

Gereift und trotzdem jung

von Georg Hoffmann

1985 gründete eine Handvoll 12- bis 15-jähriger Jungen aus Boston die Boygroup *New Kids on the Block*. Obwohl die Teenies inzwischen in die Jahre gekommen sind, gehört die Band noch immer zu den erfolgreichsten der Welt und fand zahlreiche Nachahmer.

1995, genau zehn Jahre später, riefen vier junge Assistenz- und Oberärzte unter dem Kürzel IGLD¹ eine Art „Boygroup der Labordiagnostik“ ins Leben. Ihr Interesse galt der damals ziemlich aufwendigen und störanfälligen Durchflusszytometrie. So war die IGLD in den Anfangszeiten vor allem eine Selbsthilfegruppe. Ihre Mitglieder steckten tagsüber tief in der Routine-diagnostik und fanden erst abends und an Wochenenden Zeit für ihr anspruchsvolles Hobby. Einmal im Jahr traf man sich zu einer Tagung, um voneinander zu lernen und Mitstreiter zu gewinnen.

Obwohl die IGLD-Gründer inzwischen längst keine „Kids“ mehr sind und auch die Durchflusszytometrie, wie nebenstehend beschrieben, deutlich gereift ist, kann von Langeweile keine Rede sein: Die Technik befindet sich gerade im Aufbruch in eine neue Systemgeneration, spannende wissenschaftliche Fragestellungen, etwa aus der Stammzellforschung, haben ihr neue Impulse gegeben, und – das vielleicht Schönste von allem – der Verband zieht viele junge Menschen an, die auf den nach wie vor kostenfreien Tagungen voneinander lernen wollen. Wer einmal teilgenommen hat, der weiß, dass man dort eine Menge „junge Wilde“ trifft, die für eine einzigartige Atmosphäre moderner Wissenschaftlichkeit sorgen. Anfang März kann sich jeder in Salzburg selbst davon überzeugen (siehe S. 185).

¹ Interdisziplinäre Gruppe für Labor und Durchflusszytometrie



Bild: Dr. C. Thomas Nöbe, www.haematlabor.de

Reagenzkombinationen in der Durchflusszytometrie

New „Kits“ on the Block

Die Durchflusszytometrie wird immer anwenderfreundlicher. Einen wesentlichen Beitrag zu ihrer Verbreitung in der Laborroutine leisten gebrauchsfertige Reagenz-Kits mit optimierten Antikörper-Farbstoff-Kombinationen.

Die Anfänge der Durchflusszytometrie liegen nicht einmal 50 Jahre zurück, und so muss es nicht verwundern, dass die Technik noch vor ein bis zwei Jahrzehnten als „experimentell“ angesehen wurde. Inzwischen hat sie sich zwar einen festen Platz in der Routine forschender und diagnostischer Labore gesichert, doch deshalb ist in den kommenden Jahren noch längst kein Stillstand zu erwarten. Wachsendes Wissen über molekulardiagnostische und immunologische Zusammenhänge, Entwicklung immer neuer Antikörper und Farbstoffe, Optimierung der Laser- und Informationstechnik – das alles trägt dazu bei, dass die Durchflusszytometrie ständig im Fluss ist und ihre erfolgreiche Nutzung an eine hohe Expertise ihrer Nutzer gebunden bleibt.

Die Technik selbst wurde allerdings stetig vereinfacht, so dass sich der Anwenderkreis nun zunehmend auf Nichtspezialisten ausweitet. Zwei Entwicklungen haben zu dieser „Demokratisierung der Zytometrie“ beigetragen: Kompakte, einfach bedienbare *Benchtop Analyser* und gebrauchsfertige Reagenz-Kits. Inzwischen stehen vorkonfektionierte Kombinationen von Antikörpern und Fluorochromen für alle gängigen Applikationen zur Verfügung.

Zu nennen sind die Zählung und Vitalitätsmessung von Blutzellen, das HIV-Monitoring (CD4/CD8), die Immunphänotypisierung von Stamm- und Progenitorzellen (CD34) oder der sogenannte Immunstatus (Erfassung von B-, T- und NK-Lymphozyten mit CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD56 und anderen). Dazu kommen spezielle wissenschaftliche Fragestellungen, etwa zur Entzündung (Cyto- und Chemokine, oxidativer Burst), Apoptose (Annexin V, Caspase-3) oder aus der Hämatookologie (Signalwege des Zellwachstums, *Companion Diagnostics*).

Cocktails vom Profi

Bis zu zehn unterschiedliche Zielstrukturen lassen sich mit modernen Zytometern in einem Analysengang erfassen, aber je größer das Panel, desto komplexer wird die Farbstoffmischung und desto größer ist die Gefahr überlappender Anregungs- und Emissionsspektren. Multiple Bestimmungen erfordern ein hohes Maß an theoretischem Wissen und praktischem Können, und deshalb lässt man – um im Bild zu bleiben – die „bunten Cocktails“ lieber vom Profi mixen, als sie selbst herzustellen.

Zur Auswahl stehen u. a. Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Rhodamin und Brilliant Violett sowie signalverstärkende Alexa- und Tandem-Farbstoffe (Texas-Rot, Cyanin7) und nanomolekulare Halbleiter (*Quantum Dots*) mit steuerbarem Emissionsspektrum.

Zytometrische Pauschalreise

Die Kunst der Profis besteht nun darin, Antigene, die häufig gemeinsam exprimiert werden, so zu markieren, dass die Farbinterferenz minimiert wird. Zudem gewährleisten die Hersteller von Kits die Stabilität der Farbstoffe und haben auch Standards und Kontrollen sowie Reagenzien für die Probenvorbereitung im Angebot. Schließlich bieten sie auch Support bei der Datenauswertung und -interpretation durch Software mit speziell angepassten Algorithmen.

Diese „zytometrische Pauschalreise“ ist zweifellos von Vorteil, denn dank geprüfter Reagenzkombinationen und Kontrollmaterialien, CE-markierter Kits und validierter Software kann auch der eher unerfahrene Anwender heute qualitätsgesicherte Ergebnisse liefern. Allerdings hat jeder Service seinen Preis: Die Kosten für vorkonfektionierte Produkte, die vor allem aus

Fluorochrom-konjugierten Antikörpern, einem Lysereagenz, Pufferlösungen und Kontrollen bestehen, liegen meist höher als diejenigen für die entsprechenden Einzelreagenzien.

Dabei darf bei der Kostendiskussion nicht außer Acht gelassen werden, dass qualitativ fragwürdige Ergebnisse und Fehlinterpretationen ökonomische Belastungen durch Wiederholungsuntersuchungen und nicht indizierte Therapien nach sich ziehen. Aber für relativ einfache Messungen, etwa die Bestimmung der CD4/CD8-Ratio bei HIV-Patienten, sollte man als Alternative zu Fertigt kits auch weiterhin erwägen, die benötigten Testbestandteile selbst zusammenzustellen. Ein gewisses Grundwissen über die Technik, ihre Schwachpunkte und die Dateninterpretation muss schließlich bei jedem vorhanden sein, der durchflusszytometrische Analysen anbietet.

Ausblick

Letztlich ist der Trend zum „Zytometer to go“ nicht aufzuhalten. Im Vergleich zu traditionellen Großgeräten sind die bereits verfügbaren kompakten Tischgeräte einfacher zu bedienen, arbeiten mit geringeren Probenvolumina, erzeugen weniger Abfall und verursachen niedrigere

Betriebskosten. Die noch junge Technik der Durchflusszytometrie erlebt somit eine Entwicklung im Zeitraffer, die in der Klinischen Chemie Jahrzehnte gedauert hat: Bei ihr bestand die erste Systemgeneration ebenfalls aus Geräten und Reagenz-Kits unterschiedlicher Hersteller. In den 1980er-Jahren wuchsen beide zu Pauschalangeboten aus einer Hand zusammen; hier befindet sich die Immunzytometrie heute.

Auf diese zweite Generation folgte ab etwa 2000 die dritte, in der alle Komponenten von der Prä- bis zur Postanalytik in Straßen und *Workcells* integriert wurden. In der Durchflusszytometrie wird dieses Konzept bislang nur von wenigen Herstellern propagiert, doch ist es wohl nur eine Frage der Zeit, wann die Grenzen zwischen Routine- und Spezialanalytik zerfließen. Die neuen Kits sind dafür eine der Grundvoraussetzungen. 🌸



Priv.-Doz. Dr. med. Kai Gutensohn
LADR MVZ Dr. Kramer & Kollegen
email@kai-gutensohn.de

Hersteller- und Produktübersicht

Der große Wunschzettel unterschiedlichster Anwendergruppen hat zu einer breiten Palette an vordefinierten „Bausätzen“ für die Durchflusszytometrie geführt. Auf den nächsten Seiten präsentieren sich beispielhaft zwei Weltkonzerne der Labor diagnostik, ein renommierter deutscher Pionier der Zytometrie sowie ein Unternehmen, das vielfältige Forschungs- und Routinereagenzien internationaler Partnerfirmen vertreibt.

BD Biosciences und **Beckman Coulter** stellen neben Analysengeräten für andere Bereiche der Labor diagnostik auch Durchflusszytometer her. Dazu bieten sie eine große Auswahl an Testkits und Zusatzreagenzien für praktisch alle oben genannten Anwendungsbereiche der Zytometrie.

Biozol hat sich auf Human- und Veterinär diagnostik spezialisiert. Die Reagenzien für die Durchflusszytometrie stammen von Dako, BioLegend und EXBIO.

Partec produzierte kurz nach der Erfindung der Technik durch W. Göhde (Universität Münster, 1968) das weltweit erste Durchflusszytometer und entwickelt auch weiterhin innovative Analysensysteme mit den zugehörigen Testkits.

Weitere Kit-Hersteller sind Biocat, Biomol, Dianova, eBioscience, Enzo Life Sciences, Millipore, Miltenyi und Wershe Life Technologies (kein Anspruch auf Vollständigkeit).

gh