

B - 6 DURCHFLUSSZYTOMETRIE**Bernhard Thiele****B - 6.1 Kreuzprobe (FCXM)****B - 6.1.1 Einleitung**

Der komplementabhängige Mikrolymphozytotoxizitätstest (CDC, "NIH-Methode") gilt noch immer als Standard für die Spender-Empfänger-Verträglichkeitstestung (Crossmatch). Er erfaßt jedoch keine nicht-komplementaktivierenden Antikörper (wie z.B. IgG₂, IgG₄) und kann zudem durch schlechte Qualität der Donorzellen beeinflusst werden. Die erforderliche Unterscheidung zwischen reaktiven Antikörpern der Klassen IgG oder IgM erfolgt indirekt über reduzierende Reaktionsbedingungen mittels Dithiothreitol (DTT).

Im Unterschied hierzu ermöglicht das durchflusszytometrische Crossmatch nach Markierung mit anti-Humanglobulinen (FCXM-AHG), anti-CD3 und Propidiumiodid prinzipiell den sicheren Ausschluß von Granulozyten, Monozyten und avitalen Lymphozyten aus der Analyse sowie simultan eine Aussage zur Targetspezifität (B- und/oder T-Lymphozyten) möglicher Antikörper. Die analytische Unterscheidung von B- und T-Zellen muß zudem mit dem Ziel der Differenzierbarkeit zellgebundener alloreaktiver Antikörper von membranständigen Immunglobulinen (sIg) der B-Zellen erfolgen.

Der FCXM-AHG gilt als weitgehend invariabel in Bezug auf die Qualität der Spenderzellen. Sowohl die analytische wie auch die diagnostische Sensitivität des FCXM-AHG übertreffen deutlich die des CDC- XM. Dies ist von unmittelbarer Konsequenz, da die Quantität der Bindung allogener Antikörper nicht notwendigerweise mit der Akuität oder Schwere einer Rejektion korreliert. Eine mögliche klinische Bedeutung kommt darüber hinaus dem Nachweis nicht-komplementaktivierender Antikörper zu.

B - 6.1.2 Nachweisprinzipien

Der Nachweis zytophiler Antikörper im zytofluorometrischen Crossmatch (FCXM) erfolgt zumeist in der indirekten Immunfluoreszenz nach Inkubation von Spenderlymphozyten (PBL, Milz, LK) mit Empfängerserum und anschließender Quantifizierung der Zellbindung fluorochrom-markierter anti-IgG und anti-IgM Sekundärantikörper (AHG: Anti-Humanglobulin-Methode). Ausschließlich diese Methode wird nachfolgend behandelt.

Für durchflusszytometrische Antikörper-Screeninguntersuchungen zur Bestimmung der Panelreaktivität wird nach dem gleichen Detektionsprinzip ein ausgewähltes Panel von Lymphozyten als Targetzellen verwendet. Dieses Verfahren hat sich jedoch in europäischen Labors nicht durchgesetzt.

Andere Varianten des durchflusszytometrischen Crossmatch (FCXM) basieren auf dem Nachweis komplementvermittelter Zytotoxizität nach Inkubation von Spenderlymphozyten mit Empfängerserum und (Kaninchen-)Komplement und anschließender Detektion mit Propidiumiodid. Auch dieses Verfahren hat sich hauptsächlich wegen seiner Störanfälligkeit und der Abhängigkeit von der Vitalität der Spenderzellen nicht durchsetzen können.

B - 6.1.3 Material und Methoden

B - 6.1.3.1 Material

- Zentrifugenröhrchen 6 x 50 mm, Pipetten
- Positives Kontrollserum (anti-Bw4/anti-Bw6-Mix)
- Negatives Kontrollserum (Poolserum aus >10, i.d.R. männlichen, AB Rhesus-positiven Spendern, Seren zuvor einzeln geprüft)
- anti-CD3-FITC (oder -PE)
- anti-CD19-FITC (oder-PE)
- anti-human-IgG-PE (oder -FITC)
- anti-human-IgM-PE (oder -FITC)
- RPMI 1640
- PBS/5% BSA pH 7,4
- Propidiumiodidlösung (0,2 µg/ml in PBS)
- 1% Paraformaldehyd/PBS

B - 6.1.3.2 Apparative Voraussetzungen

- Zentrifuge
- Zählkammer, Partikelzählgerät oder Hämatozytometer
- Durchflusszytometer mit zwei Streulicht- und mindestens drei Fluoreszenzdetektoren

B - 6.1.3.3 Durchführung

- 1) Spender-Lymphozyten über Ficoll-Dichtegradienten isolieren und 2 x in RPMI bei 500g waschen. Je nach Fragestellung ist die Verwendung kryokonservierter Zellen oder aus Milz oder Lymphknoten präparierter Lymphozyten möglich.
- 2) Zellsuspension auf 5.000-10.000 Zellen/µl einstellen
- 3) Seren vorbereiten:
 - pos. Kontrollserum
 - neg. Kontrollserum
 - Testserum
- 4) je 50 µl Zellsuspension ($0,25-0,5 \times 10^6$ Zellen) mit 50 µl Serum (in 6 x 50 mm Zentrifugenröhrchen) mischen und 30 min bei RT inkubieren

- 5) 3 x 10 min mit je 4 ml PBS/BSA bei 500g zentrifugieren
- 6) anschließend Überstand absaugen, ggf. Pellet mit Filterpapierspitze trocknen
- 7) Zellpellet gründlich resuspendieren
- 8) Antikörperlösung vorbereiten:
pro Ansatz (100µl Gesamtvolumen):
 - 100 µl PBS
 - 5 µl anti-CD3-FITC
 - 1 µl F(ab)₂ anti-human-IgG Ak-PE bzw. F(ab)₂ anti-human-IgM
 - 10 µl Propidiumiodid (0,2 µg/ml)

Anmerkung: Die zu wählende endgültige Ak-Konzentration ist u.a. abhängig von Hersteller und Charge, sowie von der Sensitivität des Durchflusszytometers. Sie muß anhand von Verdünnungsreihen von Negativ- und Positivkontrollen im Ergebnis von Schachbretttitrationen nach dem Kriterium einer größtmöglichen Intensitätsdifferenz von Positiv- und Negativkontrolle ermittelt werden. Weiterhin kann die Wahl der Fluorochrome auch umgekehrt zu dem hier angegebenen Beispiel erfolgen. Bei Durchflusszytometern mit Eignung für Vierfarbfluoreszenz empfiehlt sich die Kombination anti-Ig/ anti-CD3/ anti-CD19/PI.

- 9) Je 100 µl der Antikörperlösung zum Zellpellet pipettieren, resuspendieren und 30 min im Dunkeln inkubieren
- 10) Zellen 2 x 10 min mit PBS bei 500g waschen
- 11) Anschließend Überstand dekantieren und Zellpellet resuspendieren
- 12) Pro Ansatz je nach Gerätecharakteristik des Durchflusszytometers 200-500 µl PBS/1% Paraformaldehyd zugeben und Zellen resuspendieren
- 13) Datenaufnahme mit geräteüblicher Einstellung im engen Lymphozytengate und Dreifarbfluoreszenz bei entsprechender Kompensation und unter Ausschluss von Ereignissen mit hoher Intensität in FL3 (avitale Zellen).
- 14) Postakquisitorische Datenanalyse im Fluoreszenzhistogramm anti-CD3 vs. anti-Ig:
- 15) Bei getrennter Bewertung von B- und T-Zellen zählt ein Shift von > 10 Kanälen (Differenz der mittleren Fluoreszenzkanäle von Negativkontrolle und Patientenprobe) als positiv. Besser ist für den Vergleich der Fluoreszenzverteilungen der Kolmogoroff-Smirnoff-Test geeignet, der neben Unterschieden im arithmetischen Mittel auch Unterschiede der Verteilungsform erfaßt. Zu beachten ist ferner, daß B-Zellen Oberflächen-Immunglobuline exprimieren, die bereits in der Negativkontrolle ein deutliches Fluoreszenzsignal liefern. Hier kann nur die Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität bewertet werden.
- 16) Auch wenn der angegebene Versuchsansatz keinen Spezifitätsnachweis liefert, besteht bei einem positiven T-Zell-Signal der Verdacht auf anti-HLA-Klasse I- Antikörper. (Im Fall des Vorliegens von anti-Klasse I-Antikörpern reagieren auch B-Zellen mit einer

Fluoreszenzzunahme). Die ausschließliche Antikörperbindung auf B-Zellen legt den Verdacht auf anti-HLA-Klasse II-Antikörper nahe, deren prädiktive Wertigkeit an dieser Stelle nicht beurteilt werden soll.

- 17) Mit Partikeln für quantitative Fluoreszenzstandardisierung lassen sich zudem zellgebundene Immunglobuline als Zahl gebundener Moleküle pro Zelle schätzen.

B - 6.1.4 Fehlerquellen und Problemlösung

Für die Qualität des FCXM-AHG spielt der Sekundärantikörper eine entscheidende Rolle. Um eine mögliche Fc-Rezeptorbindung (NK-Zellen, aktivierte T-Zellen) als Ursache falsch positiver Ergebnisse zu umgehen, sollten F(ab')₂ oder Fab-Fragmente verwendet werden. Der Sekundärantikörper muß bei hoher Markierungsintensität (hohe Affinität, hohe Protein zu Fluorochrom-Ratio) eine niedrige Hintergrundbindung sowie eine hohe Bindungsspezifität aufweisen. Kreuzreaktionen mit Zelloberflächenproteinen und insbesondere mit Maus-Immunglobulin sind auszuschließen.

Die optimalen Konzentrationen von Patientenserum und Sekundärantikörpern müssen aufeinander abgestimmt und chargenweise im Ergebnis von Schachbretttitrationen ermittelt werden. Das meßtechnische Optimum liegt in der Nähe der größtmöglichen Differenz der Fluoreszenzintensitäten von Positiv- und Negativkontrolle.

Kritisch für die Sensitivität des Ansatzes sind die Zellkonzentration (um 1×10^6 /ml) und die eingesetzte Zellzahl ($1-5 \times 10^5$) je Röhrchen. So kann eine höhere Zellzahl als im Vergleichsansatz die Sensitivität für den Alloantikörpernachweis signifikant senken und falsch negative Ergebnisse verursachen.

Die Analyse der möglichen anti-HLA Klasse I-Antikörper erfolgt günstigerweise an mit anti-CD3 markierten T-Zellen. Auf diese Weise lassen sich Interferenzen von Immunglobulinen mit Fc-Rezeptoren (CD16) der NK Zellen vermeiden. Es gibt keinen Sekundärantikörper, der zwischen spezifischer und Fc-Rezeptor-vermittelter Bindung eines Immunglobulins unterscheiden kann.

Neben den aufgeführten Faktoren ist die Wahl der Kontrollansätze für die Konsistenz und Plausibilität des Meßergebnisses maßgebend. Für die Negativkontrollen wird üblicherweise gepooltes Serum gesunder Spender verwendet. Frauen sind hierfür als Serumspender wegen möglicher Alloantikörper nach Schwangerschaften potentiell weniger geeignet als Männer.

Als universelle Positivkontrolle für anti-Klasse I-Antikörper läßt sich ein Gemisch aus anti-Bw4/antiBw6 Seren in angemessener Verdünnung einsetzen. Diese sollte so hoch gewählt werden, daß die Meßkalibration auch schwach positive Antikörpertiter berücksichtigt.

Kälteantikörper oder andere autoreaktive Antikörper, die meist der Immunglobulinklasse M angehören, müssen durch spezifische anti-IgG und anti-IgM Konjugate von anti-HLA Antikörpern der Klasse IgG unterschieden werden. Dies ist für breitreaktive anti-Ig Konjugate nicht möglich.

B - 6.1.5 Indikationen und Einsatzgebiete

- Antikörpernachweis im Screening: nur ausnahmsweise als durchflusszytometrisches Verfahren (sehr zeitaufwendig)
- Crossmatch unmittelbar vor Transplantation zusätzlich zum CDC-NIH-Test
- Crossmatch mit konservierten Spenderlymphozyten nach Transplantation zur adjuvanten Rejektionsdiagnostik (bei gegebener Panelreaktivität)

Im Crossmatch unmittelbar vor Transplantation und der Ergänzung des CDC-Tests besteht die Hauptindikation des FCXM. Der besondere Wert des FCXM liegt dabei in der wesentlich höheren Empfindlichkeit, der größeren Unabhängigkeit von der Qualität der Spenderzellen, dem direkten Nachweis der gebundenen Immunglobulinklasse (IgG und/oder IgM), der Nachweisbarkeit von Antikörpern ohne Komplementbindungsaktivität sowie der besseren Quantifizierbarkeit der Antikörperbindung. Der Hauptnachteil des FCXM ist der wegen seiner hohen Sensitivität etwas niedrigere positive prädiktive Wert im Vergleich zum CDC-NIH-Test.

B - 6.1.6 Literatur

1. Berteli AJ, Daniel V, Pomer S, Opelz G: Clinical relevance of pretransplant flow cytometric crossmatches with T and B lymphocytes in kidney transplantation. *Transplant Proc* 22(4): 1895-6, 1990
2. Chen M, Wade J, Levy GA, Greig PD: Effect of HLA matching and T- and B-cell crossmatch on acute rejection and graft survival following liver transplantation. *Transplant Proc* 26(5): 2695-6, 1994
3. Christiaans M, Van den Berg-Loonen E, Ten Haaf A, Nieman F, Van Hooff J: Effect of flow cytometry, complement-dependent cytotoxicity, and auto crossmatch on cadaveric renal transplant outcome. *Transplant Proc* 27(1): 1028-30, 1995
4. Cook DJ, Klingman LL, Koo AP, Goldfarb D, Dennis VW, Hodge EE: Quantitative flow cytometry cross-matching for precise measurement of donor-specific alloreactivity. *Transplant Proc* 26(5): 2866-7, 1994
5. Lazda VA, Pollak R, Mozes MF, Jonasson O: The relationship between flow cytometer crossmatch results and subsequent rejection episodes in cadaver renal allograft recipients. *Transplantation* 45(3):562-5, 1988
6. Mascaretti L, Sioli V, Puglisi G, Rossini G, Trezzi D, Scarpino C, Scalapogna M, Sirchia G: Pretransplant flow cytometry crossmatch in first cadaveric kidney transplants. *Transplant Proc* 27(1): 668-70, 1995
7. Ogura K, Koyama H, Takemoto S, Chia J, Johnson C, Terasaki PI: Flow cytometry crossmatching for kidney transplantation. *Transplant Proc* 25(1): 245-6, 1993
8. Ogura K, Terasaki PI, Johnson C, Mendez R, Rosenthal JT, Ettenger R, Martin DC, Daiko E, Cohen L, Mackett T et al.: The significance of a positive flow cytometry crossmatch test in primary kidney transplantation. *Transplantation* 56(2): 294-8, 1993
9. Ogura K, Terasaki PI, Koyama H, Chia J, Imagawa DK, Busuttil RW: High one-month liver graft failure rates in flow cytometry crossmatch-positive recipients. *Clinical Transplantation* 8(2 Pt 1): 111-5, 1994
10. Scornik JC, Brunson ME, Schaub B, Howard RJ, Pfaff WW: The crossmatch in renal transplantation. Evaluation of flow cytometry as a replacement for standard cytotoxicity. *Transplantation* 57(4): 621-5, 1994
11. Talbot D: Flow cytometric crossmatching in human organ transplantation. [Review] *Transplant Immunology* 2(2): 138-9, 1994
12. Wahlberg J, Bengtsson M, Bergström C, Gannedahl G, Festin R, Lewen G, Frödin L: Impact of flow cytometry crossmatching results on the outcome of cadaveric kidney transplantation. *Transplant Proc* 26(3): 1752-3, 1994

B - 6.2 HLA-B27, -DR4 und -DR4-Subtypen**B - 6.2.1 Einleitung**

Durchflusszytometrische Bestimmungen einzelner HLA-Antigen können eine Alternative zum Antigennachweis im komplementabhängigen Zytotoxizitätstest sein. Dies ist besonders dann der Fall, wenn im Rahmen von Screeninguntersuchungen in längeren Testserien eines oder wenige gesuchte HLA-Antigene nachgewiesen werden sollen. Wegen des methodischen Aufwandes und prinzipieller Schwierigkeiten (es müssten zahlreiche verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Affinitäten, Kreuzreaktionen und F/P-Ratios eingesetzt werden) eignet sich die Durchflusszytometrie jedoch nicht für Typisierungszwecke. Einen nennenswerten Stellenwert hat der durchflusszytometrische HLA-Antigennachweis bisher nur im Fall der Antigene B27 und DR4 erlangt.

B - 6.2.2 Prinzip

Durchflusszytometrische Nachweise einzelner HLA-Antigene beruhen auf der direkten Immunfluoreszenz, wobei mögliche Kreuzreaktionen (z.B. B7 x B27) über die Bewertung von Intensitätsunterschieden erkannt werden sollen. Über Zweitmarkierungen wie anti-CD45 oder anti-CD3 kann die zu bewertende Lymphozytenpopulation näher definiert werden.

B - 6.2.3 Apparative Voraussetzungen und Material**B - 6.2.3.1 Material**

- Röhrchen, Pipetten
- 1% Paraformaldehyd/PBS
- Lysereagenzien oder Dichtegradientenmedium
- Typisierte Blutproben als Positiv- und Negativkontrolle
- Quantitative Fluoreszenzstandards (Eichbeads)

B - 6.2.3.2 Apparative Voraussetzungen

- Zentrifuge
- Durchflusszytometer mit zwei Streulicht- und mindestens zwei Fluoreszenzdetektoren

B - 6.2.4 Durchführung**Beispiel für HLA-B27**

- 1) 100 µl EDTA-Blut mit 2 µl Antikörperkonjugat (je nach Herstellerangaben) mischen und 10-30 min bei RT im Dunkeln inkubieren
- 2) Vollblutlyse (je nach Hersteller wash- oder no-wash Lyse)
- 3) Zellen in Paraformaldehyd resuspendieren

- 4) Datenaufnahme mit geräteüblicher Einstellung im engen Lymphozytengate und im Monozytengate. Zur Quantifizierung der Fluoreszenz und Eichung (Benchmark) empfiehlt sich das Mitführen von fluoreszierenden Beads definierter Intensität. Die zweite Fluoreszenz kann mit anti-CD45 oder anderen Markern belegt sein, die eine exakte Bestimmung der zu untersuchenden Population erlauben.
- 5) Datenanalyse im eindimensionalen Fluoreszenzhistogramm, Bestimmung des arithmetischen Mittels der Fluoreszenz (Mean Channel, MC) und Zuordnung der Probe als "positiv", "Grauzone" oder "negativ" entsprechend der Lage des Mean Channel (MC) zur Referenzgrenze (Cutoff). Dabei gelten für Monozyten und Lymphozyten separate Grenzwerte.

Für den Nachweis von DR-Merkmalen (zB. DRB1*0401 oder DRB1*0404) erfolgt die Datenanalyse an B-Zellen aus dem engen Lymphozytengate unter Ausschluß anti-CD3-markierter T-Zellen.

B - 6.2.5 Fehlerquellen und Problemlösung

Wegen signifikanter Kreuzreaktionen zwischen HLA-B7 und HLA-B27 ergibt sich eine breite Zone für die Lage des erhaltenen Fluoreszenzmittels, innerhalb der sichere Zuordnung als "positiv" oder "negativ" nicht möglich oder mit Unsicherheit behaftet ist. In diesen nicht entscheidbaren Fällen muß eine Bestimmung im Lymphotoxizitätstest erfolgen. Zudem reagieren monoklonale anti-B27 Antiseren sehr unterschiedlich mit verschiedenen B27-Varianten, was die Abgrenzung von möglichen B7⁺/B27⁻ oder B7⁺/B7⁺ -Konstellationen erschwert.

B - 6.2.6 Indikationen und Einsatzgebiete

Nachweis krankheitsassoziierter HLA-Antigene (meistens in der Diagnostik des rheumatischen Formenkreises)

- HLA B27
- DR4 oder DR4-Subtypen

B - 6.2.7 Literatur

1. Drover S, Codner D, Qi C, Marshall W.H.: Monoclonal antibodies with T-cell like specificities that differentiate DRB1*0401 from all other DR4 specificities. Human Immunol. 34 (Suppl. 1): 10, 1992
2. Eastman PJ, Baier KA, Bryan CF: HLA-B27 typing. A comparative evaluation between the standard NIH method and flow cytometry. Ann N Y Acad Sci 677: 402-3, 1993
3. Fizet D, Hitte C, Ferrer AM, Vezon G: Identification of HLA B27 antigen by flow cytometry. Ann Biol Clin (Paris) 47: 408-11, 1989
4. Janssen WC, Rouwen JA, Hoffmann JJ: Improved flow cytometric method for HLA-B27 typing. Ann Clin Biochem 29 (Pt 6): 663-7, 1992