



Richtlinien des Center of Disease Control (CDC) in Atlanta für die Bestimmung von CD4+ T-Zellen

Die ersten Richtlinien des CDC wurden 1992 herausgegeben. 1997 erfolgte eine ausgedehnte Revision. Von diesem Papier, das Sie unter http://www.cdc.gov/epo/mmwr/mmwr_rr.html im Internet finden können, möchte ich einige Punkte wiedergeben, die vielleicht für Sie von Interesse sind.

I. Laborsicherheit

8. Im Waste sollte eine Endkonzentration von 0.5% Natriumhypochlorit vorhanden sein. Eine übliche Haushaltsbleiche hätte eine Konzentration von 5%. In einen 1000ml fassenden Waste-Behälter sollte man daher mindestens 100ml Haushaltsbleiche vorlegen.

11. Kommerzielle, fixierende Lysereagenzien reduzieren die Zell-assoziierte infektiöse Aktivität von HIV um 1000 bis 100.000-fach. Ähnlich wirkt eine Einwirkung von 1-2% Paraformaldehyd oder Formaldehyd in einem pH7.0 bis 7.4 Puffer. Dies gilt aber nicht unbedingt für andere infektiöse Erreger (z.B. Hepatitis). Der Zeitrahmen für eine komplette Inaktivierung der HIV Erreger ist nicht eindeutig bestimmt. Empfohlen wird die Verwendung eines fixierenden Lysereagenzes und die Resuspension in 1-2% Paraformaldehyd oder Formaldehydpuffer.

II. Probensammlung

A. Antikoagulanz / Probenalter

1. Analyse am Häma-Analyzer: K3EDTA verwenden und innerhalb von 30h analysieren. Bei manchen Analyzern innerhalb kürzerer Zeit notwendig. *(Anmerkung: Wir haben im Wilhelminenspital mit Ausnahme des H3 praktisch alle modernen Häma-Systeme getestet und haben Veränderungen des Diffs bereits nach 6h bemerkt. Studien, die angeblich ein stabiles Diff über längere Zeit beweisen, sind oft manipuliert. Da werden z.B. 20 Proben nach 6, 12, 24 und 48 Stunden gemessen, die Diffs der 20 Proben werden pro Zeitpunkt gemittelt und dann wird begeistert publiziert, daß sich das Diff im Mittel kaum verändert hat. Das ist aber Schwachsinn. Wir haben bei unseren Studien gesehen, daß sich das Diff bei einzelnen Proben oft deutlich ändert. Aber bei jeder Probe in eine andere Richtung. Der Mittelwert bleibt dadurch relativ konstant, sagt aber nichts aus.)*

2. Antikoagulanz für Flow Analyse innerhalb von 30h: K3EDTA, ACD, oder Heparin möglich

Analyse innerhalb von 48h: ACD oder Heparin möglich; Verwendung von K3EDTA soll bei Proben, die älter als 30h sind, manche Lymphozytensubgruppen verändern. Proben älter als 48h sollen zurückgewiesen werden.

III. Probentransport

A. Transport sollte bei Raumtemperatur (18-22°C) erfolgen, der Einfluß von Kühlung ist nicht eindeutig dokumentiert.

IV. Probenzustand

Wenn die Probe bei Berührung warm erscheint, sollte diese Abweichung notiert werden, eine Analyse kann aber erfolgen. Proben sollten nicht rasch erwärmt oder gekühlt werden.

Die Probe soll zurückgewiesen werden, wenn sie hämolytisiert, gefroren, geronnen oder älter als 48h ist.

V. Probenverarbeitung

A. 2. Das Differential sollte mit einem Häma-Analyzer erfolgen, der 10000 bis 30000 Zellen zählt. *(Wird schwer möglich sein. Es gibt nämlich kaum einen Analyzer, der soviel Leukos differenziert. Die meisten differenzieren unter 10.000, abhängig von der Leukozahl. Der Coulter STKS differenziert 8192, unabhängig von der Leukozahl).*

B.2.: Zentrifugieren nicht stärker als 3-5 Minuten bei 400xG.

Anmerkung: Das mag für fixierte Proben stimmen, das hab ich noch nicht ausprobiert. Ausprobiert habe ich aber die Zentrifugation nach Ammoniumchloridlyse in 50ml Kulturgefäßröhrchen. Wenn man da zu wenig zentrifugiert (z.B. 7 Minuten bei 200G) dann kann man bis zu 75% seiner Leukos verlieren. Nach wenig guten und vielen schlechten Erfahrungen mit quantitativen Ergebnissen nach Waschen von Zellen werde ich auf Waschen verzichten, wenn immer möglich.

B.4.: Waschpuffer sollte proteinhaltig sein um Zellklumpen zu vermeiden.

B.7.: Aufbereitete Zellen (in fixierendem Puffer resuspendiert) bei 4-10 Grad nicht länger als 24h aufheben.

VI. Antikörperpanel

Da steht nicht viel neues, vielmehr wurde das CDC Protokoll in diesem Abschnitt zum BD-Prospekt.

VII. Negativ(Isotyp)- und Positivkontrollen

A.3.-4.: Für CD3, CD4, CD8 und CD45 braucht man keine Isotypkontrollen

B. Eine Methodenkontrolle (z.B. Blut eines Spenders oder einer kommerziellen

Kontrolle) sollte immer mitgeführt werden.

VIII. Flow-Zytometer Qualitätskontrolle

Wenn man die Kompensation mit Beads eingestellt hat, muß man diese noch mit gefärbten Lymphozyten nachjustieren. Wenn man in der Probe ein viel schwächeres oder ein viel stärkeres Signal hat, als jenes, mit dem man die Kompensation eingestellt hat, muß eine leichte Fehlkompensation erwartet werden.

"Wenn man die Kompensation mit Beads eingestellt hat, muß man diese noch mit gefärbten Lymphozyten nachjustieren"

IX. Probenanalyse

X. Datenanalyse

D. Bei manchen Proben muß man die nach den Isotypkontrollen definierten Schwellen verschieben, um die Populationen optimal zu trennen. (*Anmerkung: schön, daß das einmal offiziell und klar ausgesprochen wird, daß Isotypkontrollen manchmal einfach nicht passen.*) Dies sollte aber nicht für kontinuierliche Populationen erfolgen (*Richtig. Bei denen merkt man leider nicht, wenn die Isotypkontrolle nicht paßt.*)

F. Wenn FITC-gefärbte Zellen auch (falsch) PE positiv erscheinen oder umgekehrt, und dies nur bei einer Probe passiert, soll man die Probe vor dem Färben min PBS Waschen um das Plasma zu

entfernen.

G. Interne Qualitätschecks

1. Lymphozytenrecovery (Lymphos im Gate als % Satz der Lymphos in der Probe): optimal 95%, minimal 90%

2. Lymphozytenreinheit (Anteil der Lympho im Gate): Optimal ≥ 90 , minimal ≥ 85

Anmerkung: niedrige Lymphozytenreinheit ist nicht immer ein Zeichen, daß etwas schief gelaufen ist. Baso z.B. wird man aus einem Lightscatter-gate nie rausbekommen. Bei einer Probe, die nur sehr wenige Lympho aber z.B. 1% Baso hat, kann man also keine besonders hohe Gate-Reinheit erwarten.

3. Summe von CD3+CD4+ Zellen und CD3+CD8+ Zellen soll ident mit Anteil der CD3+ Zellen sein. Optimal: Abweichung kleiner 5%, minimal Abweichung kleiner 10%.

Zellen mit höheren Anteil v. gamma-delta-T-Zellen (sind CD8-CD4-) können davon abweichen. *Anmerkung: was man dann tun soll, darüber schweigen sich die Richtlinien leider aus.*

4. CD3+ plus CD19+ plus NK-Zellen sollte (nach Korrektur für die Reinheit des Lymphogates) optimal zwischen 95 und 100%, minimal zwischen 90 und 110% ergeben.

XI. Datenspeicherung

Daten (möglichst auch Listmode) sollen 2 Jahre oder entsprechend den lokalen Gesetzen aufgehoben werden. Elektronische Datenspeicherung ist zulässig.

XII. Befund

A. Befund soll CD-Bezeichnung und kurze Beschreibung enthalten. Z.B. CD4+/Helper-Zellen, CD8+/Suppressor-Cytotoxic cells, usw.

Als CD4+ oder CD8+ sollten nur die auch CD3+ angegeben werden.

B. Prozentwerte sollten entsprechend der Reinheit des Lymphogates korrigiert angegeben werden.

C. Absolutwerte sollen angegeben werden.

"Diese (Richtlinien) könnten falsch oder mit Vorurteilen behaftet sein"

XIII. Qua-

litätssicherung

Nichts besonderes.

In der Diskussion steht dann noch ein vorbildlich ehrlicher

Satz: "Weil es nicht für jede Richtlinie publizierte Daten gab, basieren manche Empfehlungen auf Expertenerfahrung und Meinung. Diese

könnten falsch und mit Vorurteilen behaftet sein."W

Appendix: Auswirkung von Medikamenten oder biologischen Faktoren auf die Resultate der Immunphänotypisierung

Ursache	Effekt	Resultat
Zidovudine (AZT)	Vermehrte Granulozytenfragilität, erschwerte RBC-Lyse	Vermehrte Granulozyten- und RBC-Verunreinigung des Lympho-
Manche Antibiotika (z.B. Cephalosporine)		Erhöhte Autofluoreszenz
Corticoide	Verminderte CD4+ T-Zellen	Verminderte CD4+ T-Zellen (relativ und absolut)
Schwere körperliche Anstrengung	Verminderte Lymphozytenzahl	Verminderte Absolutwerte
Tagesschwankungen	Schwankungen der Lymphozytenzahl	Schwankungen der Absolutwerte