

IGLD-Jahrestagung 2012 in Essen

Zellanalyse am Scheideweg

Automationssysteme für die Durchflusszytometrie werden immer größer, schneller und komplexer. Parallel dazu zeichnet sich ein neuer Trend zu kleinen, einfach bedienbaren Geräten ab. Bei der IGLD-Jahrestagung 2012 in Essen wurden interessante Neuentwicklungen vorgestellt.

Mit über 600 Teilnehmern verzeichnete die Tagung einen Rekordbesuch. Wesentlichen Anteil am Erfolg hatten die Partnerverbände GFID und INSTAND – und natürlich die für die IGLD typische Mischung aus Wissenschaft und Party (s. S. 60). Diese translationale Tagung vermittelt seit 16 Jahren zwischen Forschung, Labor und Klinik und legt dabei den Schwerpunkt auf zelluläre Diagnostik und Therapie.

Die Durchflusszytometrie war schon immer eines der Leitthemen, denn wie kaum eine andere Technik ist sie ein Indikator der

rasanten Weiterentwicklung im Grenzbereich zwischen Life Sciences und angewandter medizinischer Diagnostik. 2012 war klar zu erkennen: Die Entwicklung geht ab jetzt in zwei verschiedene Richtungen.

Die großen Analysensysteme der Marktführer bieten immer mehr Marker und Farben, höhere Auflösung, verbunden mit teuren Reagenzien und höchsten Ansprüchen an die Datenauswertung. Und da wird die Zeiteinsparung bei der Messung schnell wieder durch den erhöhten Aufwand für die Analyse und Interpretation der Informa-

tionsvielfalt aufgeessen. Zudem halten manuelle Erfassung der Auftragsdaten, manuelle Probenvorbereitungsschritte – vor allem durch Waschvorgänge bedingt – die Zytometrie immer noch in der Ecke des Speziallabors, wo die besten Fachkräfte des Labors gebunden werden.

Intelligente Software

Die Geldeinsparung durch effizientere Datenauswertung ist inzwischen wichtiger geworden als potenzielle Reagenzienrabatte. Daher stehen intelligente



Cytognos: Komplette und innovative Lösungen für die Flowzytometrie

Das Biotech-Unternehmen Cytognos verbindet Reagenzien (neue Fluorochrome und Kits) mit Software-Lösungen (Infinicyt™) für eine schnelle und sichere durchflusszytometrische Analyse.

Von der Analyse der Listmode-Daten zum Ausdruck des Reports

Das Infinicyt™ Softwarepaket unterstützt Anwender bei der multiparametrischen Analyse von durchflusszytometrischen Daten. Für die intuitive Auswertung komplexer Datensätze steht eine Vielzahl innovativer und exklusiver Tools zur Verfügung.

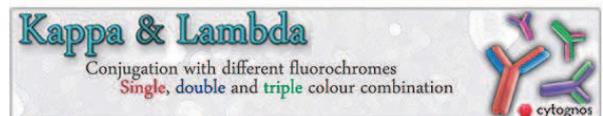
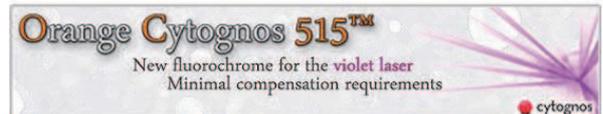
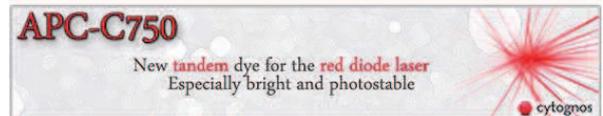
Die wichtigsten Tools auf einen Blick:

- APS: Der Automatische Populations-Separator führt eine automatische n-dimensionale Trennung von Zellen auf der Basis aller Messparameter durch und stellt die Cluster grafisch dar.
- Reference Image: Ein nützliches Tool, um bereits gespeicherte Referenzproben mit der aktuellen Messung zu vergleichen.
- Compass: Ein leistungsfähiges Tool zur Interpretation der Daten, das es dem Benutzer erlaubt, Datenbanken unterschiedlicher, bereits analysierter Referenzfälle bzw. Erkrankungen zu generieren. Der Compass vergleicht sie mit der aktuell bearbeiteten Patientenprobe und gibt Diagnosehinweise aus.

Weitere Informationen sowie Demoversion und Workshop-Termine: www.cytognos.com und www.infinicyt.com

Kontaktinformation

Vertrieb in D: Michael Steinbrecher • Bioleague GmbH & Co. KG • Tel. 04543/8088-422 • info@bioleague.de • support@cytognos.com • www.bioleague.de



Softwarelösungen für die Analyse und Visualisierung zehner- und höherdimensionaler Daten im Vordergrund des Interesses; *Infinicyt*, *GemStone* und *Kaluza* erschließen hier informationstechnisches Neuland (siehe Kästen auf S. 26 und 30-31).

Sebastian Böttcher (Universität Kiel) berichtete aus dem *EuroFlow*-Projekt am Beispiel von Non-Hodgkin-Lymphomen, wie die Messergebnisse durch automatisierte Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*) und Datenbankabgleich mit einer großen Population von Lymphom-Patienten so verdichtet werden können, dass der befundende Arzt auch ohne Informatikkenntnisse eine sehr viel höhere Diagnosesicherheit erreicht. Darüber hinaus sind die Automatisierung der Probenvorbereitung und die bidirektionale Anbindung an die Labor-EDV die wichtigsten Herausforderungen für die Durchflusszytometrie der nächsten Jahre.

Kompromisslose Vereinfachung

Der andere Weg geht zur kompromisslosen Miniaturisierung und Vereinfachung. Das Gerät von *Merck Millipore* ist inklusive Computer nicht mehr größer als eine Bürokaffeemaschine. Dies gelingt durch Wegfall des Hüllstroms, Beschränkung auf die wirklich notwendigen Parameter für eine bestimmte Fragestellung – zum Beispiel Apoptose – und eine dedizierte Auswertesoftware. Auch die Einlernzeit reduziert sich auf diese Weise drastisch.

Noch getoppt wird dieser Miniaturisierungsgrad durch eine vom selben Unternehmen vertriebene Technologie, die die Zellanalyse in einer Transferpipette ermöglicht. Nach dem Ansaugen werden die Zellen direkt in der Einmalspitze über Elektroden mit



Bildquelle: Merck Millipore

dem Coulterverfahren (Impedanzmessung) nach Zahl und Größe beurteilt. Das Ergebnis erscheint auf einem im Pipettengriff integrierten Display. So lassen sich Zellkulturansätze im Handumdrehen vergleichend auswerten (Wachstumskurven, Substanzvergleich). Das mühsame, mit

analytischen Schwankungen behaftete Zählen in der Neubauerkammer unter dem Mikroskop entfällt.

Auch in der Bildanalyse tut sich was: Die komplexen zellulären Fluoreszenzmuster in der Autoimmundiagnostik werden zukünftig digitalisiert und vom Computer objektiv analysiert. Auf der IGLD-Tagung waren Systeme zur Musteranalyse von *Aesku* und *Euroimmun* zu sehen. Sie minimieren das Risiko subjektiver, interindividuell schlecht reproduzierbarer Bewertungen.

Es geht also auch auf dem etablierten Gebiet der Zellanalyse immer weiter. Die nächste Tagung findet übrigens vom 14. bis 17. März 2013 in Dresden statt. 🌸



Dr. med. Carl Thomas Nebe
Onkologikum Kaiserslautern
thomas.nebe@onkologikum-labor.de
Mitglied des Vorstands der IGLD e. V.
www.igld.de



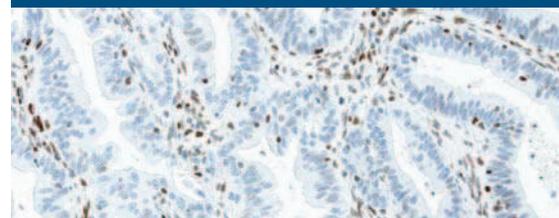
Sehen Sie *optimal*?

Sehen oder nicht Sehen:

Oft bedeutet das den Unterschied zwischen Sein oder nicht Sein. Ventana OptiView sorgt dafür, dass Sie sehen, was mit anderen Detektionssystemen nicht zu sehen ist.

Die Vorteile von OptiView auf einen Blick:

- **Höchste analytische Qualität:**
Beispiellose Klarheit, Tiefe und Intensität
- **Optimierte Diagnose:**
Macht selbst gering exprimierte Antigene sichtbar
- **Ausgeprägte Flexibilität:**
Jeder gewünschte Antikörper lässt sich einstellen
- **Gesteigerte Schnelligkeit:**
Beschleunigte Diagnose



Mit OptiView lässt sich beispielsweise die Abwesenheit von PMS2 Protein auf den Tumorzellen eindeutig nachweisen.

Roche Diagnostics Deutschland GmbH
 Sandhofer Straße 116
 68305 Mannheim
 www.ventanamed.com

VENTANA und OPTIVIEW sind Marken von Roche.
 © 2012 Roche Diagnostics. Alle Rechte vorbehalten.

Fortschritte der Durchflusszytometrie

Komplexe Farbmuster

Seit kurzem können bei der Leukämie- und Lymphomdiagnostik bis zu zehn Oberflächenmarker im Durchflusszytometer parallel analysiert werden. Damit verbessert sich der Nachweis seltener Zellpopulationen; gleichzeitig nimmt die Komplexität der Analytik und Auswertung erheblich zu.

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen, die mit farbstoffmarkierten Antikörpern besetzt sind, als feiner Strahl an einer Laserlichtquelle vorbeigeführt. Dabei lassen sich unterschiedliche Signale auffangen: Das Streulicht gibt Auskunft über Größe und Struktur der Zellen, die Farbsignale der Antikörper repräsentieren vor allem die Expression von Antigenen (Glykoproteinen) auf der Oberfläche der Zellen. Im Computer werden dann Aber-tausende von Informationen verrechnet

und als „Plots“ grafisch dargestellt, so dass sich unterschiedliche Zelltypen als Punktwolken (Cluster) voneinander abgrenzen lassen. Je mehr Signale pro Zelle zur Verfügung stehen, desto feinere Unterscheidungen sind möglich.

Verbesserte Charakterisierung

Vor rund zehn Jahren etablierten sich in der hämatologischen Diagnostik Drei- bis Fünffachfärbungen, seit kurzem hat die gleichzeitige Verwendung von bis zu zehn

Farben Routinetauglichkeit erreicht. Der Einsatz dieser Vielfarben-Durchflusszytometrie erlaubt die genaue Charakterisierung auch kleiner Zellpopulationen aufgrund ihres Oberflächenantigenmusters. Beispielsweise sind damit geringgradige Knochenmarksinfiltrationen durch Lymphome oder minimale Reste von Leukämiezellen nach einer Therapie (MRD = *minimal residual disease*) nachweisbar.

Typischerweise grenzt man mit drei Antigenen („Farben“) eine Zellpopulation



Navios™ – 10-Farb-Durchflusszytometrie in der Routinediagnostik

Effektives Zeitmanagement und die Einhaltung aller regulatorischen Bestimmungen sind die wesentlichen Herausforderungen im durchflusszytometrischen Routinelabor. Beckman Coulter hat mit dem Durchflusszytometer Navios™ das leistungsstärkste System seiner Klasse im Portfolio, das allen Anforderungen moderner Labordiagnostik Rechnung trägt. Die flexible Ausstattung mit bis zu drei Lasern und zehn Fluoreszenzdetektoren setzt neue Maßstäbe in der Analyse komplexer Fragestellungen. Die mögliche Reduktion der Röhrenchenanzahl pro Panel und die damit verbundene Einsparung redundanter Gatingmarker steigert nicht nur die Sensitivität der Diagnostik, sondern erlaubt auch ein effizientes und wirtschaftliches Arbeiten. Besonders zum



Tragen kommt dies in der Leukämie- und Lymphomdiagnostik sowie bei der Analyse kleiner Zellpopulationen.

Das Navios™ Durchflusszytometer ist auch in der 3-Laser-Konfiguration komplett CE-zertifiziert und wird unter GMP-Bedingungen hergestellt. Das serienmäßige Probenkarussell, ein eingebauter Probenmischer und Analysegeschwindigkeiten von bis zu 25.000 Ereignissen pro Sekunde bieten ein Höchstmaß an Automation. Die Nachverfolgbarkeit der Proben gelingt über Barcodes und auf Wunsch erfolgt eine Anbindung an alle gängigen Laborinformationssysteme. Mit dem Navios™ Durchflusszytometer setzt Beckman Coulter konsequent seine Philosophie fort, innovative Technik mit einem Höchstmaß an Bedienkomfort zu vereinen.

Kontaktinformation

Dr. Andreas Böhmeler • Beckman Coulter GmbH • Tel. 02151/333-712 • aboehmler@beckmancoulter.com • www.beckmancoulter.de

gegenüber anderen Zellen ab und charakterisiert sie dann durch den Expressionsstatus von beispielsweise fünf weiteren Antigenen.

Analytische Herausforderung

So wird bei der varianten Form der Haarzelleukämie die Kombination der Antigene CD45, CD19 und CD22 zur Identifizierung der B-lymphatischen Zellen eingesetzt. Mithilfe der exprimierten Antigene CD103 und CD11c und einer fehlenden Expression von CD25 nimmt man dann die Differenzierung gegenüber der klassischen Haarzelleukämie vor, über die Negativität für CD10 und CD5 gelingt die Differenzierung gegenüber anderen reifen B-Zellneoplasien. Schließlich kann über die Expression von Kappa oder Lambda die Leichtkettenrestriktion dieser Erkrankung nachgewiesen werden.

Im Vergleich zur Dreifachfärbung kommt es bei der Zehnfachfärbung durch die überlappenden Emissionsspektren zu umfangreicheren Wechselwirkungen zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen. Deshalb muss man beim Design des Antikörperpanels Antigene, deren Koexpression häufig erwartet wird, mit Fluorochromen konjugieren, für die möglichst wenig Interferenz besteht. Ideal ist die Verwendung fertiger Antikörpergemische. Deren Hersteller gewährleisten die Stabilität der Farbstoffe – und hier insbesondere der Tandemkonjugate. Nach sorgfältiger Kompensationseinstellung wird mithilfe der FMO-Methode (*fluorescence minus one*) für jedes untersuchte Antigen der Bereich der Positivität festgelegt.

Datenauswertung

Große Bedeutung für die Erkennung seltener Zellen kommt der *Gating*-Strategie zu. Dabei ist eine leistungsstarke und benutzerfreundliche Analyse-Software unerlässlich, die eine geradlinige und

standardisierte Auswertung der Analysedaten und deren Transfer in ein Laborinformationssystem ermöglicht.

Die Auswertung von Zehnfachfärbungen fällt naturgemäß umfangreicher aus als die der Dreifachfärbung. Für den Computer ist die Verarbeitung von „mehrdimensionalen Datenräumen“ kein Problem, doch zur Darstellung für das menschliche Auge stehen auf dem Bildschirm oder Befundausdruck nur zwei Dimensionen zur Verfügung. Deshalb werden die verschiedenen Streulicht- und Fluoreszenzsignale bislang paarweise in Plots aufgetragen. Je größer die Anzahl der Antigene und damit Farben, desto mehr Zweifachkombinationen ergeben sich. Hier ist die Bioinformatik gefordert, neue anschauliche Darstellungsformen zu finden, die es dem befundenden Arzt erlauben, das Wesentliche der jeweiligen Krankheit zu erkennen.

Ausblick

Die heute verfügbaren Zehnfachfärbungen stellen einen großen Fortschritt zur Steigerung der diagnostischen Qualität bei gleichzeitig rationellerem Ressourceneinsatz dar (weniger Ansätze bei höherer Anzahl von Antigenen). Es ist absehbar, dass sich die Zahl simultan detektierbarer Fluoreszenzfarbstoffe in der nächsten Zytometergeneration weiter erhöhen wird. So bleibt die Komplexität sowohl der Messtechnik als auch der Datenauswertung die entscheidende Herausforderung in diesem Jahrzehnt. 🌸



Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Kern

MLL Münchner Leukämielabor GmbH

wolfgang.kern@mll.com

Ventana Gesamtkonzept für Ihr Labor

Qualität, Effizienz
und Sicherheit!



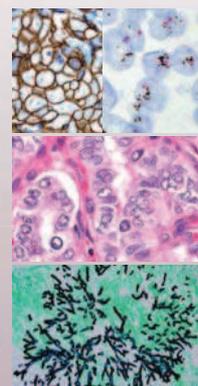
Workflow
VANTAGE

H & E
SYMPHONY

Spezialfärbung
NexES Spezialfärber

IHC/ISH
BenchMark Serie

Digitale Pathologie
**iScan Coreo Au
Virtuoso**



Innovation für die Gesundheit

Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim

mannheim.gewebediagnostik@roche.com

VENTANA, VANTAGE, SYMPHONY, NEXES, BENCHMARK,
ISCAN COREO AU und VIRTUOSO sind Marken von Roche.
© 2011 Roche Diagnostics. Alle Rechte vorbehalten.

www.ventanamed.com