

Verlaufskontrolle von HIV-positiven Patienten mit dem Durchflußzytometer EPICS® XL und dem Multi-Q-Prep von Coulter

Controlled observation of HIV-positive patients with Coulter flow cytometer EPICS XL and multi-Q Prep

R. Eckhardt, H. J. Egner
Coulter Electronics, Krefeld

Einleitung

Die Durchflußzytometrie ist eine moderne Methode zum Untersuchen von Einzelzellen anhand deren physikalischen oder biologischen Eigenschaften. Viele praktikable und diagnostisch relevante Applikationen wurden in den letzten 5–10 Jahren durch den Einsatz dieser Geräte in der klinischen Forschung entwickelt. An dieser Stelle sollen nur die Wichtigsten genannt werden:

- Lymphozytensubtypisierung
- Leukämie- und Lymphomdiagnose
- Tumordiagnose
- DNA-/Zellzyklusanalyse
- Chemotherapiemonitoring
- Retikulozytenzählung

Bei allen diesen Anwendungen unterstützt die Durchflußzytometrie den Diagnostiker durch zusätzliche Informationen und gibt Hinweise für die Prognose und den Verlauf einer Erkrankung.

Eine heute weltweit durchgeführte Routineapplikation der Durchflußzytometrie ist das Quantifizieren von Lymphozytensubpopulationen von mit HIV infizierten Patienten. Nach Angaben des Bundesgesundheitsamtes waren bis zum 31. 12. 91 in Europa etwa 500000 Einwohner mit dem HI-Virus infiziert (1). In den Ländern Deutschland, Österreich und Schweiz waren es 85000 Personen, von denen etwa die Hälfte unter regelmäßiger ärztlicher Kontrolle standen (1).

Die Infektion mit dem Human Immundeficiency Virus (HIV) führt zu erheblichen Fehlreaktionen des menschlichen Immunsystems, ähnlich den Autoimmunerkrankungen des „Graft-Versus-Host-Disease“-Typs. Diese Störungen des zellulären Immunsystems lassen sich mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (MAK) nachweisen. Hierzu werden die einzelnen Lymphozytenpopulationen mit MAK und Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend im Durchflußzytometer analysiert und quantifiziert.

Inzwischen ist es gesichertes Fachwissen, daß das HI-Virus zuerst die Zellen befällt, die auf ihrer Oberfläche CD4-Antigene exprimieren (2). Dies sind die CD4⁺-T-Helferzellen und die Monozyten/Makrophagen. Die CD4⁺-Lymphozytenzahl bleibt nach einer Infektion über einen individuellen Zeitraum konstant. Erst mit dem Auftreten

von Antikörpern gegen das HI-Virus im Serum (Serokonversion) beginnt die Zahl der CD4⁺-Lymphozyten abzunehmen. Mit dieser Abnahme der CD4⁺-Lymphozyten geht eine Zunahme der CD8⁺-Lymphozyten (T-Suppressor-Zellen) einher, so daß die Zahl der reifen T-Zellen (CD3⁺) über einen langen Zeitraum konstant bleibt (Abb. 1). Durch die Abnahme der CD4⁺-Lymphozyten und die gleichzeitige Zunahme der CD8⁺-Zellen kommt es zu einer Umkehr der Ratio dieser Zellen (Normal CD4⁺/CD8⁺ >1,5; Aids <1,5).

Da die CD4⁺-Lymphozyten wichtige Aufgaben bei der Abwehr von Infektionserregern und dem Erkennen von entarteten Körperzellen haben, kommt es durch deren Zusammenbruch zu den typischen Begleiterscheinungen einer HIV-Infektion, wie opportunistischen Infektionen und Kaposisarkomen. Das Auftreten und die Schwere dieser Erkrankungen korreliert mit der Anzahl der CD4⁺-Lymphozyten im peripheren Blut (3). Allein durch die Quantifizierung der CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozytenpopulation und deren Ratio lassen sich wichtige Aussagen zum Stadium einer HIV-Infektion treffen.

Weitere prognostisch wichtige Lymphozytensubpopulationen sind die aktivierten CD3⁺- und CD8⁺-Zellen. Ein Anstieg des Anteils dieser Zellen deutet auf eine Progression der Erkrankung hin (4).

Aus dem Verbundforschungsobjekt Frankfurt/Main stammt die Beobachtung, daß die bei vielen Patienten manifeste Knochenmarksuppression durch eine T-Zell-Subpopulation verursacht wird, die den T-Zell-Rezeptor γ/δ (Gamma/Delta) trägt (5). Diese Zellpopulation schädigt die Knochenmarkzellen entweder durch Freisetzen von Zytokinen oder aber durch direkten Zell-Zell-Kontakt. Eine Quantifizierung dieser Zellen sollte demzufolge regelmäßig bei HIV-Infizierten durchgeführt werden.

Gerät, Reagenzien und Messung

Gerätebeschreibung

Der Coulter® EPICS® XL ist ein kompaktes Durchflußzytometer, das sich mit dem Multi-Q-Prep und dem Multi-Carousel-Loader (MCL) zu einem kompletten System mit automatischer Probenvorbereitung und Probenzufuhr erweitern läßt.

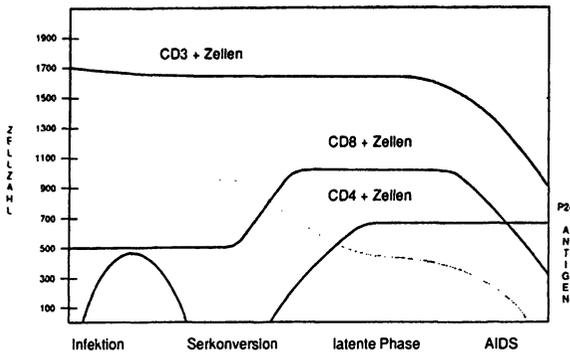


Abb. 1: Schematische Verlaufskurve von unterschiedlichen T-Zell-Populationen und des p24-Virusantigens während einer HIV-Infektion. rot: p24-Antigen; schwarz: CD3⁺ T-Lymphozyten; grün: CD8⁺ T-Lymphozyten; blau: CD4⁺ T-Lymphozyten, zusammengestellt nach verschiedenen Autoren

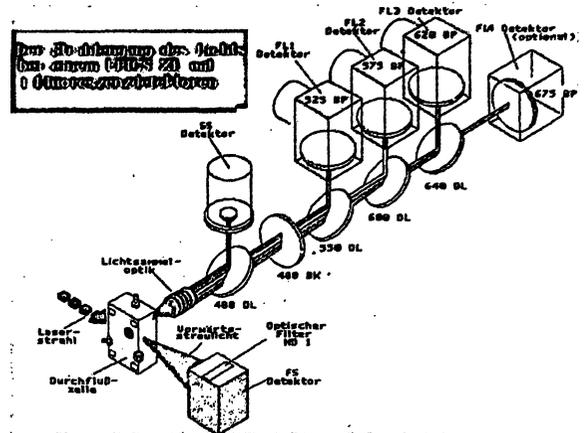


Abb. 2: Darstellung des Strahlenganges von Laser- und Fluoreszenzlicht am Coulter® EPICS® XL, ausgerüstet mit 4 Fluoreszenzlichtdetektoren. Die optischen Eigenschaften der einzelnen Filter sind mit angegeben

Das Durchflußzytometer erlaubt die simultane Messung von Vorwärts- und 90°-Streulicht sowie 4 verschiedener Fluoreszenzen. Insgesamt können pro Zelle 11 verschiedene Parameter (aus 20 Möglichen), inklusive Zeit und Ratio, analysiert werden. Die Analysenrate ist ungefähr 4000 Zellen/sec.

Die Signale werden direkt nach der Messung digitalisiert und durch Glasfaserkabel an die Workstation übermittelt. Mit Hilfe von vier Transputern werden Rechenoperationen wie Lin-Log-Konversion, Farbkompensation und Ratiobildung durchgeführt. Anschließend werden auf dem Monitor der Workstation bis zu 8 Histogramme dargestellt. Dabei geschieht die statistische Analyse in Echtzeit.

In diesen Histogrammen können 24 Statistikregionen definiert werden, 16 davon als Gates, die zusätzlich miteinander verknüpft werden können. Alle Gates können wahlweise als Autogating-Funktion angewählt werden. Durch Einsatz entsprechender Kontrollen ist es möglich, die Bereiche für eine positive Fluoreszenzmarkierung automatisch zu definieren. Durch den Multi-Carousel-Loader (MCL), in Verbindung mit dem hohen Automatisierungsgrad der Software, ist ein Probendurchsatz von etwa 100 Proben in der Stunde möglich.

Alle Meßdaten können sowohl als Listmode oder Histogrammdateien abgespeichert werden und stehen jederzeit zur Reanalyse zur Verfügung. Die Statistikdaten können als ASCII-Files in andere Programme geladen werden und stehen dann für weitere Auswertungen in Datenbanken oder Statistikprogrammen, z. B. Exel® oder Lotus®, zur Verfügung. Auch können komplette Histogramme in Textverarbeitungsprogramme eingebunden werden.

Durch den Coulter® Multi-Q-Prep und den MCL wird aus dem EPICS® XL ein nahezu geschlossenes System zur Ver-

arbeitung hochinfektöser Blutproben. Die Gefahr eines Kontaktes mit infektiösem Blut ist auf ein Minimum reduziert.

Reagenzien und Untersuchungsmaterial

Q-Prep oder Multi-Q-Prep (Coulter)
Cyto Stat monoklonale Antikörper (Coulter)

- T3-ECD/T4-RD1/T8-FITC (CD3/CD4/CD8)
- T3-ECD/I3-RD1/T1yA1-FITC (CD3/HLA-DR/-)
- T8-ECD/I3-RD1/NKH1-FITC (CD8/HLA-DR/CD56)
- T11-RD1/B1-FITC (CD2/CD20)
- entsprechende isotypische Negativkontrollen

Die Antikörperkombinationen können teilweise fertig gemischt bezogen oder aber vom Anwender aus Einzelantikörpern selbst kombiniert werden.

2 ml Vollblut (Antikoagulant: EDTA oder Heparin)

Für die Durchführung der Antikörpermarkierungen werden je Test 100 µl Vollblut in ein Probenröhrchen vorgelegt und anschließend mit 10 µl der 3-Farb-Cyto-Stat MAKs gemischt und 10–15 min inkubiert. Die Lyse der Erythrozyten wird anschließend mit dem Multi-Q-Prep durchgeführt.

Für die 3fach-Markierung aus Einzelantikörpern oder einem einzel- und einem doppelmarkierten MAK werden je 10 µl dieser Antikörper zu 100 µl Vollblut gegeben, 10–15 min inkubiert und anschließend mit dem Multi-Q-Prep verarbeitet (6).

Der Multi-Q-Prep ist in der Lage, 32 Proben in weniger als 19 min für die durchflußzytometrische Analyse zu verarbeiten. Die fertigen Proben können dann direkt in den

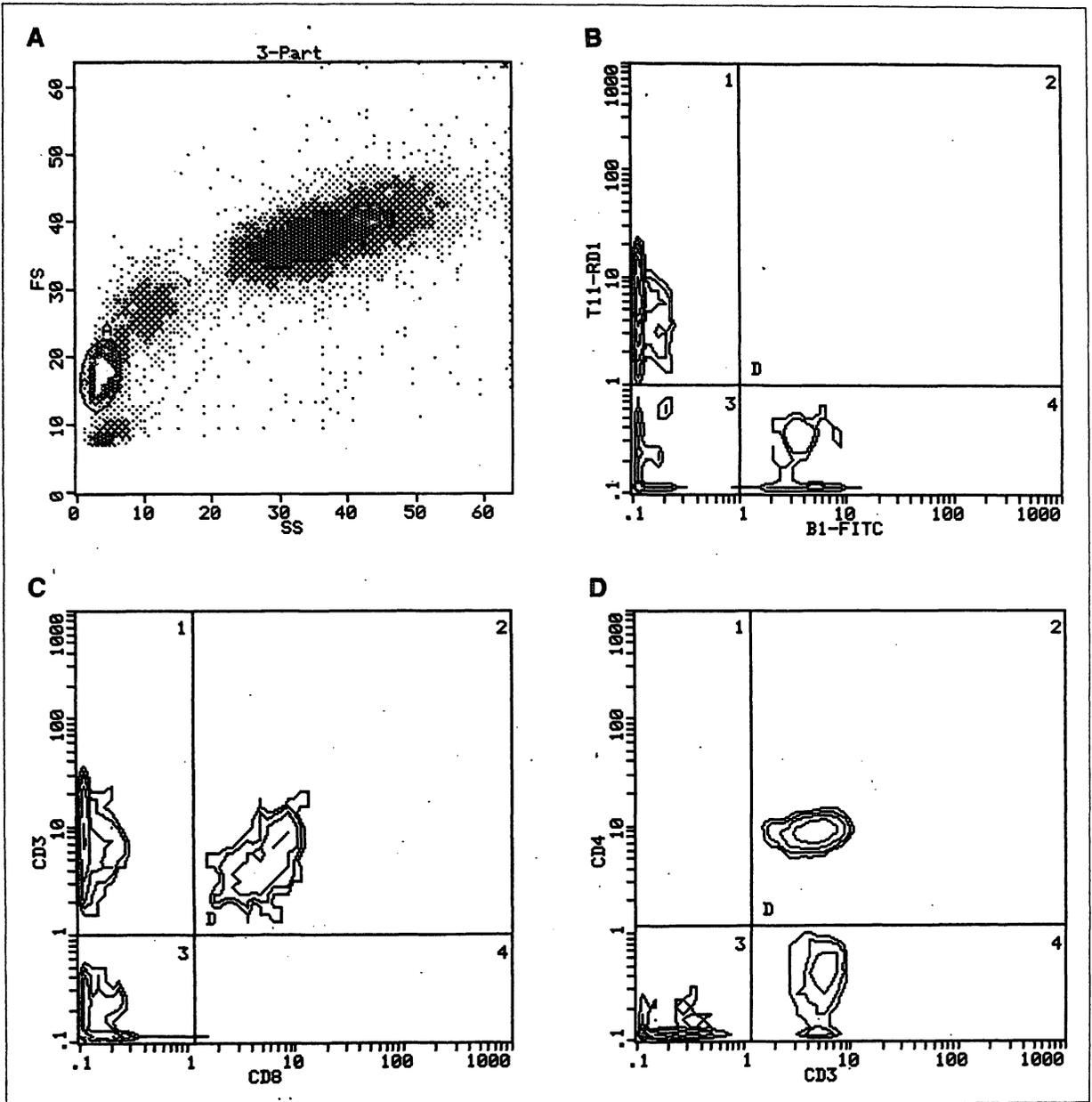


Abb. 3: Zweiparameter-Histogramme von Laserlichtstreuung (a) und Antikörperfluoreszenzmarkierung (B-D) an Vollblut eines gesunden Blutspenders.

A Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Deutlich sind die drei Leukozytenpopulationen (Lymphozyten – unten links; Monozyten – mitte links; Granulozyten – oben rechts) zu erkennen. Die Lymphozyten sind durch ein Bitmap (Gate) markiert. Nur Zellen innerhalb des Bitmaps werden für die Fluoreszenzanalyse herangezogen

B Fluoreszenzmessung nach Markierung mit den Antikörpern T11-RD1/B1-FITC (CD2/CD20).

C Doppelantikörpermarkierung CD3/CD8. Die Population im Quadrant 2 (oben rechts) sind die Suppressor-zytotoxischen-T-Zellen.

D Fluoreszenzmarkierungen mit dem Antikörperpaar CD3/CD4. Die Zellen im Quadrant 2 sind die T-Helferzellen. Eventuell im Bitmap eingeschlossene Monozyten würden aufgrund ihrer Reaktion mit CD4 in Region 1 (oben links) erscheinen, da sie nicht mit CD3 reagieren.

Multi-Carousel-Loader des EPICS® XL überführt werden. Dieser ist mit einem Barcode-Scanner ausgerüstet und identifiziert somit automatisch die Nummer der Probe und deren Position im Karussell.

Messung

Zur Messung werden die Zellen, in Flüssigkeit suspendiert, der Durchflußzelle zugeführt und dort mit Hilfe der

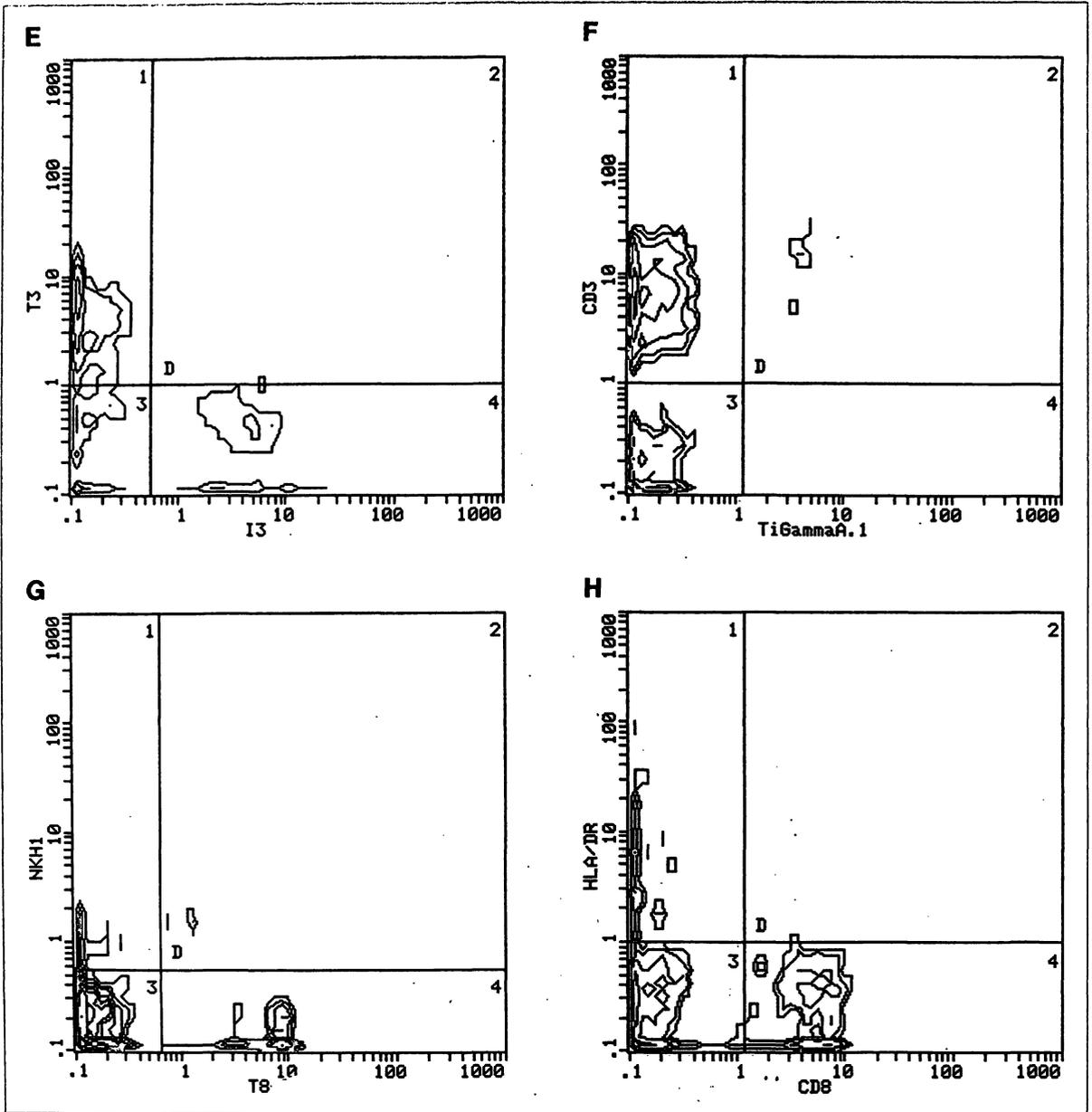


Abb. 3: E Messung der Antikörperfluoreszenz nach Markierung mit den Antikörpern T3/3 (CD3/HLA-DR). In dieser Probe befinden sich keine aktivierten T-Zellen, da in Region 2 keine Ereignisse akquiriert sind.
 F Detektion der beiden T-Zell-Populationen mit den T-Zell-Rezeptoren α/β (alpha/beta, Quadrant 1) und γ/δ (Gamma/Delta, Quadrant 2). Im Zuge einer HIV-Infektion werden vermehrt Zellen des T-Zell-Rezeptortyps γ/δ im peripheren Blut gefunden.
 G Bestimmung der Killerzellpopulation mittels der Antikörper CD8 und CD56, die Zellen im Quadrant 2, CD8⁺ CD56⁺.
 H Doppelmarkierung mit den Antikörpern CD8 und HLA-DR. Die aktivierten Suppressor-Zytotoxischen-T-Zellen treten im Quadrant 2 auf

Mantelflüssigkeit hydrodynamisch fokussiert. In der Durchflußzelle passieren die Zellen den Laserstrahl. Das Laserlicht wird von den Zellen entsprechend ihrer physikalischen Eigenschaften gestreut und gleichzeitig werden die an die Zelle gegebenen Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission angeregt und die Fluoreszenzen werden auf Detektoren aufgefangen und verstärkt.

Der Strahlengang im EPICS® XL ist in Abbildung 2 dargestellt..

In der Abbildung 3 ist der Ausdruck der Histogramme einer Messung von Laserlichtstreuung und unterschiedlicher Antikörperfluoreszenzen dargestellt. Histogramm A zeigt die Vorwärts- und Seitwärts-Laserlichtstreuung der

Zellen und das Bitmap um die Lymphozyten. Die Histogramme B-H zeigen zweiparametrische Darstellungen der unterschiedlichen Antikörperfluoreszenzen.

Die Statistikquadranten wurden jeweils automatisch mit Hilfe der isotypischen Negativkontrolle gesetzt.

Literatur:

1. Aids-Nachrichten aus Forschung und Wissenschaft. Herausgeber: Aids-Zentrum des Bundesgesundheitsamtes Band 2/1992.
2. Geissler, R. G., Rossol, R., Ganser, A. Verbesserung der Proliferation hämatopoetischer Knochenmarkvorläuferzellen durch Depletion einer Gamma/Delta-T-Zellrezeptor-positiven Lymphozytenpopulation bei Patienten mit progredienter HIV-Infektion. 4. Deutscher Aidskongreß, 63.

3. Redfield, R., Burke, B. (1988) HIV-Infektion – The clinical picture. *Sci. Amer.* 259, 82.

4. Levacher, M., Hulstaert, F., Tallet, S. (im Druck) The significance of activation markers on CD8 Lymphocytes in human Immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value.

5. Weber, I. N., Weiss, R. A. (1989) Der Zelluläre Mechanismus der HIV-Infektion. In *Spektrum der Wissenschaft, Sonderheft 7, Aids*.

6. Eckhardt, R. (1991) Durchflußzytometrie, eine schnelle und einfache Methode zur Analyse großer Zellzahlen. *Lab. Med.* 15, 563-569.

Anschrift des Verfassers:

Dr. rer. nat. Rolf Eckhardt

H. J. Egner

Coulter Electronics GmbH

4150 Krefeld

Ab 1. 7. 93 (neue Postleitzahl) 47705 Krefeld