

# Die Brückenbauer

Das Brückenbauen gehört zu den spielerischen Elementen vieler Trainings- und Therapieprogramme. Immer geht es darum, in einer Gruppe mit vorgegebenen Materialien eine Kluft zu überwinden. Im Kindergarten baut man zum Beispiel aus Strohhalmen eine Brücke für die Spielzeugeisenbahn, in Teambildungskursen für Erwachsene eine begehbare Seilbrücke über eine Schlucht. Trainiert werden Fähigkeiten wie kollektive Entscheidungsfindung oder Sozialkompetenz.



Das Brückenbauen ist auch ein zentrales Element unserer *Plattform Diagnostik*, die im Märzheft 2007 zum erstenmal als eigene Rubrik erschien und seither überaus erfolgreich ist. Zu den Beiträgen der damaligen Ausgabe gehörte ein Bericht über die Jahrestagung der „Interdisziplinären Gruppe für Labor und Durchflusszytometrie“ (IGLD), diesen März kam es nun zu einem persönlichen Treffen bei der Tagung 2009. Auslöser war zunächst nur die räumliche Nähe zwischen Tagungsort und Trillium-Büro (beides im Münchner

Westen), aber schnell wurde klar, dass auch eine inhaltliche Nähe besteht. Deshalb beginnen wir gleich auf den nächsten Seiten mit dem im Gastkommentar angesprochenen Brückenbau zwischen München und Fulda, wo der Verein seinen Sitz hat.

Beim IFCC-Kongress 2009 in Innsbruck wurde dann im Juni eine Partnerschaft mit der Schweizerischen Union für Labormedizin (SULM) gestartet. Der neue Vorsitzende Dr. Martin Risch hat ähnliche Ziele wie der

IGLD-Vorsitzende Dr. Kai Gutensohn: Beide gestalten Zukunft als interdisziplinäre Brückenbauer.

Vielleicht hat ja der Erfolg unserer Plattform etwas mit dem „spielerischen“ Element einer Medienkooperation zu tun: Interessengruppen, zwischen denen auf (berufs-) politischer Ebene womöglich eine Kluft liegt, können hier zusammenfinden und dabei neue kollektive Fähigkeiten trainieren. Das jedenfalls ist die Idee.

gh

## Gleichwertiges Miteinander

Hamburg ist – noch vor Venedig – die Stadt mit den meisten Brücken in Europa. Davon inspiriert wurde vor fast 14 Jahren der Verein IGLD e.V. (Interdisziplinäre Gruppe für Labor und Durchflusszytometrie) in Hamburg gegründet. Wir organisieren seither vor allem Symposien und Workshops, mit denen wir Ufer miteinander verbinden. Dabei bildet das Selbstverständnis der „Einheit von Klinik, Diagnostik, Therapie und Wissenschaft“ den Grundstein unserer kostenfreien Veranstaltungen.

Was verbindet uns mit der Plattform Diagnostik dieser Zeitschrift? Uns gefällt, dass im Trillium-Report die Verflechtung von ambulantem und stationärem Sektor, die Verknüpfung der verschiedenen Fachdisziplinen und der offene Dialog der unterschiedlichen Berufsgruppen konzeptionell im Vordergrund stehen. Die IGLD verfolgt sinngemäß dieselben Ziele, nur eben mit einer Tagung anstelle einer Zeitschrift. Wir verstehen uns als Plattform, die ein gleichwertiges und offenes Miteinander der Teilnehmer, Referenten, Organisatoren und Sponsoren ermöglicht. Deshalb freuen wir uns auf eine nachhaltige Kooperation im Sinne unserer Vereinsziele.



Priv.-Doz. Dr. med.  
Kai Gutensohn  
IGLD e.V.  
AescuLabor  
Hamburg

**swisslab**  
Medizinische Informationssysteme  
www.swisslab.de | tel. +49-30-62 60 10

Zentrallabor  
Mikrobiologie  
Transfusion  
Pathologie

Universitätskliniken  
Krankenhäuser  
Facharztlabore

Die diagnostische Informationsplattform

**Labor und Durchflusszytometrie**

Die Abkürzung IGLD steht für „Interdisziplinäre Gruppe für Labor und Durchflusszytometrie“, aber damit ist das Themenspektrum der IGLD-Jahrestagungen nur sehr unvollständig beschrieben. Der Name sollte bei der Gründung des Vereins im Jahr 1995 zwei Tätigkeitsfelder inhaltlich verbinden, die damals für junge, ambitionierte Laborärzte schwer vereinbar schienen. „Labor“ stand für tägliche Routine, „Durchflusszytometrie“ für (eher nächtliche) Forschung. Da lag es auf der Hand, ein Symposium ins Leben zu rufen, das Wissenschaft und Praxis verband und obendrein – quasi im Rahmen kollegialer Nachbarschaftshilfe – kostenlos war.

Die Arbeit der IGLD ist nicht politisch, sondern an Inhalten orientiert. Hierarchien spielen für den Verein keine Rolle, alle Aktiven arbeiten ehrenamtlich. Die Tagungsprogramme sind facettenreich und thematisch grenzüberschreitend. Auch wenn die Durchflusszytometrie inzwischen Einzug ins Routinelabor gehalten hat (S. 92), ist das Konzept erhalten geblieben, Theorie und Praxis zu verbinden. Der Themenkatalog hat sich allerdings mit insgesamt zehn Schwerpunkten erheblich ausgeweitet.

**Themen des Programms 2009**

Der Autor des nebenstehenden Beitrags Priv.-Doz. Dr. Michael Spannagl, Leiter des Labors für Immungenetik und Molekulare Diagnostik am Klinikum Großhadern, war Organisator der Tagung mit den nachfolgenden Sessions. Jeweils einer von fünf bis sechs Vorträgen ist in Klammern als Beispiel aufgeführt. Die fett gedruckten Punkte werden hier im Detail vorgestellt.

1. Hämostaseologie (Gentherapie der Hämophilie)
2. Stammzellbiologie (Der Mensch ist so alt wie seine Stammzellen)
3. **Immungenetik und Transplantation** (Hochauflösende HLA-Genotypisierung)
4. Sterilproduktion in der Zelltherapie (Herstellung von Stammzellprodukten)
5. Analyse biomedizinischer Daten (Signalübertragung in Netzwerken)
6. POCT (RiLiBäk/Akkreditierung)
7. Neue Versorgungsstrukturen (ambulant-stationäre Verknüpfung)
8. Hämatologie/Onkologie (Genexpressions- und SNP-Arrays)
9. Transfusionsmedizin (Stammzelletherapie solider Tumoren)
10. **Workshops** (Grundlagen der Durchflusszytometrie)

Über die Themenblöcke 4 und 5 sind Beiträge in den nächsten beiden Trillium-Ausgaben vorgesehen. Informationen zum Verein unter [www.igld.de](http://www.igld.de).

gh



**IGLD-Tagungsbericht**

Universität München, Klinikum Großhadern

12. bis 14. März 2009

**Immungenetik und Transplantationsmedizin**

**Die virtuelle Kreuzprobe**

**Nach einer molekulargenetischen Erfolgphase erleben Serologie und Kreuzprobe eine Renaissance im HLA-Labor. Die Methoden haben sich allerdings erheblich verfeinert.**

Die Transplantationsmedizin gehört zu den größten und seit Prof. Christiaan Barnard (1967) wohl auch spektakulärsten Errungenschaften der Hochleistungsmedizin. Der entscheidende Durchbruch erfolgte vor kaum mehr als 50 Jahren: 1958 entdeckte der Arzt und Nobelpreisträger Jean Dausset das HLA-System (*human leucocyte antigen*) und fand damit die Erklärung für die bis dato tödlich verlaufenen Versuche, Organe von einem Spender auf einen Empfänger zu übertragen.

Die Erkennung körperfremder Zellen ist ein komplizierter Vorgang, bei dem die enorme individuelle Variabilität der HLA-Klassen I und II eine Schlüsselrolle spielt. Vereinfacht gesagt prüft der Körper des Empfängers die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) durch einen Vergleich der fremden und eigenen HLA-Muster. Gegen fremde Muster wird häufig eine spezifische Immunantwort ausgelöst, die bei wiederholtem Kontakt (z.B. einer erneuten Transplantation) eine zytotoxische Reaktion auslöst und die fremden Zellen zerstört. Abhilfe schafft letztlich zwar nur die Immunsuppression, aber ein möglichst perfektes HLA-Matching ist nach wie vor eine gute Voraussetzung für den Erfolg.

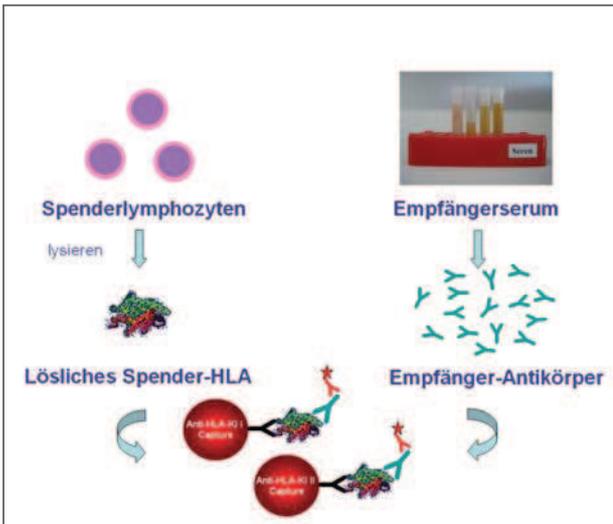
Im Hintergrund jeder Klinik mit Transplantationszentrum müssen deshalb aufwändige Labortechniken vorgehalten werden, um die Vorbereitung von Spender und Empfänger, die richtige Zuordnung der Organe und die angemessene Behandlung von etwaigen Abstoßungsreaktionen zu gewährleisten.

**HLA-Diagnostik im Wandel der Zeit**

Ursprünglich wurde das HLA-System mit serologischen Techniken proteinchemisch charakterisiert. Dabei nutzte man Antisera, die durch natürliche Immunisierung, z.B. gegen den Embryo in der Schwangerschaft, entstanden waren. Mit diesen einfachen Verfahren ließ sich jedoch die Heterogenität der Proteinstrukturen auf den Zelloberflächen nicht ausreichend auflösen.

Eine neue Welt eröffnete sich mit der DNA-Sequenzierung, die den genetischen Hintergrund der HLA-Proteinstrukturen aufzuklären erlaubte. Zuverlässige Techniken lassen inzwischen eine Differenzierung von Tausenden individueller HLA-Varianten zu, wie Dr. Hirv von IMG Laboratories (Labor Dr. Klein, Dr. Rost) zeigte. Entscheidend sei allerdings eine fachgerechte Befundung, insbesondere Aufbereitung der genetischen Codes und Begriffe, damit der Laborbericht auch im klinischen Alltag verstanden werde.

Wegen der ausgeprägten Mikroheterogenität des HLA-Systems auf DNA-Ebene gewinnt heute die Betrachtung des pro-



Testprinzip der „virtuellen Kreuzprobe“: Spenderzellen werden über Ficollgradienten gereinigt, lysiert und mit Mikrobeads inkubiert. Nach Zugabe von Empfängerserum reagieren etwaige HLA-Antikörper mit dem löslichen Spender-HLA. Der Komplex wird mit markiertem Konjugat (Anti-IgG-PE) zum Leuchten gebracht und im Luminexgerät, einer Art Durchflusszytometer, gemessen.

teinchemischen Phänotyps wieder an Bedeutung. Auch die klassische Kreuzprobe erlebt eine Renaissance, nicht zuletzt durch das vermehrte Auftreten von Antikörpern gegen Oberflächenantigene in potenziellen Empfängern. Solche präformierten Antikörper entstehen natürlicherweise bei der Schwangerschaft, aber zunehmend auch aufgrund vorangegangener Transfusionen oder Transplantationen.

Dass außer HLA auch andere Oberflächenproteine der Zelle eine wichtige Rolle in der Transplantationsimmunologie spie-

len, zeigte Frau Dr. Kauke aus München am Beispiel des MICA-Systems (*MCC class I-related chain A*). Dabei handelt es sich um eine polymorphe Klasse von Antigenen auf Spenderseite, die die Bildung pathologischer Allo-Antikörper des Empfängers anregen und zur Abstoßung von Transplantaten führen können.

Kreuzproben werden unmittelbar vor einer Transplantation zum Ausschluss von Antikörpern des Empfängers gegen HLA-Antigene des Spenders durchgeführt. Die Referenzmethode ist der komplement-abhängige Lymphozytotoxizitätstest (CDC), der den im Körper ablaufenden Erkennungs- und Abstoßungsprozess physiologisch möglichst

exakt nachbildet. In den letzten Jahren haben sich aber auch immunchemische Festphasenassays (z.B. ELISA) im Antikörperscreening fest etabliert. Sie sind weniger aufwändig und gut automatisierbar.

Aktuell wird die standardisierte Kopplung von HLA-Proteinen auf Mikrobeads zum Nachweis präformierter löslicher Antikörper im so genannten „Luminex-Crossmatch“ intensiv wissenschaftlich untersucht. Laut Dr. Schaub aus

der Nephrologie in Basel kann man mit dem aus der Durchflusszytometrie abgeleiteten Luminex-Verfahren eine robuste serologische HLA-Diagnostik aufbauen, die dem CDC ebenbürtig ist.

Die Luminex-Technologie ermöglicht es, die Antikörperspezifität für exakt definierte HLA-Moleküle durch die Wahl der gekoppelten Antikörper festzulegen. Vergleicht man nun die HLA-Typisierung des Spenders mit den vorher spezifizierten HLA-Antikörpern des Empfängers, so kann damit ein „virtueller“ Crossmatch durchgeführt werden, d.h. die Verträglichkeit von Spender und potenziellem Empfänger kann nach Kenntnis der HLA-Typisierung des Spenders ohne Verwendung seiner Leukozyten mit dem Computer kalkuliert werden.

Erste Vergleichsstudien zwischen der CDC-Referenzmethode und dem neuen Verfahren ergaben eine hohe Übereinstimmung. Bei abweichenden Resultaten besaß der Luminextest vereinzelt sogar eine bessere Vorhersagekraft bezüglich des späteren Transplantationserfolgs. Ob eines Tages im klinischen Alltag die zytotoxische durch die virtuelle Kreuzprobe abgelöst werden kann, ist derzeit Gegenstand prospektiver Untersuchungen.



Priv.-Doz. Dr. med.  
Michael Spannagl  
Klinikum der  
Universität München  
Labor für Immungenetik  
Tel. 089/7095-4401  
mispannagl@t-online.de

www.igld.de

Dr. J. Wessels,  
Univ. Göttingen

## IGLD-Workshop-Programm

Die Hörsäle und Seminarräume im Klinikum Großhadern der Universität München mit den angrenzenden Instituten der Grundlagen- und der angewandten Forschung boten ideale Voraussetzungen zur Durchführung von Workshops während des Symposiums. Unter der Überschrift „Neues aus Immunologie und zellulärer Therapie“ wurden auch diesmal zahlreiche Vortragsthemen mit praktischen Anleitungen unterfüttert. Da der Buchstabe D in der Abkürzung IGLD für Durchflusszytometrie steht, befassten sich fünf von insgesamt zehn Workshops mit dieser Technologie.

Praxiserfahrene Fachleute (im Bild Dr. Hans-Dieter Kleine, Seracell Rostock) gestatteten den Teilnehmern einen detaillierten Blick ins Innere der höchst komplexen Geräte. Von diesem vertieften Einblick profitieren auch die Trillium-Leser auf den nächsten beiden Seiten; dort werden vier aktuelle Durchflusszytometrie-Systeme vorgestellt.

Alle, die sich für die hochkarätigen und preisgünstigen Workshops der IGLD interessieren, sind schon heute herzlich zum nächsten Symposium nach Bad Soden-Allendorf bei Frankfurt eingeladen. Workshopthemen werden unter anderem die Messung von Stamm- und Progenitorzellen und Bestimmung des Immunstatus sein.



Infos unter [www.igld.de](http://www.igld.de), persönliche Anfragen an [johannes.wessels@med.uni-goettingen.de](mailto:johannes.wessels@med.uni-goettingen.de)

Die neue Generation der Durchflusszytometer

# Anspruchsvolle Routineanwendungen

**Trotz hoher technischer Komplexität hat die Durchflusszytometrie inzwischen den Sprung in die Routinediagnostik geschafft. Prä- und Postanalytik sind die nächsten Herausforderungen.**

Durchflusszytometer analysieren einzelne Zellen in Blut und anderen Suspensionen auf physikalische und biochemische Eigenschaften. Dabei passiert jede Zelle einen Laserstrahl in einem feinen Flüssigkeitsstrom (hydrodynamische Fokussierung). Zwei Arten von Signalen werden aufgenommen: Im Streulicht erkennt man Zellgröße und Granularität und kann so Lymphozyten und Monozyten sowie neutrophile und eosinophile Granulozyten trennen. Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlänge erlauben die simultane Unterscheidung vieler biologisch relevanter Subpopulationen innerhalb der genannten Zellarten. Diese Signale stammen von unterschiedlichen Fluorochromen, die kovalent an monoklonale Antikörper gegen Zelloberflächenmarker gekoppelt sind (Immunphänotypisierung). Das Ergebnis ist eine Vielzahl von Computergrafiken, sog. Scattergrammen, mit Abertausenden von Zellpunkten (Beispiele Seite 94).

Die erste durchflusszytometrische Anwendung der 1984 mit dem Nobelpreis in Medizin geehrten Entdeckung monoklonaler Antikörper war die Auftrennung von B- und T-Lymphozyten, die sich im Mikroskop nur schwer unterscheiden lassen. Die Auftrennung erfolgte damals tatsächlich physikalisch, weshalb diese Geräte heute noch *Fluorescence-Activated Cell Sorter* (FACS) genannt werden. Die Sortiereigenschaft wird aber aus Komplexitäts- und Kostengründen nur noch in Forschungsgeräten genutzt.

### Einsatzgebiete

Blut stellt ein naheliegendes Untersuchungsgut dar, weil sich die Zellen dort bereits in Suspension befinden. Dementsprechend wird die Durchflusszytometrie vor allem in der Hämatologie zur Typisierung von Leukämien und Lymphomen sowie in der Immunologie zur Abklärung von Immundefekten eingesetzt. Auch das „immunologische Differenzialblutbild“ ist als Alternative zu seinem schwer automatisierbaren mikroskopischen Pendant ein (auch wirtschaftlich) lohnendes Anwendungsgebiet, und schließlich profitiert die zelluläre Liquordiagnostik von der si-

cheren Zellzuordnung – vorausgesetzt die Geräte arbeiten sparsam und mit geringem Zellverlust. Die Vereinzelung von Zellen aus einem Gewebeverband ist dagegen auch heute noch eine Herausforderung, die stets gewisse Kompromisse erfordert. Deshalb bleibt der Einsatz in der Pathologie begrenzt.

Dank der Messung von 20.000 bis 100.000 Zellen je Probe ist die Analyse seltener Zellen eine weitere Domäne der Durchflusszytometrie: Die Bestimmung von CD34-positiven humanen Progenitorzellen hat durch die Stammzelltransplantation enorm an Bedeutung gewonnen, und in der Allergiediagnostik wird so die Analyse der Degranulation basophiler Granulozyten durch Allergeninkubation ex vivo ermöglicht.

Dank einer Vielzahl technischer Verbesserungen wurden Zytometer in den letzten Jahren immer leistungsfähiger und routinetauglicher. Dennoch darf man sich keiner Täuschung hingeben: Wenn man über die einfache Lymphozytentypisierung hinausgeht, bleibt die Durchflusszytometrie auf absehbare Zeit ein anspruchsvolles Spezialgebiet, das aufgrund seiner analytischen, prä- und post-

### Eine neue Generation

Seit dem letzten Trillium-Review über Durchflusszytometrie (TR 2005 (3)3:76) sind fast vier Jahre vergangen, in denen sich viel getan hat. Die hier abgebildeten Modelle der beiden Marktführer BD und Beckman Coulter wurden soeben der Öffentlichkeit vorgestellt und demonstrieren, wie analytische Komplexität routinetauglich gemacht werden kann.

In der nebenstehenden Tabelle vergleichen wir beispielhaft jeweils ein Gerät für den Basiseinsatz in der Hämatologie und Immunologie mit einem komplexeren System, das sich auch für wissenschaftliche Fragestellungen eignet. Natürlich ist die Palette der Anwendungen und Geräte in Forschung und Klinik viel breiter. Insbesondere klassische Hämatologiegeräte setzen zunehmend Technologien der Durchflusszytometrie zur Erweiterung ihres Spektrums ein. Dieses Thema ist bereits fest für eine spätere Trillium-Ausgabe vorgesehen.





Michael Braun  
Beckman Coulter  
Europark Fichtenhain B13, 47807 Krefeld  
Tel. 02151/333-788, 0171/304 98 23  
mbraun@beckman.com  
www.beckmancoulter.com

*Beckman Coulter Navios™*





Dr. Norbert Leclere  
BD Biosciences  
Tullastraße 8-12, 69126 Heidelberg  
Tel. 06221/305-406, 0172/625 21 29  
norbert\_leclere@europe.bd.com  
www.bd.com

*BD LSRFortessa™*

Firma	BD Biosciences		Beckman Coulter		
	BD FACSCanto™ II 	BD™ LSR II 	Cytomics™ FC 500 	Navios™ 	
Systemdaten	Tiefe, Breite, Höhe (cm)	61 x 91 x 64	87 x 156 x 56	74 x 90 x 61	70 x 95 x 61
	Gewicht (kg)	144	239	85	104
	Stromverbrauch (Anschluss)	16 A, 220 V	16 A, 220 V	16 A, 220 V	16 A, 220 V
	min. Abwärme (Klimatisierung)	0,54 kW/h	0,35 kW/h	2,3 KW/h	~0,62 KW/h
	Aufwärmzeit (Min., Gerät messfertig)	15	max. 60 (je nach Laser)	15	10 (durch Klimatisierung)
	Wartungsintervall (Firmen-Service)	2x pro Jahr	2x pro Jahr	1x pro Jahr	1x pro Jahr
EDV	Betriebssystem	MS Windows XP prof.	MS Windows XP prof.	MS Windows 2000	MS Windows Vista Business
	Speicherkapazität <sup>1</sup> (GB)	80 + 250 (+ 320 GB extern)	80 + 250 (+ 320 GB extern)	40 + 250	bis zu 500 + 500
	LIS-Anbindung Gerät	uni- / bidirektional möglich	unidirektional möglich	bidirektional möglich	bidirektional
	LIS-Anbindung Pipettor	bidirektional	-	bidirektional möglich	bidirektional
	Probenidentifikation	Karussell, Position	-	Tube, Karussell, Position	Tube, Karussell, Position
Analytik	Anzahl Laser	bis zu 3	bis zu 7	2	3
	Art der Laser	Ionen, Festkörper	Ionen, Festkörper	Ionen, Festkörper	Festkörper
	Anzahl Messparameter	10	20	7	12
	Auflösung <sup>2</sup>	262.144	262.144	1.048.576	1.048.576
	Anregungswellenlängen (nm)	488 - 633 (405 optional)	355, 405, 488, 532, 561, 640 (11 Modelle)	488, 633	405, 488, 638
	Empfindlichkeit (MESF) <sup>3</sup>	< 100 / < 50	< 80 / < 30	600 / 300 / 600	112 / 15 / 75
	Durchflussrate (µl/Min.)	30, 60 oder 120	15-120	10, 30, 60	10, 30, 60
	Max. Flussrate (events/Sek.)	10.000	70.000	4.500	> 25.000
	Min. Probenvolumen (µl) <sup>4</sup>	30	20	50	50
	Kontrollmaterialien	Beads, Zellen	Beads, Zellen	Beads, Zellen, Vollblut	Beads, Zellen, Vollblut
Fluoreszenzkanäle <sup>5</sup>	6-8	18	5	10	
Präanalytik	Loader	optional (Röhrchen/Platten)	optional (Platten)	integriert	integriert
	Probenkapaz. (Röhrchen / Platten)	40 / 96 oder 384	- / 96 oder 384	32 / 96	32 / 96
	Typischer Durchsatz <sup>6</sup>	96/20 Min. (Platten)	96/20 Min. (Platten)	90/Std. (Röhrchen)	90/Std. (Röhrchen)
CE/IVD-Zertifizierung	ja	nein	ja	ja	
Besonderheiten und Alleinstellungsmerkmale	Elektronik digital; hohe Empfindlichkeit (Octagon-Optik); austauschbare Spiegel und Filter; praktisch kein Totvolumen durch direktes Ansaugen der Probe über die Nadel (wichtig für Liquor, Lymphknoten, Pädiatrie, Versuchstiere); label-spezifische Instrumentsettings; DNA- und Calcium-Messung mit UV-Anregung (Ionenlaser).		Pico-Motoren zur Steuerung und Justage der Laser (Laseralignment); Klimatisierung zur Regelung der Temperatur innerhalb des Systems; automatische Mischvorrichtung (Vortex) für Messröhrchen; Barcode Erkennung an Karussell, Position und Messröhrchen; flexibles Setting durch austauschbare Filter (Justagefrei).		

Die Tabelle basiert auf Herstellerangaben und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und Richtigkeit.

## Erläuterungen

1. Alle Geräte besitzen zwei interne Festplatten
2. Kanäle des Analog-Digitalwandlers
3. mean equivalent of soluble fluorochrome
4. Ansaugvolumen ohne Totvolumen
5. Errechnet sich aus Zahl der Fluoreszenzkanäle (nebenstehend) plus 2 (Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht)
6. Anhaltzahlen mit erheblichen Streubreiten (abh. von Zellzahl, Volumen, Flussrate u.ä.)

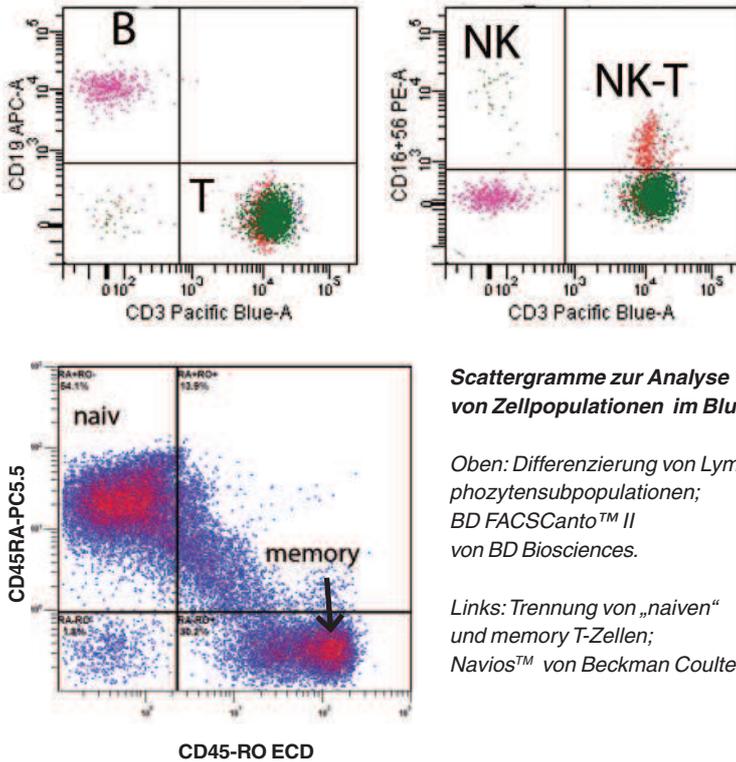
## Fluoreszenzkanäle BD

Blau: 530 nm (FITC), 585 nm (PE), 670 nm (PerCP), 780 nm (PE-Cy7)  
 Rot: 660 nm (APC), 780 nm (APC-H7)  
 Violett: 450 nm (Horizon V450), 510 nm (AmCyan)

## Fluoreszenzkanäle Beckman Coulter

Blau: 525 nm, 575 nm, 620 nm, 675 nm, 755 nm LP  
 Rot: 660 nm, 725 nm, 755 nm LP  
 Violett: 450 nm, 550 nm

Hinweis: Die in Klammern aufgeführten Farbstoffe sind nur Beispiele. Eine komplette Auflistung würde den Rahmen dieser tabellarischen Darstellung sprengen.



## Scattergramme zur Analyse von Zellpopulationen im Blut

Oben: Differenzierung von Lymphozytensubpopulationen; BD FACSCanto™ II von BD Biosciences.

Links: Trennung von „naiven“ und memory T-Zellen; Navios™ von Beckman Coulter.

analytischen Komplexität hervorragend geschulte Mitarbeiter benötigt, oft sogar die beste Kraft im Labor. Die Einarbeitung in die differenzierte Analysesoftware erfordert Monate, und die Datenauswertung in einem vieldimensionalen Raum übersteigt auch das Vorstellungsvermögen des Durchschnittsakademikers.

Professionelle Durchflusszytometrie erfordert für die Befundung stets einen erfahrenen Hämatologen, Immunologen oder Laborarzt, denn die Ergebnisqualität eines Labors erkennt man gerade auch daran, ob es nur Zahlenkolonnen oder einen Befund im Kontext klinischer Angaben liefert – und auch, ob der Befund aus Textbausteinen oder individuellen Aussagen von medizinischer Relevanz besteht.

### Technische Verbesserungen

Der Datendurchsatz und damit die Messgeschwindigkeit haben sich deutlich erhöht, was auch einen höheren Probendurchsatz ermöglicht. Um die Datenanalyse von beispielsweise 100 Proben pro Stunde am Gerät parallel zur Messung zu ermöglichen, sollte man mindestens eine zusätzliche Auswertestation einplanen.

Moderne Geräte verfügen jetzt über acht oder zehn Fluoreszenzkanäle für Mehrfarbanalysen mit neuen Fluorochromen. Die simultane Verwendung mehrerer Antikörper ermöglicht eine höhere Auflösung kleiner Subkompartimente, beispielsweise bei der Analyse der Hämatopoese in Knochenmarksproben oder von Lymphozytensubpopulationen in kleineren Probenvolumina durch Verkürzung von Markerpanels.

wird; das erlaubt die Nachbearbeitung und Korrektur der Auswertung auf der Basis von unverfälschten Rohdaten. Genau zu hinterfragen ist bei den verschiedenen Geräten allerdings, ob auch wirklich alle Kanäle (Dekaden) im unteren Messbereich nutzbar sind.

Schließlich hat sich die Servicehäufigkeit der Geräte reduziert, was angesichts des heute üblichen Reagenzienleasings inkl. Servicekosten ein für Hersteller und Anwender durchaus relevantes Thema ist.

### Erweiterte Möglichkeiten

Alternativ zur Typisierung mit Antikörpern werden auch fluoreszente Nukleinsäurefarbstoffe oder fluorogene Enzymsubstrate verwendet, um Zellproliferation und andere Zellfunktionen zu erfassen. Diese Untersuchungen eröffnen der Hämatologie eine neue Dimension, doch ist hier eine Standardisierung notwendig, wie sie vor Jahren in der Klinischen Chemie für Enzyme stattgefunden hat. Besonders kritisch ist der untere Messbereich, da sich die Leistungsfähigkeit des gesamten Immunsystems durch eine Multiplikation von Zellfunktion und Zellzahl errechnet. Analog zur elektrischen Leistung in der Physik („Spannung mal Stromstärke“) wirken sich folglich Schwankungen eines Faktors hier extrem stark aus.

Alle Geräte erlauben prinzipiell die Zählung von Bakterien, um z.B. pathologische Proben für die weitere mikrobiologische Untersuchung herauszufiltern. Für diesen Zweck wurden auch eigene Urindurchflusszytometer entwickelt. Schließlich sei

Auch wenn nicht alle Farbkanäle (Fluoreszenzen) genutzt werden, weil es z.B. dafür noch keine Antikörperkonjugate gibt, so kann man immerhin durch geschickte Wahl mehrerer Fluorochrome deren spektralen Überlappungen deutlich besser kompensieren.

Ferner wurde die Kanalauflösung der Verstärker wesentlich verbessert, so dass eine lineare physikalische Verstärkung mit anschließender digitaler Logarithmierung möglich

die Luminex-Technologie erwähnt, bei der anstelle von Zellen künstliche Beads im Laserstrahl analysiert werden. Diese werden mit unterschiedlichsten Liganden, z.B. Antikörpern oder Nukleinsäuresonden, beladen, um lösliche Reaktionspartner nachzuweisen. Das Potenzial dieser Technologie für die Immunchemie und molekulare Diagnostik wird als sehr hoch eingeschätzt, da man auf diese Weise Biomarkerprofile, z.B. Cytokine mit hoher Präzision messen kann (s.a. Seite 90).

### Herausforderungen

Nach der Optimierung der eigentlichen Analytik in den Messgeräten liegen die größeren Herausforderungen nun in der Probenvorverarbeitung und Datenverarbeitung. Die einfachen Lymphozytensubpopulationen werden bereits ohne Wachschriffe weitgehend automatisiert vorbereitet und ausgewertet, doch für die Untersuchung komplexerer Zellgemische müssen ungebundene Antikörper weiterhin wie in der klassischen Immundiagnostik mit Zentrifugationsschritten abgetrennt werden. Dies – sowie das manuelle Setzen von Softwareregionen bei der Auswertung – verlangt von MTLA und Arzt besondere Fachkunde. Der von den Firmen propagierte Einsatz von Hohlfasermodulen, die vertikale Zentrifugation oder die Verwendung von Coombszentrifugen konnten die manuelle Probenvorbereitung bisher noch nicht ersetzen.

Ein kritischer und störanfälliger Schritt ist ferner die Kalibration: Während klassische Hämatologiegeräte, die heute ja ebenfalls Laserdurchflusszytometer darstellen, volumetrische Messungen und damit echte Konzentrationsbestimmungen von Zellen erlauben, kommen bei den hier besprochenen Geräten Mikropartikel bekannter Konzentration zum Einsatz.

Dass die Fluoreszenz-Durchflusszytometer aus der Grundlagenforschung hervorgegangen sind, bemerkt man spätestens bei der Anbindung an die Labor-EDV (LIS). Meist benötigt man dafür sog. Middleware, d.h. Rechner, die die Übersetzungsarbeit zwischen dem Auswertungs-PC des Messgerätes und der Labor-EDV leisten.

Auf der Wunschliste vieler Anwender stehen Dinge, die im Routinelabor heute eigentlich Selbstverständlichkeiten sind. Dazu gehören HL7-/ASTM-Schnittstellen, online-Übertragung der Untersuchungsanforderungen, um eine sich ständig aktualisierende Arbeitsliste zu generieren, oder positive Probenidentifikation zur Vermeidung von Verwechslungen. Mangelware sind auch herstellerspezifische Tabellen mit altersabhängigen Normwerten. In manchen Bereichen wie z.B. der Analyse

Strukturwandel in der Labormedizin

# Die Mutter aller Probleme

von Knochenmarkproben ist die Auswertung durch Software von Drittanbietern interessant (z.B. Infinicyt von Cytognos). Vor der Anschaffung ist jedoch zu prüfen, ob die Datenformate der Geräte wirklich dem FCS-Standard entsprechen oder proprietäre Definitionen enthalten.

Weiterhin stecken Reagenzienkühlung und Chargenverwaltung *on board* bei der Durchflusszytometrie noch in den Anfängen, und für viele Antikörper existieren keine stabilen Kontrollreagenzien, die einer kompletten Prozesskontrolle standhalten. Schließlich ist die Wärme- und Geräuschentwicklung bei einigen Geräten nicht unerheblich und kann kostenträchtige Umbaumaßnahmen vor Ort erfordern.

## Fazit und Ausblick

Ohne Frage tragen die beschriebenen technischen Verbesserungen der neuen Gerätegeneration entscheidend dazu bei, dass sich die Routineanwendungen der klinischen Durchflusszytometrie inzwischen gut etabliert haben. Die in der Übersichtstabelle aufgeführten Geräte decken alle Anforderungen für Basisuntersuchungen vergleichbar gut ab und unterscheiden sich eher in ihrer Flexibilität für Spezialanwendungen und der Zahl der Fluoreszenzkanäle. Angesichts des erheblichen Umstellungsaufwandes vom Reagenzwechsel über die Softwareschulung bis zu neuen Normalwerten sollte ein Systemwechsel gut überdacht werden.

Aktuell droht der Durchflusszytometrie Gefahr aus wirtschaftlicher Richtung: Die kassenärztliche Bundesvereinigung beabsichtigt in diesem Jahr, die Abrechnungsziffer „Ähnliche Untersuchungen“ zu streichen. Damit ist die GKV-Vergütung für die Mehrzahl der Untersuchungen, die über die einfache Immunphänotypisierung hinausgehen, künftig ungeklärt. So bleibt am Ende ein Fragezeichen über der Weiterentwicklung dieser innovativen Technik, die ihre medizinischen Potenziale noch längst nicht ausgeschöpft hat.



Dr. med. Thomas Nebe  
Hämatologisches Speziallabor  
am Onkologikum Frankfurt  
thomas.nebe@onkologikum-labor.de

## Größe allein macht noch nicht erfolgreich. Das gilt für viele Branchen, so auch für die Labormedizin.

In der Laborbranche herrschen Überkapazitäten von 20% bis 30%, entstanden nach der Laborreform 1999 durch stetig erweiterte Gerätekapazitäten und Verschiebungen in der Leistungserbringung zwischen den Arztgruppen ambulant und stationär. Das macht eine strukturelle Gesundung der Branche fast unmöglich, wobei unter Gesundung z.B. die Besetzung mittlerer und größerer Krankenhaus-Laborabteilungen mit Kompetenzträgern oder die Verminderung der Quersubvention hausärztlicher Leistungen durch Selbstzuweisung zu verstehen wäre. Der wohnortnahe Zugang zum laborärztlichen Kompetenzträger verschwindet, einfache präanalytische Erfordernisse werden um des Gewinns im Cent-Bereich willen gröblich missachtet, hohe Globalkosten durch zu langen Probentransport werden billiger in Kauf genommen.

Die Mutter aller Probleme ist die überdimensionierte Produktionskapazität. Schon lange krankt die Branche an völlig unrealistischen Absatzzielen, die auf zu optimistischen Erwartungen von Investoren, insbesondere beim Generieren von so genannten IGeL-Neugeschäften, beruhen. Natürlich soll die Ärzteschaft optimistisch in die Zukunft blicken, doch dabei darf die Realität nicht übersehen werden. Konsolidierung und Strukturänderung ist angesagt, nicht das Vorhalten zu hoher Produktionskapazitäten. Mehr noch: Der Wert der Labormedizin könnte steigen, wäre nicht alles immer im Überfluss verfügbar.

Ohne Frage ist der Unterhalt von überflüssigen, weil zu gering ausgelasteten Labors teuer; vor allem Personalkosten können in Zeiten schwacher Nachfrage nicht schnell genug reduziert werden. Um nicht von den Fixkosten erdrückt zu werden, müssen die Laborbetreiber diese auf möglichst viele erbrachte Leistungen umlegen. Dies wirkt sich erheblich auf den Preis für die Leistungen aus.

Die Überkapazitäten hängen direkt mit einem weiteren Problem der Branche zusammen, dem teilweise

absurd anmutendem Streben nach Größe zur Erzielung von Skaleneffekten. Man könnte es auch die Faszination der großen Zahl nennen. Die großen Laboreinheiten flüchten in noch größere Kooperationen, um die Fixkosten ihres kapitalintensiven Geschäfts zu senken. Dies ist zwar verständlich, doch macht schiere Größe allein mit Sicherheit noch nicht erfolgreich.

Durch die Fixierung auf Skaleneffekte und Synergien werden Wettbewerbsfaktoren, die mindestens ebenso wichtig sind, oft vernachlässigt. Dazu gehört das Design der Laborprozesse einschließlich der Präanalytik und Beratungsqualität ebenso wie die kreative Anpassung an die Erfordernisse der Patienten vor Ort und die strukturelle Kooperation über die Sektoren des Gesundheitswesens hinweg. Ergänzt würde dies durch sektorenübergreifende Bildung von Allianzen, beispielsweise der Deutschen Krankenhausgesellschaft und der niedergelassenen Ärzteschaft, zur nachhaltigen Sicherung der Patientenversorgung mit laborärztlichen Leistungen.

Labormedizin hat nicht nur etwas mit Preis, Kosten und Gebührenordnungen zu tun; sie ist wenig sichtbarer und doch integraler Bestandteil der Patientenversorgung und messbarer Fortschrittsträger für Medizin und Gesellschaft. Labormedizin entzieht sich durch die immanente Qualität dem Vorwurf der Zwei-Klassen-Medizin, zumindest wenn die Indikationsstellung in geregelten Bahnen läuft.

## Ist die Malaise heilbar?

Für die Gesundung der Branche müssten also die offenen Stellen im Krankenhausbereich durch Kompetenzträger nachhaltig besetzt und die Überkapazitäten im niedergelassenen Bereich abgebaut werden. Ferner benötigen wir identische Regelungen zur Labor-Kompetenz und zur Indikationsstellung im PKV- wie im GKV-Bereich, und nicht zuletzt müssen die Selbstkosten im Bereich der GKV auf die Basis betriebswirtschaftlich anerkannter Kostenstrukturen gestellt werden. Nur so bleibt die Freiberuflichkeit der Labormedizin nachhaltig erhalten.



Dr. Bernhard Wiegel  
Laborarzt, Deggendorf  
dr.bernhard.wiegel@t-online.de