

# Durchflußzytometrie in der Klinischen Diagnostik

**Positionspapier der Arbeitsgruppe Durchflußzytometrie und Quantitative Mikroskopie der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin**

Flow Cytometry in Clinical Diagnostics

Position Paper of the Working Group Flow Cytometry and Quantitative Microscopy of the German Society for Clinical Chemistry and the German Society for Laboratory Medicine

U. Sack<sup>1</sup>, G. Rothe<sup>2</sup>, S. Barlage<sup>2</sup>, R. Gruber<sup>3</sup>, D. Kabelitz<sup>4</sup>, T.O. Kleine<sup>5</sup>, A. Lun<sup>6</sup>, H. Renz<sup>7</sup>, A. Ruf<sup>8</sup> und G. Schmitz<sup>2,9</sup>

**Zusammenfassung:** Die Durchflußzytometrie hat sich in den vergangenen Jahren von einer reinen Forschungsmethode zu einem fest etablierten diagnostischen Verfahren entwickelt. Die verwendeten Protokolle und die Indikationen zur durchflußzytometrischen Diagnostik sind ebenso wie die technischen Ansätze und Datenanalyse in ständiger Entwicklung begriffen. Das Ziel des vorliegenden Positionspapiers ist es, anhand aktueller Literatur und moderner Protokolle und Techniken die diagnostische Wertigkeit durchflußzytometrischer Methoden kritisch zu beleuchten. Dabei werden Verfahren, die nachgewiesenermaßen einen Stellenwert in der Primärdiagnostik und Therapiekontrolle besitzen, ebenso dargestellt wie Verfahren, deren Bedeutung bei einem hohen diagnostischen Potential noch nicht ausreichend belegt ist. Die Autoren beabsichtigten nicht, mit der vorliegenden Übersicht Standards zu definieren, sondern wollen für die Weiterentwicklung der Durchflußzytometrie, aber auch für die Verständigung mit anderen interessierten Fachgesellschaften eine Diskussionsgrundlage bereitstellen.

**Schlüsselwörter:** Durchflußzytometrie; Zelluläre Diagnostik.

**Summary:** Flow cytometry in recent years has evolved as a firmly established diagnostic method after initially being only a research method. Protocols and indications for flow cytometric diagnostics as well as technical approaches and strategies for data analysis are currently in continuous development. The goal of this position paper is the critical discussion of the diagnostic value of flow cytometric methods based on recent literature and modern protocols and techniques. Methods with a well established value in primary diagnostics and therapy control are discussed as well as methods which are still of uncertain relevance despite a high diagnostic potential. The authors do not intend to define standards with this review but to provide a basis for the further development of flow cytometry as well as development of consensus with other interested scientific societies.

**Keywords:** flow cytometry; cellular diagnostics.

<sup>1</sup>Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Leipzig

<sup>2</sup>Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Universität Regensburg

<sup>3</sup>Zentrallabor Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität, München

<sup>4</sup>Institut für Immunologie, Klinikum an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

<sup>5</sup>Philipps-Universität, Medizinisches Zentrum für Nervenheilkunde, Funktionsbereich Neurochemie, Marburg

<sup>6</sup>Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Campus Virchow-Klinikum, Berlin

<sup>7</sup>Abteilung Klinische Chemie und Zentrallaboratorium, Klinikum der Universität Marburg

<sup>8</sup>Städtisches Klinikum Karlsruhe, Zentrum für Labormedizin, Mikrobiologie und Transfusionsmedizin, Karlsruhe

<sup>9</sup>Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Gerd Schmitz, Institut für Klinische Chemie, Klinikum der Universität Regensburg, D-93042 Regensburg. Fax: +941-944-6202; E-mail: Gerd.Schmitz@klinik.uni-regensburg.de

Eingegangen: 12. Mai 2000 / Angenommen: 12. Mai 2000

Die Durchflußzytometrie ist ein automatisierbares Verfahren zur Analyse von Zellen in Suspension. Die technische Entwicklung reicht von einfachen Zählgeräten bis hin zu modernen multiparametrischen Geräten [1, 2]. Diese technische Entwicklung war eng mit der Entwicklung der Computertechnologie verknüpft, so daß die Ansteuerung der Meßgeräte und die Analyse der bei der Messung erhobenen Daten trotz steigender Komplexität bewältigt und zunehmend vereinfacht werden konnte.

Die Fortschritte in Immunologie, Zellbiologie, Biochemie, Molekularbiologie, molekularer Medizin und auf vielen anderen Gebieten führen zu einem raschen Ansteigen der Fragestellungen und verfügbaren Protokolle. Zunehmend wird dabei klar, daß durchflußzytometrische Untersuchungen einen wichtigen Beitrag für die Diagnostik leisten können. Immunregulatorische

Prozesse bei physiologischen und pathologischen Vorgängen lassen sich am frühesten an Zellen des Immunsystems untersuchen, oft einen beträchtlichen Zeitraum vor dem Auftreten serologischer Parameter.

In den vergangenen Jahren hat sich die Durchflußzytometrie von einer reinen Forschungsmethode zu einem etablierten und zunehmend standardisierten Verfahren in der Routinediagnostik entwickelt. Für die Routinediagnostik stehen mittlerweile weitgehend automatisierte Lösungen zur Verfügung. Zu den gebräuchlichen Anwendungen sind heute Protokolle etabliert, die eine schnelle und einheitliche Abarbeitung der Untersuchungsproben zulassen. Dennoch muß konstatiert werden, daß eine umfassende Standardisierung der Durchflußzytometrie heute noch nicht erreicht ist und zudem viele Untersuchungen einen erheblichen Anspruch an Sorgfalt und Sachverstand der beteiligten Personen stellen.

Allgemeine Hinweise zu Entnahme, Lagerung und Transport von Proben sowie zur Testinterpretation bilden den ersten Teil der vorliegenden Übersicht. Im folgenden werden die Verfahren beschrieben, die a) aufgrund ausreichender Standardisierung und erwiesenem diagnostischen Nutzen in der Routinediagnostik fest etabliert sind, b) an der Schwelle zur diagnostischen Nutzung stehen, aber noch keinen gesicherten diagnostischen Nutzen haben, nicht ausreichend standardisiert sind oder für die noch keine routinetauglichen Protokolle etabliert wurden, und c) möglicherweise das Potential haben, späteren Eingang in die Routinediagnostik zu finden, aber noch ein besonders hoher Forschungsbedarf besteht.

Danach werden, ausgehend von den verfügbaren Methoden, Indikationen und Referenzen in tabellarischer Form dargelegt, sofern dies nicht bereits im Text geschehen ist.

## 1. Präanalytik, technische Hinweise und Dateninterpretation

### 1.1. Untersuchungsmaterial und Probenvorbereitung

Die meisten Untersuchungen für die Routinediagnostik werden heute aus EDTA-antikoagulierte Vollblut durchgeführt. Es ist aber ebenso möglich, mit Zitrat- oder Heparin-antikoagulierte Blut zu arbeiten. Von extrazellulärem Kalzium abhängige Vorgänge wie Oxidativer Burst, Phagozytose oder die intrazelluläre Zytokinmessung erfordern allerdings im Falle moderner Vollblutmethoden Heparinblut.

Die Proben müssen generell möglichst frisch ins Labor gelangen, insbesondere bei Messung von throm-

bozytären Antigenen, Aktivierungsmarkern und funktionellen Tests. Für Immunphänotypisierungen wird in aller Regel die taggleiche Bestimmung angestrebt. Dies ist jedoch bei der Leukämie- und Lymphomdiagnostik oft nicht möglich [3]. Blut sollte im allgemeinen bei Raumtemperatur, Körperflüssigkeiten mit einer geringen Stabilität von Zellen eher gekühlt aufbewahrt und transportiert werden. Die eingesetzte Zellzahl liegt bei den meisten Messungen um die  $10^5$  Zellen pro Einzelansatz.

Damit eine Probe durchflußzytometrisch gemessen werden kann, muß über ein für die zu bestimmenden Eigenschaft spezifisches Nachweisprinzip der Analyt für fluoreszenzoptische Detektion zugänglich gemacht werden. Das kann über fluorochrommarkierte monoklonale Antikörper oder biochemische Reaktionen mit fluoreszierenden bzw. fluorogenen Substraten erfolgen, die einzeln oder in Kombination eingesetzt werden.

Während in ersten Protokollen die Färbung von Zellen des Blutes erst nach Separation der Leukozyten erfolgte, wird heute meist Vollblut inkubiert und vor der Messung eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dabei unterscheiden sich Rezepturen und Fixierungseigenschaften der verschiedenen kommerziell angebotenen Produkte erheblich und beeinflussen die Ergebnisse in unterschiedlichem Maße.

### 1.2. Messung im Durchflußzytometer

Die eigentliche Messung erfolgt in Durchflußzytometern, die in verschiedener Bauart von einigen Herstellern in mittlerweile routinetauglicher Konfiguration und Softwareausstattung angeboten werden. Die am stärksten verbreiteten Gerätetypen verwenden heute als Lichtquelle einen Argonlaser mit 488 nm Anregungswellenlänge zum Teil ergänzt durch eine Laserdioden mit 635 nm Emission. Auf diese Geräte sind die meisten Applikationen mit bis zu vier simultanen Immunfluoreszenzen ausgerichtet. Durch Kombination mit anderen Lasern oder Anregungsquellen und Verwendung speziell entwickelter Farbstoffe sind heute Vielfarbfluoreszenzmessungen reproduzierbar möglich [4].

Um die Expression von Zelloberflächenmolekülen besser quantifizieren zu können, gibt es verschiedene Ansätze zur Kalibration der gemessenen Fluoreszenzintensitäten [5-10]. Dabei werden die einzelnen Methoden recht kontrovers diskutiert [11, 12]. Keines der derzeit kommerziell angebotenen Verfahren zur Antigenquantifizierung konnte bislang multizentrisch validiert werden, obwohl solche Studien für einzelne Parameter vereinzelt schon existieren [13].

Wie für jede in der Routine eingesetzte Diagnostik muß auch hier eine Qualitätssicherung stattfinden [14]. Zur internen Qualitätskontrolle wird empfohlen, mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kalibrierungspartikeln die Fluoreszenzkanäle, sowie die Kompensation einzustellen. Dies ist alternativ auch mit standardisierten und auch kommerziell erhältlichen Kontrollzellen möglich. Letztere könnten auch in der Durchflußzyto-

**Nicht standardisierte Abkürzungen:** B-CLL, chronisch lymphatische Leukämie der B-Zellreihe; DAF, decay accelerating factor; FH, familiäre Hypercholesterinämie; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; GPI, Glykosylphosphatidylinositol; IFN- $\gamma$ , Interferon- $\gamma$ ; IL-1 $\alpha$ , Interleukin-1 $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ , Interleukin-1 $\beta$ ; LDL, Low density Lipoprotein; MFI, Mittlere Fluoreszenzintensität; MGUS, monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz; PNH, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie; REAL-Klassifikation, Revised European-American Lymphoma Classification; TNF- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ; ZNS, Zentralnervensystem.

metrie in einer Analysenserie als Präzisionskontrolle mitgemessen werden. Weiterhin gehören auch Richtigkeitskontrollen und externe Kontrollen in Form von Ringversuchen (z.B. INSTAND e.V.) zur guten Laborpraxis.

Die Messung ist bei Verwendung von „Single-Plattform“-Assays, bei denen eine Absolutzählung von Zellen in einer volumenkalibrierten Messung unmittelbar durchgeführt wird, besonders exakt [15, 16]. Sofern diese nicht verfügbar sind, können als Ausweichmöglichkeiten „Dual-Plattform“-Lösungen, bei denen Absolutzahlen aus einer parallelen Bestimmung an einem Hämatologieanalysator abgeleitet werden, eingesetzt werden.

Plausibilitätskontrollen tragen zur Qualitätssicherung bei. Dazu zählen der Vergleich der durchflußzytometrisch erstellten Ergebnisse mit den Ergebnissen am Hämatologieautomaten (z.B. Monozyten vs. CD14/45 positive Zellen; bei Absolutzählungen auch Lymphozytenprozent und absolute Lymphozytenzahl), die Kontrolle der Lymphozytensumme, sofern mit einem Lymphozyten-„Gate“ gearbeitet wird ( $\% T + \% B + \% NK = 100 \pm 5\%$ ), und die Kontrolle der Übereinstimmung der pro Patient mehrfach bestimmten Marker (allgemein wird CD3 in mehreren Ansätzen bestimmt).

### 1.3. Datenauswertung und -analyse

Neben der reinen Meßwerterfassung sind in die heute verfügbaren Durchflußzytometer Programme für Mehrparameteranalysen und Datenauswertung der gespeicherten Meßdaten integriert. Die für Routinediagnostik geeigneten Softwarepakete schließen Algorithmen zur standardisierten Geräteeinstellung und Qualitätskontrolle ebenso ein wie Möglichkeiten zur Abarbeitung vordefinierter Parameterkombinationen zur Abklärung typischer Fragestellungen. Diese Algorithmen sind mittlerweile auch an die Messung geringer Zellzahlen anpaßbar. Weiterhin sind Verknüpfungen mit Labordatensystemen und die Befundausgabe in deutscher Sprache wesentliche Anforderungen an derartige Softwarepakete, die bei Plattformscheidungen eine Rolle spielen sollten.

### 1.4. Dateninterpretation

Die Interpretation durchflußzytometrisch erstellter Werte ist von einer Reihe von Einfluß- und Stör-Faktoren abhängig:

- Blutentnahme, Lagerung und Transport:
  - Körperlage: wie für alle korpuskulären Bestandteile ca. 5-10% niedrigere Werte im Liegen (für Absolutbestimmungen)
  - Tageszeit: Für viele Werte besteht eine zirkadiane Rhythmik [17, 18]
  - Zu lange Lagerungs- oder Transportzeiten verfälschen die Ergebnisse (z.B. für die Lagerung von Blut bei 4°C sind in Abhängigkeit von der Aufarbeitungstechnik Veränderungen in der Detektion von Lymphozyten-populationen beschrieben) [19-21]

- Individualfaktoren
  - permanente
    - Lebens-/Ernährungsgewohnheiten (z.B. Alkohol-, Nikotin-Abusus) [22-25]
    - Die Meßwerte sind vom ethnischen Hintergrund abhängig [26-29]
    - Geschlechtsabhängigkeit [27, 28, 30, 31]
    - Erbfaktoren (z.B. CD45RA, CD16b [32, 33])
  - langfristige
    - Die Verteilung der Populationen peripherer Lymphozyten im Kindesalter ist signifikant unterschiedlich zu den Werten bei Erwachsenen und strikt altersabhängig [34, 35].
    - In der Schwangerschaft sind viele Parameter physiologischerweise verschoben [36-39].
  - kurzfristige
    - Körperliche Aktivität, Immobilisation [40, 41]
    - Ernährung, Nahrungskarenz
    - verschiedene Grunderkrankungen [42]
    - verschiedene Therapieformen (z.B. Chemotherapeutika, Immunsuppressiva, Immunstimulantien) [43-46]

### 1.5. Personelle und strukturelle Anforderungen an durchflußzytometrische Labors

Da es für eine sachgemäße Analytik wesentlich ist, Proben in frischem Zustand aufzuarbeiten, sollten durchflußzytometrische Labors in unmittelbarer Nähe der probenentnehmenden Einrichtungen oder Praxen gelegen sein. Trotz aller automatisierten Detaillösungen ist es derzeit noch unerlässlich, im durchflußzytometrischen Labor speziell geschultes technisches Personal zu beschäftigen, das über eine umfangreiche Erfahrung verfügen sollte, um weitgehend selbständig die technischen Arbeitsabläufe durchführen zu können. Die Verfahren sollten in Standardarbeitsvorschriften (SOPs) dargestellt sein, die eine einheitlich, jedoch derzeit noch nicht standardisierte formale Struktur aufweisen sollten. Die Betreuung des Labors sollte einem wissenschaftlichen Mitarbeiter obliegen, der mit den durchflußzytometrischen Verfahren gründlich vertraut ist.

## 2. Durchflußzytometrische Untersuchungen in der Routinediagnostik

### 2.1. Etablierte diagnostische Verfahren

#### *Phänotypisierung lymphatischer Zellen*

Die im Rahmen der prognostischen Charakterisierung der HIV-Erkrankung etablierte Standard-Parameterkombination zur Charakterisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes umfaßt Antikörper gegen T-(CD3), T-Helfer- (CD4), T-zytotoxische (CD8), B-(CD19) und NK-Zellen (CD16 und oder CD56 sowie den fakultativen Einsatz von CD14 oder CD13 in Kombination mit CD45) [47]. Dieses Panel wurde primär für die Absolutzählung von CD4+ T-Zellen in einer „Dual-Plattform“-Technologie etabliert. CD14 und CD45 dienen als Gate-Kontrolle zur Etablierung

**Tabelle 1** Indikationen zur durchflußzytometrischen Untersuchung

Untersuchung	Parameter	Indikationen	Referenzen
<b>Immunphänotypisierung</b>			
Peripheres Blut	Lymphozyten-Subpopulationen	HIV Transplantation HIV HIV Omenn-Syndrom SCID Primärdiagnostik und Verlaufskontrolle bei Non-Hodgkin-Lymphomen	[48-50] [53-57] [60-67, 253, 255] [254] [52] [58, 59] [3, 68, 70, 71, 77-79]
	CD38+CD8+ Naive/Memory-T-Zellen T-Zell-Repertoire B-Zell-Aktivierung Lymphomzellen	Stammzelltransplantation Mb. Bechterew Kawasaki-Syndrom Paroxysmale nokturne Hämoglobinurie Anämiediagnostik Qualitätskontrolle	[83, 84, 86, 87] [92-94] [97-101] [102, 105-107] [108-111] [115, 116]
	CD34+ Stammzellen HLA-B27 V <sub>H</sub> T-Zellen CD16+ & CD66b+ Granulozyten Retikulozyten Residualzellen in filtrierten Blutkomponenten LDL-Rezeptor Fetale Erythrozyten CD11a/b auf Granulozyten HLA-DR auf Monozyten HLA-DR4 Aktivierte Thrombozyten, Retikulierte Thrombozyten	Familiäre Hypercholesterinämie Fetomaternale Hämorrhagie Leukozytenadhäsionsdefizienz Sepsis Rheumatoide Arthritis Thrombotische Erkrankungen, Thrombozytopenie	[117-120] [121] [151-153] [198, 211] [221-226] [122-124, 126, 127]
Knochenmark	Blastäre Zellen	Primärdiagnostik und Verlaufskontrolle bei akuten Leukämien und myeloproliferativen Erkrankungen	[3, 68-72, 74-76, 326]
	Lymphomzellen	Primärdiagnostik und Verlaufskontrolle bei Non-Hodgkin-Lymphomen	[3, 68, 71, 77-79]
	Plasmazellen	Differentialdiagnostik klonaler Gammopathien	[80, 81]
Fötale Blut	Lymphozyten-Subpopulationen	SCID	[51]
Liquor	Lymphozyten-Subpopulationen	entzündliche / autoimmune Erkrankungen des ZNS	[181, 182]
Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit	Lymphozyten-Subpopulationen	entzündliche / autoimmune Lungenerkrankungen Interstitielle Lungenerkrankungen Sarkoidose Kollagenosen exogen allergische Alveolitis und andere eosinophile Lungenerkrankungen	[154, 155, 158-160, 167, 168, 170-172, 174, 175] [157, 161-166] [161-163] [161, 163, 173] [156, 161, 163, 169, 176]
Lymphknoten	hämatopoetische (Tumor-)Zellen	Leukämie-/Lymphomdiagnostik	[193, 194]
<b>Funktionelle Charakterisierung</b>			
Peripheres Blut	Th1/Th2 Adenosindeaminase Interleukin-2-Produktion ZAP-70-Kinase Virus-spezifische T-Zellen Allogen-aktivierte T-Zellen	HIV SCID SCID SCID Überwachung antiviraler Therapien Posttransplantationsmonitoring, Graft-vs-Host-Disease	[287, 288] [321] [276] [322, 323] [230, 231] [232, 233]
	Tumor-spezifische T-Zellen	Therapiemonitoring supportiver Immuntherapien	[234]
	Mitogenaktivierte T-Zellen Phagozytoserate und -intensität	generelle Beurteilung der Immunreagibilität angeborene und transiente Phagozytosedefekte	[235] [144, 242-246]
	NADPH-Oxidasedefekt	Chronische Granulomatose, aber auch Sepsis, SIRS	[138-140, 142-149]
	Basophilendegranulation auf Allergenstimulation hin Myeloperoxidase	grenzwertige allergische und pseudoallergische Diagnosen Myeloperoxidasemangel	[248-250] [320]
<b>DNA-Analyse</b>			
Biopate	Ploidie	Spezifität von Tumorzellen	[133-137]
<b>Sonstige Verfahren</b>			
Peripheres Blut	Präformierte Antikörper (auch nicht komplementaktivierende) antithrombozytäre Antikörper	Cross-Match-Analytik zur Transplantationsvorbereitung Abklärung von Thrombozytopenien	[150] [130-132]

eines Lichtstreuungsfensters mit überwiegendem Gehalt an Lymphozyten. Diese Marker werden daher üblicherweise nicht befundet und sind bei „Single-Plattform“-Analytik, das heißt unmittelbarer Ermittlung der Absolutkonzentration von B- und T-Zellen auf einer volumenkalibrierten Plattform nicht notwendig. Ebenso dient die Bestimmung von CD8 T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen der Prüfung der Vollständigkeit des „lymphatischen“ Analysefensters.

Ausgehend von diesem Protokoll werden heute, teilweise unter Zuhilfenahme weiterer Marker, Lymphozyten zur generellen Beurteilung des zellulären Immunstatus charakterisiert, insbesondere bei HIV-Infektion [48-50], Immundefekten [51, 52] und nach Transplantation [53-57]. Die Beurteilung von Immundefekten kann im Einzelfall die Einbeziehung zusätzlicher Parameter auch auf B-Zell-Ebene erfordern [58, 59]. Häufig wird das Panel dabei je nach klinischer Fragestellung durch die Messung von Aktivierungsmarkern, namentlich HLA-DR, Interleukin-2-Rezeptor ( $\alpha$ -Kette: CD25), CD38 [60-67], und Transferrin-Rezeptor (CD71) ergänzt.

#### *Leukämie- und Lymphomdifferenzierung*

Die Immunphänotypisierung mit Hilfe der Durchflußzytometrie hat zunehmend bisherige Methoden der Morphologie und Zytochemie in der Primärdiagnostik und Verlaufskontrolle hämatologischer Neoplasien ergänzt bzw. ersetzt. Die Multiparameteranalyse aus Vollblut oder Knochenmarksuspensionsmaterial ohne vorherige Anreicherung über einen Dichtegradienten, verbesserte Auswertestrategien sowie die Verfügbarkeit neuer Antikörper und Fluorochrome erlauben hierbei eine detaillierte Charakterisierung des zellulären Phänotyps (Linienzugehörigkeit, Reifegrad) sowie eine sensitive Detektion residualer Zellen unter Therapie [3, 68-72].

Hinsichtlich der Diagnostik Akuter Leukämien ermöglicht die Durchflußzytometrie die zweifelsfreie Linienzuordnung der Zellen in nahezu allen Fällen, so daß die Diagnose einer undifferenzierten Leukämie zunehmend seltener gestellt werden muß. Scoring-Systeme zur Klassifikation der Blasten anhand einer vorgegebenen Wertigkeit einzelner exprimierter Antigene gewinnen zunehmend an Bedeutung, wobei der Nachweis intrazellulär exprimierter Antigene (z.B. Myeloperoxidase, CD79a, CD3) von wesentlicher Bedeutung ist [73, 74]. Für die Akuten Myeloischen Leukämien konnten spezielle Immunphänotypen einzelnen Entitäten der FAB-Klassifikation oder Subsets mit definierten genetischen Defekten bzw. einer eigenständigen prognostischen Relevanz zugeordnet werden [75]. In bezug auf die Akuten Lymphatischen Leukämien wurde ein Klassifikationsschema basierend auf der immunologischen Charakterisierung des Reifegrades der Blastenpopulation entwickelt [76].

Für die chronischen B-Zellneoplasien ermöglicht die Durchflußzytometrie die Bestätigung der Klonalität über den Nachweis der homogenen Expression eines Immunglobulinleichtkettentyps. In Kombination

mit weiteren differenzierungsabhängig exprimierten Antigenen kann so der Nachweis selbst geringer Anteile klonaler B-Zellen erbracht werden [77, 78]. Typische Immunphänotypen sind beschrieben für die chronisch lymphatische Leukämie der B-Zellreihe (B-CLL), die Haarzellleukämie sowie das Mantelzelllymphom [79]. Der zytoplasmatische Nachweis der Leichtkettenrestriktion erlaubt in Kombination mit Plasmazellen charakterisierenden Antigenen (CD138, CD38) den Nachweis klonaler Plasmazellen im Rahmen einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) oder eines Plasmozytoms [80, 81]. Chronische Neoplasien der T-Zellreihe stellen häufig noch ein gesondertes Problem dar, da hier die Diagnose zumeist nur bei einem abnormen Phänotyp wie dem Verlust einzelner T-Zellantigene gestellt werden kann. Die REAL-Klassifikation („Revised European-American Lymphoma Classification“) stellt ein erstes umfassendes Klassifikationsschema dar, welches auf immunologischen, morphologischen und molekularbiologischen Daten basiert [82]. Derzeit wird sie durch die WHO weiterentwickelt.

Zukünftig wird der Stellenwert der durchflußzytometrischen Diagnostik erweitert werden durch den direkten Nachweis von krankheitsspezifischen Fusionsproteinen (z.B. Bcr-ABL) sowie durch die Einbeziehung weiterer Antigene, welche die biologischen Eigenschaften der malignen Zelle bestimmen, so MHC- und Adhäsionsantigene oder Proteine, deren Expression eine Therapieresistenz gegenüber Chemotherapeutika bewirkt.

#### *Messung CD34-positiver hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen*

Das CD34 Antigen ist auf frühen Zellen der Hämatopoese exprimiert und dient als Marker zur Quantifizierung von Stamm- und Progenitorzellen aus peripherem Blut, Knochenmark oder Stammzellprodukten im Rahmen der Stammzelltransplantation [83-85].

Aufgrund des zumeist geringen Anteils von CD34 exprimierenden Zellen ist eine streng standardisierte Methodik notwendig, wobei zur Erhöhung der Spezifität eine Multiparameteranalyse in Kombination mit einer standardisierten Datenanalyse, wie sie z.B. im ISHAGE-Protokoll anhand einer sequentiellen Verknüpfung von Analyseregionen vorgegeben wird, unabdingbar ist [86, 87]. Durch die gleichzeitige Analyse des Pan-Leukozytenantigens CD45 kann eine sichere Abgrenzung leukozytärer Zellen von Aggregaten oder Membranfragmenten sowie eine zusätzliche Charakterisierung unreifer Zellen anhand der verringerten CD45-Dichte erreicht werden.

Ein weiteres Problem der Stammzellanalytik ist die Quantifizierung der Stammzellen pro Volumeneinheit des Probenmaterials. Wurden bislang zumeist Leukozytenkonzentrationen zugrunde gelegt, welche über Blutbildautomaten gewonnen wurden, und diese nachfolgend mit den prozentualen Werten der Leukozytenpopulationen aus der Durchflußzytometrie verrechnet, so ist gegenwärtig die präzisere Quantifizierung direkt

am Durchflußzytometer als „single-platform-assay“ durch Zugabe definierter Konzentrationen von Partikeln oder die Verwendung von Reagenzgefäßen mit einer vorgelegten, definierten Partikelkonzentration bei gleichzeitig definiertem Probenvolumen als Standard anzusehen [16, 88].

Zukünftig dürfte die Analyse von Stammzellsubpopulationen zunehmend an Bedeutung gewinnen. In Studien konnte gezeigt werden, daß eine Korrelation des Anteils der jeweils linien determinierten Stammzellpopulationen zur schnellen Regeneration der Neutrophilen oder Thrombozyten besteht [89]. Ein dauerhafter Transplantationserfolg ist hingegen auf die Transplantation pluripotenter unreifer Stammzellen angewiesen, deren Charakterisierung über die Analyse von CD38, CD90, HLA-DR, AC133 oder c-Kit angestrebt wird [90]. In einer neueren Arbeiten wurde weiterhin ein spezifischer Marker pluripotenter Stammzellen, der VEGF-Rezeptor 2 (KDR), beschrieben [91]. Da ebenfalls der Nachweis pluripotenter, CD34-negativer hämatopoetischer Stammzellen berichtet wurde ist zu erwarten, daß zukünftig die routinemäßige Einbeziehung weiterer Marker ergänzend zum CD34 Antigen zur Charakterisierung der Stammzeleigenschaften gefordert werden wird.

#### HLA-B27

Die durchflußzytometrische Analyse der HLA-B27 Expression stellt eine zuverlässige, ökonomische, anwendungsfreundliche und zeitsparende Alternative gegenüber dem konventionellen Mikrolymphozytentoxizitätstest und neueren serologischen Methoden dar [92-94]. Beim Einsatz der monoklonalen Antikörper ist zu bedenken, daß viele Antikörper eine Kreuzreaktivität mit HLA-B7 aufweisen. Dieses muß in entsprechenden zusätzlichen Kontrollansätzen überprüft werden. Ferner ist ein Antikörper mit einer Kreuzreaktivität gegen HLA-B37 und HLA-B39 beschrieben [95]. Damit sind diagnostische Sensitivität und Spezifität wesentlich durch die individuellen Bedingungen der Analytik beeinflusst. Hierzu zählen neben der Auswahl der Antikörper vor allem die Inkubationszeit. Eine Standardisierung dieses Testes steht aus [92, 93, 95, 96]. Positive Befunde sollten derzeit aber noch im Mikrozytotoxizitätstest oder mittels Molekularbiologie bestätigt werden.

#### V<sub>β2</sub> T-Zellen

Das Kawasaki-Syndrom ist eine akute Vaskulitis des Kindesalters mit unklarer Ätiopathogenese. Obwohl die Erkrankung in den meisten Fällen komplett ausheilt, kommt es in 10 bis 15% der Fälle zu einem Koronararterienaneurysma mit entsprechenden Konsequenzen. Im peripheren Blut findet sich eine selektive (oligoklonale) Expansion bestimmter V<sub>β</sub>-tragender T-Zellpopulationen. Obwohl das T-Zellrezeptor V<sub>β</sub> Repertoire bei den einzelnen Patienten unterschiedlich reagiert, ist in den meisten Fällen der T-Zellrezeptor des V<sub>β2</sub> Phänotyps beteiligt. Veränderungen in der Frequenz korrelieren mit Krankheitsaktivität und Re-

missionsphase. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, daß keine allgemeingültigen Referenzwerte für die Verteilung von T-Zellrezeptor V<sub>β</sub> Subpopulationen existieren. Jedoch ergibt im allgemeinen ein Cut-off von 5% eine relativ sichere Diskriminierung [97-101].

#### Paroxysmale nocturne Hämoglobinurie

Ursache der Paroxysmalen Nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) ist eine Mutation im PIG-A Gen auf der Ebene einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle mit der Folge einer partiellen bis totalen Defizienz Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-geankerter Antigene auf allen dieser Stammzelle entstammenden Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten [102-104]. Durchflußzytometrisch wird der Defekt anhand der semi-quantitativen Analyse der Bindung spezifischer Antikörper gegen GPI-verankerte Antigene nachgewiesen. Neben der Analyse der Expression des Decay Accelerating Factor (DAF, CD59) sowie des Protectins (CD55) auf Erythrozyten, Granulozyten und Monozyten ist die Analyse der FcγRIIIb-Expression (CD16b) und des CGM6 (CD66b) auf Granulozyten sowie des Lipopolysaccharid-Rezeptors (CD14) auf Monozyten möglich [105-107]. Aufgrund kurzfristiger Veränderungen der Zusammensetzung der Erythrozytenpopulation durch Hämolyse oder Transfusionen als auch aufgrund der deutlich kürzeren Verweilzeit leukozytärer Zellen im peripheren Blut ist diagnostisch die Analyse GPI-geankerter Proteine auf Leukozyten der Analyse von Erythrozyten zur Bestimmung des Anteils des mutierten Klonen an der Gesamthämatopoese vorzuziehen. Hier wiederum ist die Analyse mehrerer granulozytärer Antigene der Analyse der durch inflammatorische Stimuli beeinflussbaren Expressionsdichte des LPS-Rezeptors auf Monozyten vorzuziehen.

#### Retikulozyten

Die Analyse der Retikulozyten hat sich als eine Standardmethode der Durchflußzytometrie im klinischen Labor etabliert und hier wesentlich zur Verbesserung der Analytik beigetragen. Bei im Vergleich zur mikroskopischen Technik deutlich höheren Präzision hat die Färbung mit einem RNA-Farbstoff, zumeist Thiazol O, ebenfalls die Möglichkeit eröffnet, eine Klassifizierung des Reifungsgrades des Retikulozyten anhand der Fluoreszenzintensität als Maß des RNA-Gehaltes vorzunehmen [108-111]. Eine Subtypisierung von Retikulozyten ist auch anhand der Expression des Transferrinrezeptors (CD71) möglich [112]. Neben dem Einsatz in der Anämiediagnostik bestehen weitere Einsatzgebiete im Monitoring der Erythropoetintherapie sowie der Knochenmarksregeneration nach Chemotherapie und/oder einer Stammzelltransplantation [113, 114].

#### Residuale Leukozyten in filtrierten Blutkomponenten

Der enge Zusammenhang zwischen Komplikationen der Transfusion von Blutkomponenten wie febrilen Transfusionsreaktionen, Alloimmunisierung oder der

Übertragung des Cytomegalievirus und dem Gehalt von kernhaltigen Zellen in diesen Blutkomponenten macht eine zuverlässige Qualitätskontrolle erforderlich. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität sowie großen Geschwindigkeit stellt die durchflußzytometrische Absolutzellzählung mittels partikulärer Volumenstandards oder Volumetrie hierfür die Methode der Wahl dar [115, 116].

#### *LDL-Rezeptor*

Ursache der Familiären Hypercholesterinämie ist eine verringerte zelluläre Aufnahme von Low Density Lipoproteinen (LDL) aufgrund eines genetisch bedingten Defektes des LDL-Rezeptors [117]. Durchflußzytometrisch ist sowohl die Erfassung einer verringerten oder fehlenden Expression des Rezeptors durch semi-quantitative Analyse der Bindung spezifischer Antikörper als auch die Analyse der Rezeptorfunktion durch Analyse der Bindung und Aufnahme fluoreszenzmarkierten LDLs möglich [118]. Hierzu werden Zellen des peripheren Blutes (Monozyten oder Lymphozyten) nach zumeist 48-72stündiger Inkubation (37°C) in einem Lipoproteinmangelserum im Vergleich zu Zellen, die in einem Serum-haltigen Medium vorinkubiert wurden, analysiert, unter der Annahme, daß unter Bedingungen des Lipidmangels eine maximale Induktion der Rezeptorexpression und Funktion erzielt werden kann. Ebenso kann durch alleinige oder zusätzlich zum Lipoproteinmangelserum eingesetzte mitogene Stimulation (z.B. durch Phytohämagglutinin) eine Steigerung der Rezeptorexpression speziell auf Lymphozyten induziert werden [119]. Der Vergleich zu einem Standard, der zumeist aus identisch inkubierten Zellen einer gesunden Kontrollperson besteht, ist zur Interpretation der Daten bislang unumgänglich. Durch Vergleich mit den Werten des Kontrollprobanden können Patienten ohne eine familiäre Hypercholesterinämie (FH) von heterozygot bzw. homozygot betroffenen FH-Patienten abgegrenzt werden. Da bis zu 30% der betroffenen FH-Patienten primär eine Störung der Rezeptorfunktion aufweisen, ist die Analyse der LDL-Bindung und Internalisierung von wesentlicher Bedeutung und sollte daher parallel zur Analyse der Rezeptorexpression erfolgen. Aufgrund der in einigen Studien berichteten geringen Spezifität und Sensitivität [120] speziell der einzig auf einer Analyse der Antikörperbindung beruhenden Methoden (<80%) sollte deren Einsatzmöglichkeit als Screening-Methode in einem unselektionierten Patientenkollektiv mit Zurückhaltung bewertet werden.

#### *Fetale Erythrozyten*

Zum diagnostischen Nachweis einer fetomaternalen Hämorrhagie können im mütterlichen Blut fetale Erythrozyten nachgewiesen werden [121].

#### *Thrombozyten*

Ziel der durchflußzytometrischen Thrombozytenanalytik ist die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Thrombozyten zur Diagnose von throm-

botischen Erkrankungen, Störungen der zellulären Hämostase oder Thrombozytopeniesyndromen [122, 123]. Darüber hinaus wurde die immunologische Detektion von Thrombozyten als Methode zur Verbesserung der Thrombozytenzählung vorgeschlagen. Eine Evaluierung der Methode im Vergleich zu den derzeit verfügbaren Hämatologieanalysatoren steht jedoch aus. Gegenwärtig erstreckt sich der analytische Ansatz auf folgende Methoden.

#### Thrombozytenaktivierung ex vivo; Thrombozytenreaktivität unter Stimulation in vitro

Die in klinischen Studien bislang eingesetzten Tests basieren zumeist auf einer Analyse der Thrombozytendegranulation (P-Selektinexpression), der Konformation des GPIIb/IIIa- (Fibrinogenrezeptor-) komplexes, sowie der Bindung von Gerinnungsfaktoren (z.B. Fibrinogen), wohingegen direkte Analysen der Signaltransduktion, der Lipidzusammensetzung der Thrombozytenmembran, der Bildung von Mikropartikeln und Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten sowie von Veränderungen des Zytoskeletts bislang eher wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten blieben. Als Standard für klinische Tests darf inzwischen die Analyse aus verdünntem Vollblut angesehen werden, die im Gegensatz zur Präparation von Plättchen-reichem Plasma auf potentiell aktivierende Zentrifugationsschritte verzichtet und zur Charakterisierung der Thrombozyten eine Markierung mit einem Phycoerythrin-markierten Antikörper gegen ein dicht exprimiertes thrombozytenspezifisches Antigen (z.B. CD41/CD61 oder CD42b) verwendet [123]. Der genaue klinische Stellenwert der Thrombozytenaktivierungsanalytik wird jedoch erst nach Durchführung multizentrischer Studien mit standardisierten Methodenprotokollen beurteilt werden können, da bislang aufgrund unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität der Methoden bei zudem eingeschränkter Stabilität des Probenmaterials ein direkter Vergleich der publizierten Daten kaum möglich ist.

Ein weiterer potentieller Einsatzbereich, das Monitoring der Rezeptorblockade beim Einsatz von GPIIb/IIIa Antagonisten, ist vielfach durch die methodenbedingten Verdünnungsschritte eingeschränkt, welche zu einer Verschiebung des Gleichgewichts von freiem zu gebundenem Antagonisten führen, und somit aufgrund der schnellen Dissoziationsrate etlicher Antagonisten eine Veränderung der effektiven Rezeptorblockade bewirken können.

#### Glykoproteindefekte bzw. -defizienzen

Die Durchflußzytometrie erlaubt die rasche und sichere Diagnose von Glykoproteindefizienzen wie sie beim M. Glanzmann (Fibrinogenrezeptordefekt) oder beim Bernard-Soulier-Syndrom (von Willebrand-Faktor-Rezeptordefekt) auftreten [124]. Hierbei ist es wichtig neben der Analyse der Rezeptorexpression auch die Bindung der entsprechenden Liganden unter Stimulation zu überprüfen, um neben dem Rezeptormangel auch funktionelle Rezeptordefekte aufzudecken.

### Thrombozytenreifung (Fraktion RNA-haltiger Thrombozyten)

Die Analyse der jüngsten im peripheren Blut zirkulierenden Thrombozyten anhand des RNA-Gehaltes („retikulierte Thrombozyten“) hat sich als hilfreich in der Differentialdiagnose thrombozytopenischer Erkrankungen erwiesen, wobei eine Erhöhung des Anteils retikulierter Thrombozyten auf einen peripheren Verbrauch mit reaktiv gesteigerter Thrombopoese hindeutet, wohingegen ein nicht adäquater Anstieg des Anteils retikulierter Thrombozyten bzw. eine verringerte absolute Konzentration retikulierter Thrombozyten bei Thrombopenie auf eine verminderte Megakaryopoese hinweist [125-127]. Weitere Einsatzgebiete sind das Monitoring einer Thrombopoetintherapie sowie der Knochenmarksregeneration nach Chemotherapie und/oder einer Stammzelltransplantation [128, 129]. Eine Normbereichsangabe für den Anteil bzw. die Konzentration retikulierter Thrombozyten muß vom jeweiligen Anwender erarbeitet werden, da eine mangelnde Standardisierung der Methodik bislang eine multizentrische Evaluierung des Normbereiches verhindert hat.

### Epitopcharakterisierung von antithrombozytären Antikörpern

Thrombozytäre Antikörper stellen einen wesentlichen Mechanismus bei der Entstehung von Thrombozytopenien dar. Antikörper können sowohl gegen thrombozytenspezifische Glykoproteine als auch gegen HLA-Antigene auf Thrombozyten oder medikamentenabhängige Epitope gebildet werden. Daneben ist eine Bindung von Immunkomplexen an den FcγII-Rezeptor (CD32) möglich. Die durchflußzytometrische Quantifizierung des gesamten thrombozytengebundenen Immunglobulins mittels fluoreszenzmarkierter antihuman-IgG und -IgM Antikörper erlaubt eine sensitive Erfassung der meisten über eine Antikörperbindung vermittelten Thrombozytopenien, wobei jedoch eine Differenzierung der Antikörper basierend auf dem bekannten Epitop nicht möglich ist [130, 131]. Hierzu wurde eine auf der Analyse des Energietransfers zwischen eng benachbarten Fluorochromen basierende Technik beschrieben, welche eine Epitopcharakterisierung durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene und der Analyse der räumlichen Assoziation dieser Antikörper zum Antikörper des Patienten beruht [132].

### DNA-Analyse

In Tumorbioptaten können der DNA-Gehalt und Aneuploidien von Tumorzellen in Kombination mit der Messung von zellulären Antigenen, z.B. intrazellulären Zytokeratinen, zur Kontrolle der Zellspezifität bestimmt werden [133, 134]. Insbesondere für Kolonkarzinome [135] und Mammatumoren [136] gibt es Protokolle, und es wurde auch bereits ein Konsensusprotokoll vorgeschlagen [137].

### NADPH-Oxidasedefekt

Bei der Chronischen Granulomatose können durch einen Defekt der NADPH-Oxidase in den neutrophilen Granulozyten keine Sauerstoffradikale zur Abtötung der Bakterien (oxidative Burst) bereitgestellt werden [138]. Die Patienten fallen durch rezidivierende bakterielle Infekte oder Infekte mit apathogenen Erregern auf. Dieser Defekt der NADPH-Oxidase wird durch Messung der Sauerstoffradikalbildung in Granulozyten nach Stimulation mit einem Phorbol ester (PMA) detektiert. Zur Messung wird der Fluoreszenzfarbstoff Dihydrorhodamin DHR123 als Substrat genutzt [139-142]. Dieser Test ist im Vergleich zur konventionellen Chemilumineszenz ebenfalls ausgesprochen zuverlässig, aber zusätzlich zeitsparend. Die durchflußzytometrische Diagnostik stellt ein geeignetes Screeningverfahren dar, das auch die Identifikation von Überträgern der Erkrankung ermöglicht. Im Vergleich zum Nitroblautetrazolium-Test, der lediglich eine qualitative Aussage zuläßt, eröffnet die durchflußzytometrische Analyse auch die Möglichkeit der quantitativen Erfassung von oxidativen Burst Aktivitäten. Transiente Störungen der Sauerstoffradikalbildung werden unter verschiedenen Bedingungen wie Polytrauma, Sepsis, Medikamenteneinnahme, Exposition gegenüber Industrieoxen etc. beobachtet [143-149].

### Cross-Match-Analytik

Durch durchflußzytometrische Cross-match-Analytik vor Organtransplantation kann durch die Erfassung von auch nicht komplementaktivierenden Antikörpern die Spenderauswahl optimiert werden. Dadurch wird die Langzeitfunktion des Transplantates deutlich verbessert [150].

### Leukozytenadhäsionsdefekt (LAD)

Patienten mit LAD leiden an rekurrierenden nekrotisierenden Infektionen der Haut und der inneren Organe, verzögerter Wundheilung, schwerer Gingivitis und Parodontitis. Die molekulare Ursache des LAD 1 liegt in einem Synthesedefekt des Proteins CD18, das die 3 Adhäsionsmoleküle CD11a (Lymphozytenfunktionsantigen-1), CD11b (Komplementrezeptor 3) und CD11c (Komplementrezeptor 4) in der Zellmembran verankert. Der Defekt betrifft Phagozyten, zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen. Die molekulare Basis des LAD 2 liegt in einem Defekt des Fucose-Stoffwechsels. Dies führt zu einem Mangel an Sialyl-Lewis-X auf Glykoproteinen in der Zellmembran von Phagozyten. Die Untersuchung der Adhäsionsmoleküle auf den Granulozyten ermöglicht die Diagnose, sogar schon aus dem Fetalblut [151-153].

### Messung in anderen Körperflüssigkeiten / Kompartimenten

#### Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit

Die Durchflußzytometrie der Zellen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit trägt entscheidend zur Einordnung primärer und sekundärer Lungenerkrankungen verschiedener Ätiologien bei. Hierzu zählen ins-



besondere interstitielle Lungenerkrankungen mit Fibrosierung, Sarkoidose, Wegner'sche Granulomatose sowie verschiedene Formen der exogen allergischen Alveolitis. Ferner zeigen sich charakteristische Veränderungen bei Patienten mit Rejektion nach Lungentransplantation und anderen pathogenetischen Prozessen. Die Subdifferenzierung von Lymphozytenpopulationen sowie der quantitative Anteil von eosinophilen Granulozyten stehen im Mittelpunkt der Diagnosefindung. Entscheidend ist die Etablierung von Referenzbereichen, die durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst wird. Hierzu zählen Raucherstatus, Alter (Kinder versus Erwachsene) und die Methodik der Lavage. Ein Konsensusprotokoll für die Diagnostik der bronchoalveolären Lavage mittels durchflußzytometrischer Immunphänotypisierung ist erarbeitet worden. In mehreren Publikationen sind Referenzbereiche, zumindest für Erwachsene, veröffentlicht [154-176].

### Liquor

Zur Immunüberwachung des Zentralnervensystems (ZNS) erscheint die Durchflußzytometrie in simultan gewonnen Liquor- und Blut-Proben geeignet, wobei die Methodik für Blut an die geringe Leukozytenzahl angepaßt werden muß (Normalbereich: 1 - 5 pro µl (M/I) Lumbal-Liquor), um präzise und statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten [177-179]. Interferierende Verunreinigungen durch Erythrozyten, Thrombozyten oder zellulären Debris werden durch eine Vitalfärbung der zellulären Nukleinsäuren im Fluoreszenzkanal >650 nm eliminiert [177, 180]. Die Beurteilung erfolgt mit vorläufigen Referenzbereichen [181, 182]. Zellreaktionen im ZNS müssen von systemischen Zellreaktionen abgegrenzt werden. Es besteht eine stark ausgeprägte Blut/Liquor-Schranke unterschiedlichen Ausmaßes für Lymphozytensubpopulationen [182], wobei einige T Zells subsets, aktiviert [183] oder nicht aktiviert [182, 184], im Vergleich zu B (CD19+) und NK Zellen (CD16+56+3-) bevorzugt die Schranke bei Kontrollpersonen und verschiedenen ZNS-Entzündungen passieren [182].

Es wurde eine Zunahme des CD4+ T Zelle zu CD8+ T Zelle-Verhältnisses im Liquor bei neuroimmunologischen Erkrankungen, wie z.B. Multiple Sklerose beschrieben, und eine Abnahme bei HIV-Befall des ZNS [181]. Ein selektiver Verlust von „naiven“ T Zellen (CD4+ CD45RA+) wurde bei Multipler Sklerose, Down Syndrom und Morbus Parkinson beobachtet [185].

T-Zellen mit dem  $\gamma/\delta$ -Rezeptor und CD5+ B-Zellen werden mit der Abwehr von Infektionen und der Pathogenese von Autoimmun- und lymphoproliferativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht [179, 186, 187].

Das Messen der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Lymphozyten hat verschiedene Transfer-Routen dieser Zellen aus dem Blut ins ZNS aufgezeigt [188, 189]. Lösliche Adhäsionsmoleküle im Liquor, z.B. ICAM-1 (CD54) [190], und die Expression des Fas antigens [191] geben Hinweise auf die Aktivität

von ZNS-Erkrankungen, z.B. bei Multipler Sklerose. Multiparametrische Durchflußzytometrie erlaubt die Detektion von Lymphom-Zellen in Anteilen von weniger als 1% der Gesamtzellen im Liquor [192].

Die Durchflußzytometrie ermöglicht es weiterhin, nach Adaptation an Liquor cerebrospinalis die Immunüberwachung des ZNS zu untersuchen; jedoch müssen erste diagnostische Verfahren verbessert und weiter evaluiert werden. Bislang sollten durchflußzytometrische Untersuchungen im Liquor ausschließlich spezialisierten Zentren vorbehalten bleiben.

### Knochenmark

Zu dieser Fragestellung ist bereits im Zusammenhang mit der Bestimmung von Leukämien/Lymphomen eingegangen worden. Beziehungen bestehen auch zum Nachweis epithelialer Zellen bei der Suche nach Mikrometastasen epithelialer Tumoren (s.u.).

### Lymphknoten

Zur Differentialdiagnose einer Lymphknotenschwellung unklarer Genese kann die Durchflußzytometrie eingesetzt werden. Lymphknoten stellen für die durchflußzytometrische Lymphomdiagnostik das Material der ersten Wahl dar, sofern die Infiltration mittels Biopsie erfaßt werden kann. Neben der Lymphom- und Leukämiediagnostik (siehe dort) und dem Nachweis von DNA-Veränderungen (s.u.) finden sich typische Veränderungen auch bei reaktiver Hyperplasie [193, 194].

## **2.2. Verfahren mit potentiell diagnostischen Wert** ***Adhäsionsmoleküle auf Granulozyten***

Die zellulären Expressionsdichten der Adhäsionsmoleküle CD11b (MAC-1) sowie CD62L (L-Selektin) stehen in einer engen Beziehung zum Aktivierungsgrad der Zellen. Hierbei kommt es im Rahmen entzündlicher Prozesse zu einer schnellen Hochregulation der Oberflächenantigene, die im Falle des L-Selektins durch eine Abspaltung von der Membran (Shedding) in eine Erniedrigung übergeht [195]. Ein für eine veränderte Abwehrlage des Patienten sensitiverer Analyseparameter scheint dagegen eine reduzierte Induzierbarkeit von CD11b durch Agonisten wie das bakterielle Peptid N-formyl-Met-Leu-Phe [196] oder Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  [197] darzustellen. Schließlich stellt eine Konformationsänderung des  $\beta_2$ -Integrins, die mit einer erhöhten Affinität für dessen Liganden einhergeht, den spezifischsten Indikator zellulärer Aktivierung dar [197].

### ***HLA-DR und CD16 auf Monozyten***

Eine reduzierte Expressionsdichte von HLA-DR auf Monozyten stellt ein Korrelat einer verringerten Reagibilität gegen bakterielle Lipopolysaccharide in vitro dar [198] und erlaubt die Identifikation von Patienten mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung einer Reihe von Störungen. Eine Reduktion der HLA-DR-Expression kann bei iatrogenen Immunsuppression, z.B. nach Organtransplantation oder im Zuge komple-

xer Operationen und schwerer Verbrennungen, sowie nach Polytrauma oder bei Sepsis eintreten. Das Monitoring der relativen Dichte von HLA-DR Molekülen auf der Oberfläche von Blutmonozyten kann wichtige Hinweise auf die Reaktionsfähigkeit des Abwehrsystems geben. Die Bedeutung dieses Parameters liegt insbesondere in der frühzeitigen Identifikation von Risikopatienten und der konsekutiven Verlaufsbeobachtung entsprechender Patienten. Hierbei dient der Parameter der Diagnosedefinition und unterstützt Therapieentscheidungen. Eine Schwierigkeit der bisherigen Studien stellt die Übertragung der Ergebnisse in die klinische Praxis dar. Auf Grund fehlender Standardisierung der Methode (fehlende Absolutkalibrierung der bestimmten Antigendichten sowie unterschiedliche Methoden der immunologischen Abgrenzung der Monozyten) muß jedes Labor seine eigenen Referenzbereiche für einen Cut-off in der HLA-DR Expression definieren. Die Richtwerte schwanken zwischen 30 und 60% positiver Zellen. [198-212].

Eine weitere charakteristische Veränderung von Monozyten bei Sepsis [213] aber auch bei viralen Infekten einschließlich der HIV-Infektion [214, 215] stellt die relative Expansion von Monozyten mit Expression des Fcγ-Rezeptors IIIa (CD16a) dar. Das proinflammatorische Zytokinrepertoire dieser Zellen bei Normalprobanden [216] läßt auch hier eine prognostische Bedeutung erwarten, deren Validierung jedoch noch aussteht. Eine relative Expansion dieser Zellen auch bei geringgradigen chronisch inflammatorischen Prozessen wie z.B. in der Atherogenese [217] oder im Rahmen von metastasierten Tumorerkrankungen [218] erweitert das potentielle Anwendungsspektrum dieses Analyseparameters. Im Bezug auf die Atherogenese spiegelt eine positive Korrelation des Anteils dieser Zellen zur Plasmakonzentration von Cholesterin und Triglyzeriden [219] sowie eine negative Korrelation zum HDL-Cholesterin [217] den engen Zusammenhang zwischen der Differenzierung von Monozyten und ihrem Lipidstoffwechsel wieder. Ebenso konnte der Phänotyp des von Monozyten reifungsabhängig exprimierten Apo E mit einer gesteigerten in vitro Expression von CD16 bei Zellen des E4/E4-Phänotyps als Determinante der monozytären Differenzierung identifiziert werden. Eine selektive Reduktion der Expressionsdichte des Lipopolysaccharid-Rezeptors (CD14) unter Therapie mit Hemmstoffen der HMG-CoA-Reduktase [219] unterstützt schließlich das Konzept einer von Membranlipiden und komplexer Koassoziation von Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems abhängigen Expression von CD14 auf Monozyten [220].

#### **HLA-DR4**

HLA-DR4 gilt als ein wesentlicher genetischer Risikoparameter für rasch progrediente und besonders destruierende Formen der rheumatoiden Arthritis [221-224]. In der Durchflußzytometrie ist es möglich, diese Bestimmung schnell und einfach durchzuführen [225, 226]. Allerdings ist bislang kein Reagentsystem

verfügbar, das eine einfache Bestimmung mit wenigen Schritten ermöglicht.

Obwohl sich die Diagnostik weiterer HLA-Spezifitäten mit monoklonalen Antikörpern im Durchflußzytometer durchführen ließe, wird diese Möglichkeit auf Grund der hohen Kosten einer simultanen Bestimmung einer Vielzahl von Spezifitäten nicht genutzt.

#### **Antigenspezifische T-Zellen**

Neue Techniken der Quantifizierung von für ein bestimmtes Antigen spezifischen T-Zellen stellen einen neuen Parameter zur Überwachung der Krankheits-spezifischen Reaktivität von T-Zellen dar. Die Technik der Markierung dieser Zellen mit fluorochromkonjugierten rekombinanten MHC-Komplexen, die mit einem spezifischen Peptid beladen sind, erlaubt einen unmittelbaren Nachweis dieser Zellen mit einer der Färbung mit Antikörpern vergleichbaren Methodik [227]. Die Spezifität der Reagentien für jeweils ein MHC-Allel und ein antigenes Peptid sowie die unklare funktionelle Reaktivität dieser Zellen stellen jedoch Einschränkungen der Methodik dar. In einem alternativen Verfahren werden antigen-spezifische Zellen über die durch ein Antigen induzierte Zytokinantwort nachgewiesen [228]. Das in einer Modifikation in unsepariertem Vollblut durchführbare Analyseverfahren erlaubt den Nachweis von gegen prozessierte Proteine oder spezifische Peptide gerichteten T-Zellen. Es erfordert jedoch eine mehrstündige Inkubation der Zellen. Weiterhin kann die Reagibilität durch die vermehrte Expression von CD69 ermittelt werden [229].

#### **Virus-spezifische T-Zellen**

Die Analyse der Färbung mit rekombinanten MHC-Tetrameren und der Analyse der Antigen-abhängigen zellulären Zytokinantwort können alternativ für die Analyse des Ablaufs von primären oder reaktivierten Viruserkrankungen eingesetzt werden [230, 231]. Eine potentiell klinisch besonders relevante Anwendung stellt die Überwachung von antiviraler Therapie dar.

#### **Allogen aktivierte T-Zellen**

In ähnlicher Weise können die Analyse von Antigen-spezifischer Aktivierung und die MHC-Tetrameren-Technologie zur Analyse der allo-genen Aktivierung nach Transplantationen eingesetzt werden. Das erste Verfahren beruht auf der durchflußzytometrischen Auswertung einer gemischten Leukozytenkultur über den Nachweis von zellulärer Aktivierung oder Zytokinsynthese [232]. Das zweite Verfahren wurde kürzlich zum Nachweis der zellulären Antwort gegen Minor-Antigene im Rahmen der „Graft-versus-Host“-Erkrankung nach allogener Knochenmarkstransplantation eingesetzt [233].

#### **Tumor-spezifische T-Zellen**

Der Nachweis von gegen Tumore spezifischen T-Zellen stellt eine besonders für die Überwachung von Immuntherapien relevanten Analyseansatz dar. Die un-

mittelbare Kombination von Tetrameren-Technologie zur Identifikation von gegen ein Tumorantigen spezifischen Zellen mit der Analyse der Antigen-abhängigen Aktivierbarkeit dieser Zellen erlaubt hierbei die Analyse von immunologischer Anergie im Rahmen einer Tumorerkrankung [234].

#### *Mitogen-aktivierte T-Zellen*

Neben der antigenspezifischen Untersuchung (s.o.) bieten durchflußzytometrische Methoden die Möglichkeit, die Reagibilität von Lymphozyten auf mitogenspezifische Reize zu messen [235], das heißt den sogenannten Lymphozytentransformationstest durchzuführen und dabei auf radioaktive Meßmethoden zu verzichten.

- Die DNA-Synthese kann im Durchflußzytometer über die S-Phase (PI-Messung [236, 237]) und via BrdU-Inkorporation [238, 239] gemessen werden.
- Als Meßparameter kommen weiterhin Zelloberflächenmoleküle wie CD69 (sehr schneller Anstieg in wenigen Stunden, Maximum nach 2-3 Tagen, insbesondere auch auf NK-Zellen [229]) und intrazelluläre Zytokine (s.u.) in Frage. Da die Reaktion einzelner Zellen gemessen wird, ist neben der Frequenz reagierender Zellen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wichtig. Allerdings korrelieren diese Werte nicht unbedingt mit den Ergebnissen aus Messung der DNA-Synthese, da selektiv die Reaktion einzelner Zellpopulationen gemessen werden können und die verwendeten Aktivierungsmarker nicht zwangsläufig mit einer DNA-Synthese gekoppelt sein müssen.
- Schließlich ist die Proliferationsrate auch über die Messung der absoluten Zellzahlen zu ermitteln [240].

#### *Phagozytose*

Zur Untersuchung der Phagozytose in Monozyten und Granulozyten bietet die Durchflußzytometrie gut reproduzierbare Möglichkeiten. Hierbei wird die Phagozytoseleistung durch Messung von Frequenz und Intensität der Aufnahme FITC gekoppelter *E. coli* untersucht [241]. Phagozytosestörungen können angeboren oder erworben sein. Während hereditäre Phagozytosestörungen sehr selten sind, gibt es eine Vielzahl von klinischen Situationen, in denen es zu (transienten) Störungen der Phagozytose kommen kann. Hierzu zählen Sepsis, Polytrauma, Verbrennungen, Therapie mit immunmodulatorischen / immunsuppressiven Medikamenten und andere [144, 242-246]. Ein Problem stellt die Standardisierung und damit die interlaboratorische Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse dar. Somit muß jedes Labor seine eigenen Referenzwerte definieren und validieren [147, 148, 247].

#### *Basophilendegranulation*

Die Degranulation von basophilen Granulozyten und gewebständigen Mastzellen stellt eine entscheidende Schnittstelle im Ablauf von IgE-abhängigen und IgE-unabhängigen (sog. pseudoallergischen) Reaktionen

dar. Die Degranulation der basophilen Granulozyten kann somit als diagnostisches Fenster im Rahmen der allergologischen in-vitro Diagnostik angesehen werden. Hierzu wurden in jüngster Zeit neue Methoden entwickelt. Zur Interpretation der Testergebnisse ist eine adäquate Negativ- und Positivkontrolle unbedingt mitzuführen. Ferner hat die Allergen/Antigenqualität einen erheblichen Einfluß auf das Testergebnis. Eine Standardisierung dieses Testes steht noch aus, jedoch könnte die durchflußzytometrische Analyse der basophilen Degranulation eine erhebliche Verbesserung in der in-vitro Allergiediagnostik bedeuten [248-250]. Insbesondere die Diagnostik von Unverträglichkeiten gegenüber Konservierungsstoffen, Arzneimitteln, Lebensmitteln u.a.m. kann serologisch nur sehr eingeschränkt, gut aber mittels der Basophilendegranulation erfolgen.

### **2.3. Forschungsverfahren**

#### *Naive/Memory-T-Zellen*

Basierend auf der Analyse verschiedener Zelloberflächenmarker können T-Helferzellen als naive (CD45RA, CD62L+, CD11a<sup>hoch</sup>) und Memory- (CD29, CD62L-, CD11a<sup>niedrig</sup>) Zellen charakterisiert werden. Ihre Bestimmung kann bei Arthritiden, nach Transplantationen [251, 252] oder bei HIV-Infektion [253, 254]. Relevanz besitzen. Analog gibt es diese Subtypen auch für CD8-Zellen [253, 255].

#### *Messung dendritischer Zellen*

Verschiedene Kombinationen von Antigenen wie CD11c [256], CD14 und CD33 [257] oder CD123 [258], M-DC8 [259], CD68 [260, 261] mit jeweils mehreren linienspezifischen Antigenen führten in den letzten Jahren zur Identifikation von mehreren Populationen von Vorläufern dendritischer Zellen in peripherem Blut. Die in ihrer in Abgrenzung voneinander zum Teil unklaren drei oder mehr Populationen von dendritischen Vorläuferzellen [262] unterscheiden sich hierbei in ihrem Reifegrad sowie funktionellem Repertoire. Aufgrund ihrer großen Bedeutung in der zellulären Immunantwort stellt die Quantifizierung von dendritischen Zellen zum Beispiel nach Transplantationen oder unter immunmodulierender Therapie einen interessanten analytischen Ansatz dar. In Korrelation zu einer autoimmunen Prädisposition konnte kürzlich eine quantitativ und qualitativ gestörte in vitro Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen nachgewiesen werden [263]. Inwieweit Krankheitszustände mit quantitativen oder qualitativen Veränderungen von dendritischen Vorläuferzellen des Blutes einhergehen, ist bisher jedoch noch völlig unklar.

#### *Epitheliale Zellen / Residuale Tumorzellen*

Die Bestimmung epithelialer Zellen in der Zirkulation über den Nachweis von Zytokeratin 8/18 als Hinweis auf Mikrometastasierung epithelialer Tumoren ist durchflußzytometrisch möglich, wenngleich auch hinsichtlich der prognostischen Relevanz umstritten [264].

### *Spermienanalyse*

Auch in Spermien ist eine DNA-Analyse möglich [265]. Die Spermienanalyse hat insbesondere bei Tieren heute eine unbestrittene Relevanz [266]. Beim Menschen wird eher der Nachweis antispermatischer Autoantikörper im Durchflußzytometer geführt [267-269].

### *Immunologisches Differentialblutbild*

Durchflußzytometrische Methoden der immunologischen Zelldifferenzierung übertreffen in ihrer statistischen Genauigkeit die mikroskopischen Methoden zur Zelldifferenzierung [270]. In der spezifischen Erfassung der Linie und Reifung von Zellen insbesondere im Rahmen pathologischer Prozessen liegen wesentliche Vorteile gegenüber hämatologischen Zellanalysatoren. Die höheren Kosten rechtfertigen derzeit einen Einsatz der Technik lediglich bei hämato-onkologischen Fragestellungen oder im Rahmen der Geräteevaluation [271].

### *Intrazelluläre Zytokinmessung*

Die Messung intrazellulärer Zytokine bietet gegenüber der Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA oder ähnlichen Methoden den Vorteil, daß in Kombination mit einer Oberflächenmarker-Analyse die Zytokinproduzierenden Zellen auch innerhalb einer heterogenen Zellpopulation klar identifiziert werden können. Die Methodik läßt sich auch auf die Vollblutbestimmung (Heparinblut wegen Kalzium-Abhängigkeit der Stimulation) adaptieren. Nach Aktivierung mit unterschiedlichen Stimulatoren (s.u.) bei gleichzeitiger oder nachfolgender Blockade der Sekretion durch Monensin oder Brefeldin A (bewirken eine Blockierung des Golgi Apparates) kann die intrazelluläre Akkumulation der Zytokine durchflußzytometrisch gemessen werden. Hierzu ist eine Permeabilisierung der Zellmembran erforderlich [272, 273]. Da generell intrazelluläre Färbungen aufgrund der notwendigen Membranpermeabilisierung mit einem höheren unspezifischen Hintergrundsignal bei der durchflußzytometrischen Analyse verbunden sind, müssen entsprechende Kontrollen durchgeführt werden. Hier bietet sich neben der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Isotyp-Kontrollen auch die Spezifitätskontrolle mit den entsprechenden nicht-markierten Zytokinen als Kompetitor an. Der letzte Ansatz ist insbesondere auch wichtig um eine unspezifische Detektion von an Zytokinrezeptoren gebundenen Antigenen auszuschließen.

### Intrazelluläre Zytokine in Lymphozyten

Die Zytokinproduktion wird in T-Lymphozyten nach Stimulation des T-Zellrezeptor/CD3 Komplexes z.B. durch CD3 Antikörper oder nach Antigen/Allergen-Erkennung induziert. Maximale Produktion wird durch Stimulation mit Phorbol ester (PMA) plus Ionomycin erreicht. Das Zytokinmuster nach der unphysiologischen PMA/Ionomycin Stimulation entspricht nicht unbedingt dem Muster der Antigen-induzierten Zytokininduktion. Die Methodik der intrazellulären Zyto-

kinfärbung wurde u.a. erfolgreich für den Nachweis der Interleukin-2, -4, -5, -6, -10, -12, Interferon- $\gamma$ , Transforming Growth Factor- $\beta$ , sowie Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  Produktion in Lymphozyten eingesetzt [228, 274-280]. Eine alternative Methode zur Detektion der Synthese von Zytokinen beruht auf dem Nachweis der Sekretion dieser Proteine über bispezifische Antikörper die an die Oberfläche der Zellen binden und gleichzeitig eine Affinitätsmatrix für die Zytokine generieren [281]. Diese Methode erlaubt auch die präparative Anreicherung von Zellen entsprechend dem Muster ihrer Zytokinsekretion.

### Th1/Th2-Verhältnis

Aufgrund des Zytokinspektrums lassen sich T-Helferzellen in Th1 und Th2-Zellen einteilen. Th1-Zellen produzieren als Leit-Zytokin IFN- $\gamma$ , daneben auch IL-2 und proinflammatorische Zytokine. Th2-Zellen produzieren insbesondere IL-4 und IL-10 [282-285]. Durch das unterschiedliche Zytokinspektrum von Th1 und Th2 Zellen wird u.a. die Antikörperantwort gesteuert; so ist z.B. IL-4 essentiell für die Produktion von IgE. Die Analyse der Th1/Th2 Verteilung ist deshalb von Bedeutung für diverse klinische Bereiche wie Infektiologie, Allergologie, Onkologie, Autoimmunität [286], zum Beispiel bei der HIV-Infektion [287, 288]. Außer der „klassischen“ T-Helferzellpopulation der CD4<sup>+</sup> Zellen sind auch andere Lymphozytenpopulationen wie die CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die  $\gamma/\delta$ -T-Zellen in der Lage, stimulationsabhängig unterschiedliche Zytokine zu produzieren [289].

### Intrazelluläre Zytokine in Monozyten

Nach Stimulation mit LPS, Candida oder bakteriellen Antigenen kann in Monozyten unter anderem die Produktion von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  gemessen werden [290]. Die durchflußzytometrische intrazelluläre Zytokinmessung wird u.a. zur Funktionsbestimmung von Monozyten/Makrophagen im Rahmen der HIV Infektion eingesetzt [291, 292].

### *Zytokine auf der Zell-Oberfläche*

Hochsensitive Verfahren erlauben den Nachweis sehr schwach exprimierter Zytokine [280]. Die fehlende Verfügbarkeit routineteigter Reagenzien und Methodenprotokolle verhinderte jedoch bisher eine diagnostische Evaluierung dieser Analyseparameter.

### *Zytotoxizität*

Die Durchflußzytometrie bietet sinnvolle Alternativen zu etablierten radioaktiven Methoden (wie dem <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest) für die Messung der zytotoxischen Aktivität von Killerzellen. Als Basis hierzu kann die selektive Expression eines Oberflächenmarkers auf den Zielzellen oder den Effektorzellen dienen [293]. Alternative Verfahren beruhen auf der Markierung der Zielzellen mit einem fluoreszierenden Membranfarbstoff und der Erfassung von toten Zellen durch Propidiumjodid oder der Messung von Annexin V [294-296] (siehe auch Apoptose).

### *Nachweis allergenspezifischer B-Zellen*

Für die Allergiediagnostik kann der Nachweis allergenspezifischer B-Zellen neue Möglichkeiten eröffnen [297].

### *Apoptose*

Der programmierte Zelltod (Apoptose) spielt eine essentielle Rolle in der zellulären Homöostase [298]. Die Analyse der Apoptose hat sich daher zu einem wichtigen und pathophysiologisch relevantem Parameter bei vielen Erkrankungen entwickelt [299]. Durchflußzytometrisch lassen sich dabei sowohl frühe Parameter der Apoptose wie die Phosphatidylserin-Exposition auf der äußeren Zellmembran, als auch spätere Parameter wie die Fragmentierung der DNA und letztlich Zelltod analysieren [300]. Die Expression von Phosphatidylserin wird durch Bindung von FITC-markiertem Annexin V erfaßt [301-303]. Im späteren Stadium der Apoptose zeigt sich charakteristischerweise eine Fragmentierung der DNA in oligonukleosomale Fragmente von 180 Basenpaaren und Vielfachen davon. Die DNA Fragmentierung läßt sich durch in-situ „nick translation“ unter Verwendung von FITC-markiertem dUTP und DNA Polymerase I nachweisen [304]. Alternativ wird die „nick end labeling“ Methode mit dem Enzym TdT verwendet (sog. TUNEL Assay; [305, 306]). Die Identifizierung apoptotischer Zellen im TUNEL Test läßt sich problemlos mit einer Oberflächenfärbung kombinieren. Sehr einfach läßt sich die DNA Fragmentierung auch als Akkumulierung hypodiploider DNA nach Färbung mit Propidiumjodid in hypotonem Puffer nachweisen [307]. Schließlich können apoptotische Zellen auch einfach durch Verwendung von diskriminierenden Farbstoffen wie Propidiumjodid und Hoechst 33342 erfaßt werden [308-311].

### *Multi-Drug-Resistenz*

Durchflußzytometrische Untersuchungen der Multi-Drug-Resistenz sind mittlerweile recht zuverlässig [312]. So kann die Sensitivität von Tumorzellen auf zytostatische Medikamente vorab untersucht werden [313-315].

### *Intrazellulärer pH*

Die Aktivierung eines membrangebundenen aktiven Austauschs von Na<sup>+</sup> und H<sup>+</sup> ist ein effektiver Mechanismus zur Elimination von Säureäquivalenten, der aktivierten Zellen zu einem alkalischen pH und gesteigerten Zellvolumen verhilft [316]. In der Durchflußzytometrie wurde eine Analyse des zytosolischen pHs bereits früh in der Analyse von zellulären Aktivierungsprozessen bei inflammatorischen Erkrankungen eingesetzt [317]. Ein weiteres Einsatzgebiet der Methodik besteht in der Analyse gestörter Zellfunktion in der Qualitätskontrolle zelltherapeutischer Produkte.

### *Calciumeinstrom*

Ein rascher und reversibler Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ist eine der frühesten Veränderungen von Zellen nach einer Rezeptor-Liganden-In-

teraktion. Die durchflußzytometrischen Analyse der zytosolischen freien Calciumkonzentration dient deswegen vor allen Dingen der kinetischen Analyse einer receptorspezifischen Signaltransduktion [318]. Einer kalibrierten Analytik von Veränderung der basalen Calciumkonzentration von Zellen steht jedoch bisher das Fehlen von ratiometrischen Farbstoffen mit Anregung im sichtbaren Licht entgegen.

### *Intrazelluläre Enzymmessung*

Mittels Durchflußzytometrie kann die intrazelluläre Aktivität von Cystein-Proteinasen wie Cathepsin B und L und von Serin-Proteinasen wie Granulozytenelastase gemessen werden [319]. Derartige Verfahren erfordern kinetische Analysen und Kontrollen der Spezifität des intrazellulären Enzymsatzes in den jeweils analysierten Zellen. Am Markt verfügbare Reagentserien sind häufig durch unspezifischen Umsatz gekennzeichnet.

Weiterhin ist die Aktivität der Myeloperoxidase in Monozyten durchflußzytometrisch erfaßbar, dies ist allerdings eher bei der Leukämiediagnostik von Relevanz (siehe dort), es gibt aber auch einen spezifischen Defekt [320].

Schließlich können die Adenosindeaminase [321] und die ZAP-70-Kinase [322, 323] zur diagnostischen Abklärung der schweren kombinierten Immundefizienz intrazellulär bestimmt werden.

### *FRET-Verfahren*

Mittels Messung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) können Kolokalisationsuntersuchungen z.B. in der Charakterisierung der Epitopspezifität von Thrombozyten-gerichteten Antikörpern durchgeführt werden [132]. Die Methodik ist weiterhin dazu geeignet supradynamische Cluster von Rezeptoren in ihrer räumlichen Verteilung zu charakterisieren, die von großer Bedeutung für das funktionelle Repertoire von Zellen sind [324].

### *RNA-Messung*

Die Analyse des zellulären Gesamtgehaltes an RNA wurde bei Fehlen von spezifischeren Analysemöglichkeiten vor allen Dingen in der Frühzeit durchflußzytometrischer Untersuchungen häufig eingesetzt. Eine neue Perspektive besitzt die sensitive RNA-Analytik in einer multiparametrischen Kombination mit immunologischen Markern sowie der Analyse des zellulären DNA-Gehalts in der Charakterisierung von frühen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen [325]. Die Differenzierung des G0 und G1-Kompartiments über den RNA-Farbstoff Pyronin Y stellt hier einen Ansatzpunkt zur Detektion einer unreifen Fraktion von Langzeitkultur-initiierenden Vorläuferzellen dar.

## **Literatur**

1. Kamensky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 1965;150: 630-1.

2. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*, 3 ed. New York: Alan R. Liss, 1995.
3. Rothe G, Schmitz G. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia* 1996;10:877-95.
4. Roederer M, De Rosa S, Gerstein R, Anderson M, Bigos M, Stovel R et al. 8 color, 10-parameter flow cytometry to elucidate complex leukocyte heterogeneity. *Cytometry* 1997;29:328-39.
5. Purvis N, Stelzer G. Multi-platform, multi-site instrumentation and reagent standardization. *Cytometry* 1998;33:156-65.
6. Schwartz A, Fernandez-Repollet E, Vogt R, Gratama JW. Standardizing flow cytometry: construction of a standardized fluorescence calibration plot using matching spectral calibrators. *Cytometry* 1996;26:22-31.
7. Lenkei R, Gratama JW, Rothe G, Schmitz G, D'Hautcourt JL, Arekrans A et al. Performance of calibration standards for antigen quantitation with flow cytometry. *Cytometry* 1998;33:188-96.
8. Gratama JW, D'Hautcourt JL, Mandy F, Rothe G, Barnett D, Janossy G et al. Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 1998;33:166-78.
9. Caldwell CW, Maggi J, Henry LB, Taylor HM. Fluorescence intensity as a quality control parameter in clinical flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1987;88:447-56.
10. Höffkes HG, Schmidtk G. Quality control of flow cytometry by means of fluorescent particles (beads). *Infusionsther Transfusionsmed* 1996;23:115-6.
11. Serke S, van Lessen A, Huhn D. Quantitative fluorescence flow cytometry: a comparison of the three techniques for direct and indirect immunofluorescence. *Cytometry* 1998;33:179-87.
12. Schwartz A, Marti GE, Poon R, Gratama JW, Fernandez-Repollet E. Standardizing flow cytometry: a classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. *Cytometry* 1998;33:106-14.
13. Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993;6:904-12.
14. Landay A, Auer R, Duque R, Green W, Harvath L, Hurley A et al. Clinical applications of Flow Cytometry: Quality assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 1989.
15. Brando B., Barnett D., Janossy G., Mandy F., Autran B., Rothe G., Sommaruga E., Cozzi M. G., D'Hautcourt, J. L., Lenkei R., Schmitz G., Kunkl A., Chianese R., Papa S., and Gratama J. W. Cytometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. Submitted for publication.
16. Barnett D., Granger V., Kraan J., Whitby L., Reilly J. T., Papa S., and Gratama J. W. Reduction of intra- und inter-laboratory variation in CD34+ stem cell enumeration by the use of stable test material, standard protocols and targeted training. *Br J Haematol* 2000;108:784-92.
17. Levi FA, Canon C, Blum JP, Mechkouri M, Reinberg A, Mathe G. Circadian and/or circanemidian rhythms in nine lymphocyte-related variables from peripheral blood of healthy subjects. *J Immunol* 1985;134:217-22.
18. Levi FA, Canon C, Toutou Y, Sulon J, Mechkouri M, Ponsart ED et al. Circadian rhythms in circulating T lymphocyte subtypes and plasma testosterone, total and free cortisol in five healthy men. *Clin Exp Immunol* 1988;71:329-35.
19. Miller CH, Levy NB. Effects of storage conditions on lymphocyte phenotypes from healthy and diseased persons. *J Clin Lab Anal* 1989;3:296-300.
20. Prince HE, Arens L. Effect of storage on lymphocyte surface markers in whole blood units. *Transplantation* 1986;41:235-8.
21. Ashmore LM, Shopp GM, Edwards BS. Lymphocyte subset analysis by flow cytometry. Comparison of three different staining techniques and effects of blood storage. *J Immunol Methods* 1989;118:209-15.
22. Cook RT, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Vandersteen D, LaBrecque DR, Cook BL. Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:555-63.
23. Cook RT, Garvey MJ, Booth BM, Goeken JA, Stewart B, Noel M. Activated CD-8 cells and HLA DR expression in alcoholics without overt liver disease. *J Clin Immunol* 1991;11:246-53.
24. Jerrells TR. Immunodeficiency associated with ethanol abuse. *Adv Exp Med Biol* 1991;288:229-36.
25. Burton RC, Ferguson P, Gray M, Hall J, Hayes M, Smart YC. Effects of age, gender, and cigarette smoking on human immunoregulatory T-cell subsets: establishment of normal ranges and comparison with patients with colorectal cancer and multiple sclerosis. *Diagn Immunol* 1983;1:216-23.
26. Prince HE, Hirji K, Waldbeser LS, Plaeger-Marshall S, Kleinman S, Lanier LL. Influence of racial background on the distribution of T-cell subsets and Leu 11-positive lymphocytes in healthy blood donors. *Diagn Immunol* 1985;3:33-7.
27. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, Neuland CY, Pankiw-Trost LK, Blattner WA, Hoover RN. The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy non-smokers. *J Clin Immunol* 1989;9:214-22.
28. Choong ML, Ton SH, Cheong SK. Influence of race, age and sex on the lymphocyte subsets in peripheral blood of healthy Malaysian adults. *Ann Clin Biochem* 1995;32:532-9.
29. Senju M, Makiyama K, Hara K, Hulstaert F, Lowder JN, Jewell DP. Two-color immunofluorescence and flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte subsets in Caucasian and Japanese healthy subjects. *Jpn J Med* 1991;30:509-15.
30. Reichert T, DeBruyere M, Deney V, Totterman T, Lydyard P, Yuksel F et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;60:190-208.
31. Lee BW, Yap HK, Chew FT, Quah TC, Prabhakaran K, Chan GS et al. Age- and sex-related changes in lymphocyte subpopulations of healthy Asian subjects: from birth to adulthood. *Cytometry* 1996;26:8-15.
32. Thude H, Hundrieser J, Wonigeit K, Schwinzer R. A point mutation in the human CD45 gene associated with defective splicing of exon A. *Eur J Immunol* 1995;25:2101-6.
33. Tamm A, Schmidt RE. The binding epitopes of human CD16 (Fc gamma RIII) monoclonal antibodies. Implications for ligand binding. *J Immunol* 1996;157:1576-81.
34. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den BR, Neijens HJ, Hop WC, Groeneveld K et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997;130:388-93.
35. Hanneit I, Erkeller-Yukel F, Lydyard P, Deney V, DeBruyere M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today* 1992;13:215, 218.
36. Bisset LR, Fiddes TM, Gillett WR, Wilson PD, Griffin JF. Altered humoral immunoregulation during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 1990;23:4-9.
37. Roll U, Scheeser J, Standl E, Ziegler AG. Alterations of lymphocyte subsets in children of diabetic mothers. *Diabetologia* 1994;37:1132-41.
38. Kuhnert M, Strohmeier R, Stegmuller M, Halberstadt E. Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;76:147-51.
39. Gennaro S, Fehder W, Gallagher P, Miller S, Douglas SD, Campbell DE. Lymphocyte, monocyte, and natural killer cell reference ranges in postpartal women. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:195-201.
40. Gabriel H, Kindermann W. Flow cytometry. Principles and applications in exercise immunology. *Sports Med* 1995;20:302-20.
41. Gabriel H, Schwarz L, Born P, Kindermann W. Differential mobilization of leucocyte and lymphocyte subpopulations into the circulation during endurance exercise. *Eur J Appl Physiol* 1992;65:529-34.
42. Caldwell CW, Bridges AJ, Walker SE, Smarr KL, Reichert RJ, Anderson SK et al. A controlled study of lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1992;63:237-44.
43. McKenna RM, Schroeder TJ. Immunological monitoring in cyclosporine-treated patients. *Clin Biochem* 1991;24:75-80.
44. Debowy J, Obminka-Domoradzka B, Switala M, Garbulinski T. Influence of nonsteroid anti-inflammatory drugs on lymphocyte subpopulation and on the primary humoral response in normothermic and feverish rabbits. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1989;37:609-15.
45. Chiappelli F, Gormley GJ, Gwirstman HE, Lowy MT, Nguyen LD, Nguyen L et al. Effects of intravenous and oral dexamethasone on selected lymphocyte subpopulations in normal subjects. *Psychoneuroendocrinology* 1992;17:145-52.
46. Rota S, Rambaldi A, Gaspari F, Noris M, Daina E, Benigni A et al. Methylprednisolone dosage effects on peripheral lymphocyte

- subpopulations and eicosanoid synthesis. *Kidney Int* 1992;42: 981-90.
47. Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes: Approved Guideline. NCCLS document H42-A. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 1998.
48. Kutok JL, Roma AO, Lemire SJ, Dorfman DM. 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* 1998;110:465-70.
49. Taylor JM, Fahey JL, Detels R, Giorgi JV. CD4 percentage, CD4 number, and CD4:CD8 ratio in HIV infection: which to choose and how to use. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1989;2:114-24.
50. Giorgi JV, Detels R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;52:10-8.
51. Schofer O, Zepp F, Marz E, Stalmach T, Barrachina C, Mannhardt W, Zabel B. Simultaneous double fluorescence flow cytometry of lysed whole blood for prenatal diagnosis of combined immunodeficiency. *Monatsschr Kinderheilkd* 1989;137:264-8.
52. Saint-Basile G, Le Deist F, de Villartay JP, Cerf-Bensussan N, Journet O, Brousse N et al. Restricted heterogeneity of T lymphocytes in combined immunodeficiency with hypereosinophilia (Omenn's syndrome). *J Clin Invest* 1991;87:1352-9.
53. Kootte AM, Henny FC, Tanke HJ, Slat J, van Es LA, Paul LC. Enumeration of Leu2a+, Leu2a+-DR+, and Leu2a+-Leu15+ cells in peripheral blood of renal transplant patients. *Transplantation* 1988;45:132-8.
54. Deng MC, Breithardt G, Scheld HH. The Interdisciplinary Heart Failure and Transplant Program Münster: a 5-year experience. *Int J Cardiol* 1995;50:7-17.
55. Rayes N, Bechstein WO, Volk HP, Tullius SG, Nussler N, Naumann U et al. Distribution of lymphocyte subtypes in liver transplant recipients. *Transplant Proc* 1997;29:501-2.
56. Laurenti L, Sica S, Salutati P, Rutella S, Serafini R, d'Onofrio G et al. Assessment of hematological and immunological function during long-term follow-up after peripheral blood stem cell transplantation. *Haematologica* 1998;83:138-42.
57. Rayes N, Bechstein WO, Tullius SG, Nussler NC, Naumann U, Jonas S et al. Distribution of lymphocyte subtypes in liver transplant recipients with viral reinfection or de novo malignancy. *Transplant Proc* 1998;30:1846-7.
58. Gougeon ML, Dreon G, Le Deist F, Dousseau M, Fervier M, Diu A et al. Human severe combined immunodeficiency disease: phenotypic and functional characteristics of peripheral B lymphocytes. *J Immunol* 1990;145:2873-9.
59. Small TN, Keever C, Collins N, Dupont B, O'Reilly RJ, Flomenberg N. Characterization of B cells in severe combined immunodeficiency disease. *Hum Immunol* 1989;25:181-93.
60. Malavasi F, Funaro A, Roggero S, Horenstein A, Calosso L, Mehta K. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today* 1994;15:95-7.
61. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;16:83-92.
62. Brgisser P, Hammann C, Kaufmann D, Battegay M, Rutschmann OT. Expression of CD28 and CD38 by CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection correlates with markers of disease severity and changes towards normalization under treatment. *The Swiss HIV Cohort Study. Clin Exp Immunol* 1999;115:458-63.
63. Mocroft A, Boffill M, Lipman M, Medina E, Borthwick N, Timms A et al. CD8+.CD38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;14:158-62.
64. Viganò A, Saresella M, Rusconi S, Ferrante P, Clerici M. Expression of CD38 on CD8 T cells predicts maintenance of high viraemia in HAART-treated HIV-1-infected children. Highly active antiretroviral therapy letter. *Lancet* 1998;352:1905-6.
65. Hultin LE, Matud JL, Giorgi JV. Quantitation of CD38 activation antigen expression on CD8+ T cells in HIV-1 infection using CD4 expression on CD4+ T lymphocytes as a biological calibrator. *Cytometry* 1998;33:123-32.
66. Lenkei R, Bratt G, Holmberg V, Muirhead K, Sandstrom E. Indicators of T-cell activation: correlation between quantitative CD38 expression and soluble CD8 levels in asymptomatic HIV+ individuals and healthy controls. *Cytometry* 1998;33:115-22.
67. Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hultin P, Schmid I, Matud JL et al. Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up. *Cytometry* 1996;26:1-7.
68. Jennings CD, Foon KA. Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997;90:2863-92.
69. Martinez A, San Miguel JF, Vidrales MB, Ciudad J, Caballero MD, Lopez-Berges MC et al. An abnormal CD34+ myeloid/CD34+ lymphoid ratio at the end of chemotherapy predicts relapse in patients with acute myeloid leukemia. *Cytometry* 1999;38:70-5.
70. Reichle A., Rothe, G., Krause, S., Zaiss, M., Ullrich, H., Schmitz, G., and Andreesen, R. Transplant characteristics: Minimal residual disease and impaired megakaryocytic colony growth as sensitive parameters for predicting relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1999;13:1227-34.
71. Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem* 1999;45:1708-17.
72. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999;38:139-52.
73. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9: 1783-6.
74. Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Knapp W, Lanza F et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood* 1998;92:596-9.
75. Dunphy CH. Comprehensive review of adult acute myelogenous leukemia: cytomorphological, enzyme cytochemical, flow cytometric immunophenotypic, and cytogenetic findings. *J Clin Lab Anal* 1999;13:19-26.
76. Ludwig WD, Raghavachar A, Thiel E. Immunophenotypic classification of acute lymphoblastic leukaemia. *Baillieres Clin Haematol* 1994;7:235-62.
77. Båtata A, Shen B. Diagnostic value of clonality of surface immunoglobulin light and heavy chains in malignant lymphoproliferative disorders. *Am J Hematol* 1993;43:265-70.
78. Geary WA, Frierson HF, Innes DJ, Normansell DE. Quantitative criteria for clonality in the diagnosis of B-cell non-Hodgkin's lymphoma by flow cytometry. *Mod Pathol* 1993;6:155-61.
79. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia MJ, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994;8:1640-5.
80. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R et al. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998;152:1655-65.
81. van Zaanen HC, Vet RJ, de Jong CM, van dem Borne, van Oers MH. A simple and sensitive method for determining plasma cell isotype and monoclonality in bone marrow using flowcytometry. *Br J Haematol* 1995;91:55-9.
82. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group see comments. *Blood* 1994;84:1361-92.
83. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87:1-13.
84. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997;89:2233-58.
85. Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 1998;34:128-42.
86. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow



- cytometry. International Society of Hematology and Graft Engineering. *J Hematother* 1996;5:213-26.
87. Gratama JW, Kraan J, Levering W, Van Bockstaele DR, Rijkers GT, Van der Schoot CJ. Analysis of variation in results of CD34+ hematopoietic progenitor cell enumeration in a multicenter study. *Cytometry* 1997;30:109-17.
88. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematology and Graft Engineering. *Cytometry* 1998;34:61-70.
89. Dercksen MW, Gerritsen WR, Rodenhuis S, Dirksen MK, Slaper-Cortenbach IC, Schaasberg WP et al. Expression of adhesion molecules on CD34+ cells: CD34+ L-selectin+ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 1995;85:3313-9.
90. Buhring HJ, Seifert M, Bock TA, Scheduling S, Thiel A, Scheffold A et al. Expression of novel surface antigens on early hematopoietic cells. *Ann N Y Acad Sci* 1999;872:25-38; discussion 38-9:25-38.
91. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Mascella B et al. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999;285:1553-8.
92. Neumüller J, Schwartz DW, Dauber E, Mayr WR. Evaluation of four monoclonal antibodies against HLA-B27 for their reliability in HLA-B27 typing with flow cytometry (FC): comparison with the classic microlymphocytotoxic test (MLCT). *Cytometry* 1996;26:209-15.
93. Dunky A, Neumüller J, Wagner E, Hubner C, Bayer PM, Schwartz DW, Mayr WR. Determination of HLA-B27 by enzyme immunoassay and flow cytometry: comparison with the classic microlymphocytotoxic assay. *Ann Clin Biochem* 1997;34:199-201.
94. Dunky A, Neumüller J, Hubner C, Fischer GF, Bayer PM, Wagner E et al. HLA-B27 determination using serological methods. A comparison of enzyme immunoassay and a microlymphocytotoxic test with flow cytometry and a molecular biological assay. *Rheumatol Int* 1996;16:95-100.
95. Lingenfelser B, Fuller TC, Hartung L, Hunter J, Wittwer C. HLA-B27 screening by flow cytometry. *Cytometry* 1995;22:146-9.
96. Ward AM, Nikaein A. Comparison of monoclonal antibodies for flow cytometric analysis of HLA-B27 antigen. *Cytometry* 1995;22:65-9.
97. Abe J, Kotzin BL, Meissner C, Melish ME, Takahashi M, Fulton D et al. Characterization of T cell repertoire changes in acute Kawasaki disease. *J Exp Med* 1993;177:791-6.
98. Pietra BA, De Inocencio J, Giannini EH, Hirsch R. TCR V beta family repertoire and T cell activation markers in Kawasaki disease. *J Immunol* 1994;153:1881-8.
99. Mancia L, Wahlstrom J, Schiller B, Chini L, Elinder G, D'Argenio P et al. Characterization of the T-cell receptor V-beta repertoire in Kawasaki disease. *Scand J Immunol* 1998;48:443-9.
100. Abe J, Kotzin BL, Jujo K, Melish ME, Glode MP, Kohsaka T, Leung DY. Selective expansion of T cells expressing T-cell receptor variable regions V beta 2 and V beta 8 in Kawasaki disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4066-70.
101. Nomura Y, Masuda K, Shinkoda Y, Sameshima K, Oku S, Yoshinaga M, Miyata K. Twenty-five types of T-cell receptor Vbeta family repertoire in patients with Kawasaki syndrome. *Eur J Pediatr* 1998;157:981-6.
102. Shichishima T. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins in clinical pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Fukushima J Med Sci* 1995;41:1-13.
103. Tomita M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: *Process Citation. Biochim Biophys Acta* 1999;1455:269-86.
104. Jarva H, Meri S. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: the disease and a hypothesis for a new treatment. *Scand J Immunol* 1999;49:119-25.
105. Plesner T, Hansen NE, Carlsen K. Estimation of PI-bound proteins on blood cells from PNH patients by quantitative flow cytometry. *Br J Haematol* 1990;75:585-90.
106. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996;87:5332-40.
107. Alfinito F, Del Vecchio L, Rocco S, Boccuni P, Musto P, Rotoli B. Blood cell flow cytometry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a tool for measuring the extent of the PNH clone. *Leukemia* 1996;10:1326-30.
108. Davis BH, Bigelow NC. Flow cytometric reticulocyte quantification using thiazole orange provides clinically useful reticulocyte maturity index. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:684-9.
109. Davis BH, Bigelow NC. Reticulocyte analysis and reticulocyte maturity index. *Methods Cell Biol* 1994;42:263-74:263-74.
110. Davis BH, Bigelow NC, Koepke JA, Borowitz MJ, Houwen B, Jacobberger JW et al. Flow cytometric reticulocyte analysis. Multiinstitutional interlaboratory correlation study. *Am J Clin Pathol* 1994;102:468-77.
111. Davis BH, DiCorato M, Bigelow NC, Langweiler MH. Proposal for standardization of flow cytometric reticulocyte maturity index (RMI) measurements. *Cytometry* 1993;14:318-26.
112. Serke S, Huhn D. Identification of CD71 (transferrin receptor) expressing erythrocytes by multiparameter-flow-cytometry (MP-FCM): correlation to the quantitation of reticulocytes as determined by conventional microscopy and by MP-FCM using a RNA-staining dye. *Br J Haematol* 1992;81:432-9.
113. Davies SV, Cavill I, Bentley N, Fegan CD, Poynton CH, Whittaker JA. Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: quantitative reticulocyte counting.
114. Major A, Bauer C, Breymann C, Huch A, Huch R. rh-erythropoietin stimulates immature reticulocyte release in man. *Br J Haematol* 1994;87:605-8.
115. Neumüller J, Schwartz DW, Mayr WR. Demonstration by flow cytometry of the numbers of residual white blood cells and platelets in filtered red blood cell concentrates and plasma preparations. *Vox Sang* 1997;73:220-9.
116. Conte R, Bontadini A, Cirillo D, Fruct F. Process control of filtered red blood cells: which counting method? *Transfus Med* 1997;7:217-9.
117. Ose L. An update on familial hypercholesterolaemia. *Ann Med* 1999;31 Suppl 1:13-8:13-8.
118. Schmitz G, Bruning T, Kovacs E, Barlage S. Fluorescence flow cytometry of human leukocytes in the detection of LDL receptor defects in the differential diagnosis of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1053-65.
119. Chan PC, Edwards A, Lafreniere R, Parsons HG. Improved detection of familial hypercholesterolemia by determining low density lipoprotein receptor expression in mitogen-induced proliferating lymphocytes. *J Lipid Res* 1998;39:2261-70.
120. Raungaard B, Heath F, Brorholt-Petersen JU, Jensen HK, Fagerman O. Flow cytometry with a monoclonal antibody to the low density lipoprotein receptor compared with gene mutation detection in diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 1998;44:966-72.
121. Davis BH, Olsen S, Bigelow NC, Chen JC. Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. *Transfusion* 1998;38:749-56.
122. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol* 1999;6:342-8.
123. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschope D, Clemenson KJ et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998;79:885-96.
124. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87:4925-36.
125. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood* 1990;75:116-21.
126. Matic GB, Chapmah ES, Zaiss M, Rothe G, Schmitz G. Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability. *Cytometry* 1998;34:229-34.
127. Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:606-10.
128. O'Malley CJ, Rasko JE, Bassler RL, McGrath KM, Cebon J, Grigg AP et al. Administration of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor to humans stimulates the production of functional platelets that show no evidence of in vivo activation. *Blood* 1996;88:3288-98.
129. Richards EM, Jestice HK, Mahendra P, Scott MA, Marcus RE, Baglin TP. Measurement of reticulated platelets following peripheral blood progenitor cell and bone marrow transplantation: implications for marrow reconstitution and the use of thrombopoietin. *Bone Marrow Transplant* 1996;17:1029-33.



130. Janisiw M, Eichelberger B, Koren D, Panzer S. Screening for platelet auto-antibodies by flow cytometry and their evaluation by the MAIPA technique. *Wien Klin Wochenschr* 1998;110:531-4.
131. Köhler M, Dittmann J, Legler TJ, Lynen R, Humpe A, Riggert J et al. Flow cytometric detection of platelet-reactive antibodies and application in platelet crossmatching. *Transfusion* 1996;36:250-5.
132. Kokschi M, Rothe G, Kiehl V, Schmitz G. Fluorescence resonance energy transfer as a new method for the epitope-specific characterization of anti-platelet antibodies. *J Immunol Methods* 1995;187:53-67.
133. Melamed MR. Flow cytometry detection and evaluation of bladder tumors. *J Occup Med* 1990;32:829-33.
134. Sasaki K, Kurose A, Miura Y, Sato T, Ikeda E. DNA ploidy analysis by laser scanning cytometry (LSC) in colorectal cancers and comparison with flow cytometry. *Cytometry* 1996;23:106-9.
135. Sugai T, Nakamura S, Habano W, Uesugi N, Sato H, Funato O et al. Analysis of subclonal expansion of colorectal carcinomas by flow cytometry. *Virchows Arch* 1999;434:437-41.
136. Baldetorp B, Stol O, Ahrens O, Cornelisse C, Corver W, Falkner U, Fernö M. Different calculation methods for flow cytometric S-phase fraction: prognostic implications in breast cancer? The Swedish Society of Cancer Study Group. *Cytometry* 1998;33:385-93.
137. Ormerod MG, Tribukait B, Giaretti W. Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology. DNA Flow Cytometry Task Force of the European Society for Analytical Cellular Pathology. *Anal Cell Pathol* 1998;17:103-10.
138. Smith RM, Cumutte JT. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 1991;77:673-86.
139. Rothe G, Oser A, Valet G. Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 1988;75:354-5.
140. Emmendorffer A, Nakamura M, Rothe G, Spiekermann K, Lohmann-Mathes ML, Roesler J. Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions. *Cytometry* 1994;18:147-55.
141. Rothe G, Valet G. Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes. *Methods Enzymol* 1994;233:539-48.
142. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods* 1995;178:89-97.
143. Walker UA, Riecken B, Herbst EW, Wolff Vorbeck G, Schlesier M, Peter HH. Reduced "oxidative burst" in a granulocyte subpopulation in a case of Sweet syndrome. *Immun Infekt* 1993;1:29-31.
144. Winker N, Tuschl H, Kovac R, Weber E. Immunological investigations in a group of workers exposed to various levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Appl Toxicol* 1997;17:23-9.
145. Gessler P, Nebe T, Birle A, Haas N, Kachel W. Neutrophil respiratory burst in term and preterm neonates without signs of infection and in those with increased levels of C-reactive protein. *Pediatr Res* 1996;39:843-8.
146. Gessler P, Nebe T, Birle A, Mueller W, Kachel W. A new side effect of inhaled nitric oxide in neonates and infants with pulmonary hypertension: functional impairment of the neutrophil respiratory burst. *Intensive Care Med* 1996;22:252-8.
147. Franke L, Pizzulli A. Normal values for the function of monocytes and granulocytes in children. *Clin Lab* 1997;43:995-7.
148. Esparza B, Sanchez H, Ruiz M, Barranquero M, Sabino E, Merino F. Neutrophil function in elderly persons assessed by flow cytometry. *Immunol Invest* 1996;25:185-90.
149. Rothe G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 1990;47:440-8.
150. Bryan CF, Baier KA, Nelson PW, Luger AM, Martinez J, Pierce GE et al. Long-term graft survival is improved in cadaveric renal transplantation by flow cytometric crossmatching. *Transplantation* 1998;66:1827-32.
151. Seger RA. Granulozyten- und Makrophagendefekte. In: Wahn U, Seger R, Wahn V, eds. *Pädiatrische Allergologie und Immunologie*. München: Urban & Fischer, 1999:490-8.
152. Kishimoto TK, Larson RS, Corbi AL, Dustin ML, Staunton DE, Springer TA. The leukocyte integrins. *Adv Immunol* 1989;46:149-82.
153. Wardlaw AJ, Hibbs ML, Stacker SA, Springer TA. Distinct mutations in two patients with leukocyte adhesion deficiency and their functional correlates. *J Exp Med* 1990;172:335-45.
154. Ancochea J, Gonzalez A, Sanchez MJ, Aspa J, Lopez Botet M. Expression of lymphocyte activation surface antigens in bronchoalveolar lavage and peripheral blood cells from young healthy subjects. *Chest* 1993;104:32-7.
155. Grunewald J, Shigematsu M, Nagai S, Mikuniya T, Wigzell H, Izumi T, Eklund AG. T-cell receptor V gene expression in HLA-typed Japanese patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:151-6.
156. Restrick LJ, Sampson AP, Piper PJ, Costello JF. Insulin as a marker of dilution of bronchoalveolar lavage in asthmatic and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1211-7.
157. Midulla F, Villani A, Merolla R, Bjerner L, Sandstrom T, Ronchetti R. Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels. *Pediatr Pulmonol* 1995;20:112-8.
158. Padovan CS, Behr J, Allmeling AM, Gerlach JT, Vogelmeier C, Krombach FP. Immunophenotyping of lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid. Comparison of flow cytometric and immunocytochemical techniques. *J Immunol Methods* 1992;147:27-32.
159. Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:250-63.
160. Heaney LG, McKirgan J, Stanford CF, Ennis M. Electronic cell counting to measure total cell numbers in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J* 1994;7:1527-31.
161. Costabel U. Recommendations for diagnostic bronchoalveolar lavage. German Society of Pneumology. *Pneumologie* 1993;47:607-19.
162. Daniele RP, Elias JA, Epstein PE, Rossman MD. Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis, and management of interstitial lung disease. *Ann Intern Med* 1985;102:93-108.
163. Klech H, Hutter C. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the european society of pneumology task group on BAL. *Eur Respir J* 1990;3:937-74.
164. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1075-82.
165. Dagli E, Warner JA, Besley CR, Warner JO. Raised serum soluble interleukin-2 receptor concentrations in cystic fibrosis patients with and without evidence of lung disease. *Arch Dis Child* 1992;67:479-81.
166. Doring G, Frank F, Boudier C, Herbert S, Fleischer B, Bellon G. Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol* 1995;154:4842-50.
167. Ratjen F, Bredendiek M, Zheng L, Brendel M, Costabel U. Lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid of children without bronchopulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:174-8.
168. Ratjen F, Bredendiek M, Brendel M, Meltzer J, Costabel U. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur Respir J* 1994;7:1865-70.
169. Fabbri LM, DeRose V, Godard P, Boschetto P, Rossi GA. Guidelines and recommendations for the clinical use of bronchoalveolar lavage in asthma. *Eur Respir Rev* 1992;2:114-20.
170. Pozzi E, DeRose V, Rennard SI, Fabbri LM. Guidelines and recommendations for the clinical use of bronchoalveolar lavage in chronic bronchitis and emphysema. *Eur Respir Rev* 1992;2:120-4.
171. Riedler J, Grigg J, Stone C, Tauro G, Robertson CF. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:163-8.
172. Openshaw PJ. Flow cytometric analysis of pulmonary lymphocytes from mice infected with respiratory syncytial virus. *Clin Exp Immunol* 1989;75:324-8.
173. Domagala-Kulawik J, Hoser G, Kawalec M, Doboszynska A, Kawiak J, Droszcz W. Lymphocyte phenotyping in systemic sclerosis: a flow cytometry analysis of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid. *Anal Quant Cytol Histol* 1997;19:264-70.
174. Whitehead BF, Stoehr C, Finkle C, Patterson G, Theodore J, Clayberger C, Starnes VA. Analysis of bronchoalveolar lavage from human lung transplant recipients by flow cytometry. *Respir Med* 1995;89:27-34.
175. Lohmeyer J, Friedrich J, Rousseau S, Pralle H, Seeger W. Multiparameter flow cytometric analysis of inflammatory cells contained in bronchoalveolar lavage fluid. *J Immunol Methods* 1994;172:59-70.

176. Upadrashta BS, Adams PA, Kopp WC, Richerson IIB. Bronchoalveolar lavage T-cell and Ia antigen quantitation by flow cytometry in acute and chronic experimental hypersensitivity pneumonitis. *Exp Lung Res* 1989;15:359-73.
177. Kleine TO, Albrecht J. Vereinfachte Durchflußzytometrie von Liquorzellen mit FACSscan. *Lab Med* 1991;15:73-8.
178. Müller HAG, Toellner KM, Hlindmayer G. Durchflußzytometrische Analytik von liquor cerebrospinalis. *Lab Med* 1991;15:69-72.
179. Mix E, Correale J, Olsson T, Kostulas V, Fredrikson S, Höjberg B, Link H. Zur Bedeutung der Fetaltyp-Lymphozyten im Liquor von Patienten mit entzündlichen ZNS-Erkrankungen. *Lab Med* 1991;15:79-81.
180. Kleine TO, Hackler R, Albrecht J. Analyse von acht Lymphozyten-Subpopulationen im Vergleich zu venösem Blut mittels Durchflußzytometrie. In: Schmitz G, Rothe G, eds. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart: Schattauer, 1994:199-208.
181. Kleine TO, Hackler R, Mix E, Albrecht J, Kaiser C, Müller HAG. Analyse von Lymphozyten-Subpopulationen im Liquor cerebrospinalis. In: Schmitz G, Rothe G, eds. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart: Schattauer, 1994:189-97.
182. Kleine TO, Albrecht J, Zofel P. Flow cytometry of cerebrospinal fluid (CSF) lymphocytes: alterations of blood/CSF ratios of lymphocyte subsets in inflammatory disorders of human central nervous system (CNS). *Clin Chem Lab Med* 1999;37:231-41.
183. Vrethem M, Dahle C, Ekerfelt C, Forsberg P, Danielsson O, Emerudh J. CD4 and CD8 lymphocyte subsets in cerebrospinal fluid and peripheral blood from patients with multiple sclerosis, meningitis and normal controls. *Acta Neurol Scand* 1998;97:215-20.
184. Oksaranta O, Tarvonen S, Ilonen J, Poikonen K, Reunanen M, Panelius M, Salonen R. Influx of nonactivated T lymphocytes into the cerebrospinal fluid during relapse of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1995;38:465-8.
185. Fiszer U, Mix E, Fredrikson S, Kostulas V, Link H. Parkinson's disease and immunological abnormalities: increase of HLA-DR expression on monocytes in cerebrospinal fluid and of CD45RO+ T cells in peripheral blood. *Acta Neurol Scand* 1994;90:160-6.
186. Stinissen P, Vandevyver C, Medaer R, Vandegaer L, Nies J, Tuyls L et al. Increased frequency of gamma delta T cells in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. Reactivity, cytotoxicity, and T cell receptor V gene rearrangements. *J Immunol* 1995;154:4883-94.
187. Mix E, Meyer-Rienecker HJ. Fetal-type lymphocytes in blood and cerebrospinal fluid (CSF) in inflammatory diseases of the central nervous system (CNS). *J Lab Med* 1996;20:166-7.
188. Vass K, Rinner W, Lassmann H. Mechanisms of leukocyte migration through the blood-brain barrier. *J Lab Med* 1996;20:156-8.
189. Kleine TO, Werner HJ, Hackler R, Rösler A, Albrecht J. Approach to detect transfer of lymphocytes through the blood/CSF barrier under normal and diseased conditions. *J Lab Med* 1996;20:164-5.
190. Kraus J, Oschmann P, Engelhardt B, Schiel C, Hornig C, Bauer R et al. Soluble and cell surface ICAM-1 as markers for disease activity in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1998;98:102-9.
191. Ichikawa H, Ota K, Iwata M. Increased Fas antigen on T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1996;71:125-9.
192. Finn WG, Peterson LC, James C, Goolsby CL. Enhanced detection of malignant lymphoma in cerebrospinal fluid by multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1998;110:341-6.
193. Bryan CF, Eastman PJ, Conner JB, Baier KA, Durham JB. Clinical utility of a lymph node normal range obtained by flow cytometry. *Ann N Y Acad Sci* 1993;677:404-6.
194. Maiese RL, Segal GH, Iturraspe JA, Braylan RC. The cell surface antigen and DNA content distribution of lymph nodes with reactive hyperplasia. *Mod Pathol* 1995;8:536-43.
195. Maekawa K, Futami S, Nishida M, Terada T, Inagawa H, Suzuki S, Ono K. Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b. *J Trauma* 1998;44:460-8.
196. Engvall P, Lundahl J. Alterations in adhesion molecule (CD11b/CD18 and CD62L) expression on granulocytes after chemotherapy. *Eur J Clin Invest* 1998;28:924-9.
197. Rosenbloom AJ, Pinsky MR, Napolitano C, Nguyen TS, Levann D, Pencosky N et al. Suppression of cytokine-mediated beta2-integrin activation on circulating neutrophils in critically ill patients. *J Leukoc Biol* 1999;66:83-9.
198. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997;3:678-81.
199. Richter A, Nebe T, Kattermann R, Trede M. Immune paralysis in acute pancreatitis—HLA-DR antigen expression on CD14+DR+ monocytes. *Langenbecks Arch Chir* 1996;381:38-41.
200. Döcke WD, Reinke P, Syrbe U, Platzer C, Asadullah K, Krausch D et al. Immunoparalysis in sepsis - from phenomenon to treatment strategies. *Transplantationsmedizin* 1997;9:55-65.
201. Döcke WD, Reinke P, Staffa G, Settmacher U, Hoger T, Groth J et al. An immune monitoring program for the management of immunosuppressive therapy in the early phase after transplantation. *Transplantationsmedizin* 1994;6:13-28.
202. Döcke WD, Syrbe U, Meinecke A, Platzer C, Makki A, Asadullah K et al. Improvement of monocyte function - A new therapeutic approach ? *Intensive Care Emergency Medicine* 1994;18:473-500.
203. Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Muller JM et al. Monocyte deactivation—rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 1996;22:474-81.
204. Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Schöning B, Glockner F, Döcke WD, Volk HD. Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: effect of tumor extirpation. *J Neuroimmunol* 1998;84:164-71.
205. Zwadlo Klarwasser G, Kaul W, Schmitz C, Hetlich R. Influence of severe burn injury on the expression of RM 3/1 and HLA-DR antigens in human blood monocytes. *J Burn Care Rehabil* 1996;17:287-93.
206. Sachse C, Prigge M, Cramer G, Pallua N, Henkel E. Association between reduced human leukocyte antigen (HLA)-DR expression on blood monocytes and increased plasma level of interleukin-10 in patients with severe burns. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:193-8.
207. Klava A, Windsor AC, Farmery SM, Woodhouse LF, Reynolds JV, Ramsden CW et al. Interleukin-10. A role in the development of postoperative immunosuppression. *Arch Surg* 1997;132:425-9.
208. Oberhoffer M, Vogelsang H, Russwurm S, Hartung T, Reinhardt K. Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:363-8.
209. Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Rebmann V, Ferencik S, Majetschak M, Schmid EN et al. HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. *Ann Surg* 1999;229:246-54.
210. Schinkel C, Sendtner R, Zimmer S, Faist E. Functional analysis of monocyte subsets in surgical sepsis. *J Trauma* 1998;44:743-8.
211. van den Berk JM, Oldenburger RH, van den Berg AP, Klomp-maker IJ, Mesander G, van Son WJ et al. Low HLA-DR expression on monocytes as a prognostic marker for bacterial sepsis after liver transplantation. *Transplantation* 1997;63:1846-8.
212. Oehling AG, Akdis CA, Schapowal A, Blaser K, Schmitz M, Simon HU. Suppression of the immune system by oral glucocorticoid therapy in bronchial asthma. *Allergy* 1997;52:144-54.
213. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993;82:3170-6.
214. Allen JB, Wong HL, Guyre PM, Simon GL, Wahl SM. Association of circulating receptor Fc gamma RIII-positive monocytes in AIDS patients with elevated levels of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1991;87:1773-9.
215. Locher C, Vanham G, Kestens L, Kruger M, Ceuppens JL, Vingerhoets J, Gigase P. Expression patterns of Fc gamma receptors, HLA-DR and selected adhesion molecules on monocytes from normal and HIV-infected individuals. *Clin Exp Immunol* 1994;98:115-22.
216. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1996;87:373-7.
217. Röhre G, Gabriel H, Kovacs E, Klucken J, Stohr J, Kindermann W, Schmitz G. Peripheral blood mononuclear phagocyte sub-

- populations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1437-47.
218. Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC et al. CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1995;85:2910-7.
219. Rothe G, Herr AS, Stöhr J, Abletshausen C, Weidinger G, Schmitz G. A more mature phenotype of blood mononuclear phagocytes is induced by fluvastatin treatment in hypercholesterolemic patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1999;144:251-61.
220. Schmitz G, Orso E, Rothe G, Klucken J. Scavenging, signaling and adhesion coupling in macrophages: implications for atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:287-300.
221. Mu H, Charmley P, King MC, Criswell LA. Synergy between T cell receptor beta gene polymorphism and HLA-DR4 in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:931-7.
222. Nelson JL, Dugowson CE, Koepsell TD, Voigt LF, Branchaud AM, Barrington RA et al. Rheumatoid factor, HLA-DR4, and allelic variants of DRB1 in women with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:673-80.
223. Albani S, Roudier J. Molecular basis for the association between HLA DR4 and rheumatoid arthritis. From the shared epitope hypothesis to a peptidic model of rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 1992;25:209-12.
224. van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH, Cats A, Schreuder GM, D'Amaro J, Breedveld FC. Association of HLA-DR4 with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis. Results of a follow-up study. *Arthritis Rheum* 1991;34:822-30.
225. Wicks I, McColl G, D'Amico A, Dougherty L, Tait B. Use of monoclonal antibodies to detect disease associated HLA-DRB1 alleles and the shared epitope in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:135-9.
226. Drovser S, Karr RW, Fu XT, Marshall WH. Analysis of monoclonal antibodies specific for unique and shared determinants on HLA-DR4 molecules. *Hum Immunol* 1994;40:51-60.
227. Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes published erratum appears in *Science* 1998 Jun 19;280(5371):1821. *Science* 1996;274:94-6.
228. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* 1997;99:1739-50.
229. Maino VC, Suni MA, Ruitenberg JJ. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* 1995;20:127-33.
230. Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA et al. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*. *J Exp Med* 1998;187:1395-402.
231. Komanduri KV, Viswanathan MN, Wieder ED, Schmidt DK, Bredt BM, Jacobson MA, McCune JM. Restoration of cytomegalovirus-specific CD4+ T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nat Med* 1998;4:953-6.
232. Paglieroni TG, Perez R, Katznelson S, Muto K, Chang T, Scott S et al. Donor cell induced CD69 expression and intracellular IL-2 and IL-4 production by peripheral blood lymphocytes isolated from kidney transplant recipients. *Hum Immunol* 1999;60:41-56.
233. Mutis T, Gillespie G, Schramm E, Falkenburg JH, Moss P, Goulmy E. Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease. *Nat Med* 1999;5:839-42.
234. Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 1999;5:677-85.
235. Peacock JS, Colsky AS, Pinto VB. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. *J Immunol Methods* 1990;126:147-57.
236. Bussa S, Rumi C, Leone G, Bizzi B. Evaluation of a new whole blood cytometric lymphocyte transformation test for immunological screening. *J Clin Lab Immunol* 1993;40:39-46.
237. Mansour I, Bourin P, Rouger P, Doinel C. A rapid technique for lymphocyte preparation prior to two-color immunofluorescence analysis of lymphocyte subsets using flow cytometry. Comparison with density gradient separation. *J Immunol Methods* 1990;127:61-70.
238. Rabinovitch PS, Kubbies M, Chen YC, Schindler D, Hoehn H. BrdU-Hoechst flow cytometry: a unique tool for quantitative cell cycle analysis. *Exp Cell Res* 1988;174:309-18.
239. Kaufman SJ, Robert-Nicoud M. DNA replication and differentiation in rat myoblasts studied with monoclonal antibodies against 5-bromodeoxyuridine, actin, and alpha 2-macroglobulin. *Cytometry* 1985;6:570-7.
240. Pechhold K, Pohl T, Kabelitz D. Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry. *Cytometry* 1994;16:152-9.
241. Langermans JA, Hazenbos WL, van Furth R. Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes. *J Immunol Methods* 1994;174:185-94.
242. Domachowski JB, Malech HL. *Phagocytes*. 1 ed. St. Louis: Mosby, 1996:392-407pp.
243. Buchwald UK, Geerdens Fenge HF, Vockler J, Ziege S, Lode H. Interleukin-10: effects on phagocytosis and adhesion molecule expression of granulocytes and monocytes in a comparison with prednisolone. *Eur J Med Res* 1999;4:85-94.
244. Hubel K, Hegener K, Schnell R, Mansmann G, Oberhauser F, Staib P et al. Suppressed neutrophil function as a risk factor for severe infection after cytotoxic chemotherapy in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Ann Hematol* 1999;78:73-7.
245. Bialek R, Bartmann P. Is there an effect of immunoglobulins and G-CSF on neutrophil phagocytic activity in preterm infants? *Infection* 1998;26:375-8.
246. Shalekoff S, Tiemessen CT, Gray CM, Martin DJ. Depressed phagocytosis and oxidative burst in polymorphonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:41-4.
247. Miyagawa B, Klingemann HG. Phagocytosis and burst activity of granulocytes and monocytes after stem cell transplantation. *J Lab Clin Med* 1997;129:634-7.
248. Perretti M, Nuti S, Parente L. Investigation of rat mast cell degranulation using flow cytometry. *J Pharmacol Methods* 1990;23:187-94.
249. Mekori YA. Mast cell degranulation test: its significance in the diagnosis of drug allergy editorial; comment. *Isr J Med Sci* 1989;25:551-2.
250. Bochner BS, Sterbinsky SA, Saini SA, Columbo M, Macglashan DW. Studies of cell adhesion and flow cytometric analyses of degranulation, surface phenotype, and viability using human eosinophils, basophils, and mast cells. *Methods* 1997;13:61-8.
251. Winkler M, Schwinzer R, Wonigeit K, Ringe B, Pichlmayr R. Analysis of CD45RA- CD45RO+ „memory“ T cells in patients after kidney, heart, and liver transplantation. *Transplant Proc* 1992;24:2532-4.
252. Heitger A, Neu N, Kern H, Panzer-Grumayer ER, Greinix H, Nachbaur D et al. Essential role of the thymus to reconstitute naive (CD45RA+) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997;90:850-7.
253. Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA et al. Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients. *AIDS* 1996;10:827-34.
254. Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sanchez E, Fernandez-Cruz E. Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;14:128-35.
255. Giorgi JV, Hausner MA, Hultin LE. Detailed immunophenotype of CD8+ memory cytotoxic T-lymphocytes (CTL) against HIV-1 with respect to expression of CD45RA/RO, CD62L and CD28 antigens. *Immunol Lett* 1999;66:105-10.
256. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994;82:487-93.
257. Thomas R, Lipsky PE. Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol* 1994;153:4016-28.

258. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12551-6.
259. Schukel K, Mayer E, Federle C, Schmitz M, Riethmüller G, Rieber EP. A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998;28:4084-93.
260. Stroh I, Scheinecker C, Riedl E, Csmarits B, Bello-Fernandez C, Pickl WF et al. Identification of CD68<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J Immunol* 1998;161:740-8.
261. Crawford K, Gabuzda D, Pantazopoulos V, Xu J, Clement C, Reinherz E, Alper CA. Circulating CD2<sup>+</sup> monocytes are dendritic cells. *J Immunol* 1999;163:5920-8.
262. Szeberenyi JB, Rothe G, Pallinger E, Orso E, Falus A, Schmitz G. Multi-color analysis of monocyte and dendritic cell heterogeneity in whole blood. *Immunobiology* 2000;202:51-8.
263. Takahashi K, Honeyman MC, Harrison LC. Impaired yield, phenotype, and function of monocyte-derived dendritic cells in humans at risk for insulin-dependent diabetes. *J Immunol* 1998;161:2629-35.
264. Gross HJ, Verwer B, Houck D, Hoffman RA, Recktenwald D. Model study detecting breast cancer cells in peripheral blood mononuclear cells at frequencies as low as 10(-7). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:537-41.
265. Pinkel D, Dean P, Lake S, Peters D, Mendelsohn M, Gray J et al. Flow cytometry of mammalian sperm: progress in DNA and morphology measurement. *J Histochem Cytochem* 1979;27:353-8.
266. Maxwell WM, Welch GR, Johnson LA. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev* 1996;8:1165-78.
267. Nicholson SC, Robinson JN, Sargent IL, Barlow DH. Detection of antisperm antibodies in seminal plasma by flow cytometry: comparison with the indirect immunobead binding test. *Fertil Steril* 1997;68:1114-9.
268. Rasanen M, Agrawal YP, Saarikoski S. Seminal fluid antisperm antibodies measured by direct flow cytometry do not correlate with those measured by indirect flow cytometry, the indirect immunobead test, and the indirect mixed antiglobulin reaction. *Fertil Steril* 1996;65:170-5.
269. Sinton EB, Riemann DC, Ashton ME. Antisperm antibody detection using concurrent cytofluorometry and indirect immunofluorescence microscopy. *Am J Clin Pathol* 1991;95:242-6.
270. Terstappen LW, Loken MR. Five-dimensional flow cytometry as a new approach for blood and bone marrow differentials. *Cytometry* 1988;9:548-56.
271. Hübl W, Tlustos L, Erath A, Andert S, Bayer PM. Proposed reference method for peripheral-blood monocyte counting using fluorescence-labelled monoclonal antibodies. *Cytometry* 1996;26:69-74.
272. Hallden G, Andersson U, Hed J, Johansson SG. A new membrane permeabilization method for the detection of intracellular antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1989;124:103-9.
273. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993;159:197-207.
274. Andersson U, Hallden G, Persson U, Hed J, Moller G, DeLey M. Enumeration of IFN-gamma-producing cells by flow cytometry. Comparison with fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* 1988;112:139-42.
275. Kabilan L, Andersson G, Lolli F, Ekre HP, Olsson T, Trye-Blomberg M. Detection of intracellular expression and secretion of interferon-gamma at the single-cell level after activation of human T cells with tetanus toxoid in vitro. *Eur J Immunol* 1990;20:1085-9.
276. Weinberg K, Parkman R. Severe combined immunodeficiency due to a specific defect in the production of interleukin-2. *N Engl J Med* 1990;322:1718-23.
277. Schmitz J, Assenmacher M, Radbruch A. Regulation of T helper cell cytokine expression: functional dichotomy of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1993;23:191-9.
278. Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur J Immunol* 1994;24:1097-101.
279. Vikingsson A, Pederson K, Muller D. Enumeration of IFN-gamma producing lymphocytes by flow cytometry and correlation with quantitative measurement of IFN-gamma. *J Immunol Methods* 1994;173:219-28.
280. Assenmacher M, Scheffold A, Schmitz J, Segura Checa JA, Miltenyi S, Radbruch A. Specific expression of surface interferon-gamma on interferon-gamma producing T cells from mouse and man. *Eur J Immunol* 1996;26:263-7.
281. Brostherus H, Brings S, Leyendeckers H, Manz RA, Miltenyi S, Radbruch A et al. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol* 1999;29:4053-9.
282. Romagnani S, Kapsenberg M, Radbruch A, Adorini L. Th1 and Th2 cells. *Res Immunol* 1998;149:871-3.
283. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46.
284. Elson LH, Nutman TB, Metcalfe DD, Prussin C. Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> lymphocyte subpopulation. *J Immunol* 1995;154:4294-301.
285. Scheffold A, Lohning M, Richter A, Assenmacher M, Manz R, Austrup F et al. Analysis and sorting of T cells according to cytokine expression. *Eur Cytokine Netw* 1998;9:5-11.
286. Maino VC, Picker LJ. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry* 1998;34:207-15.
287. Clerici M, Shearer GM. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 1994;15:575-81.
288. Clerici M, Shearer GM. A TH1→TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993;14:107-11.
289. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 1995;373:255-7.
290. de Caestecker MP, Telfer BA, Hutchinson IV, Ballardie FW. The detection of intracytoplasmic interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumour necrosis factor alpha expression in human monocytes using two colour immunofluorescence flow cytometry. *J Immunol Methods* 1992;154:11-20.
291. Tartakovsky B, Burke M, Vardimon N, Rosenberg F, Hattashvili D, Turner D, Yust I. Increased intracellular macrophage inflammatory protein-1beta correlates with advanced HIV disease. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;19:1-5.
292. Estcourt C, Rousseau Y, Sadeghi HM, Thieblemont N, Carreno MP, Weiss L, Haeflner-Cavaillon N. Flow-cytometric assessment of in vivo cytokine-producing monocytes in HIV-infected patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;83:60-7.
293. Hoshino T, Hara A, Inoue M, Honda J, Imai Y, Oizumi K, Yokoyama MM. Flow cytometric measurement of NK cell cytotoxicity. *J Clin Lab Immunol* 1991;36:39-43.
294. Chang L, Gusewitch GA, Chritton DB, Folz JC, Lebeck LK, Nehlsen-Cannarella SL. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 1993;166:45-54.
295. Lehmann C, Glass B, Zeis M, Schmitz N, Uharek L. Investigating the lysis of small-cell lung cancer cell lines by activated natural killer (NK) cells with a fluorometric assay for NK cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48:209-13.
296. Goldberg JE, Sherwood SW, Clayberger C. A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. *J Immunol Methods* 1999;224:1-9.
297. Irsch J, Hunzelmann N, Tesch H, Merk H, Maggi E, Ruffilli A, Radbruch A. Isolation and characterization of allergen-binding cells from normal and allergic donors. *Immunotechnology* 1995;1:115-25.
298. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7:663-98.
299. Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 1999;71:163-210.
300. Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by flow cytometry. *Methods Mol Biol* 1998;91:217-38.
301. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.

302. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;31:1-9.
303. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-20.
304. Gold R, Schmied M, Rothe G, Zischler H, Breitschopf H, Wekerle H, Lassmann H. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1023-30.
305. Chapman RS, Chresta CM, Herberg AA, Beere HM, Heer S, Whetton AD et al. Further characterisation of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukaemic cells. *Cytometry* 1995;20:245-56.
306. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
307. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;139:271-9.
308. Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* 1994;15:12-20.
309. Sasaki DT, Dumas SE, Engleman EG. Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry* 1987;8:413-20.
310. Telford WG, King LE, Fraker PJ. Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;172:1-16.
311. Elstein KH, Zucker RM. Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. *Exp Cell Res* 1994;211:322-31.
312. Pallis M, Turzanski J, Langabeer S, Russell NH. Reproducible flow cytometric methodology for measuring multidrug resistance in leukaemic blasts. *Adv Exp Med Biol* 1999;457:77-88.
313. Nuessler V, Stotzer O, Gullis E, Pelka-Fleischer R, Pogrebniak A, Gieseler F, Wilmanns W. Bcl-2, bax and bcl-xL expression in human sensitive and resistant leukemia cell lines In *Process Citation. Leukemia* 1999;13:1864-72.
314. Den Boer ML, Kapoun P, Pieters R, Kazemier KM, Janka-Schaub GE, Veerman AJ. Myeloid antigen co-expression in childhood acute lymphoblastic leukaemia: relationship with in vitro drug resistance. *Br J Haematol* 1999;105:876-82.
315. Perez-Simon JA, Valverde B, Martinez A, Tabernero D, Almeida J, Gutierrez N et al. Correlation of rhodamine 123 efflux by neoplastic plasma cells with clinical and biological characteristics of multiple myeloma. *Cytometry* 1999;38:24-9.
316. Orlowski J, Grinstein S. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem* 1997;272:22373-6.
317. Rothe G, Kellermann W, Valet G. Flow cytometric parameters of neutrophil function as early indicators of sepsis- or trauma-related pulmonary or cardiovascular organ failure. *J Lab Clin Med* 1990;115:52-61.
318. Rabinovitch PS, June CH, Grossmann A, Ledbetter JA. Heterogeneity among T cells in intracellular free calcium responses after mitogen stimulation with PHA or anti-CD3. Simultaneous use of indo-1 and immunofluorescence with flow cytometry. *J Immunol* 1986;137:952-61.
319. Rothe G, Klingel S, Assfalg-Machleidt I, Machleidt W, Zirkelbach C, Banati RB et al. Flow cytometric analysis of protease activities in vital cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1992;373:547-54.
320. Becker R, Pfluger KH. Myeloperoxidase deficiency: an epidemiological study and flow-cytometric detection of other granular enzymes in myeloperoxidase-deficient subjects. *Ann Hematol* 1994;69:199-203.
321. SenGupta S, Petsche D, Gelfand EW, Chechik BE. A flow cytometric method for the detection of adenosine deaminase in mononuclear cells. *J Immunol Methods* 1985;80:155-62.
322. Mazer B, Harbeck RJ, Franklin R, Schwinzer R, Kubo R, Hayward A, Gelfand EW. Phenotypic features of selective T cell deficiency characterized by absence of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and undetectable mRNA for ZAP-70 kinase. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:129-38.
323. Sloan-Lancaster J, Presley J, Ellenberg J, Yamazaki T, Lipincott-Schwartz J, Samelson LE. ZAP-70 association with T cell receptor zeta (TCRzeta): fluorescence imaging of dynamic changes upon cellular stimulation. *J Cell Biol* 1998;143:613-24.
324. Szöllösi J, Damjanovich S, Mutyus L. Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research. *Cytometry* 1998;34:159-79.
325. Gothot A, Pyatt R, McMahon J, Rice S, Srouf EF. Functional heterogeneity of human CD34(+) cells isolated in subcompartments of the G0/G1 phase of the cell cycle. *Blood* 1997;90:4384-93.
326. Jennings CD, Foon KA. Flow cytometry: recent advances in diagnosis and monitoring of leukemia. *Cancer Invest* 1997;15:384-99.