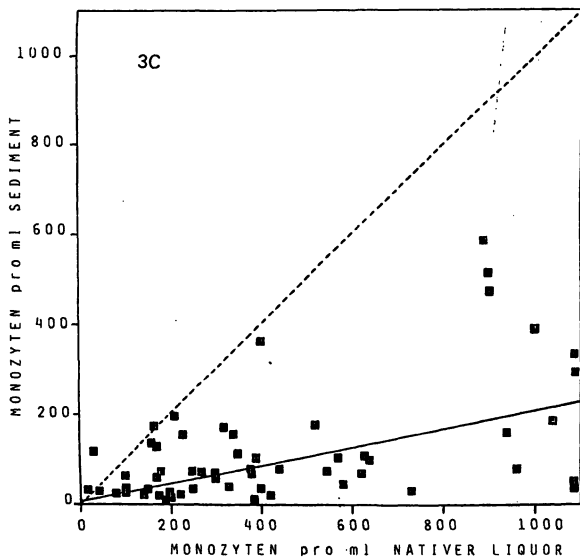


Abb. 3C: Monozytäre Zellen (■) in 73 nativen Liquorproben (x) und ihrem Zellsediment (y): $y = +5,5 + 0,21x$. Nach (6) ist der y-Abschnitt nicht signifikant von 0, der Anstieg signifikant kleiner als 1.

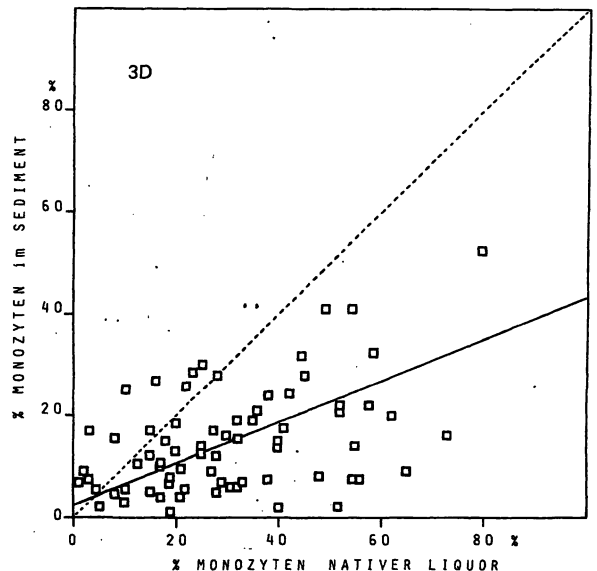


Abb. 3D: Der prozentuale Anteil monozytärer Zellen (□) an den gesamten Liquor-Leukozyten von 73 nativen Liquorproben (x) und in ihrem Zellsediment (y): $y = +2,8 + 0,41x$. Nach (6) unterscheidet sich der y-Abschnitt nicht signifikant von 0, jedoch ist der Anstieg signifikant kleiner als 1. Weitere Einzelheiten siehe Methodik.

Durchflußzytometrie von 3fach fluoreszenz-markierten Liquor-lymphozyten in Gegenwart ungebundener Antikörper

Zur Vermeidung weiterer Zellverluste wurde der Versuch unternommen, die Messungen am Durchflußzytometer durchzuführen, ohne freie bzw. unspezifisch gebundene Antikörper durch Waschschritte mittels Zentrifugation aus den Ansätzen zu entfernen. Die Ansätze wurden deshalb nach der Inkubation lediglich mit PBS verdünnt.

Neben FITC- und PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern wurde LDS-751, ein Vitalfarbstoff für Nukleinsäuren, besonders von DNS (5), als dritter Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt. Dadurch konnte der Erythrozyten-(und Thrombozyten-)Anteil in blutigen Liquorproben sowie zellulärer Debris eliminiert werden.

Leerwerte mit LDS-751 allein oder mit den Reagenzienkombinationen A-F führten zu keinen Meßereignissen im Analysenfenster für Lymphozyten, wodurch die Reinheit der verwendeten Reagenzien und Lösungen belegt wird. Ferner kann damit gezeigt werden, daß freier Antikörper nicht mit den Messungen interferiert.

Mit der Erhöhung der Reagenzienmenge im Routineansatz nimmt die unspezifische Markierung speziell bei PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern deutlich zu. Abb. 4 zeigt dies beispielhaft anhand einer CD4/CD8-Färbung. Der Anstieg in der Fluoreszenz 2 (Abb. 4) kann nur unvollständig durch die Verschiebung der Fluoreszenzgrenzen kompensiert werden: Bei Analyse von drei zellreichen Liquorproben nahmen bei einer Erhöhung der Reagenzienmenge von 5 µl bis auf 20 µl die Lymphozytensubpopulationen der B-Lymphozyten, der aktivierten T-Lymphozyten, der NK-Zellen sowie der CD3⁺, CD16⁺, CD56⁺-Zellen scheinbar zu (Tab. 2). Die Zunahme ist durch eine unspezifische Färbung anderer Lymphozytenfraktionen bzw. durch den Verlust klarer Kriterien zur Festlegung der Bewertungsgrenzen für die Fluoreszenzen bedingt.

Ein Waschen der Proben durch zweimalige Zentrifugation führte zu einer deutlichen Verschiebung der Lymphozytensubpopulationen (Tab. 2), was nicht nur einen generellen, sondern auch einen selektiven Zellverlust aufzeigt.

Tab. 3 demonstriert, daß in 10 verschiedenen nativen Liquorproben mit Pleozytosen von 10 bis 2200 Leukozyten/µl und in deren Zellsediment gleiche prozentuale Anteile der 7 untersuchten

Tab. 2: Markierung von Lymphozytensubpopulationen in nativen Liquorproben mit zunehmenden Mengen von monoklonalen Antikörpern (Reagenz A-F)

Lymphozyten-Subpopulation	Anzahl der markierten Zellen im Ansatz bei Antikörpermenge				
	5 µl	5 µl	10 µl	15 µl	20 µl
		gewaschen**			
B-Lymphozyten CD19 ⁺	1344*	3507*	1262*	1273*	1601*
T-Lymphozyten CD3 ⁺	5582	3145	5811	5663	5551
aktivierte T-Zellen CD3 ⁺ , HLA-DR ⁺	716	485	667	608	1216
T-Suppressor-/cytotoxische Zellen CD8 ⁺	1552	1357	1804	1549	1687
T-Helfer-/Inducer-Zellen CD4 ⁺	4040	4227	3907	4081	3655
NK-Zellen - CD16 ⁺ , CD56 ⁺ , CD3 ⁻	399	272	441	587	607
CD3 ⁺ , CD16 ⁺ , CD56 ⁺ -Zellen	124	29	177	183	246

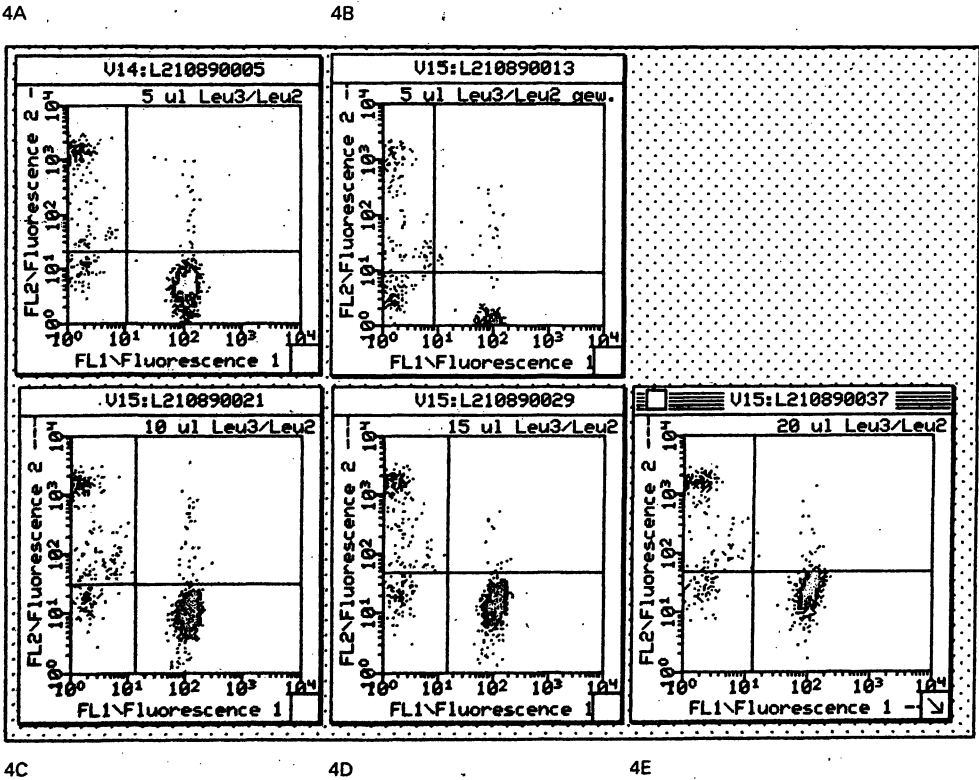
* Mittelwert von 3 verschiedenen Liquorproben mit 187 bis 2200 Leukozyten/µl und bis zu 20 000 Erythrozyten/µl
** gewaschener Routine-Ansatz

Lymphozytensubpopulationen nach Markierung mit 5 µl Antikörper-Reagenz nachgewiesen wurden. Daraus wird gefolgert, daß nach einer einmaligen Zentrifugation zur Anreicherung von Zellen aus einer zellarmen Liquorprobe im Zellsediment nicht nur annähernd gleiche Gesamtlymphozyten (s. o.), sondern auch gleiche Verhältnisse bezüglich der untersuchten Lymphozytensubpopulationen gemessen werden wie in der nativen Ausgangsprobe.

Ferner zeigt sich, daß 5 µl Antikörperreagenz ausreichend sind, um alle in der Liquorprobe vorhandenen Lymphozyten hinreichend zu markieren.

Letzteres wird durch einen Methodenvergleich untermauert, bei dem zellreiche Liquorproben einerseits wie Liquorproben (y), an-

Abb. 4: Darstellung von mit CD4-FITC- (Anti-Leu-3a-FITC-) und CD8-PE- (Anti-Leu-2a-PE-) markierten Liquorlymphozyten-subpopulationen im Fluoreszenz 1 (FL1)/Fluoreszenz 2 (FL2)-Diagramm nach Inkubation mit steigenden Mengen an Reagenz D im Routine Ansatz: 5 µl Reagenz D (Abb. 4A), 10 µl Reagenz D (Abb. 4C), 15 µl Reagenz D (Abb. 4D), 20 µl Reagenz D (Abb. 4E); Abb. 4B: Gewaschener Routine-Ansatz. Gleiche zellreiche Liquorprobe wie in Abb. 2. Beachte den Anstieg in FL2 mit Zunahme von Reagenz D, was nur zum Teil durch Veränderung der Fluoreszenzgrenzen kompensiert werden kann. Weitere Einzelheiten siehe Methodik.



Tab. 3: Bestimmung von 7 Lymphozytensubpopulationen in 10 verschiedenen-zellreichen Liquorproben unkonzentriert nativ und im Zellsediment

Lymphozyten-Subpopulation	Native Liquorprobe % Gesamt-Lymphozyten $\bar{x}$	Zellsediment % Gesamt-Lymphozyten $\bar{x}$	Student Verteilung* p
B-Lymphozyten CD19 ⁺	7,0 %	6,0 %	< 0,10
T-Lymphozyten CD3 ⁺	80,9 %	81,6 %	< 0,25
aktivierte T-Zellen CD3 ⁺ , HLA-DR ⁺	12,5 %	12,7 %	< 0,40
T-Suppressor-/cyto-toxische Zellen CD8 ⁺	21,2 %	22,0 %	< 0,10
T-Helfer-/Inducer-Zellen CD4 ⁺	61,6 %	59,7 %	< 0,10
NK-Zellen - CD16 ⁺ , CD56 ⁺ , CD3 ⁺	8,2 %	9,2 %	< 0,25
CD3 ⁺ -, CD16 ⁺ -, CD56 ⁺ -Zellen	4,7 %	4,6 %	< 0,45

* gepaarter T-Test

dererseits wie Blutproben (x) präpariert und ausgewertet wurden. Vorläufige Berechnungen nach (6) mit der Formel $y = a + bx$ zeigen, daß keine signifikanten Unterschiede bei a von 0 und bei b von 1 bestehen, d. h., daß beide Methoden für zellreiche Liquorproben identisch sind.

Qualitätskontrolle einer Messung

Für jede Liquor- und Blutprobe wurden in den Ansätzen mit den Reagenzien C, E und F die prozentualen Anteile aller CD3⁺-Zellen verglichen. Eine Abweichung von maximal $\pm 5\%$ war dabei zulässig. Die Addition der Prozentwerte für T-, B- und NK-Zellen sollte eine Summe von 100 % ergeben. Für Blutproben wurde ein Toleranzbereich von 95 bis 105 % festgelegt. Bei Liquorproben wurde der Toleranzbereich ebenso mit $\pm 5\%$ definiert, wobei der Sollwert dem Reinheitsgrad des Analysefensters für die Lymphozyten der jeweiligen Probe entsprach.

Es wurden nur Liquor- und Blutproben verwendet, die diesen Bedingungen entsprachen.

Intraserielle Impräzision

Bei jeder analysierten Liquor- oder Blutprobe wurden in den Ansätzen mit den Reagenzien E und F die prozentualen Gesamtanteile an CD3⁺-Zellen ermittelt. Ferner wurde beim Ansatz mit Reagenz D die Prozentsumme der CD4⁺- plus CD8⁺-Zellen gebildet. Diese Werte wurden jeweils mit der CD3⁺-Fraktion aus der Präparation mit Reagenz C verglichen. Der intraserielle Variationskoeffizient, berechnet nach (7), lag zwischen 2,5 und 4 % für Liquorproben (n = 71) und zwischen 2,7 und 9 % für Blutproben (n = 50). In Blutproben streute die Summe aus CD4⁺- plus CD8⁺-Zellen stärker, da hier in der CD8⁺-Fraktion CD56⁺- und CD16⁺-Lymphozytensubpopulationen auftreten können, die andererseits CD3⁺ sind (8).

Aufstellung von vorläufigen Referenzwerten von Lymphozytensubpopulationen im Lumballiquor

In Tab. 4 sind vorläufige Referenzwerte für die 7 analysierten Lymphozytensubpopulationen in 21 Lumballiquorproben von Patienten mit Bandscheibenschaden aufgezeigt. Im Vergleich zu den jeweiligen Lymphozytensubpopulationen im Vollblut sind die T-Lymphozyten (CD3⁺) und T-Helfer-/Inducer-Zellen (CD4⁺) im Liquor höher, die B-Lymphozyten (CD19⁺) und NK-Zellen (CD16⁺, CD56⁺, CD3⁺) niedriger. Der CD4/CD8-Quotient liegt bei 2,2 im Lumballiquor und ist nahezu doppelt so hoch wie im peripheren Blut. Vergleichbare CD4/CD8-Quotienten wurden im Lumballiquor mit anderen Techniken bei nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen gefunden (9, 10). Die gefundenen Werte für die Lymphozytensubpopulationen aus Blut liegen in den für Normalpersonen ermittelten Bereichen (11), jedoch sind bei den hier untersuchten Patienten die Werte für NK-Zellen erhöht.

Zusammenfassend wird festgestellt, daß die hier vorgestellte Methode die eingangs gestellten Anforderungen größtenteils erfüllt.

Tab. 4: Referenzwerte von 7 Lymphozytensubpopulationen im Lumballiquor und Vollblut von 21 erwachsenen Patienten beiderlei Geschlechts mit Bandscheibenschaden

Lymphozyten-Subpopulation	Lumballiquor (n = 21) % der gesamten Lymphozyten	Vollblut (n = 21) % der gesamten Lymphozyten
B-Lymphozyten CD19 ⁺	1,5*	11*
T-Lymphozyten CD3 ⁺	0,3–3,2**	8–13**
aktivierte T-Zellen CD3 ⁺ , HLA-DR ⁺	91,7	69,0
T-Suppressor-/cyto-toxische Zellen CD8 ⁺	80,5–96,6	61–79
T-Helfer-/Inducer-Zellen CD4 ⁺	8,9	9,0
CD4 / CD8-Quotient	3,0–20,3	4–22
NK-Zellen - CD16 ⁺ , CD56 ⁺ , CD3 ⁺	26,6	33,0
CD3 ⁺ -, CD16 ⁺ -, CD56 ⁺ -Zellen	16,9–36,6	26–41
	60,0	45,0
	49,6–76,9	33–53
	2,2	1,3
	1,5–4,4	0,8–1,7
	5,8	20,0
	1,9–10,6	7–27
	2,7	5,0
	1,3–6,5	1–15

* Median

** 10. bis 90. Perzentil

In den Lumballiquorproben lagen folgende Parameter im Referenzbereich (12): Leukozyten 0–5/μl, Erythrozyten < 50/μl, Gesamtprotein < 0,45 g/l, Glukose > 62 mg/dl, Laktat < 2,1 mmol/l.

füllt. Weitere Untersuchungen sind im Gang, die den klinischen Aussagegehalt dieser einfachen Methode zur Bestimmung von Lymphozytensubpopulationen aus Liquor cerebrospinalis überprüfen sollen.

Schrifttum:

1. KLEINE, T. O.: Liquor. In: THOMAS, L. (Hrsg.): Labor und Diagnose. Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg, 939–965 (1984).
2. KLEINE, T. O.: Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik. Thieme Verlag Stuttgart, 76–92 (1980).
3. TERSTAPPEN, L. W. M. M., LOKEN, M. R.: Five-Dimensional Flow Cytometry as a New Approach for Blood and Bone Marrow Differentials. Cytometry 9, 548–556 (1988).
4. KAPS, M., BURKHARDT, E., BERNDT, H. R.: Processing Human CSF Cells for Scanning Electron Microscopy. Mikroskopie 41, 203–207 (1984).
5. TERSTAPPEN, L. W. M. M., SHAH, V. O., CONRAD, M. P., RECKTENWALD, D., LOKEN, M. R.: Discriminating Between Damaged and Intact Cells in Fixed Flow Cytometric Samples. Cytometry 8, 477–484 (1988).
6. PASSING, H., BABLOK, W.: A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 709–720 (1983).
7. STAMM, D.: Der analytische Teilschritt und seine Zuverlässigkeit. In: GREILING, H., GRESSNER, A. M.: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer Verlag 1987, 8–30 (1987).
8. LANIER, L. L., LE, A. M., PHILLIPS, J. H., WARNER, N. L., BABCOCK, G. F.: Subpopulations of human Natural Killer Cells defined by Expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. J. Immunol. 131, 1789–1796 (1983).
9. POLMAN, C. H., deGROOR, C. J. A., KOETSIER, J. C., SMANIA, T., VEERMAN, A. J. P.: Cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis and other neurological diseases: an immunocytochemical study. J. Neurol. 234, 19–22 (1987).
10. SALMAGGI, A., LAMANTIA, L., MILANESE, C., BIANCHI, G., EOLI, M., CAMPI, A., NESPOLO, A.: CSF T-cell subsets in multiple sclerosis: Relationship to cerebrospinal fluid myelin basic protein and clinical activity. J. Neurol. 236, 336–339 (1989).
11. Clinical Monograph No. 1: Normal Values; Definition of a Reference Range for Lymphocyte Subsets of Healthy Adults. Becton Dickinson Immunocytometry Systems. Erembodegem, Belgium; San Jose, Ca, USA.
12. KLEINE, T. O.: Nervensystem. In: GREILING, H., GRESSNER, A. M.: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer Verlag Stuttgart, 859–893 (1987).

Danksagung

Der Fa. Becton Dickinson dankt T. O. Kleine für die großzügige Bereitstellung eines FACScan.

Anschriften der Verfasser:

Prof. Dr. T. O. Kleine
Med. Zentrum für Nervenheilkunde,
Funktionsbereich Neurochemie
Rudolf-Bultmann-Straße 8

Dr. J. Albrecht
Becton Dickinson GmbH
Tellastraße 8–12
6900 Heidelberg 1