

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Universitätsmedizin Rostock
Direktor : Prof. Dr. med. Peter Schuff-Werner

**"Vergleichende Untersuchung zur Validität durchflusszytometrisch mit
hämatologischen Analyseautomaten differenzierter Blutbilder unter Nutzung
der computergestützten Mikroskopie"**

Inauguraldissertation

Zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Julia Dörre, geb. am 14.01.1984 in Ueckermünde
aus Düsseldorf

Rostock, 2012

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr.med. Schuff-Werner

2. Gutachter: Prof. Dr.med. Junghans

3. Gutachter: PD Dr.med. Fiedler

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20.02.2013

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	
Tabellenverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
1 Einleitung	1
1.1 Das „Blutbild“ aus historischer und heutiger Sicht	1
1.2 Entwicklung der Technologie zur Erstellung eines „Apparativen Differenzial-Blutbildes“ und erste Ansätze zur „automatisierten“ mikroskopischen Blutbild-Differenzierung	4
1.2.1 Die Impedanzmessung	4
1.2.2 Laserlichtstreuung und Fluoreszenz	5
1.3 Digitalisierte automatische Mikroskopie („Pattern Recognition“ und Diffmaster Octavia)	8
1.4 Gegenwärtiger Stand der apparativen Blutbilddifferenzierung	12
1.5 Die diagnostische Bedeutung des Differenzialblutbildes	14
1.6 Ziel und Fragestellung der Arbeit	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Beschreibung der hämatologischen Analysesysteme mit denen im Rahmen der Untersuchung apparative Differenzialblutbilder erstellt wurden	16
2.1.1 Hämatologiesystem Sysmex XE-2100	16
2.1.2 Hämatologiesystem Coulter LH 750	20
2.1.3 Hämatologiesystem CELL-DYN Sapphire	23
2.2 Patienten und Durchführung der Untersuchung	26
2.3 Mikroskopische Differenzierung	26
2.4 Statistik	28
3 Ergebnisse	31
3.1 Vergleichende Validierung von Parametern des Kleinen Blutbildes (Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl)	31

3.2	Vergleichende Validierung von Differenzialblutbildern, die mittels apparativer hämatologischer Analysesysteme erstellt wurden	33
3.2.1	Vergleich von selektierten Differenzialblutbildern aus der Laborroutineanforderung	34
3.2.1.1	Neutrophilendifferenzierung	34
3.2.1.2	Lymphozytendifferenzierung	34
3.2.1.3	Monozytendifferenzierung	35
3.2.1.4	Eosinophilendifferenzierung	36
3.2.1.5	Basophilendifferenzierung	37
3.3	Beschreibung von Blutbildern, die im Rahmen der Untersuchung durch Abweichungen aufgefallen sind	38
3.4	Auswertung morphologischer Warnhinweise	49
4	Diskussion	53
4.1	Übereinstimmungen der an den verschiedenen Geräten ermittelten Parameter des Kleinen Blutbildes	53
4.2	Übereinstimmungen der an den verschiedenen Geräten ermittelten Parameter des Differenzialblutbildes	54
4.2.1	Vergleich der apparativen Differenzierung mit der computergestützten mikroskopischen Differenzierung	56
4.2.1.1	Differenzierung neutrophiler Granulozyten	56
4.2.1.2	Differenzierung von Lymphozyten	60
4.2.1.3	Differenzierung von Monozyten	65
4.2.1.4	Differenzierung von eosinophilen Granulozyten	66
4.2.1.5	Differenzierung von basophilen Granulozyten	67
4.3	Möglichkeiten und Grenzen der computerassistierte Mikroskopie (Diffmaster ^R)	68
4.4	Verweigerung der Erstellung von Differenzialblutbildern durch automatische Analysesysteme	70
4.5	Sensitivität und Spezifität morphologischer Warnhinweise von hämatologischen Differenzierungsautomaten	73
4.5.1	Sensitivität und Spezifität der morphologischen Warnhinweise	76
4.5.1.1	Blasten/ abnorme Lymphozyten	76

4.5.1.2 Unreife Granulozyten/ Linksverschiebung 77

5 **Zusammenfassung** 80

6 **Literaturverzeichnis** 82

Anhang

Thesenblatt

Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Danksagung

Abbildungsverzeichnis

- | | | |
|---|---|----|
| 1 | Darstellung der Impedanzmessung nach dem Coulter-Prinzip (modifiziert nach Longanbach et al., 2007) | 5 |
| 2 | Darstellung der vier Lichtsignale, die durch das Auftreffen eines Laserstrahls auf eine Zelle entstehen können (modifiziert nach Longanbach et al., 2007) | 6 |
| 3 | Bildschirmpräsentation eines mikroskopischen Befundes, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde | 11 |
| 4 | Darstellung der Leukozytenpopulationen als Scattergramm (Ruzicka et al., 2001) | 20 |
| 5 | Leukozytenanalyse durch das Coulter-Beckman Hämatologiesystem LH750 | 22 |
| 6 | Scattergramm einer Leukozytendifferenzierung mit Hilfe des CELLDYN Sapphire | 24 |
| 7 | Differenzierte Leukozytendarstellung durch das hämatologische Analysesystem CELLDYN Sapphire als Scattergramm (A), als Histogramm (B) mit Darstellung der relativen Anzahl der Ereignisse (y-Achse) gegen ihre Größe (x-Achse) und als Konturliniendarstellung (C) (CELL-DYN Sapphire 2005) | 25 |
| 8 | Darstellung der Vergleiche zwischen Leukozytenzahlen, die mit den durchflußzytometrischen Analysesystemen ermittelt wurden | 32 |
| 9 | Darstellung der Vergleichsmessungen von Monozytenanteilen, die mit den zytometrischen Analysesystemen (Sysmex XE 2100, Sapphire Cell Dyn, Coulter LH 750) und mikroskopisch | |

	ermittelt wurden	36
10	Darstellung der Vergleichsmessungen von Erythrozytenanteilen, die mit den zytometrischen Analysesystemen (Sysmex XE 2100, Sapphire Cell Dyn, Coulter LH 750) und mikroskopisch ermittelt wurden	37
11	Darstellung von einer Auswahl an Zellfragmenten, die durch den mechanischen Ausstreichvorgang entstanden sind und somit zur Zelldifferenzierung nicht mehr zur Verfügung stehen	38
12	Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 11, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde	39
13	Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 14, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde	40
14	Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 16, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde	41
15	Darstellung zweier Riesenthrombozyten durch die Cellavision-Software	43
16	Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 52, die mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurden	44
17	Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 124, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde	46
18	Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 139, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde	47
19	Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 232, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde	48

20	Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 368, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde	49
21	Bildschirmpräsentation mit der Darstellung der segmentkernigen Neutrophilen und Monozyten Probe 52	58
22	Bildschirmpräsentation mit der Darstellung der segmentkernigen Neutrophilen und Monozyten Probe 368	58
23	Bildschirmpräsentation eines Blutbildes mit der Diagnose einer infektiösen Mononukleose	63
24	Bildschirmpräsentation eines Blutbildes bei einem Patienten mit der Diagnose eines Plasmozytoms	71
25	Bildschirmpräsentation eines Blutbildes bei einem Patienten mit der Diagnose einer cMML, CML	72

Tabellenverzeichnis

1	Vom rechnergestützten automatisierten und mechanisierten Mikroskopiersystem (Diffmaster Octavia) zur Klassifizierung vorgeschlagene Einordnung der im Ausstrich gefundenen reifen Leukozyten und ihrer Vorstufen sowie anderer kernhaltiger Zellen und Artefakte	10
2	Zusammenstellung der morphologischen Warnhinweise des Sysmex XE-2100 Gerätes („Qualitative Flags“)	18
3	Darstellung der quantitativen Warnhinweise beim Sysmex XE-2100 gemäß den Referenzintervallen für das Differentialblutbild des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Rostock	19
4	Morphologische Warnhinweise des Coulter LH 750	22
5	Morphologische Warnhinweise des CELL-DYN Sapphire	25
6	Referenzwertintervalle für das Differentialblutbild erwachsener Patienten	28
7	Zusammenfassung der einzelnen Korrelationskoeffizienten nach Passing Bablok für die mit unterschiedlichen Analysesystemen bestimmten Parameter des Kleinen Blutbildes	32
8	Darstellung der Warnhinweise des Coulter LH 750, Sapphire Cell Dyn und Sysmex XE2100	50
9	Darstellung der Sensitivität, Spezifität und Effizienz morphologischer Warnhinweise	51

10 Prozentuale Verteilung des weißen Blutbildes mit abweichender Verteilung im Bereich der Monozyten und Neutrophilen

58

Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
BAND	stabkernige neutrophile Granulozyten
Baso	basophile Granulozyten
CD	Cluster of Differentiation (Unterscheidungsgruppen)
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
DF	Diskriminierungsfunktion
DIFF	Differentialblutbild
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eo	Eosinophile Granulozyten
Ery	Erythrozyten
Fa.	Familie
FISH	Fluorescence in situ Hybridization
fl	Femtoliter
FN	falsch negativ
FP	falsch positiv
g	Gramm
Gran	Granulozyten
IG	Immature Granulocytes (unreife Granulozyten)
IgM	Immunglobulin M
IMI	Immature Myeloid Information (Information über unreife granulozytäre Vorstufen)
l	Liter
Ly	Lymphozyten
MCH	Mittlerer Hämoglobin-Gehalt eines einzelnen Erythrozyten in pg/Zelle
MCHC	Mittlere Hämoglobin-Konzentration eines einzelnen Erythrozyten in g/dl
MCV	Mittleres Volumen eines einzelnen Erythrozyten in fl
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mono	Monozyten

Neu	Neutrophile Grnauulozyten
nm	Nanometer
NRBC	Nucleated Red Blood Cells (erythrozytäre Vorstufen)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Picogramm
r	Korrelationskoeffizient
RBC	Red Blood Cells (rote Blutkörperchen)
RF/DC	Meßprinzip: Gleichstrom mit überlagerter Hochfrequenz
RN	richtig negativ
RP	richtig positiv
SFL	Fluoreszenzintensität
SLS	Sodium Larylsulfat
SSC	Seitwärtslichtstreuung
VARLYM	Atypische Lymphozyten
VCS	Volumen-Konduktivität-Laserlichtstreuung
WBC	White Blood Cells (Leukozyten)

1 Einleitung

1.1. Das „Blutbild“ aus historischer und heutiger Sicht

Soweit historisch überliefert ist, konstruierten Hans Jansen und sein Sohn im 16. Jahrhundert das erste Mikroskop (Gerlach, 1939), womit der Grundstein für die morphologische Untersuchung von Blutzellen und ihre Differenzierung gelegt wurde. Wer aber letztlich das Mikroskop als methodisches Prinzip wirklich erfunden hat, ist bis heute nicht sicher bekannt, da schon im 13. Jahrhundert Sammellinsen als Sehhilfe beschrieben worden waren. Girolamo Fracastoro berichtete Anfang des 16. Jahrhunderts, dass man „Gegenstände größer und näher erkennen kann, wenn man sie durch zwei miteinander verbundene Gläser betrachtet“ (Piersing, 2009); auf diese Beobachtung ließe sich die weitere Entwicklung des Mikroskops durchaus zurückführen.

Die erste Untersuchung menschlicher Blutzellen liegt über 300 Jahre zurück und geht auf Untersuchungen zurück, die Antony van Leeuwenhoek an seinem eigenen Blut 1674 durchführte (Leeuwenhook, 1674). Im Rahmen einer Erkrankung beschrieb er erstmalig morphologische Abweichungen bei Blutzellen. Etliche Jahre später, etwa um 1700, gelang es ihm, die Zahl der Erythrozyten im menschlichen Blut zu berechnen (Seeger und Poppy, 1991).

Weitere Einblicke in die Pathophysiologie der roten Blutkörperchen und der Blutgerinnung mittels physikalisch chemischer Blutuntersuchungen erlaubten Untersuchungen, die Boyle (1684) durchführte. Seine Untersuchungen fasste er in einer ersten Monographie des Blutes zusammen. Später führten Jurin (1717) und Hewson (1773, 1775) diese Untersuchungen fort (Autenrieth, 1974). Dabei beschäftigte sich Jurin vornehmlich mit dem Aussehen des Blutes im rechten Herzen und der Lunge im Vergleich zum Blut in den peripheren Gefäßen sowie der Gerinnbarkeit und Gewichtsveränderung des Blutes außerhalb des Körpers (Prochaska, 1820)

Carl Zeiss und Ernst Abbe gelang es, im Laufe des 19. Jahrhunderts das Mik-

roskop technisch entscheidend zu verbessern. Mit den höher auflösenden und damit qualitativ eindeutig leistungsfähigeren Mikroskopen konnten die weißen Blutzellen und ihre Veränderungen bei verschiedenen Erkrankungen erstmals morphologisch beschrieben werden (Abbe, 1906, Gerlach, 1998). Allerdings war die damalige Welt der Blutzellen sozusagen „farblos“. Mit der Entwicklung von Methoden zur Anfärbung der Zellen mit Hilfe von Anilinfarbstoffen kam der eigentliche Durchbruch für die Differenzierung von Leukozyten. Diese Entwicklung ist Paul Ehrlich zu verdanken, der mit Anilinfarbstoffen experimentierte um Zellkerne und Zytoplasma sowie weitere zelluläre Bestandteile bzw. Einschlüsse erkennen zu können (Ehrlich, 1877).

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die Färbemethoden durch Verwendung saurer und alkalischer Farbstoffe optimiert. Derartige pH-abhängige Farbstoffe gehen stabile Verbindungen mit unterschiedlichen Zellstrukturen ein und bewirken damit charakteristische Strukturanfärbungen: basische Farbstoffe (Methylenblau, Methylazur) binden z. B. an das sauer reagierende Chromatin und an DNA (Basophilie); saure Farbstoffe, wie Eosin und Fuchsin hingegen binden alkalisch reagierende Strukturen wie das Zytoplasma (Merck, 1986). Zu den heute noch gebräuchlichen Färbemethoden zählen die Färbungen nach May-Grünwald (1902), Giemsa (1902) und Pappenheim (1908) (Boroviczeny, 1991). Erst das 1931 durch Knoll und Ruska (1932) entwickelte Elektronenmikroskop erlaubte eine weitergehende Analyse der anfärbbaren zellulären Substrukturen.

Neben den qualitativen Analysen spielen vor allem auch quantitative Aspekte der Blutzellbetrachtung eine wesentliche Rolle in der hämatologischen Diagnostik, was zur Entwicklung sog. Zählkammermethoden führte: Karl Vierordt führte 1852 das Prinzip der Blutkörperchenzählung mittels einer Zählkammer ein (Vierordt, 1852). Für die Zählung der jeweiligen Zellen in einer Probe¹ werden die Zellen unter dem Mikroskop visuell ausgezählt und dann auf das definierte Probenvolumen hochgerechnet. Hierfür benötigte Vierordt seinerzeit noch ganze drei Stunden. Rasch gab es verschiedene Verbesserungen der

¹ Bestimmung ihrer Zahl pro Volumeneinheit einer Suspensionslösung

Methode und schließlich wurde die Zählkammer nach Karl Thoma von Ernst Abbe (1878) erstmal vorgestellt. Das verwendete Prinzip, ein Gitternetz in den Boden der Kammer zu ritzen, anstatt wie bei den bis dahin verwendeten Zählkammern eine Teilung im Okular zu verwenden, setzte sich relativ schnell durch und wird bis heute nahezu unverändert im Labor eingesetzt. Die heute zur Zellzählung im Labor verwendete Zählkammer ist die nach Neubauer benannte Modifikation (Romeis, 1989).

In der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts gehörten die mikroskopischen Methoden zur Zählung roter und weißer Blutzellen sowie der Thrombozyten in volumenkalibrierten Zählkammern zusammen mit der manuellen Hämoglobin- und Hämatokritbestimmung zum Standardrepertoire eines hämatologischen Labors. Bei entsprechender Fragestellung wurde zusätzlich Blut ausgestrichen und für die Differenzierung der Leukozyten nach Größe und Morphologie gefärbt. Hierbei wurden im gleichen Arbeitsgang auch die roten Blutkörperchen und die Thrombozyten morphologisch analysiert. Die Größe der Erythrozyten und ihre Beladung mit Hämoglobin, die aufgrund der Intensität ihrer Anfärbarkeit beurteilt wird, sowie die Einführung von Rechengrößen, denen die Erythrozytenzahl, die Hämoglobinkonzentration des Blutes und der Hämatokrit zugrunde liegen (sog. Winthrobe-Indices) erlaubten eine gewisse Standardisierung der Blutbildanalytik, die auch heute noch gültig ist (Wintrobe, 1980).

Solche „manuellen“ Methoden, wie sie umgangssprachlich auch genannt werden, sind naturgemäß zeit- und personalaufwendig, auch sind diese in der Reproduzierbarkeit und Präzision insbesondere bei kleinen Zellzahlen den automatischen bzw. apparativen Methoden unterlegen, so dass mit zunehmender Anforderung von hämatologischen Untersuchungen diese Methoden durch mechanisierte und automatisierte Verfahren zu ersetzen.

1.2 Entwicklung von Technologien zur Erstellung eines „Apparativen Differenzialblutbildes“ und erste Ansätze zur „automatisierten“ mikroskopischen Blutbilddifferenzierung

1.2.1 Die Impedanzmessung

Die Impedanzmessung, auch als Widerstandsmessprinzip bezeichnet, ist das historisch älteste Messprinzip zur Bestimmung von Zahl und Größe von Blutzellen. Entwickelt wurde es durch Wallace Coulter Anfang der 50er Jahre und 1956 erstmals als routinetaugliches Verfahren vorgestellt (Coulter, 1956).

Es basiert auf der Messung der Widerstandsänderung beim Durchtritt elektrisch nicht leitender Partikel durch eine Öffnung zwischen zwei Elektroden in einer elektrisch leitfähigen Flüssigkeit. Durch die Kapillaröffnung fließt ein Gleichstrom mit einer definierten Stromstärke zwischen externer und interner Elektrode (Abb. 1). Bewegen sich Blutzellen einer verdünnten Vollblutprobe als elektrisch nicht leitende Partikel einzeln nacheinander durch diese Messöffnung, entsteht jeweils ein Widerstand, der proportional zum Volumen der Blutzelle ist. Die Spannung muss sich erhöhen, um eine konstante Stromstärke zu gewährleisten (Coulter, 1956). So können Zahl und Volumen verschiedener Blutzellen, die durch die Kapillaröffnung geführt werden, ermittelt werden. Die Anzahl der Spannungsimpulse pro Zeit- und/oder Volumeneinheit entspricht der Anzahl der Zellen, welche die Kapillare passieren. Die Signalhöhe bzw. Impulsfläche ist ein Maß des Volumens der jeweilig durch die Messküvette fließenden Zelle. Dargestellt werden die gemessenen Impulse in Form eines Histogramms.

Die Zählung von Erythrozyten und Thrombozyten im verdünnten Vollblut gelingt aufgrund der unterschiedlichen Volumina meist problemlos. Für die Zählung der Leukozyten werden typischerweise die Erythrozyten lysiert, sodass die verbleibende Zellsuspension neben den Leukozyten lediglich Thrombozyten enthält, deren Diskriminierung sich durch ein „Abgrenzen“ aufgrund ihres Volumens („Gating“) relativ einfach gestaltet.

Bei der Differenzierung von Leukozyten sind der Analyse allein nach dem Impedanzprinzip durch die biologische Varianz der Leukozyten mit Überlappun-

gen in den Größenverhältnissen Grenzen gesetzt. Sie erlaubt lediglich eine orientierende Beurteilung im Sinne eines 3-Part-Differentialblutbildes (Coulter Electronics, 1983). Für weitergehende Analysen müssen alternative Verfahren verwendet oder mit der Impedanzmethode kombiniert werden.

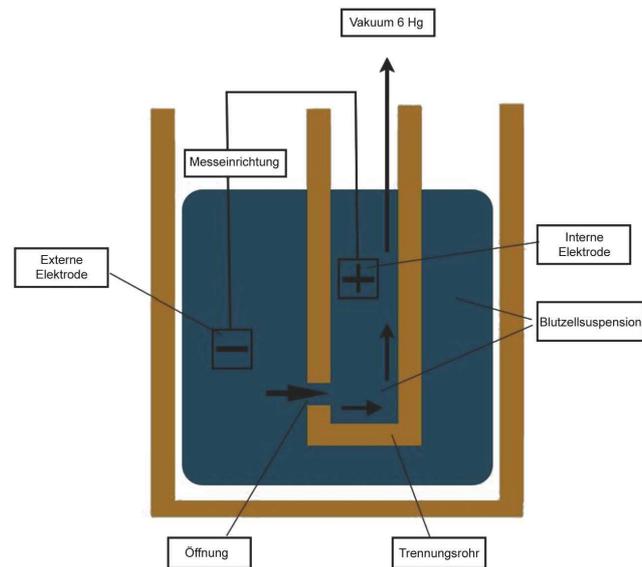


Abb 1
Darstellung der Impedanzmessung nach dem Coulter-Prinzip (modifiziert nach Longanbach et al., 2007)

In den nachfolgenden Jahren wurden Geräte entwickelt, die durch Nutzung unterschiedlicher biochemischer und physikalischer Eigenschaften der Leukozytenmembran, u. a. auch der Veränderung der Membrandurchlässigkeit für Farbstoffe oder der physikochemischen Eigenschaften des Kerns nach Entfernung des Zytoplasmas, die zusätzlich gewonnenen Messgrößen als Histogramme darstellen können und so eine Multiparameteranalyse möglich machen.

1.2.2 Laserlichtstreuung und Fluoreszenz

Ein anderes Prinzip der Blutzellzählung und -differenzierung ist die Verwendung von Laserlichtstreuung und Fluoreszenz. Dabei passiert die zu differen-

zierende Einzelzelle eine optische Durchflussküvette und wird dabei von einem fokussierten monochromatischen Laserstrahl getroffen. Hierbei ändert das Licht seine Richtung, d.h. der Lichtstrahl wird in unterschiedlichen Winkeln abgelenkt (Mullaney et al., 1970; Terstappen et al., 1986). Diese Streulichtsignale werden über in bestimmten Winkeln angeordnete Photosensoren detektiert und in elektrische Impulse umgewandelt. Da das Laserlicht aufgrund spezifischer Membran- und Zytoplasmaeigenschaften der verschiedenen Leukozyten in unterschiedlichen Winkeln abgelenkt wird, können die Unterschiede der Zelleneigenschaften über von der Industrie nicht vollständig offen gelegte Algorithmen ermittelt werden (Abb. 2). Der 0° Lichtverlust (Vorwärtsscatter) gibt die Größe der Zelle an, da er das Maß der Verringerung des Axiallichtes misst. Das 7° Streulicht gibt den Grad der Komplexität einer Zelle an. Komplexe innere Zellstrukturen erzeugen ein stärkeres Streulicht als weniger komplexe Strukturen. Das 90° Streulicht ist die Seitwärtsstreuung im rechten Winkel zum Laserlicht. Durch dieses Signal lassen sich segmentkernige von nicht segmentkernigen Leukozyten unterscheiden, die eine stärkere Streuung im 90° Winkel hervorrufen. Das 90° D Streulicht ist ein seitengestreutes Licht, das durch eine Zelle während der Streuung depolarisiert wird (Van de Hulst, 1981). Dieses Streulicht wird zur Erkennung von eosinophilen Granulozyten verwendet, deren Granula Licht während der Streuung depolarisieren.

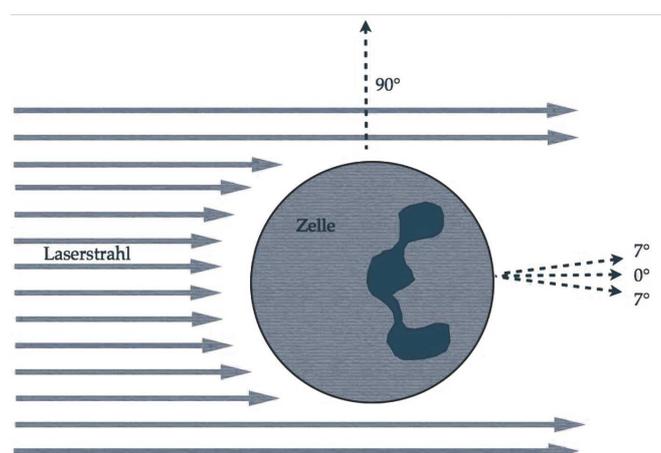


Abb 2

Darstellung der vier Lichtsignale, die durch das Auftreffen eines Laserstrahls auf eine Zelle entstehen können (modifiziert nach Longanbach et al., 2007)

Bei der Fluoreszenzmethode werden die Proben mittels spezieller Farbstoffe markiert. Der Fluoreszenzfarbstoff absorbiert Licht bei einer bestimmten Wellenlänge, um dieses später wieder zu emittieren (Waggoner, 1986). Da die Zellen in Abhängigkeit vom Fluoreszenzfarbstoff in unterschiedlichen Wellenbereichen unterschiedlich stark fluoreszieren, kann über die Fluoreszenz als weiteres Kriterium eine Zuordnung der Zellen erfolgen.

Durch eine Reihe technischer Weiterentwicklungen hat sich die Zellzählung und Differenzierung wesentlich verbessert. Sowohl für die Impedanzmessung als auch für die optischen Messungen konnten durch Einführung der hydrodynamische Fokussierung die Ergebnisse optimiert werden, da bei diesem Verfahren der zentrale Probenstrom, in dem sich die Blutzellen befinden, langsamer als die Laminarströmung fließt und die Blutzellen daher einzeln nacheinander die Messküvette passieren (Ost et al., 1998). Die hydrodynamische Fokussierung verhindert die Aggregation von Zellen und damit Größenverzerrungen sowie Rezirkulationen im Messbereich und folglich potentielle Doppelzählungen und/oder verfälschte Messsignale (Longanbach et al., 2007).

René Thom fand Ende der 70er Jahre bei der Widerstandsmessung mit Wechselstrom heraus, dass sich Blutzellen nur bis zu einer bestimmten Feldstärke innerhalb der Messöffnung als Isolatoren verhalten. Ein wesentliches Ergebnis seiner Untersuchung war, dass voneinander verschiedene Leukozytenklassen bei der Widerstandsmessung mit hochfrequentem Wechselstrom unterschiedliche Signale geben, wodurch sich die Zellen unterscheiden lassen. Fortschritte in der Lasertechnologie erlauben eine Analyse des Streulichtverhaltens zellulärer Oberflächen, sodass in den modernen Geräten drei unterschiedliche apparative Differenzierungstechniken miteinander kombiniert werden können.

Die kombinierte Widerstandsmessung mit Hochfrequenz und Gleichstrom und die simultane Streulichtmessung von polarisiertem Laserlicht unter Nutzung verschiedener Streulichtwinkel ist technisch in den Geräten der Fa. Beckman-Coulter (Coulter STKS, MAXM, LH 750) und der Fa. Toa-Sysmex (SE 9000, XE 8000) umgesetzt.

Auch die Geräte der Fa. Abbott-Diagnostics (Cell-Dyn 1800, 3200, 3500,

3700, Sapphire, Ruby) nutzen kombinierte Technologien. Sie unterscheiden sich aber von den oben genannten Gerätesystemen dadurch, dass sie mit polarisiertem und depolarisiertem Licht unter Nutzung von vier verschiedenen Streulichtwinkeln arbeiten. Die Streulichtanalyse erlaubt neben Informationen über die Größe und Granularität der Zellen auch Angaben zur Kernlappung. (Gruber et al., 2000).

Zytochemische Methoden stellen eine weitere Möglichkeit der Leukozytendifferenzierung dar. Dabei werden die Leukozyten im sogenannten „Peroxidasekanal“ mit optischer Messtechnik differenziert. Zuerst werden die Erythrozyten lysiert um dann die Leukozytenkonzentration zu bestimmen. Im Anschluss erfolgt die Differenzierung der Zellen in ihre Subpopulationen anhand der Zellgröße und Myeloperoxidaseaktivität, nachdem die Leukozyten mit 4-Chloro-1-Naphtol und H₂O₂ angefärbt wurden. Dabei sind z.B. neutrophile Granulozyten groß und besonders peroxidaserreich und somit gut zu detektieren. Umgesetzt wurde dieses Verfahren zusammen mit der optischen Analyse und der Nutzung der Lyseresistenz bestimmter Zellpopulationen in den Geräteentwicklungen der Fa. Technicon (H-1 bis H-3, Bayer Diagnostic, Technicon) und dem Vorläufergerät Hemalog D der Fa Technicon (Schneider, 1989). Der „Peroxidasekanal“ ist auch heute noch integraler Bestandteil des automatisierten hämatologischen Analysesystems („ADVIA“) der Fa. Siemens.

1.3 Digitalisierte automatische Mikroskopie („Pattern Recognition“ und Diffmaster Octavia^R)

Während der 70er Jahre wurden sog. „Pattern-Recognition-Systeme“ entwickelt, die es erlaubten, herkömmliche Blutaussstriche mit Hilfe von automatisierten Mikroskopen und Bildauswertungssoftware zu differenzieren. Diese Pattern-Recognition-Technologie hat ihre Grundlage in technischen Entwicklungen der Militärforschung. Die Technologie zur landkartenartigen Erkennung von Geländestrukturen war seinerzeit Grundlage der Flugbahn- und Zielerkennung von Lenkflugkörpern (Cruise missiles) und wurde für die Differenzierung und Wiedererkennung von ausgestrichenen Blutzellen adaptiert.

Aufgrund zahlreicher Limitationen hat sich allerdings diese Technologie nicht durchsetzen können (Seeger, Poppy, 1991; Avenarius, 1995).

Neuerdings erhebt eine andere Bildanalysetechnologie den Anspruch, die herkömmliche mikroskopische Untersuchung (Differenzierung) ersetzen zu können. Hierbei handelt es sich um das sog. „Diffmaster-System“ (Cellavision^R).

Die fortschreitende Entwicklung der Rechner- und Speichertechnologie mit exponentiell ansteigenden Speicherkapazitäten sowie der Möglichkeit der Digitalisierung von Bildern erlaubte in den 90ern die Entwicklung einer Technologie, die einen unter standardisierten Bedingungen automatischen gefertigten Ausstrich systematisch abscannt und die vorhandenen Zellelemente erfasst, fotografiert, digitalisiert und mittels definierter Algorithmen klassifiziert beziehungsweise zuordnet. Das System Diffmaster Octavia (CellaVision, Schweden) ist ein solches automatisches mikroskopisches System zur diagnostischen Anwendung. Es besteht aus einem motorgetriebenen verschiebbaren Mikroskopiertisch, welcher acht Blutausrichtriche fassen kann und einem Mikroskop (Olympus BX50WI, Olympus Europe, Hamburg, Germany) mit einem 100x Objektiv (Sony, Tokio, Japan).

Das Einspannen der Blutausrichtriche und das Auftragen des Immersionsöls erfolgt durch den Untersucher. Das System überprüft mit dem motorgesteuerten Kreuztisch die Qualität des Ausstrichs und lokalisiert einen Bereich mit optimaler Zelldichte zur Analyse (DiffMaster Octavia, 2002).

Die erfassten kernhaltigen Zellen (Leukozyten, kernhaltige Erythrozyten und Riesenthrombozyten, aber auch Kernschatten) werden mit einer CCD-Kamera dokumentiert und rechnergestützt digitalisiert. Aufgrund von werkseitig programmierten Wiedererkennungsalgorithmen wird vom Gerät eine Vorklassifizierung der Zellen vorgenommen (Tab. 1), welche vom Untersucher bestätigt oder verworfen bzw. korrigiert werden können (Abb. 3).

Tab. 1

Vom rechnergestützten automatisierten und mechanisierten Mikroskopiersystem (Diffmaster Octavia) zur Klassifizierung vorgeschlagene Einordnung der im Ausstrich gefundenen reifen Leukozyten und ihrer Vorstufen sowie anderer kernhaltiger Zellen und Artefakte

Leukozyten	Andere
Unidentifiziert	Erythroblast (NRBC)
Eosinophiler	Kernschatten
Basophiler	Artefakt
Lymphozyt	Riesenthrombozyt
Monozyt	
Segmentkerniger Granulozyt	
Stabkerniger Granulozyt	
Metamyelozyt	
Myelozyt	
Promyelozyt	
Blast	

Für die morphologische Beurteilung des roten Blutbildes wird ein optimaler Ausstrichbereich mit einer Übersichtsvergrößerung x100 mikroskopiert und in digitalisierter Form abgespeichert. Dieser Ausstrichbereich lässt sich beliebig vergrößern und damit vom Untersucher analysieren. Die möglichen morphologischen Kriterien sind in einer semiquantitativ zu bewertenden Tabelle vorgegeben (z. B. Polychromasie, Hypo- bzw. Hyperchromasie, Mikro-, Makro- und Poilkilozytose). Auch vorhandene abnormen Zellformen oder Zelleinschlüsse, wie z. B. Targetzellen, Howell- Jollykörper, Pappenheimkörper, Akanthozyten, Sphärozyten können dokumentiert werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit zehn weitere Zellcharakteristika zu definieren und manuell hinzuzufügen.

Neben den genannten Zuordnungsmöglichkeiten gibt es die Rubrik „Unidentifiziert“, für Zellen die durch den Diffmaster nicht klassifiziert werden konnten und dem Anwender zur endgültigen Validierung angezeigt werden. Zellen, die

auch der Anwender nicht eindeutig zuordnen kann, die jedoch in der Differenzierung bleiben, gehen unter dieser Bezeichnung in den Befund ein. Als „nicht klassifiziert“ werden Zellen bezeichnet, die weder klassifiziert werden können noch in die Differenzierung eingeschlossen werden sollen (DiffMaster Octavia, 2002).

Die getroffenen Zellzuordnungen werden abgespeichert und dem Untersucher auf dem Monitor angezeigt. Die Validierung kann nun abgeschlossen und der Befund elektronisch freigegeben werden (Kratz et al, 2005) (Abb. 3). Eine elektronische Weiterleitung von morphologischen Befunden, in Form von Zellbildern, kann mit einer entsprechenden Software erfolgen (e-mail).



Abb 3

Bildschirmpräsentation eines mikroskopischen Befundes, der mit dem „Diffmaster Octavia“, erstellt wurde. Mittelständig sind die Absolutzahlen und prozentuale Verteilung der weißen Blutzellen sowie andere morphologische Hinweise abgebildet. Durch Verschiebung der Zellbilder „per Mausklick“ in eine andere (aufrufbare) Rubrik besteht die Möglichkeit einer Neuordnung im Sinne einer morphologischen Validierung, die bei der klassischen Mikroskopie nicht möglich ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die einzelnen Zellen zu vergrößern und die Belichtung zu optimieren.

Das System wird durch das Programm „Cytologica“ gesteuert. Dieses Programm übernimmt die Bildaufnahme, Analyse und Klassifizierung. Man kann verschiedene Ansichten der Leukozyten unterscheiden. Mittels der Ansicht „Leukozytenanalyse“ werden die Leukozyten nach Klassen unterteilt ange-

zeigt und können detailliert vergrößert und/oder im Färbeverhalten modifiziert angezeigt werden, wodurch die abschließende Bewertung und Klassifizierung erleichtert wird. Die der jeweiligen Leukozytenklasse zugeordneten Zellen werden als absoluter und relativer Anteil der differenzierten Leukozyten angegeben.

Grundlage der Algorithmen für die Klassifizierung der Leukozyten sind zahlreiche zytologische Charakteristika, die als wissensbasierte Software hinterlegt sind. Dazu zählen u.a. Zellgröße, Kern/Plasma-Relation, Färbeverhalten und Kern- und Zytoplasmatextur (DiffMaster Octavia, 2002).

Das Programm nutzt in der Standardversion verschiedene Farben, die den Vertrauenswert, mit welcher Sicherheit das Programm eine Zelle klassifiziert hat, darstellen. Grün bedeutet, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Zelle der richtigen Klasse zugeordnet wurde, während die rote Markierung eine hohe Unsicherheit bei der Klassifizierung anzeigt.

Alle Leukozytenbilder werden gespeichert und sind so jederzeit wieder abrufbar.

1.4 Gegenwärtiger Stand der apparativen Blutbilddifferenzierung

Heute nutzt die automatische Differenzierung alle genannten Technologien zur Erfassung unterschiedlicher Charakteristika der Leukozyten und kombiniert sie sinnvoll, um die im peripheren Blutbild vorhandenen Zellen richtig zuzuordnen (Dörner, 2003).

Moderne hämatologische Analyser ermöglichen die Erstellung eines automatisierten "Five-part Diff" (Buttarelo et al., 1992). Die technische Weiterentwicklung der Geräte erlaubt mit gewissen Einschränkungen auch die Identifizierung pathologischer oder unreifer Zellen, wie z. B. „unreife Granulozyten“ oder „atypischer Lymphozyten“ (Ansari-Lari et al., 2003). Hierdurch hat sich die Verlässlichkeit der automatisierten Leukozytendifferenziersysteme deutlich verbessert und zu einem signifikanten Rückgang der mikroskopischen Zelldifferenzierung geführt (Bain et al., 2005; van der Meer et al., 2006).

Um den Anwender eines hämatologischen Differenzierungsautomaten darauf

aufmerksam zu machen, dass sich Zellen im Blut befinden, die eine abweichende Zellmorphologie aufweisen oder welche das Gerät nicht erkennen bzw. zuordnen kann, werden „Flags“ bzw. Warnhinweise angezeigt. Auch bei abweichenden Besonderheiten der zu untersuchenden Blutprobe, so z. B. bei Vorliegen von Gerinnseln oder kernhaltige Erythrozytenvorstufen bzw. Thrombozytenaggregaten, geben die hämatologischen Differenzierautomaten in der Regel sehr konkrete Warnhinweise, dass die maschinellen Zähl- und Differenzierungsergebnisse hierdurch verfälscht sein können. Solche Proben werden dann der herkömmlichen mikroskopischen Differenzierung zugeführt.

Der wesentliche Vorteil der modernen Blutbildanalytik liegt auf der Hand: Größerer Probendurchsatz mit deutlich geringerer Personalbindung und eine deutlich verbesserte Reproduzierbarkeit und Präzision der Zähl- und Differenzierungsergebnisse, da die Automaten eine weit höhere durchfließende Zellzahl analysieren als es mit herkömmlichen Methoden möglich war.

Von daher lassen sich auch Kritiken an diesen Methoden relativieren, da bei möglicherweise nur wenigen zirkulierenden pathologischen Leukozyten die Chance, dass diese bei der Analyse von 10.000 Leukozyten übersehen werden, geringer ist als bei einer mikroskopischen Differenzierung von nur 100 Zellen (Rümke, 1985).

Dennoch bleibt die mikroskopische Zelldifferenzierung der apparativen Differenzierung in sofern überlegen, als minimale, morphologisch aber bedeutsame zytologische Veränderungen insbesondere bei unreifen Vorläuferzellen von den Analysesystemen nicht richtig erkannt werden können (Bain, 2005), das bezieht sich insbesondere auf die Lymphozytenmorphologie und das rote Blutbild .

Die Personal- und Kostensituation im Labor erlaubt allerdings heute keine mikroskopisch-manuelle Bearbeitung aller Blutbildanforderungen mehr. Die Entscheidung, ob ein Blutbild zusätzlich manuell „nachdifferenziert“ werden muss, hat eine erhebliche Bedeutung für die Laborkosten, die Produktivität und die Befundrückführungszeiten.

Jedes Labor muss daher seine eigenen Review-Kriterien definieren, um festzulegen, wie mit einem automatisch erstellten Differenzierungsbefund, der diesen Kriterien entspricht, weiter zu verfahren ist.

1.5 Die diagnostische Bedeutung des Differenzialblutbildes

Das sog. große Blutbild umfasst neben den Parametern des kleinen Blutbildes (Quantifizierung der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten, Hämoglobin- und Hämatokritbestimmung sowie Berechnung von MCV, MCH und MCHC) eine qualitative und quantitative Zuordnung der Leukozyten zu neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Ihr Anteil wird auch heute noch in den meisten Laboratorien in Prozente bezogen auf die Gesamtzahl der differenzierten Zellen (in der Regel 100) angegeben. Diese immer wieder kritisierte Verfahrensweise kann zu Fehlinterpretationen führen, da z. B. eine relative Lymphopenie bei relativer Neutrophilie, bezogen auf die absolute Lymphozytenzahl, durchaus noch normal sein kann.

Neben der „horizontalen“ Differenzierung im Sinne der Zuordnung zu einer Zellart, werden mit der „vertikalen“ Differenzierung auch unterschiedliche Reifungsstufen der Leukozyten im Sinne der physiologischen oder pathologischen Linksverschiebung erfasst. Diese Begrifflichkeit bezieht sich im Wesentlichen auf die Vorstufen der myeloischen Zellen und umfasst die Unterscheidung von segment- und stabkernigen neutrophilen Granulozyten, von Metamyelozyten, Myelozyten, Promyelozyten und Myeloblasten.

Physiologischerweise zirkulieren 4.5 bis 11.5×10^9 Leukozyten pro Liter im peripheren Blut. Eine der häufigsten Erstbefunde bei der Aufnahmeuntersuchung eines Patienten stellt die Leukozytose dar, welche reaktiv als physiologische Reaktion des Organismus oder als Ausdruck einer pathologischen Veränderung z. B. im Rahmen einer hämatologischen Neoplasie auftreten kann. Nur die morphologische Differenzierung kann Aufschluss darüber geben, welche der genannten Ursachen einer Leukozytose zugrunde liegen (Kroschinsky et al., 2007).

Auch der Erstbefund einer Leukopenie rechtfertigt ein Differenzialblutbild, da zwar die betroffene verminderte Leukozytenpopulation durch die maschinelle Differenzierung eindeutig identifiziert werden kann, aber dadurch nicht geklärt

wird, ob bestimmte Leukozytenpopulationen ganz verschwunden sind oder ob es sich z.B. um eine Lymphopenie im Sinne einer Virusinfektion handelt.

Um eine optimale diagnostische Aussage der Analyse des Blutausriches zu gewährleisten und eine hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen, wurden durch die International Consensus Group of Hematology einheitliche Nachdifferenzierungs- oder Reviewkriterien definiert, nach denen eine mikroskopische Kontrolle des untersuchten Blutes möglichst zu erfolgen hat (Barnes et al., 2005).

1.6 Ziel- und Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorgelegten Arbeit ist es, die mit Hilfe von hämatologischen Analysensystemen erstellten Blutbilder mit der mikroskopischen Differentialblutbildanalyse zu vergleichen.

Drei automatische Hämatologieanalysensysteme, der XE 2100 (Sysmex, Norderstedt), der LH 750 (Coulter-Beckman, Krefeld) und der CELL-DYN Sapphire (Abbott, Wiesbaden) stehen für diese Untersuchung zur Verfügung. Die maschinell erstellten Differentialblutbilder werden mit Hilfe eines automatischen Mikroskopiensystems (Diffmaster Octavia, CellaVision, Schweden) verglichen. Die Untersuchung soll an unterschiedlichen Patientenproben erfolgen, die für die Erstellung eines Blutbildes von Patienten der Notaufnahme, Patienten der hämatologisch-onkologischen Abteilung und Patienten der Intensivstation angefordert werden.

Ziel der vergleichenden Untersuchung soll die Ermittlung von Sensitivität und Spezifität der apparativen Blutbilddiagnostik sein., das heißt die quantitative und qualitative Anzahl falsch positiver und falsch negativer Ergebnisse, wobei die Ergebnisse des durch den Untersucher validierten automatischen Mikroskopiensystems als Referenz dienen.

Weiterhin erfolgt der Vergleich der Blutbildautomaten untereinander. Dabei sollen die Geräte im Hinblick auf die Verlässlichkeit der quantitativen Differenzierung und der gesetzten morphologischen Warnhinweise (Flags) untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung der Hämatologischen Analysensysteme mit denen im Rahmen der Untersuchung apparative Differenzialblutbilder erstellt wurden

Für die Untersuchungen wurden die Systeme Sysmex XE-2100 (Sysmex, Norderstedt), Coulter LH 750 (Beckman Coulter, Krefeld) und CELL-DYN Sapphire (Abbott, Wiesbaden) eingesetzt.

2.1.1. Hämatologiesystem Sysmex XE-2100

Die Geräte der X-Klasse mit dem Standardgerät Sysmex XE-2100 sind automatisierte hämatologische Analysensysteme, die nach dem RF/DC- Widerstandsmessprinzip (Gleichstrom mit überlagerter Hochfrequenz) und mit der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie arbeiten (Lehner et al., 2008; Tsuruda et al., 1999).

Es sind sowohl Blutbildanalysen im geschlossenen Modus (Samplermodus) als auch durch Einzelprobenzufuhr (manueller Modus) möglich. Beim Samplermodus werden die Proben im Probenröhrchen automatisch zugeführt, gemischt, angesaugt und analysiert.

Für die Leukozytenzählung und -differenzierung verwendet das System eine „Diff“- Messkammer. Die Erythrozyten werden durch ein Reagenz lysiert, welches selektiv die Degranulation von basophilen Zellen unterdrückt, wodurch diese von anderen Leukozytenformen unterschieden werden können. Die permeabilisierten Leukozyten werden mit einem spezifischen Nukleinsäurefarbstoff angefärbt. Im optischen Detektorblock gelingt über drei verschiedene optische Informationen die Klassifizierung der Leukozyten aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalisch-chemischen Zelleigenschaften. Dabei werden eine Vielzahl von Messdaten, die aus Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung sowie Fluoreszenzintensität generiert werden, nach, im Einzelnen nur dem Hersteller bekannten, mathematischen Algorithmen analysiert (Ruzicka et al., 2001). Die grafische Darstellung der Leukozytenklassifizierung erfolgt mittels Scattengrammen (Abb. 4).

In einem gesonderten Messkanal erfolgt die Analyse unreifer myeloischer Vorstufen („immature granulocytes“, „IG“). Nach der Erythrozytenlyse kommt ein spezielles Reagenz, welches hauptsächlich auf die Lipidkomponenten der Zellmembran wirkt, zur Anwendung. Dabei wird das Zytoplasma aller reifen Leukozyten infolge der lytischen Wirkung des lipophilen Reagenz freigesetzt, da deren Membran deutlich höhere Lipidanteile enthält (Lehner et al., 2008). Die Zellmembranen der unreifen Leukozyten sind dagegen geschützt, da sie sich in der Lipidzusammensetzung und den Lipidanteilen von den reiferen Zellen unterscheiden.

Daran schließt sich die Analyse der Zellen mittels Widerstandsmessprinzip nach dem RF/DC-Messprinzip (Symex Norderstedt) an. Die Quantifizierung unreifer Granulozyten kann in der Verlaufsdagnostik entzündlicher Prozesse klinisch relevant sein; ihr Auftreten ist aber in jedem Fall ein Kriterium für die Erstellung eines zusätzlichen mikroskopischen Differentialblutbildes (Nachdifferenzierungskriterium). Der Nachweis hämatopoetischer Progenitorzellen ist ebenfalls über den IG-Nachweis möglich (Lehner et al., 2008).

Die traditionell schwierige Analyse kernhaltiger erythrozytärer Vorstufen (Erythroblasten bzw. Normoblasten) erfolgt in einem weiteren separaten Kanal mit Hilfe einer Kernfluoreszenzfärbung: Die Erythrozyten werden hämolysiert, sodass nur noch der Kern übrig bleibt. Die Leukozytenmembran wird zwar für den Fluoreszenzfarbstoff permeabel, bleibt aber ansonsten erhalten. Die Diskriminierung erfolgt durch die unterschiedlichen Volumina der fluoreszierenden Erythroblastenkerne und der als Zelle intakten Leukozyten, deren Kerne ebenfalls fluoreszieren.

Dieses Verfahren erlaubt die sichere Unterscheidung kernhaltiger erythrozytärer Vorstufen von den Leukozyten (Ruzicka et al., 2001).

Des Weiteren wird von „floating thresholds“ Gebrauch gemacht. Durch die Einstellung von oberen und unteren Grenzwerten können einzelne Zellpopulationen zugeordnet werden und somit Thrombozyten von kleineren Erythrozyten unterschieden werden. Die Hämoglobinmessung erfolgt in einer Durchflussküvette. Dort wird das ausgetretene Hämoglobin in Oxyhämoglobin umgewandelt, welches sich mit Natrium-(Sodium)-Lauryl-Sulfat zu SLS-Hämoglobin verbindet. Die Konzentration wird dann fotometrisch bestimmt (Sysmex,

Norderstedt).

Das Analysensystem Sysmex XE-2100 verwendet ähnlich wie auch die anderen hämatologischen Analysensysteme eine interpretierende Software, um pathologische Befunde zu identifizieren und mit Kommentaren (Flags) zu versehen. Man unterscheidet dabei morphologische Flags (Tab. 2), die vom Anwender nicht verändert werden können, von Hinweisen, welche vom Nutzer geändert werden können und auf quantitativen Festlegungen beruhen (Tab. 3).

Tab. 2

Zusammenstellung der morphologischen Warnhinweise des Sysmex XE-2100 Gerätes („Qualitative Flags“)

WARNHINWEIS	MÖGLICHE BEDEUTUNG
Blasts?	Blastenhinweise im IMI oder Diff Scattergram
Immature Gran?	Unreife Granulozyten im IMI oder Diff Scattergram
Left Shift?	Verschiebung der Granulozyten im Diff Scattergramm nach oben rechts oder Linksverschiebung im IMI Scattergramm
Abn Lympho/-L-Blasts?	Verschiebung der Lymphozyten im Diff Scattergramm nach oben rechts oder Blasten im IMI Scattergramm
NRBC?	Kernhaltige erythrozytäre Vorstufen, d.h. Spots zwischen Ghosts und Lymphozyten im Diff Scattergramm
Atypical Lympho?	Atypische Lymphozyten, auffällige Zellen im Diff Scattergramm oben rechts

♂

Tab. 3

Darstellung der quantitativen Warnhinweise beim Sysmex XE-2100 gemäß den Referenzintervallen für das Differentialblutbild des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Rostock (die quantitativen Warnhinweise galten für alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte)

Warnhinweise	Bedeutung
Leuko+	erhöhte Leukozytenzahl (Leukozyten > $30 \times 10^9 / l$)
Leuko-	niedrige Leukozytenzahl (Leukozyten < $4 \times 10^9 / l$)
Neutro+	erhöhte Neutrophilenzahl (Neutrophile > $0,84 \times 10^9 / l$)
Neutro-	niedrige Neutrophilenzahl (Neutrophile < $0,36 \times 10^9 / l$)
Lympho+	erhöhte Lymphozytenzahl (Lymphozyten > $0,42 \times 10^9 / l$)
Lympho-	niedrige Lymphozytenzahl (Lymphozyten < $0,20 \times 10^9 / l$)
Mono+	erhöhte Monozytenzahl (Monozyten > $0,15 \times 10^9 / l$)
Baso+	erhöhte Basophilenzahl (Basophile > $0,01 \times 10^9 / l$)
Eosino+	erhöhte Eosinophilenzahl (Eosinophile > $0,05 \times 10^9 / l$)

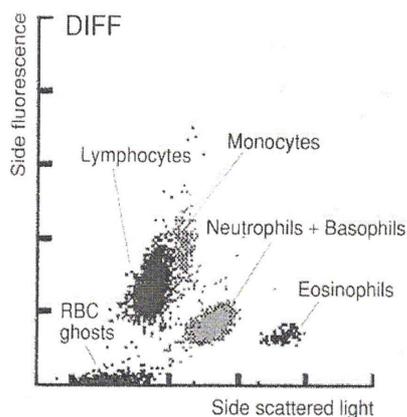


Abb. 4

Darstellung der Leukozytenpopulationen als Scattergramm. Die Unterteilung erfolgt in Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile + Basophile, Eosinophile und das Erythrozytengebiet (RBC ghosts). Auf der X-Achse wird der Seitwärtslichtstreuung (SSC) gegen die Fluoreszenzintensität (SFL) aufgetragen (Ruzicka et al., 2001)

2.1.2 Hämatologiesystem Coulter LH 750

Das System Coulter LH 750 ist ein vollautomatisches hämatologisches Analysensystem, welches nach dem Impedanz-Prinzip und der VCS-Technologie arbeitet.

Das System LH 750 verfügt für die Zählung von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten über zwei Messkanäle. Die Analysen werden nach dem Impedanzprinzip parallel in drei unabhängigen Kapillaren durchgeführt.

Die Leukozytendifferenzierung erfolgt nach Lyse der Erythrozyten unter Beibehaltung eines fast nativen zellulären Zustandes der Leukozyten mit der VCS-Technologie, die Volumen (V), Konduktivität (C) und Laserlichtstreuung (S) einschließt (Longanbach et al., 2007). Die Widerstandsmessung im Gleichstrom erfasst das Volumen der Zelle. Mit der Messung der internen Leitfähigkeit (Konduktivität) im hochfrequenten Wechselstrom werden zelluläre Kenngrößen (z.B. Kern/Plasma-Relation, Granularität) analysiert. Zusätzlich wird jeder Leukozyt einem monochromatischen Laserlicht ausgesetzt, wodurch Informationen zur Oberflächenstruktur und Form der Zelle gewonnen werden (Fernandez et al., 2001).

Bei jedem Messvorgang werden die Daten von etwa 8200 Leukozyten in eine Matrix übernommen und in einem dreidimensionalen Koordinatensystem analysiert. Diese Technologie gestattet die zwei- oder dreidimensionale Klassifizierung der Leukozyten. Die Diskriminationsfunktion 1 (DF 1) mit Volumen (y)-Achse gegen Streulicht (x)-Achse zeigt die Aufteilung von Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen und Eosinophilen. Basophile Granulozyten sind aufgrund verschiedener interner Leitfähigkeit in dieser Form des Scatterplots hinter den Lymphozyten verborgen (Abb. 5). Das DF 2-Scattergramm, bei der Volumen gegen Konduktivität aufgetragen wird, zeigt hauptsächlich Lymphozyten, Monozyten und Neutrophile. Entfernt man die Neutrophilen aus dem DF 2 Scattergramm, können die Basophilen im DF 3-Scatterplot dargestellt werden (Beckman Coulter Germany, Krefeld).

Die Leukozytenzählung wird durch einen Interferenzalgorithmus, welcher die Einflüsse kernhaltiger erythrozytärer Vorstufen, Riesenthrombozyten und lyseresistenter Zellen berücksichtigt (Aulesa et al., 2004), korrigiert. Im Anschluss an die Leukozytendifferenzierung wird die gleiche hämolysierte, aber Leukozyten enthaltende Probe in die Hämoglobin-Messkammer gegeben, um die Hämoglobinkonzentration zu ermitteln, dabei wird die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 525 nm gemessen.

Die Darstellung der Messergebnisse erfolgt in Form von Scatterplots, Histogrammen und Analysendaten unter Verwendung interpretierender Software. Auffällige Proben werden durch das System kenntlich gemacht. Dabei werden numerische Flags, deren Grenzwerte durch den Benutzer selbst definiert werden können, von morphologischen Flags unterschieden, die nach internen Algorithmen durch das System angezeigt werden (Tab. 4).

Zu den numerischen Flags gehören Leukozytose und Leukozytopenie sowie Neutropenie, Neutrophilie, Lymphopenie, Lymphozytose, Monozytose, Eosinophilie und Basophilie.

Für die eigentliche Messung werden im automatischen Modus die EDTA-Röhrchen gemischt und anschließend die Proben automatisch zur Ansaugnadel geführt und analysiert. Eine manuelle Einzelprobenzufuhr ist auch hier alternativ möglich.

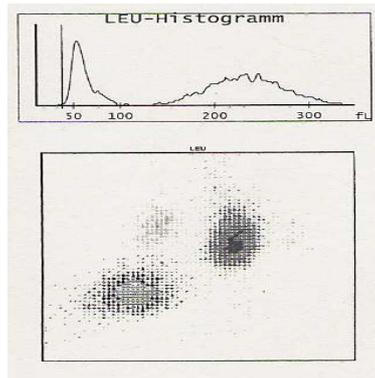


Abb. 5

Leukozytenanalyse durch das Coulter-Beckman Hämatologiesystem LH 750. Die obere Abbildung zeigt ein Leukozytenhistogramm, in dem die relative Anzahl der Leukozyten gegen die Volumenverteilung aufgetragen ist. Darunter ist ein zweidimensionales Scattergramm nahe der Diskriminierungsfunktion 1 (DF1) dargestellt, wobei das Zellvolumen (y-Achse) gegen die Laserlichtstreuung (x-Achse) aufgetragen wird

Tab. 4

Morphologische (qualitative) Warnhinweise des Coulter LH 750
Die vom Labor vorgegebenen quantitativen Grenzen sind in Tab. 3 dargestellt

Warnhinweis	Bedeutung
Unreife Gran 1	Unreife Granulozyten und/oder Stabkernige
Unreife Gran 2	Metamyelozyten, Myelozyten, Promyelozyten
Niedrige Opacity LY	Population mit niedriger Konduktivität im Lymphozytenbereich
Niedriges Volumen LY	Population mit niedrigem Volumen im Lymphozytenbereich
Lymphoblasten	Blastenverdächtige Zellen im Lymphozytenbereich
Monoblasten	Blastenverdächtige Zellen im Monozytenbereich
NE Blasten	Blastenverdächtige Zellen im Neutrophilenbereich
ERY	kernhaltige erythrozytäre Vorstufen
Atypische Lymphozyten	Lymphozyten die durch Größe, Form, Kern-Plasma-Relation oder Granulierung auffallen
Diff prüfen	Differentialblutbild muss kontrolliert werden

2.1.3 Hämatologiesystem CELL-DYN Sapphire

Das System CELL-DYN Sapphire ist ein automatisches hämatologisches Analysengerät, welches nach den Prinzipien der Durchflusszytometrie und optischen Streulicht-/Fluoreszenz-Messung arbeitet. Es sind sowohl Blutbildanalysen im geschlossenen Modus als auch eine Einzelprobenzufuhr möglich. Nach dem Ansaugen wird die Probe in unterschiedlichen Kanälen verdünnt, mit den jeweiligen Reagenzien gemischt und in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein dritter Anteil der Probe wird für die absorptionsphotometrische zyanidfreie Hämoglobinmessung verwendet (Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Germany).

Für die Leukozytendifferenzierung wird die Probe mit einem speziellen Reagenz verdünnt, wobei die Erythrozyten lysiert werden. Die Differenzierung erfolgt über die optische Streulicht-/Fluoreszenz-Messung (MAPSS)². Jede einzelne Zelle wird über die 0°-Lichtabschwächung (Größe), 7°-Streulicht (Komplexität), 90°-Streulicht (Lobularität des Zellkerns), depolarisiertes 90°-Streulicht (Granularität) sowie zusätzlich durch eine Fluoreszenzmessung charakterisiert (Abb. 6). Neben reifen Leukozyten können auch stabkernige Neutrophile, unreife Granulozyten, Blasten und atypische Lymphozyten differenziert werden. Durch die Fluoreszenzmessung werden kernhaltige erythrozytäre Vorstufen und avitale bzw. Leukozytenkerne identifiziert (Lehner et al., 2008).

Erythrozyten und Thrombozyten werden sowohl über Widerstandsmessung als auch optisch charakterisiert und gezählt. Für die optische Messung wird die Verdünnung in der Durchflußküvette mittels hydrodynamischer Fokussierung analysiert. Partikel zwischen 1 und 35 fl werden zu den Thrombozyten gezählt, Teilchen größer als 35 fl gehören zu den Erythrozyten. Die Widerstandsmessung stellt dabei die Qualitätskontrolle der optischen Streulichtmessung dar (Lehner et al., 2008). Unterscheiden sich die Ergebnisse von denen der optischen Messung, bestimmt ein vorgegebener Algorithmus den Wert oder verweigert die Messung (Longanbach et al., 2007).

² „Multi angle polarized scatter separation“

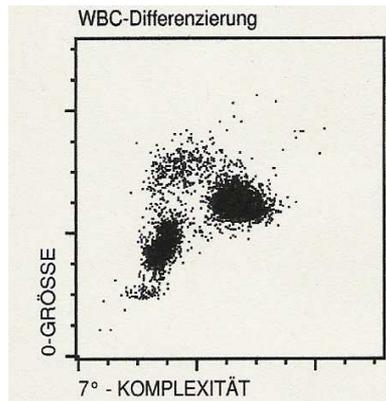


Abb. 6

Scattergramm einer Leukozytendifferenzierung mit Hilfe des CELLDYN Sapphire. Die 0° Lichtabschwächung wird gegen das 7° Streulicht dargestellt. Dadurch werden Größe und Komplexität der Zellen erfasst und es kann eine Unterteilung in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten erfolgen

Die Hämoglobinmessung erfolgt nach dem Prinzip der Absorptionsspektrometrie: Die Erythrozyten werden hierzu vollständig lysiert und das freigesetzte Hämoglobin in ein Einzelchromogen umgewandelt. Als erstes wird das durch die lysierte Probe transmittierte Licht gemessen, anschließend das durch ein reines Hämoglobinreagenz transmittierte Licht. Die Hämoglobinkonzentration wird nach folgender Gleichung ermittelt: Mittelwert der Messung am reinen Reagenz/ Mittelwert der Messung an der Probe.

Nach der Erfassung aller Daten erfolgt die Auswertung auf der Basis von Algorithmen einer interpretierenden Software. Dargestellt werden die Ergebnisse in Form von Scattergrammen, Histogrammen und Konturliniendarstellungen (Abb. 7)

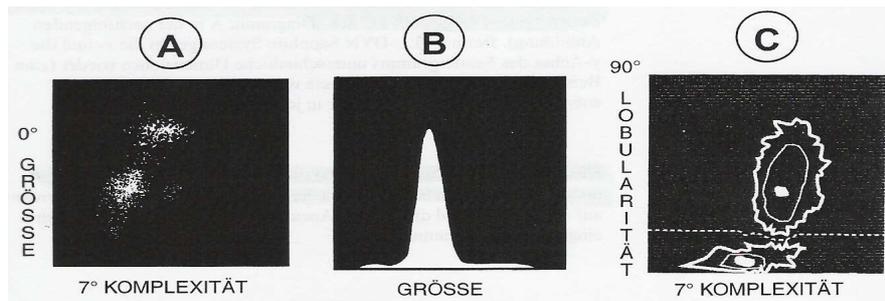


Abb. 7

Differenzierte Leukozytendarstellung durch das hämatologische Analysesystem CELLDYN Sapphire als Scattergramm (A), als Histogramm (B) mit Darstellung der relativen Anzahl der Ereignisse (y-Achse) gegen ihre Grösse (x-Achse) und als Konturliniendarstellung (C). Dabei sind Ereignisse gleicher Häufigkeit durch Linien miteinander verbunden und in Form von unregelmäßig gezackten Ringen werden die Maxima dargestellt (CELL-DYN Sapphire, 2005)

Ergebnisse, die ober- oder unterhalb eingestellter Grenzwerte liegen, werden vom Analysesystem erkannt und berichtet. Dazu gehören quantitative Bewertungen wie Leukozytose und Leukozytopenie sowie Neutropenie, Neutrophilie, Lymphopenie, Lymphozytose, Monozytose, Eosinophilie und Basophilie. Weiterhin wird das Vorhandensein atypischer oder unreifer Subpopulationen (Tab. 5) markiert und zusätzlich ein Index (CI) mit einem maximalen Wert von 0,94 angegeben, welcher die vom System ausgehende Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der eine solche Subpopulation auch tatsächlich vorhanden ist. (Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Germany).

Tab. 5

Morphologische Warnhinweise des CELL-DYN Sapphire

Warnhinweise	Bedeutung
BAND	Stabkernige Neutrophile vorhanden
IG	Unreife Granulozyten vorhanden
BLAST	Blasten vorhanden
VARLYM	Atypische Lymphozyten vorhanden

2.2 Patienten und Durchführung der Untersuchungen

Über einen Zeitraum von zwölf Monaten werden in EDTA-Entnahmeröhrchen entnommene und zur Erstellung eines großen Blutbildes an das Zentrallabor des Universitätsklinikums Rostock eingesandte Blutproben von 463 Patienten der Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikum Rostock zeitgleich an drei unterschiedlichen hämatologischen Analysegeräten untersucht und mit der jeweiligen, mittels eines computergestützten automatischen Mikroskopiersystems erstellten, morphologischen Referenz verglichen.

Das internistische Patientengut wurde für die Untersuchung zufällig aus der Notaufnahme, der Intensivstation und der hämatologisch-onkologischen Abteilung ausgewählt. Es wurden ausschließlich Patienten, die zum Untersuchungszeitpunkt älter als 18 Jahre waren, in die Studie aufgenommen. Die Selektion aus verschiedenen Abteilungen erfolgte, um möglichst viele Untersuchungsproben mit reaktiven oder pathologischen Veränderungen des weißen Blutbildes innerhalb des durch die Verfügbarkeit der verschiedenen Geräte limitierten Zeitraumes zu erfassen.

Nach Durchführung der angeforderten Untersuchungen am Routinehämatologiegerät wurden die Proben archiviert, gekühlt gelagert und innerhalb eines Zeitfensters von maximal vier Stunden nach der erfolgten venösen Blutentnahme mit Hilfe des automatischen Ausstrich- und Färbeautomaten SP-100 (Sysmex, Norderstedt) nach festgelegtem einheitlichem Protokoll fixiert, gefärbt, gespült und getrocknet (Maedel et al., 2007). Anschließend wurden die Proben an den Hämatologiegeräten XE 2100 (Sysmex, Norderstedt), LH 750 (Beckmann-Coulter, Krefeld) und CELL DYN Sapphire (Abbott, Wiesbaden) gemessen und die Ergebnisse dokumentiert und archiviert.

2.3. Mikroskopische Differenzierung

Alle Ausstriche, die die laborspezifischen Nachdifferenzierungskriterien erfüllten, wurden im Rahmen der Routineanalyser konventionell mikroskopiert. Davon unabhängig wurden alle erstellten Ausstriche mit Hilfe des automati-

sierten computergestützten Mikroskopierarbeitsplatzes Cellavision Diffmaster (Sysmex, Norderstedt) mikroskopiert. Auf jedem Ausstrichpräparat wurden 2x 200 kernhaltige Zellen bei der mechanischen meanderartigen Durchmusterung des Ausstriches erfasst, digital abgespeichert und aufgrund wissensbasierter morphologischer Kriterien bestimmten Zellpopulationen zugeordnet.

Das System ist in der Lage, die physiologischerweise auftretenden Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten, stabkernige und segmentkernige neutrophile Granulozyten sowie eosinophile und basophile Granulozyten) zu klassifizieren und nach morphologischen Kriterien zu gruppieren (Linssen et al., 2007). Aufgrund vorgegebener morphologischer Algorithmen werden auch nicht als normal einzuordnende unreife Granulozytenvorstufen und Blasten erkannt und entsprechend kategorisiert. Die möglichen Zuordnungen, die das System leisten kann, entsprechen denen, die man von der herkömmlichen Differenzierung kennt, allerdings muss die vom Gerät vorgeschlagene Klassifizierung der Leukozyten für jeden Ausstrich am Bildschirm visuell überprüft und gegebenenfalls durch Verschiebung der Zelle in die richtige Rubrik manuell korrigiert werden (s. Abb. 3).

Für die vorliegende Untersuchung wurden in jedem einzelnen Ausstrich durch den Diffmaster Octavia 400 weiße Blutzellen analysiert. Das Gerät benötigt dafür circa 13 Minuten, daher ist es möglich, 4-5 Blutausstriche pro Stunde durch das System zu analysieren (Ceelie et al., 2007). Die derart ermittelte endgültige mikroskopische Differenzierung der Ausstriche wurde anhand der Referenzwertintervalle (Tab. 6) entweder als quantitativ auffällig oder aufgrund der Identifizierung von unreifen oder atypischen Zellen als morphologisch und somit als qualitativ auffällig bewertet.

Tab. 6

Referenzwertintervalle für das Differentialblutbild erwachsener Patienten
(Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Rostock,
www.ilab.med.uni-rostock.de)

Differentialblutbild	Referenzintervall (absolut ($\times 10^9/l$))	Referenzintervall (relativ %)
basophile Granulozyten	0 - 0,01	0 - 1%
eosinophile Granulozyten	0 - 0,05	0 - 5%
Metamyelozyten	0 - 0,01	0 - 1%
stabkernige neutrophile Granulozyten	0 - 0,08	0 - 8%
segmentkernige neutrophile Granulozyten	0,36 - 0,84	36 - 84%
Lymphozyten	0,20 - 0,42	20 - 42%
Monozyten	0 - 0,15	0 - 15%

Die Differenzierungsergebnisse der drei hämatologischen Analysensysteme wurden mit den Ergebnissen der mikroskopischen Differentialblutbilder mit Hilfe von Korrelationsberechnungen nach Passing-Bablok durch Ermittlung von Korrelationsquotienten verglichen. Bezüglich der Analyse der Warnhinweise wurden Sensitivität, Spezifität und die Effizienz an Hand der richtig positiv, richtig negativ, falsch positiv und falsch negativ eingeteilten Ergebnisse ermittelt (s. Kap. 2.4).

2.4 Statistik

Der Vergleich der Geräte untereinander erfolgt als Methodenvergleich nach Passing Bablok, wobei die Proben an den einzelnen Geräten gemessen und dann als einzelne Messpunkte untereinander verglichen wurden. Der Methodenvergleich nach Passing Bablok ist ein Regressionsmodell zum Vergleich von zwei Messreihen, bei denen man nicht von einer Normalverteilung aus-

gehen kann und Varianzen nicht konstant sind. Bei dieser Methode werden Ausreißer nicht als grobe Fehler betrachtet und Fehler der Variablen berücksichtigt (Passing, Bablok, 1983). Somit ist der Vorteil dieses verteilungsunabhängigen Verfahrens, dass die Messwerte durch das Vorkommen von Werten, die entfernt von der Hauptmenge der Daten liegen, unbeeinflusst bleiben (Kohlhaas et al., 1993). Statistisch gesicherte Aussagen werden über den linearen Zusammenhang zwischen den Werten ermittelt ($y=a+bx$). Der Korrelationsquotient r wird als Produktmoment-Korrelationskoeffizient angegeben. Die Ergebnisse der automatisierten Differentialblutbilder wurden sowohl untereinander als auch mit den mikroskopischen Ergebnissen verglichen. Weicht der prozentuale Anteil der einzelnen Leukozytenpopulationen um 10% und mehr voneinander ab, so wurden diese Blubilder im Einzelnen näher erläutert (s. Kap.3.3). Die morphologischen Warnhinweise wurden nach folgenden Kriterien unterteilt.

<i>Richtig Positiv (RP)</i>
Hat ein System ein pathologisches Ereignis angezeigt und konnte das durch die mikroskopische Differenzierung belegt werden, so ist dieses Ergebnis richtig positiv
<i>Richtig Negativ (RN)</i>
Hat ein System ein Ereignis als unauffällig eingestuft und somit keinen Warnhinweis gegeben und wurde das Ereignis durch die mikroskopische Untersuchung ebenfalls als unauffällig eingestuft, ist dieses Ergebnis richtig negativ
<i>Falsch Positiv (FP)</i>
Das Ergebnis ist falsch positiv, wenn das System einen Warnhinweis gegeben hat, der durch die mikroskopische Differenzierung nicht bestätigt werden konnte
<i>Falsch Negativ (FN)</i>
Ein Ergebnis wird als falsch negativ bezeichnet, wenn das System ein Ereignis als unauffällig eingestuft hat, also keinen Warnhinweis gegeben hat, dennoch aber anhand der mikroskopischen Analyse eine pathologische Probe vorlag

Durch diese Unterteilung konnten diagnostische Sensitivität, Spezifität und Effizienz wie folgt errechnet werden.

<i>Sensitivität</i> ($RP \times 100\% / RP+FN$)
Vermögen der Untersuchungsmethode möglichst alle Proben mit pathologischen Veränderungen als solche zu erfassen
<i>Spezifität</i> ($RN \times 100\% / RN+FP$)
Vermögen der Untersuchungsmethode möglichst alle Proben ohne pathologische Veränderungen als solche zu erfassen
<i>Effizienz</i> ($(RP+RN) \times 100\% / RP+RN+FP+FN$)
Der Anteil richtiger Ergebnisse einer Untersuchungsmethode bezogen auf die Gesamtheit der untersuchten Ereignisse

3. Ergebnisse

3.1 Vergleichende Validierung von Parametern des Kleinen Blutbildes (Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl)

mit Hilfe von drei hämstologischen Analyseautomaten wurden die absoluten Werte für die Leukozyten-, Thrombozyten- und Erythrozytenzahl sowie die Hämoglobinkonzentration [mmol/l] und der Hämatokritwert als Dezimalbruch ermittelt.

Der Vergleich der durch die einzelnen durchflusszytometrischen Analysesysteme etwa zeitgleich gemessenen Werte der jeweils gleichen Proben erfolgte statistisch nach der Methode nach Passing Bablok, wie unter „Material und Methoden“ dargestellt.

Der Vergleich der durch die verschiedenen Geräte ermittelten Zählwerte für Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten und der gemessenen Hämoglobinkonzentrationen sowie die von den Geräten ermittelten Hämatokritwerte sind graphisch im Anhang in den Abbildungen A1-5 (a-c) dargestellt. Exemplarisch hierfür ist die Korrelation des Leukozytenvergleiches in Abb. 8 (a-c) dargestellt. Die nach Passing-Bablok berechneten Korrelationskoeffizienten (r) sind in der Tab. 7 zusammengefasst.

Die Hämoglobin- und Hämatokritbestimmungen; die an den verschiedenen Geräten gemessen wurden, zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Der lineare Zusammenhang wird durch Korrelationskoeffizienten zwischen 0,986 und 0,999 beschrieben. Auch die Ergebnisse der quantitativen Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenmessungen stimmen sehr gut überein, was durch Korrelationskoeffizienten zwischen 0,997 und 0,998 für die Leukozyten- mit 0,991 bis 0,995 für die Erythrozyten- und mit 0,992 bis 0,995 für die Thrombozytenzählung zum Ausdruck kommt.

Tab. 7

Zusammenfassung der Korrelationskoeffizienten³ nach Passing Bablok für die mit unterschiedlichen Analysesystemen bestimmten Parameter des kleinen Blutbildes

	Methoden x	Methoden y	r	Regressionsgerade
Leukozyten	System XE2100	LH 750	0,998	$Y = 0,993 * X - 0,045$
	System XE2100	Sapphire	0,998	$Y = 0,997 * X + 0,001$
	Sapphire	LH 750	0,997	$Y = 0,997 * X - 0,056$
Thrombozyten	System XE2100	LH 750	0,992	$Y = 0,893 * X + 0,097$
	System XE2100	Sapphire	0,995	$Y = 1,006 * X + 7,090$
	Sapphire	LH 750	0,994	$Y = 0,890 * X - 6,753$
Erythrozyten	System XE2100	LH 750	0,993	$Y = 0,988 * X + 0,077$
	System XE2100	Sapphire	0,995	$Y = 1,018 * X + 0,066$
	Sapphire	LH 750	0,991	$Y = 0,969 * X + 0,017$
Hämoglobin	System XE2100	LH 750	0,999	$Y = 1,012 * X - 0,120$
	System XE2100	Sapphire	0,995	$Y = 1,053 * X - 0,407$
	Sapphire	LH 750	0,996	$Y = 0,959 * X + 0,281$
Hämatokrit	System XE2100	LH 750	0,987	$Y = 1,000 * X - 0,010$
	System XE2100	Sapphire	0,989	$Y = 1,000 * X - 0,010$
	Sapphire	LH 750	0,986	$Y = 0,947 * X + 0,004$

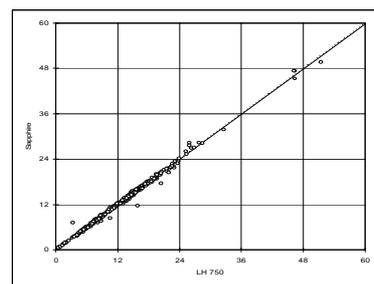
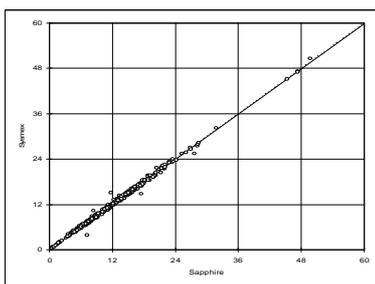
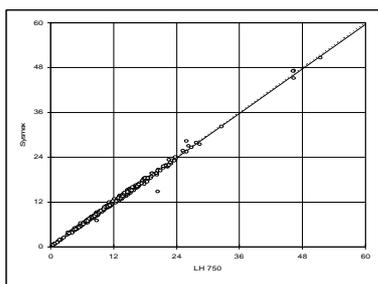


Abb. 8a-c

Darstellung der Vergleiche zwischen Leukozytenzahlen, die mit den durchflußzytometrischen Analysesystemen ermittelt wurden

³ Der Wert 1,0 zeigt den größten linearen Zusammenhang; der Wert 0,0 bedeutet, dass kein Zusammenhang besteht

3.2 Vergleichende Validierung von Differenzialblutbildern, die mittels hämatologischer Analysesysteme erstellt wurden

Die im Untersuchungszeitraum angeforderten 463 Differentialblutbilder wurden an drei Geräten (Sysmex XE 2100, Sapphire Cell Dyn und Coulter LH 750) durchflusszytometrisch und mikroskopisch differenziert. Verglichen werden konnten 427 Differentialblutbilder; 36 Blutbilder konnten auf Grund von Analyseverweigerung durch die Geräte oder auf Grund einer zu geringen Zellzahl im Ausstrich nicht zum Vergleich herangezogen werden. Die Ergebnisse der Analysesysteme wurden sowohl untereinander als auch mit der computergestützten mikroskopischen Auswertung (Referenz) verglichen (s. Anh., Tab.1). Im Rahmen dieser Auswertung werden sowohl die prozentuale Verteilung als auch die absoluten Zahlen der Leukozyten betrachtet.

Die mit durchflusszytometrischen hämatologischen Analysesystemen ermittelten relativen und absoluten Anteile der verschiedenen im peripheren Blut vorkommenden Leukozyten zeigen im Gerätevergleich unterschiedlich gute lineare Korrelationen. Mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,913 und 0,992 werden neutrophile Granulozyten und Lymphozyten prozentual vergleichbar gut von allen drei Gerätesystemen erkannt. Bei der Betrachtung der absoluten Zellzahlen werden ähnlich gute Korrelationen mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,833 und 0,997 erreicht. Die beste Übereinstimmung der Geräte wird für die Lymphozytendifferenzierung erzielt: Sie wird durch einen Korrelationskoeffizienten (r) zwischen 0,987 und 0,992 nach Passing-Bablok beschrieben (s. Anh., Tab.1).

Die Vergleichbarkeit der von den Geräten klassifizierten Monozytenanteile drückt sich in Korrelationskoeffizienten von 0,663 bis 0,841 und die der eosinophilen Granulozyten in Korrelationskoeffizienten von 0,802 bis 0,937 aus. Die von den unterschiedlichen Geräten erkannten basophilen Granulozyten zeigen dagegen nur eine geringe Übereinstimmungen (Korrelationskoeffizient 0,068 bis 0,407).

3.2.1 Vergleich von selektierten Differenzialblutbildern aus der Laborroutineanforderung

3.2.1.1 Neutrophilendifferenzierung

Bei der maschinellen Differenzierung neutrophiler Granulozyten werden segmentkernige, stabkernige Granulozyten sowie vereinzelt gefundene unreife granulozytäre Vorstufen wie Metamyelozyten unter „Neutrophilen“ zusammengefasst. Wie der Tab.1 im Anhang zu entnehmen ist, besteht eine akzeptabel gute Korrelation zwischen den Analysesystemen und der mikroskopischen Differenzierung mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,913 und 0,947. Beim Vergleich der relativen Werte sieht man die beste Übereinstimmung zwischen dem Sapphire Cell Dyn und dem Coulter LH 750 ($r = 0,967$). Bei den absoluten Werten erzielen der Sapphire Cell Dyn und der Sysmex XE 2100 die beste Übereinstimmung mit $r = 0,997$. Das Analysesystem von Sysmex (XE 2100) und der LH 750 stimmen geringfügig schlechter überein (relativ: $r = 0,939$, absolut: $r = 0,994$) Vergleicht man das Ergebnis der apparativen mit dem der mikroskopischen Differenzierung, so zeigt dieses bei den mit dem Sapphire Cell Dyn erzielten Differenzierungsergebnisse für Neutrophile die beste Übereinstimmung ($r = 0,943$ bzw. $r = 0,947$); die Übereinstimmung fällt für den Coulter LH 750 mit $r = 0,932$; $r = 0,946$ und für den Sysmex XE 2100 mit $r = 0,913$; $r = 0,942$ geringgradig ungünstiger aus. Im Anhang (Abb A6 a-f) wird die prozentuale Verteilung der Neutrophilen im Gerätevergleich und im Vergleich mit der mikroskopischen Differenzierung grafisch dargestellt.

3.2.1.2 Lymphozytendifferenzierung

Bei der Lymphozytendifferenzierung zeigt sich die größte Übereinstimmung für die Analysesysteme Sapphire Cell Dyn und Sysmex XE 2100 mit $r = 0,992$ für den relativen Anteil und $r = 0,997$ für den absoluten Anteil. Der Coulter LH 750 stimmt für die Lymphozytendifferenzierung mit dem Sysmex XE 2100 mit $r = 0,986$, der Coulter LH 750 und der Sapphire Cell Dyn stimmen ebenfalls gut überein ($r = 0,987$ für den relativen Zellanteil und $r = 0,986$ für die Be-

trachtung der absoluten Zellzahlen (s. Anh., Tab.1)).

Die mikroskopische Differenzierung zeigt mit der maschinellen Lymphozyten-differenzierung durch das Coulteranalysesystem LH 750 mit $r = 0,948$ für den relativen Anteil und durch den Sapphire Cell Dyn für die absoluten Zellzahlen mit $r = 0,839$ die beste Übereinstimmung. Auch für den Sysmex XE 2100 konnte mit der mikroskopischen Analyse ($r = 0,939$ bzw. $r = 0,833$) eine gute Vergleichbarkeit gezeigt werden (s. Anh. Abb. A7 a-f).

3.2.1.3 Monozytendifferenzierung

Beim Vergleich der Monozytendifferenzierung korrelieren die mit den verschiedenen Geräten ermittelten Werte mit Korrelationskoeffizienten nach Passing Bablok von 0,633 bis 0,841 (s. Anh. Tab.1 und Abb. A8 a-f). Exemplarisch werden die Monozytenkorrelationen in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 9 a-f) dargestellt. Die beste Wertekorrelation besteht zwischen dem Sapphire Cell Dyn und Sysmex XE 2100 mit $r = 0,811$ für die relativen Ergebnisse und $r = 0,841$ für die absoluten Zellzahlen. Die beste Übereinstimmung mit der mikroskopischen Differenzierung wird vom Sysmex XE 2100 mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,788 erreicht, gefolgt vom Sapphire Cell Dyn mit $r = 0,737$. Betrachtet man die Ergebnisse der absoluten Zahlen, so erreicht hier der Sapphire die beste Korrelation mit $r = 0,799$, gefolgt vom Sysmex XE 2100 mit $r = 0,794$. Der Coulter LH 750 erreicht Übereinstimmungen mit $r = 0,663$ für den prozentualen Anteil und $r = 0,679$ für den absoluten Anteil. Tendenziell werden im Vergleich der absoluten Zellzahlen bessere Übereinstimmungen erreicht.

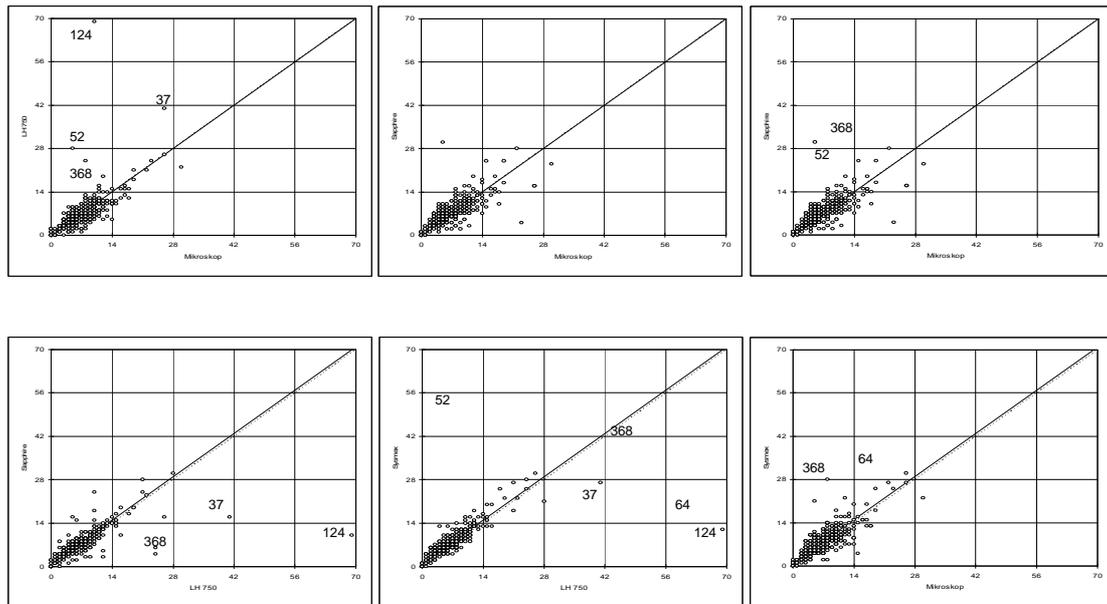


Abb. 9

Darstellung der Vergleichsmessungen von Monozytenanteilen, die mit den zytometrischen Analysesystemen (Sysmex XE 2100, Sapphire Cell Dyn, Coulter LH 750) und mikroskopisch ermittelt wurden.

3.2.1.4 Eosinophilendifferenzierung

Die mit den verschiedenen Analysesystemen erfolgte Differenzierung von eosinophilen Granulozyten zeigt eine, gegenüber den bisher betrachteten Zellpopulationen, deutlich geringere aber noch akzeptable Übereinstimmung, wobei sich Korrelationskoeffizienten zwischen 0,806 und 0,940 errechnen lassen (s. Anh. Tab.1 und Abb. A4 a-f). Die grafische Darstellung der Vergleiche ist exemplarisch der Abb. 10 zu entnehmen. Die Übereinstimmung mit der mikroskopischen Differenzierung kommt mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,802 und 0,988 zum Ausdruck. Die beste Übereinstimmung mit der Mikroskopie ergibt sich für den Sysmex XE 2100 mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,866$ und $r = 0,839$. Beim Vergleich des Sysmex XE 2100 mit dem Coulter LH 750 ergibt sich ein linearer Zusammenhang von $r = 0,835$ bzw. $r = 0,833$ und beim Vergleich der mit dem Sysmex XE 2100 und dem Sapphire Cell Dyn ermittelten relativen und absoluten Werte ($r = 0,937$ und $r = 0,940$). Für den Sapphire Cell Dyn und den Coulter LH 750 errechnet sich eine Übereinstimmung mit $r = 0,810$ bzw. $r = 0,806$. Somit erreichen der Sysmex XE 2100 und der Sapphire Cell Dyn die beste Übereinstimmung für die

Eosinophilenerkennung.

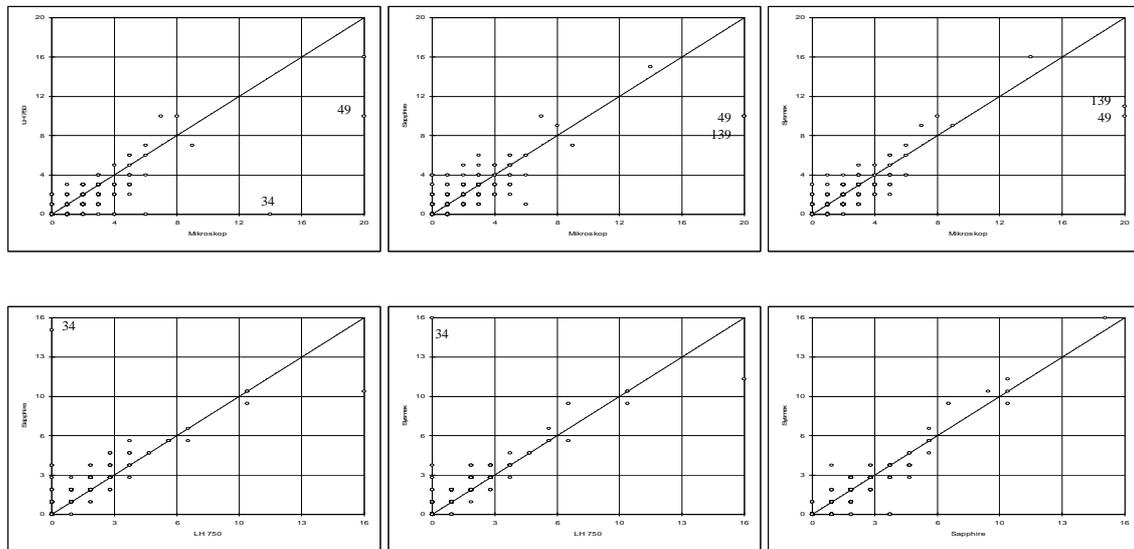


Abb. 10

Darstellung der Vergleichsmessung von Eosinophilenanteilen, die mit den zytometrischen Analysesystemen (Sysmex XE 2100, Sapphire Cell Dyn, Coulter LH 750) und mikroskopisch ermittelt wurden

3.2.1.5 Basophilendifferenzierung

Bei der Basophilendifferenzierung ist weder bei der Betrachtung der relativen Anteile noch bei der Analyse der absoluten Zellzahlen ein linearer Zusammenhang zwischen den mit den verschiedenen Geräten als basophile Neutrophile erkannten Zellen und den mikroskopischen differenzierten Basophilen zu erkennen. Die Korrelationskoeffizienten bewegen sich im Bereich 0,078 und 0,407, wobei der Coulter LH 750 und der Sapphire Cell Dyn die geringste Korrelation untereinander bei der Bestimmung des relativen Anteils aufweist ($r = 0,114$). Bei der Zählung der absoluten Basophilenzahl besteht für den Coulter LH 750 und den Sysmex XE 2100 die geringste Übereinstimmung mit $r = 0,007$. Beim weiteren Gerätevergleich stimmen der Sapphire Cell Dyn und der Sysmex XE 2100 am Besten überein ($r = 0,407 / r = 0,158$). Beim Vergleich mit der mikroskopischen Analyse schneidet bei der prozentualen Betrachtung der Coulter LH 750 am Schlechtesten ab ($r = 0,078$). Bei den

absoluten Werten kommt der Sapphire Cell Dyn lediglich auf eine Korrelation von $r = 0,169$. Die beste Übereinstimmung mit der Mikroskopie besteht, sowohl für die prozentuale als auch für die absolute Zählung, für den Sysmex XE 2100 ($r = 0,335$ bzw. $r = 0,338$).

3.3 Beschreibung von Blutbildern, die im Rahmen der Untersuchung durch Abweichungen aufgefallen sind

In der im Anhang befindlichen Tab.2 werden die Differentialblutbilder aufgeführt, die um mehr als 10% bei der Aufteilung der einzelnen Zellpopulationen voneinander abweichen. Nachfolgend werden diese Blutbilder im Einzelnen näher beschrieben.

Blutbild 6, 9, 12, 35, 93, 254

Alle Geräte ermitteln bei diesen Blutbildanalysen gleichsinnig höhere Lymphozytenzellzahlen und niedrigere neutrophile Zellzahlen. Die möglichen Ursachen, z.B. Ausstrichartefakte (s. Abb. 11), werden an anderer Stelle diskutiert (Seite 60 f.)

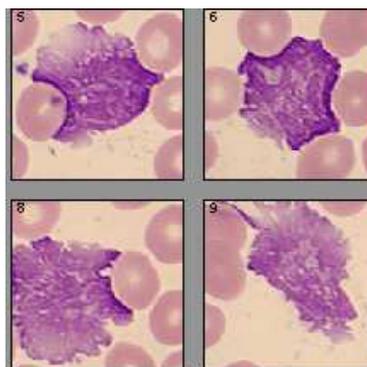


Abb. 11

Darstellung von einer Auswahl an Zellfragmenten, die durch den mechanischen Ausstreichvorgang entstanden sind und somit zur Zelldifferenzierung nicht mehr zur Verfügung stehen

Blutbild 11

Bei diesem peripheren Blutausstrich (Abb. 12) kommt es zu einer abweichenden prozentualen Verteilung von Neutrophilen und Monozyten. Alle Geräte ermittelten ungefähr 10% niedrigere Neutrophilenzellzahlen und stattdessen um 10% erhöhte Monozytenzellzahlen. Ursachen für mögliche Fehlzuordnungen der Monozyten und Granulozyten werden in der Diskussion aufgezeigt. Es ist zu erwähnen, dass bei diesem Blutbild eine Neutrophilie vorliegt.

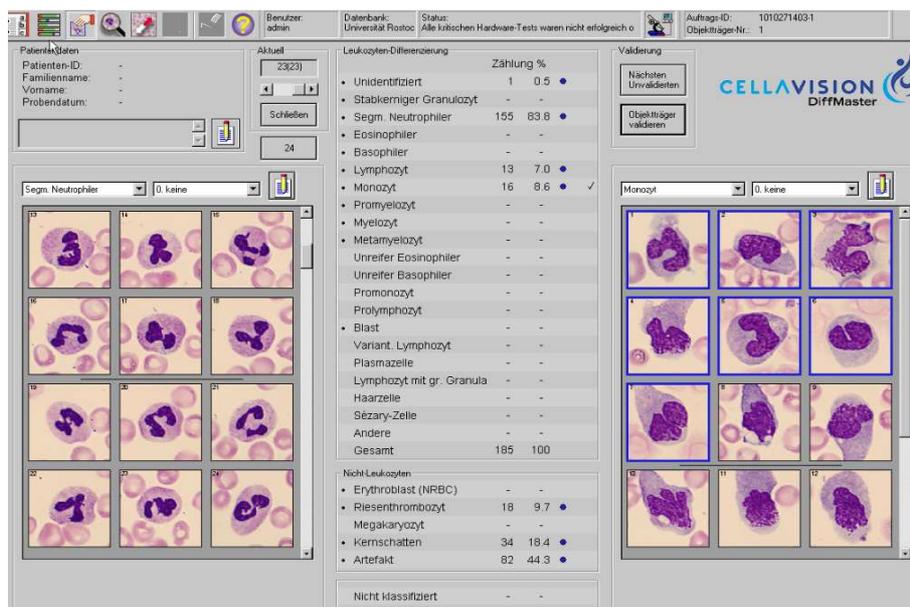


Abb. 12

Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 11, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde.

Abgebildet ist die Zuordnung der Zellen zu segmentkernigen Neutrophilen und Monozyten durch das Cellavision-System.

Blutbild 14

Bei diesem Blutbild haben alle verwendeten Hämatologiegeräte vermeintlich zu hohe Lymphozytenwerte ermittelt. Bei der mikroskopischen Differenzierung wurden 12% Blasten differenziert (Abb. 13). Diese werden durch die drei durchflußzytometrischen Analysesysteme quantitativ nicht erfasst, sondern sie geben bei Erkennen von Blasten nur einen qualitativen morphologischen Warnhinweis. Offensichtlich werden die Blasten von den Geräten den Lymphozyten zugeordnet, wodurch sich gegebenenfalls die hohen Lymphozyten-

werte bei annähernd gleichen prozentualen Verteilungen in den anderen Zellreihen erklären lassen.

Weiterhin besteht eine Neutropenie, welche durch alle Geräte richtig erkannt und durch den Coulter LH 750 sowie den Symex XE 2100 als Warnhinweis markiert wird.

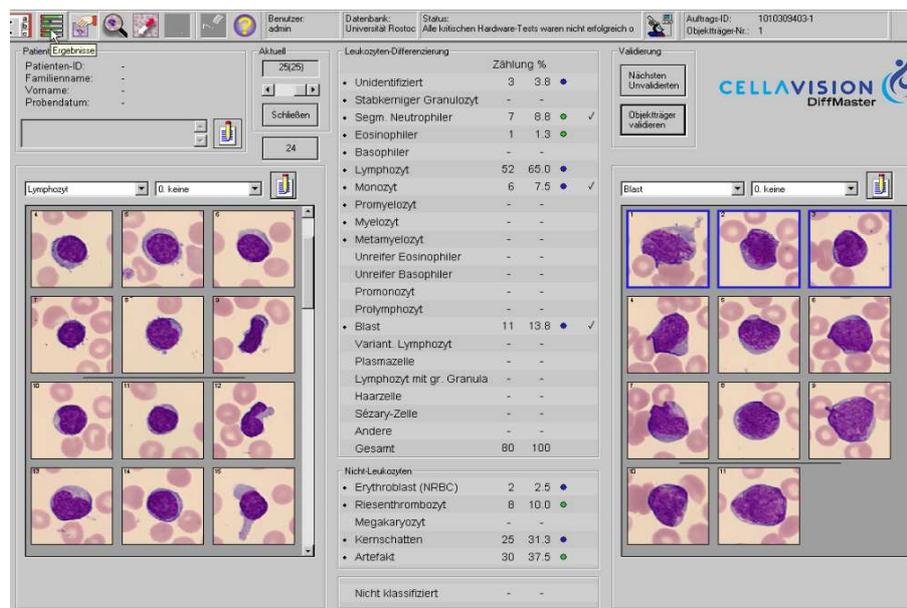


Abb. 13

Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 14, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde. Dargestellt wird die Zuordnung der Zellen zu Lymphozyten und Blasten durch das Cellavision-System.

Blutbild 16

Bei der apparativen Differenzierung werden bei dieser Probe durch alle Geräte Monozyten der Lymphozytenpopulation zugeordnet, wodurch es zu niedrigeren Monozyten- und zu höheren Lymphozytenwerten kommt. Auffallend ist in diesem Ausstrich die Einkerbung der Lymphozytenkerne, welche den Geräten möglicherweise eine genaue Zuordnung zu Monozyten erschwerte und diese Zellen eher den Lymphozyten zugeordnet wurden (s. Abb. 14). Zudem fällt ein hoher Anteil an Riesenthrombozyten auf, welcher auch ursächlich für die Fehlklassifizierung sein könnte. Ein Warnhinweis auf atypische Lymphozyten wird durch keines der Geräte gegeben. Diesem Blutbild liegt die klinische Diagnose einer Makroglobulinämie Waldenström zugrunde. Eine nähere Er-

läuterung zu diesem Krankheitsbild und der differentialblutbildlichen Erkennung findet sich im Diskussionsteil (S.64) dieser Arbeit.

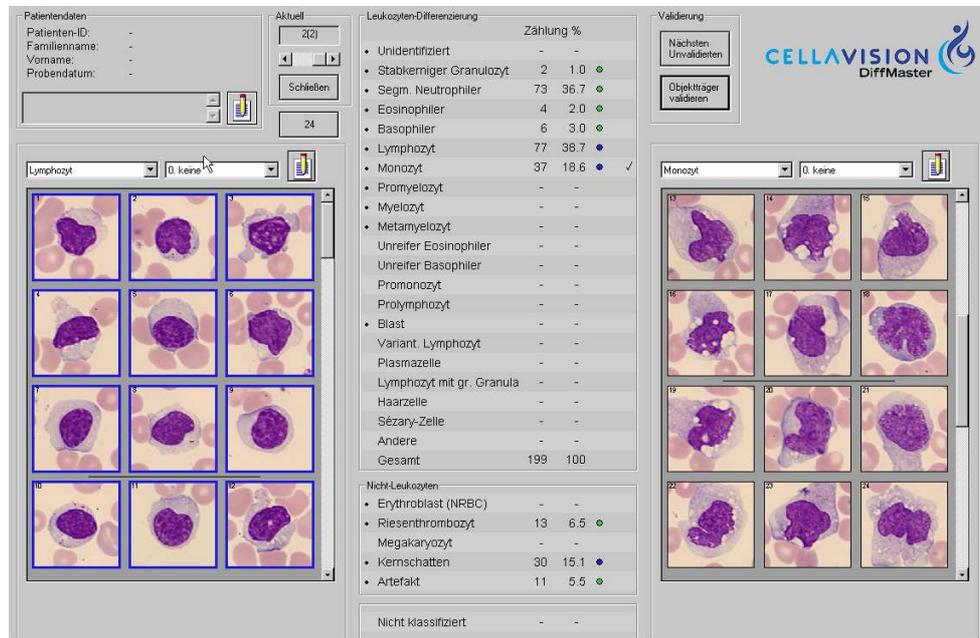


Abb. 14

Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 16, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde. Dargestellt ist die Zuordnung der Zellen zu Lymphozyten und Monozyten durch das Cellavision-System.

Blutbild 34

Die Differenzierungsergebnisse des Sapphire Cell Dyn und des Symex XE 2100 sind annähernd kongruent mit der mikroskopischen Differenzierung. Der Coulter LH 750 differenziert in diesem Fall allerdings keine Eosinophilen. Es ist davon auszugehen, dass die eosinophile Zellpopulation vollständig den neutrophilen Granulozyten zugeordnet wurde. Es wurde daher kein Hinweis auf eine Eosinophilie gegeben, allerdings weist das Gerät auf unreife Granulozyten hin, welche im peripheren Ausstrich nicht gefunden werden konnten.

Blutbild 37

In diesem peripheren Blutausstrich fällt eine pathologische Linksverschiebung

mit 12% Myelozyten auf. Unabhängig davon werden 6% Erythroblasten gefunden. Alle drei Analysesysteme differenzieren hier sehr unterschiedlich und abweichend von der mikroskopischen Differenzierung. Da die Geräte keine Klassifizierung in unreife Granulozyten (Stabkernige, Metamyelozyten und Myelozyten) erlauben, wird die mikroskopisch ermittelte Summe dieser mit der von den Geräten ermittelten Neutrophilenzahl verglichen. Eine morphologische Warnung bezüglich unreifer Granulozyten erfolgt bei dieser Probe nur durch den Sysmex XE 2100.

Blutbild 41

In dieser Probe werden mikroskopisch 6% Blasten und 1% Plasmazellen differenziert, welche aber quantitativ nicht durch die apparativen Analysesysteme erfasst werden. Morphologisch wird von allen Geräten ein Warnhinweis für Blasten gegeben.

Allerdings differenzieren der Sapphire Cell Dyn und der Sysmex XE 2100 nur 12% bzw. 18% Neutrophile, statt der 33% die mikroskopisch gefunden werden. Desweiteren werden durch den Coulter LH 750 falsch niedrige Monozytenwerte und durch den Cell Dyn Sapphire falsch hohe Monozytenwerte angegeben. Die prozentuale Verteilung des Differenzialblutbildes ist auch der Tabelle 2 im Anhang zu entnehmen. Mögliche Ursachen für die fehlerhafte Zuordnung von Neutrophilen und Lymphozyten sind in der Diskussion aufgeführt. Insgesamt ist dieses Blutbild als pathologisch einzustufen. Mikroskopisch findet man unreife granulozytäre Vorstufen, Blasten und eine Plasmazelle. Reife segmentkernige Neutrophile sind in nur in relativ geringer Zahl vorhanden. Alle Geräte setzen diverse Warnhinweise, so dass dieses Blutbild in jedem Fall einer Nachdifferenzierung unterzogen worden wäre.

Blutbild 49

In diesem Ausstrich fallen circa 10% Riesenthrombozyten (s. Abb. 15) auf, welche aufgrund ihrer Größe durch die Geräte offensichtlich den Lymphozyten zugeordnet werden. Der Sysmex XE 2100 und der Coulter LH 750 geben einen Warnhinweis für die gleichfalls vorliegende Eosinophilie.

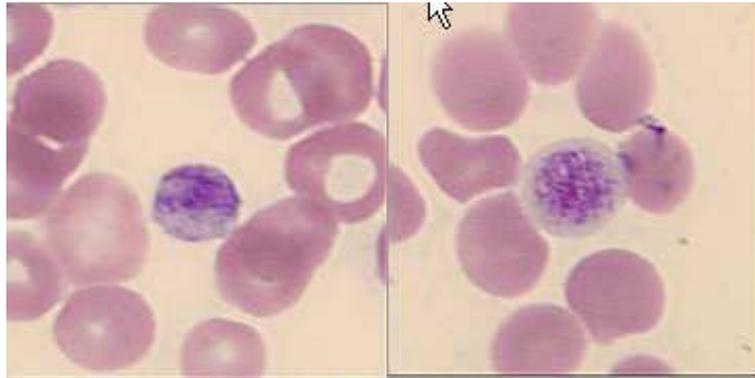


Abb. 15

Darstellung zweier Riesenthrombozyten durch das Cellavision-System

Blutbild 52

Bei dieser Probe ermitteln die drei Analysesysteme relativ höhere Monozytenzahlen als sich bei der mikroskopischen Differenzierung finden lassen. Dieses lässt sich durch die fehlende quantitative Erfassung von Monoblasten durch die apparativen Systeme erklären. Mit der computerassistierten Mikroskopie (s. Abb. 16) werden 18% Blasten ermittelt, welche von den Analyseautomaten wohl den Monozyten zugeordnet werden. Allerdings wird durch alle drei Geräte ein morphologischer Warnhinweis auf Blasten gesetzt. Des Weiteren finden sich niedrigere Neutrophilenzahlen (Differenz zwischen 17% und 12%) und höhere Lymphozytenwerte (Differenz zwischen 6% und 18%). Dieser Sachverhalt ist wiederum am Ehesten auf das Vorhandensein von nacktkernigen Zellen zurückzuführen, darauf wird in der Diskussion (S.57 ff.) noch näher eingegangen.



Abb. 16

Bildschirmpräsentation der mikroskopischen Befunde des Blutbildes 52, die mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurden.

Dargestellt werden jeweils die Zuordnungen der Zellen zu Monozyten und Monoblasten durch das Cellavision-System.

Blutbild 64

Es liegt mikroskopisch eine Verteilung von 47% Neutrophilen, 26% Lymphozyten und 26% Monozyten vor. Der Coulter LH 750 misst ebenfalls 46% Neutrophile, 27% Lymphozyten und 26% Monozyten. Der Sapphire Cell Dyn zählt 46% Neutrophilen, aber 36% Lymphozyten und 16% Monozyten. Somit werden durch dieses Gerät Monozyten nicht als solche erkannt, sondern den Lymphozyten zugeordnet. Der Sysmex XE 2100 zählt wiederum nur 39% Neutrophile, aber dafür 31% Lymphozyten und 30% Monozyten. Bei der mikroskopischen Betrachtung fallen 17% Myelozyten, 3% Metamyelozyten und 3% Blasten auf. Möglicherweise werden die myeloischen Vorläuferzellen durch den Sysmex XE 2100 als Monozyten klassifiziert. Jedoch wird durch alle Geräte ein „Blasten-“, „Monoblasten-“ und „unreife Granulozyten-“ Warnhinweis gegeben. Dieses Blutbild gehört zu einem Patienten mit der Diagnose einer AML⁴, MDS⁵ unter zytostatischer Therapie. Durch das richtige Setzen der Warnhinweise aller Geräte kommt dieses Blutbild in die mikroskopische

⁴ Akute myeloische Leukämie

⁵ Myelodysplastisches Syndrom

Nachdifferenzierung.

Blutbild 121, 171

Bei der Blutprobe 121 ermitteln alle drei Geräte eine annähernd identische prozentuale Lymphozyten- und Neutrophilenverteilung. Mikroskopisch werden jedoch weniger Lymphozyten differenziert und im Gegenzug mehr Neutrophile.

Bei der Probe 171 findet man die umgekehrte Situation. Die Analysesysteme geben eine prozentuale Verteilung von 27% - 30% Lymphozyten (vs. 46%) und 62% - 67% Neutrophile (vs. 39%) an. Erklärungsansätze sind im Diskussionsteil meiner Arbeit zu finden (s.S. 69).

Blutbild 124

Fälschlicherweise kommt der Coulter LH 750 bei diesem Blutbild auf eine Verteilung von 69% Monozyten und 6% Neutrophile. In der mikroskopischen Differenzierung finden sich nur 10% Monozyten (s. Abb. 17), was mit dem Ergebnis der apparativen Differenzierung durch die beiden anderen Geräte übereinstimmt. Entsprechend stimmt auch der relative Neutrophilenanteil der anderen Geräte mit der mikroskopischen Differenzierung überein. Auf diese Problematik gehe ich in der Diskussion (s. S. 57f.) näher ein.

Der Coulter LH 750 gibt den morphologischen Warnhinweis „Monoblasten“ und empfiehlt das Differentialblutbild zu überprüfen. Auch der Sysmex XE 2100 gibt einen Blastenhinweis. In der mikroskopischen Differenzierung konnten allerdings keine Blasten gefunden werden.

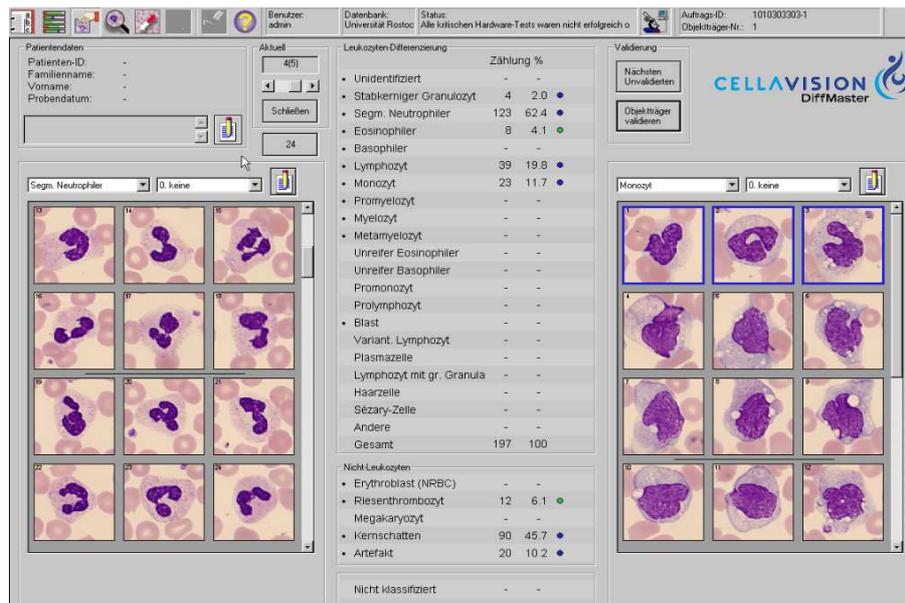


Abb. 17

Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 124, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde.

Dargestellt wird die Zuordnung der Zellen zu segmentkernigen Neutrophilen und Monozyten durch das Cellavision-System.

Blutbild 139

Der Sysmex XE 2100 und der Cell Dyn Sapphire messen sowohl einen falsch niedrigen Eosinophilenanteil als auch einen falsch niedrigen Neutrophilenanteil. Die relativen Lymphozytenanteile sind dem entsprechend höher. Die Differenzierung des Coulter LH 750 entspricht annähernd der mikroskopischen Verteilung. Der Sysmex flagt „abnorme Lymphozyten, Lymphoblasten“, der Sapphire gibt den Hinweis „VARLYM“, der Coulter und der Sysmex flagen beide eine Eosinophilie. Es handelt sich bei diesem Blutbild um die Diagnose einer CLL⁶, die durch den Sysmex XE 2100 richtig geflagt wird. Bei diesem Blutaussstrich konnten unter dem Mikroskop zahlreiche zerstörte Zellen (Kernschatten) gefunden werden (s. Abb. 18). Näheres dazu siehe Diskussion (S. 60).

⁶ Chronisch lymphatische Leukämie

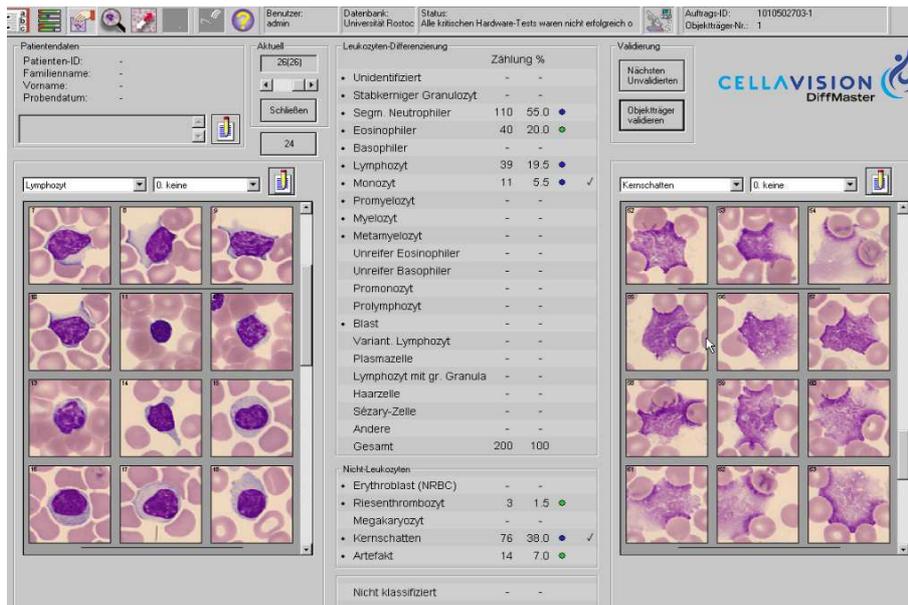


Abb. 18

Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 139, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde.

Links die Einordnung der Lymphozyten, rechts exemplarisch ein Anteil der Kernschatten

Blutbild 232

Alle automatischen Analysensysteme zeigen bei dieser Probe ein ähnliches relatives Verteilungsmuster der differenzierten Zellen. Beim Vergleich mit der mikroskopischen Differenzierung (s. Abb. 19) wurden von allen Geräten im Vergleich zur computerassistierten Mikroskopie zu hohe Lymphozytenzahlen gemessen. Entsprechend werden die relativen Anteile der Neutrophilen und der Monozyten zu niedrig gegenüber der Mikroskopie angegeben.

Dieses Blutbild fällt durch eine relative Neutropenie und eine relative Lymphozytose auf, was auch alle Geräte erkennen. Zusätzlich zu diesem quantitativen Hinweis gibt der Coulter LH 750 auch einen morphologischen Hinweis auf atypische Lymphozyten, näheres siehe Diskussion S. 65). Zudem finden sich im mikroskopischen Ausstrich, wie auch bei dem Blutbild 139, reichlich Kernschatten, die sich auf das Relativverhältnis auswirken könnten.

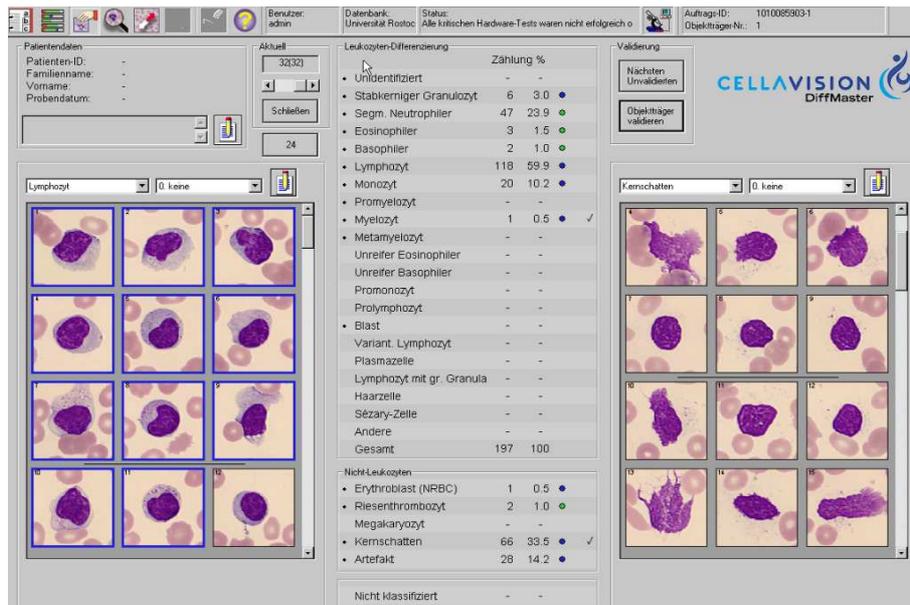


Abb. 19

Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 232, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde.

Links die Einordnung der Lymphozyten, rechts exemplarisch ein Anteil der klassifizierten Kernschatten, die zum Teil aber als sogenannte „Nacktkernige“ hätten eingeordnet werden müssen.

Blutbild 368

Es finden sich Abweichungen bezüglich des Neutrophilenanteils, wobei mikroskopisch und durch den Sapphire Cell Dyn 88% bzw. 87% erfasst werden, der Coulter LH 750 misst 71% und der Sysmex XE 2100 64%. Die Monozyten werden vom Coulter LH 750 mit 24%, vom Sysmex XE 2100 mit 28% und vom Sapphire Cell Dyn, wie auch ähnlich von der mikroskopischen Differenzierung mit 8% bzw. 6% Monozyten angegeben. Der prozentuale Anteil an Lymphozyten ist sowohl bei den drei Geräten als auch bei der mikroskopischen Differenzierung annähernd gleich. In der Probe 368 fallen weiterhin 10% unreife granulozytäre Vorstufen (Myelozyten und Metamyelozyten) sowie 10% stabförmige Granulozyten auf. Es kann daher angenommen werden, dass diese Vorstufen auf Grund ihrer Zellgröße und Kernformatierung, den Monozyten zugeordnet wurden. Alle Geräte geben einen Hinweis auf unreife Vorstufen und eine Linksverschiebung. Der Sysmex und der LH 750 geben zudem einen Blastenflag an.

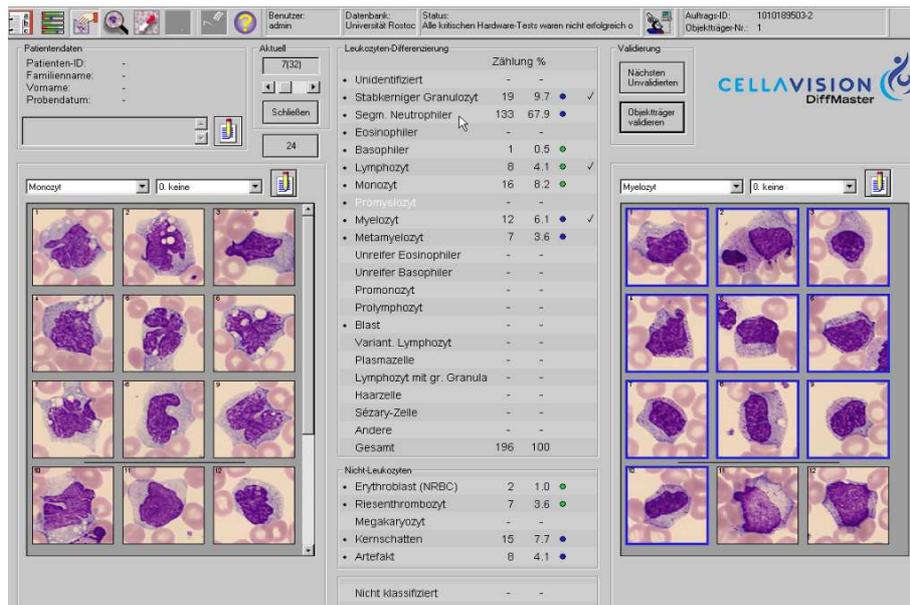


Abb. 20

Bildschirmpräsentation des mikroskopischen Befundes Blutbild 368, der mit dem „Diffmaster Octavia“ erstellt wurde.

Links die Einordnung der Monozyten, rechts die Einordnung der unreifen granulozytären Vorstufen (in diesem Fall Myelozyten).

3.4 Auswertung morphologischer Warnhinweise

Zu den morphologischen Warnhinweisen gehören Hinweise auf das Vorhandensein von unreifen Granulozyten (Metamyelozyten, Myelozyten, Promyelozyten), Hinweise auf eine Linksverschiebungen (mehr als 8% stabkernige Granulozyten), auf das Auftreten von Blasten der lymphatischen und granulozytären Zellreihen und das Vorhandensein kernhaltiger erythrozytärer Vorstufen (NRBC).

Die Geräte kennzeichnen das Auftreten solcher Ereignisse durch sogenannte „Flags“ (s. Tab. 8). Die Wertigkeit dieser Warnhinweise wird mit Hilfe der mikroskopischen Differenzierung geprüft und mittels der Berechnung von Spezifität, Sensitivität und Effizienz dargestellt (s. Tab. 9).

Unauffällige Proben werden durch den Coulter LH 750 mit einer Spezifität von 70,5% erkannt. Der Sapphire Cell Dyn erreicht eine Spezifität von 97,4% und der Sysmex XE 2100 erkennt 87,2% als richtig negativ.

Tab. 8

Übersicht über die gerätetypischen Warnhinweise.

	LH 750	Sapphire	Sysmex
Unauffällige Probe	Kein Flag	kein Flag	kein Flag
Unreife Granulozyten (Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten)	Gran 2	IG Ns	unreife Gran IG
Linksverschiebung (Stabförmige Granulozyten > 8%)	Gran 1	BAND Ns, N%	Linksversch Neutro+
Blasten, atypische Lymphozyten	Lympho-, Mono-, NE- Blasten atypische Lymphozyten	BLAST VARLYM %L, Ls	Blasts Abn Lympho atyp Lympho
Erythrozytäre Vorstufen	NRBC	NRBC	NRBC

Ein auffälliges Blutbild wird durch einen Warnhinweis markiert, wobei die Art des Warnhinweises keine Rolle spielt. So erreicht der Sysmex XE2100 eine Sensitivität von 84,7%. Der Sapphire Cell Dyn kommt auf eine Sensitivität von 71,0% und der Coulter LH 750 erreicht eine Sensitivität für solche allgemein pathologischen Flags von 92,2%. Somit hat der Coulter LH 750 die höchste Sensitivität im Vergleich der Geräte untereinander, jedoch damit einhergehend die niedrigste Spezifität. Der Sysmex XE 2100 erreicht eine Sensitivität von 84,7% und eine Spezifität von 87,2%. Der Sapphire Cell Dyn erreicht die beste Spezifität, darunter leidet aber wiederum die Sensitivität mit nur 71,0%. Für den Warnhinweis „unreife Granulozyten“ wird durch den Coulter LH 750 eine Sensitivität von 66,6%, durch den Sapphire Cell Dyn eine Sensitivität von 31,0% und durch den Sysmex XE 2100 eine Sensitivität von 70,1% erreicht. Durch den Sysmex XE 2100 werden folglich die meisten Blutbilder mit unreifen Granulozyten auch durch den entsprechenden Warnhinweis erkannt. Auch bezüglich der Spezifität erreicht der Sysmex XE 2100 das beste Ergebnis mit 97,6%. Der Sapphire Cell Dyn erkennt 93,8% der Blutbilder bezogen auf unreife Granulozyten als richtig negativ und der Coulter LH 750 79,4%. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich für den Sysmex XE 2100 eine Effizienz von 92,0%, für den Coulter LH 750 eine Effizienz von 76,8% und für den Sapphire Cell Dyn eine Effizienz von 81,0% ermitteln.

Tab. 9
Sensitivität, Spezifität und Effizienz morphologischer Warnhinweise

Auffällig		Sysmex XE 2100	LH 750	Sapphire Cell Dyn
	RP	295	321	247
Unauffällig	FN	53	27	101
	RP	68	55	76
Unreife Granulozyten	FP	10	23	2
	Sensitivität	84,70%	92,20%	71,00%
Linksverschiebung	Spezifität	87,20%	70,50%	97,40%
	Effizienz	85,20%	88,30%	75,80%
Blasten/atyp Zellen		Sysmex XE 2100	LH 750	Sapphire Cell Dyn
	RP	61	58	27
NRBC	FP	8	70	21
	RN	331	269	318
Linksverschiebung	FN	26	29	60
	Sensitivität	70,10%	66,60%	31,00%
Blasten/atyp Zellen	Spezifität	97,60%	79,40%	93,80%
	Effizienz	92,00%	76,80%	81,00%
NRBC		Sysmex XE 2100	LH 750	Sapphire Cell Dyn
	RP	134	130	109
Blasten/atyp Zellen	FP	36	106	65
	RN	238	168	209
NRBC	FN	18	22	43
	Sensitivität	88,20%	85,50%	71,70%
Blasten/atyp Zellen	Spezifität	86,90%	61,30%	76,30%
	Effizienz	87,30%	70,00%	74,60%
NRBC		Sysmex XE 2100	LH 750	Sapphire Cell Dyn
	RP	27	18	14
Blasten/atyp Zellen	FP	62	14	11
	RN	326	374	377
NRBC	FN	11	20	24
	Sensitivität	71,10%	47,40%	36,80%
Blasten/atyp Zellen	Spezifität	84,00%	96,40%	97,20%
	Effizienz	82,90%	92,00%	91,80%
NRBC		Sysmex XE 2100	LH 750⁷	Sapphire Cell Dyn⁵
	RP	2	0	0
Blasten/atyp Zellen	FP	30	0	1
	RN	393	423	422
NRBC	FN	7	9	9
	Sensitivität	22,20%	-	-
Blasten/atyp Zellen	Spezifität	92,90%	-	-
	Effizienz	91,4%	-	-

⁷ Fehlende Erkennung von Erythroblasten durch das Gerät

Eine Linksverschiebung wird durch den LH 750 mit einer Sensitivität von 85,5% erkannt und durch den Flag „Gran1“ ausgedrückt. Dieser Flag wird auch häufig bei unauffälligen Blutbildern gesetzt, so dass das Gerät eine Spezifität von nur 61,3% erreicht. Der Sapphire erkennt bei 71,7% der Blutbilder eine richtig positive Linksverschiebung und 76,3% als richtig negativ, dagegen erreicht der Sysmex XE 2100 eine Sensitivität von 88,2% und eine Spezifität von 86,9%.

Der Coulter LH 750 erreicht bezüglich des Warnhinweises „Linksverschiebung“ eine Effizienz von 70,0%, der Sapphire Cell Dyn erreicht 74,6% und der Sysmex XE 2100 87,3%. Somit erkennt der Sysmex XE 2100 im Vergleich der drei Geräte die meisten pathologischen Blutbilder als richtig positiv und die meisten unauffälligen Blutbilder auch als richtig negativ.

Bei der Erkennung von Blasten erreicht der Coulter LH 750 eine Sensitivität von 47,4%, der Sapphire Cell Dyn von 36,8% und der XE 2100 von 71,1%. Das heißt, dass Blasten in den Blutausrichen, wenn auch in unterschiedlichen Ausmaß, wirklich als solche erkannt und richtig geflagt werden. Die Anzahl der als richtig erkannten unauffälligen Blutbilder ist mit 96,4% beim Coulter LH 750, mit 97,2% beim Sapphire Cell Dyn und mit 84,0% beim Sysmex XE 2100 erfreulich hoch. Auffällig ist, dass durch den Sysmex XE 2100 häufig der Flag „abn Ly/L-BI“ (abnorme Lymphozyten/ Lymphoblasten) bei einer Lymphopenie (verminderter Lymphozytenzahl) erfolgt, jedoch mikroskopisch kein Blastennachweis erfolgen kann. Die Effizienzen betragen für den Coulter LH 750 92,0%, für den Sapphire Cell Dyn 91,8% und für den Sysmex XE 2100 82,9%.

Unter allen untersuchten Blutproben fanden sich lediglich neun Proben mit dem mikroskopischen Nachweis erythrozytärer Vorstufen. Nur der Sysmex XE 2100 erkannte zwei dieser neun Proben und gab den entsprechenden Warnhinweis. So erreicht dieses Gerät eine Sensitivität von 22,22% für den Nachweis von Erythroblasten. Die anderen Geräte erwiesen sich in unserer Untersuchung als hierzu nicht in der Lage.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden Blutbilder von 463 Patientenblutproben, die mit drei hämatologischen Analysegeräten (Sysmex XE 2100, Coulter LH 750 und Cell Dyn Sapphire) analysiert wurden, miteinander verglichen, wobei die mit einem System maschinell ermittelten Kenngrößen des kleinen Blutbildes und des Differentialblutbildes mit denen verglichen werden, die mit dem jeweils anderen Analysesystem gemessen wurden. In einem weiteren Schritt sollten die Ergebnisse der apparativen Differenzierung mit den Ergebnissen der digitalisierten computergestützten Mikroskopie verglichen werden. Hierbei wird besonders Wert auf die Frage gelegt, ob die von den einzelnen Geräten gegebenen morphologischer Warnhinweise mit morphologischen Auffälligkeiten im Ausstrich korrelieren.

4.1 Übereinstimmungen der an den verschiedenen Geräten ermittelten Parameter des kleinen Blutbildes

Die Anforderung eines kleinen Blutbildes, das die Erythrozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenzählung, die Hämoglobin- und Hämatokritbestimmung und die Berechnung von MCV, MCH und MCHC umfasst, ist einer der häufigsten hämatologischen Laboraufträge im klinischen Alltag. Die mit den verschiedenen Systemen gemessenen Werte stimmen in meiner hier vorgelegten Untersuchung wie auch in der Literatur berichtet (Igout et al., 2004, Chin Yee et al., 2001 und Fernandez et al., 2001) sehr gut überein.

Die Geräte zeigen eine lineare Regression zwischen 0,986 und 0,999 als Ausdruck einer direkten linearen Korrelation. Die größte Übereinstimmung beim kleinen Blutbild besteht zwischen dem Sysmex XE 2100 und dem Sapphire Cell Dyn. Eine annähernd 100%ige Übereinstimmung an allen Geräten wird bei den Leukozytenzählungen erzielt. Dabei korreliert hier der Sysmex XE 2100 gleich gut mit dem Coulter LH 750 und mit dem Sapphire Cell Dyn.

Igout et al. (2004) vergleichen den Coulter LH 750 mit der Flow Cytometrie,

wobei der CD 45 Antikörper als Leukozytenmarker verwendet wird (Schlenke et al., 1998). Dabei zeigt sich im Hinblick auf die WBC Zählung eine strenge und signifikante Korrelation mit $r= 0,990$. Auch Chin Yee et al. (2001) vergleichen die Leukozytenzählung des Coulter LH 750 mit der Flow Cytometrie als Referenzmethode und erhalten ebenfalls gute Übereinstimmungen mit $r= 0,978$. Im Vergleich zum Gerätevorgänger, dem Gen S Analysegerät, gibt der Coulter LH 750 zu 78% weniger Warnhinweise auf WBC Interferenzen, welche zumeist durch NRBC`s, Riesenthrombozyten oder verklumpte Thrombozyten entstehen, und ermöglicht so eine schnellere und weniger kostenintensive Leukozytenzählung (Chin Yee et al., 2001). Fernandez et al. (2001) untersuchen ebenfalls den Coulter LH 750 und ermitteln ähnlich Ergebnisse ($r= 0,926$) für die Leukozytenzählung. Auch für die anderen, in dieser Untersuchung verwendeten Geräte können gute Ergebnisse erzielt werden. Walters et al. (2000) untersuchen den Sysmex XE 2100 und erstellen Vergleiche mit dem Vorgängermodell Sysmex SE 9000. Dabei ergeben sich Korrelationen mit $r > 0,99$ für alle Parameter des kleinen Blutbildes. Park et al. (2007) können diese Ergebnisse auch für den Sapphire Cell Dyn bestätigen. Insgesamt zeigen diese und die vorangegangenen Untersuchungen für alle drei automatischen Analysesysteme bezüglich des kleinen Blutbildes hervorragende Übereinstimmungen. Die Verwendung von automatischen Systemen kann daher in der Routinediagnostik erhebliche Kosten durch eine verringerte zeitliche Bindung des Personals einsparen.

4.2 Übereinstimmungen der an den verschiedenen Geräten ermittelten Parameter des Differentialblutbildes

Vergleichende Untersuchungen zur Zuverlässigkeit von hämatologischen Differenzierungsautomaten sind insofern schwierig, da die zu ermittelnden Parameter morphologisch und damit mehr oder weniger subjektiv definiert sind. Die unterschiedlichen methodisch-technologischen Ansätze zur Charakterisierung einer bestimmten Zellpopulation sind nicht direkt vergleichbar. Daher ist es durchaus erklärbar, dass auch schon geringe morphologische Abweichungen einer Zelle in ihrer Größe und Oberflächenbeschaffenheit, ihrer Granularität aber auch ihrer Kernbeschaffenheit zu unterschiedlicher Kategorisierung

bzw. Einordnung einer Zelle führen kann.

Einige Geräte signalisieren solche Abweichungen in Form von Warnhinweisen oder „Flags“, andere sortieren die Zelle ohne weitere Kommentierung in eine beliebige Schublade, was eigentlich mit der geforderten Qualität eines Differenzialblutbildes nicht zu vereinbaren ist. Letztlich sind nur unauffällige Blutbilder gut vergleichbar.

Wie bereits im Ergebnisteil im Einzelnen dargestellt, zeigen die untersuchten durchflusszytometrischen Analysesysteme unterschiedliche Übereinstimmungen bezüglich der quantitativen Zuordnung der verschiedenen Zellpopulationen.

Die durchflusszytometrischen Analysesysteme erreichen im Vergleich untereinander und mit der computerassistierten Mikroskopie gute lineare Korrelationen mit Korrelationskoeffizienten (r) zwischen 0,883 und 0,992 für neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Die von den unterschiedlichen Geräten erkannten eosinophilen Granulozyten zeigen ebenfalls gute Übereinstimmungen. Für Monozyten werden Korrelationskoeffizienten von 0,658 – 0,841 erreicht. Bei der Zellpopulation der basophilen Granulozyten zeigt keines der Geräte eine Übereinstimmung, eine lineare Korrelation ist nicht nachweisbar.

Ähnliche Ergebnisse werden auch in früheren Arbeiten erwähnt. So hat Ruzicka et al. (2001) ebenfalls hervorragende Korrelationen ($r= 0,925, 0,922, 0,877$) für die Populationen der Neutrophilen, Lymphozyten und Eosinophilen im Vergleich zur manuellen Mikroskopie ermitteln können. Für das Monozytenkollektiv werden Korrelationen mit $r= 0,756$ angegeben. In diesem Bereich liegen auch die Korrelationen, die in dieser Untersuchung bezüglich der Monozyten errechnet wurden. Ruzicka et al. (2001) vergleichen den Sysmex XE 2100 mit dem Vorgängermodell NE 8000 und können eine Verbesserung der Korrelationskoeffizienten für die einzelnen Zellgruppen des Differentialblutbildes angeben. Auch für den Sapphire Cell Dyn können durch Park et al. (2007) die Ergebnisse bestätigt werden. Auch in dieser Studie zeigt sich, dass die Korrelationskoeffizienten für Monozyten, Eosinophile und Basophile geringer ausfallen als für Lymphozyten und Neutrophile. Die oben beschriebenen Korrelationen werden auch an den Vorgängermodellen des Sysmex XE 2100, dem NE 1500 und dem SF 3000, durch Korninger et al. (1998) gemessen. Auch hier bewegen sich die linearen Korrelationen für Monozyten zwischen

0,579 für den NE 1500 und 0,831 für den SF 3000 (XE 2100: 0,788 prozentual und 0,794 bei Betrachtung der absoluten Zellzahl). Bei den Basophilen konnte ebenfalls keine vernünftige Korrelation nachgewiesen werden (Korninger et al., 1998).

Auffallend ist, dass die automatische Auszählung der basophilen Zellpopulation nicht oder nur marginal mit der manuellen Differenzierung korreliert (Vives-Corrans et al., 1996). Picard et al. (1998), die in ihrer Studie die Vorgängermodelle des Coulter LH 750, den Coulter STKS und den Coulter Gen S miteinander vergleichen, erklären dies durch eine zu geringe Anzahl an Blutbildern mit ausreichendem Basophilenanteil.

4.2.1 Vergleich der apparativen Blutbilddifferenzierung mit der computergestützten mikroskopischen Differenzierung

4.2.1.1 Differenzierung neutrophiler Granulozyten

Die apparative Differenzierung von neutrophilen Granulozyten stimmt mit der digitalen mikroskopischen Differenzierung gut überein. Dennoch soll hier noch einmal näher auf die „Ausreißer“ beim Vergleich der Differenzierung von neutrophilen Granulozyten eingegangen werden (s. Ergebnisteil und Anhang Abb. 1 a-f), um mögliche Ursachen zu diskutieren.

Es fällt bei der Neutrophilendifferenzierung auf, dass die hämatologischen Analysesysteme bei einer Neutrophilenanzahl über 80% häufig niedrigere Ergebnisse aufweisen als bei der computergestützten Mikroskopie gefunden werden. Stattdessen wird ein höherer Lymphozytenanteil ausgewiesen. Diese Beobachtung wurde auch schon im Rahmen vergleichender Validierungen von Vorläufern der hier untersuchten hämatologischen Differenzierungsautomaten berichtet (Korninger et al., 1998). Eine nähere Beschreibung und eventuelle Ursache bleibt unerwähnt. In der angegebenen Literatur wird auch erwähnt, dass bei einem Neutrophilenanteil unter 40% die durchflusszytometrischen Analysesysteme tendenziell zu hohe Neutrophilenanteile angeben. Dieses Problem konnte in der vorliegenden Arbeit, bei einem Probenumfang von 463 Blutbildern, nur in einem Fall beobachtet werden: Alle drei Analyse-

systeme ermittelten falsch hohe Neutrophilenanteile. In einem weiteren Fall wird eine falsch hohe Neutrophilenzahl durch den Sapphire Cell Dyn ermittelt. Die anderen Geräte fanden der mikroskopischen Differenzierung entsprechende Neutrophilenanteile. Bei der Auswertung der Probenausreißer ist häufig zu erkennen, dass neutrophile Granulozyten prozentual niedriger bestimmt werden als durch die mikroskopische Differenzierung; der Lymphozytenanteil fällt dann entsprechend höher aus. In drei Fällen fand sich ein erhöhter Monozytenanteil mit entsprechend erniedrigter Neutrophilenzahl (s. Tab. 10). Diese fehlerhafte Klassifizierung erfolgt in einem Fall (Probe 52, s. Abb. 21) durch alle drei Geräte, in einem weiteren Fall (Probe 368, s. Abb. 22) durch den Colter LH 750 und den Sysmex XE 2100 und in dem dritten Fall (Probe 124, s. Abb.17; Ergebnisteil) nur durch den Coulter LH 750.

Tab. 10

Prozentuale Verteilung des weißen Blutbildes mit abweichender Verteilung im Bereich der Monozyten und Neutrophilen

		Neu	Ly	Mono	Eo	Baso
Probe 52	Mikroskopie	56	20	5	2	1
	Sysmex XE 2100	39	38	21	2	0
	Coulter LH 750	44	26	28	1	2
	Sapphire Cell Dyn	41	29	30	2	0
Probe 124	Mikroskopie	67	20	10	4	1
	Sysmex XE2100	60	16	12	2	1
	Coulter LH 750	6	25	69	0	1
	Sapphire Cell Dyn	59	28	10	2	1
Probe 368	Mikroskopie	88	4	8	0	1
	Sysmex XE 2100	64	8	28	0	1
	Coulter LH 750	71	5	24	0	0
	Sapphire Cell Dyn	87	6	6	0	0

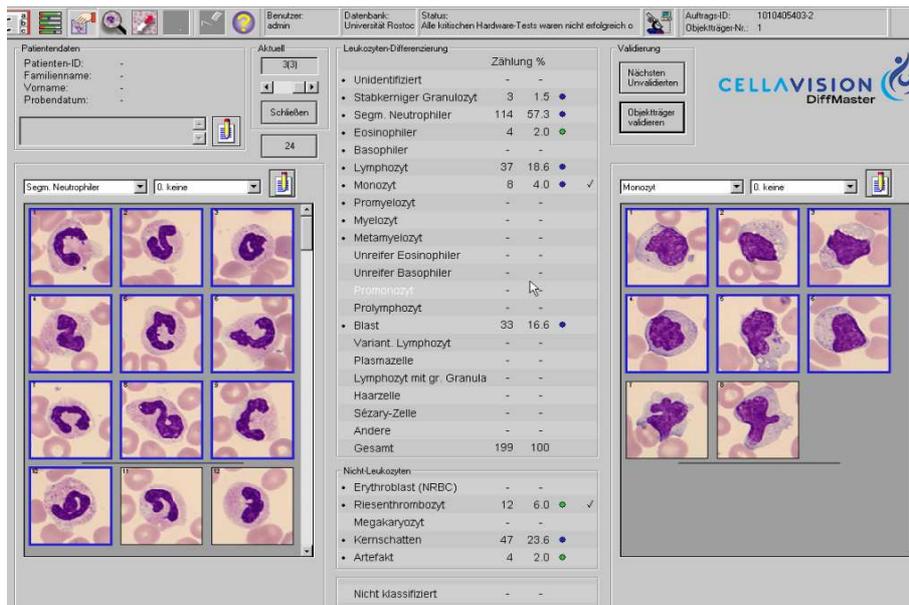


Abb. 21
Bildschirmpräsentation mit der Darstellung der segmentkernigen Neutrophilen und Monozyten in der Probe 52

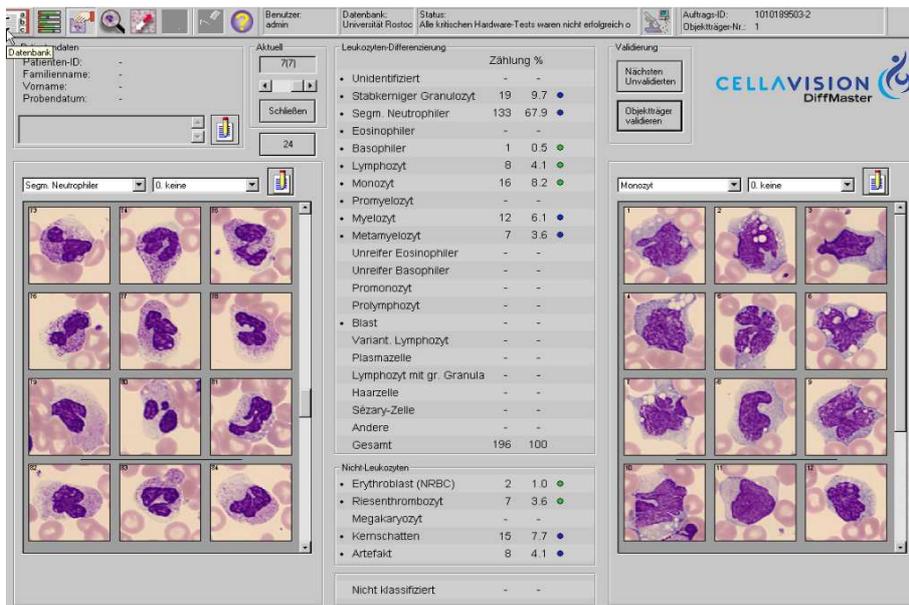


Abb. 22
Bildschirmpräsentation mit der Darstellung der segmentkernigen Neutrophilen und Monozyten in der Probe 368

Erwartungsgemäß findet man mehr Probenausreißer in den Proben onkologischer Patienten, was offensichtlich darauf zurückzuführen ist, dass die hämatologischen Analyseautomaten Schwierigkeiten haben, bei pathologischen Blutproben unreife oder atypische Zellen zu erkennen bzw. zuzuordnen. Eine

besondere Herausforderung stellen dabei die Leukämien und die Erkennung von Blasten durch die automatischen Analysesysteme dar (Tohyama et al., 2005). Ein Beispiel dafür ist Probe 64 (s. Anh. Abb. 3b, 3f). Mikroskopisch ergibt sich das Bild einer akuten myeloischen Leukämie, die unter zytostatischer Therapie einen Monozytenanteil von 26% aufweist. Durch den Coulter LH 750 wird das quantitative Differentialblutbild richtig klassifiziert. Der Sapphire Cell Dyn erkennt die Monozyten nicht und ordnet sie den Lymphozyten zu, wodurch sich der prozentuale Anteil an Lymphozyten im Blutbild erhöht. Der Sysmex XE 2100 misst geringgradig höhere Lymphozyten- und Monozytenwerte und kommt damit auf eine geringgradig abweichende prozentuale Verteilung des Differentialblutbildes (s. Anh., Tab. 2).

Bei der mikroskopischen Analyse sind die neutrophilen Granulozyten auffällig granuliert; unreife granulozytäre Vorstufen sowie reichlich Blasten sind ebenfalls vorhanden. Alle Geräte setzten diesbezüglich die richtigen morphologischen Warnhinweise. Das Blutbild wird in einem solchen Fall gemäß der durch das Labor festgelegten qualitativen Nachdifferenzierungskriterien mikroskopisch differenziert.

In einem Fall werden von den drei Geräten eindeutig neutrophile Granulozyten den Lymphozyten bzw. den Monozyten zugeordnet, wobei in der mikroskopischen Übersicht sog. „Pseudopelger“ mit einem wenig oder nicht gelappten Kern als Variante der neutrophilen Granulozyten auffallen. Diese Zellen sind Ausdruck einer dysplastischen Granulopoese, ursächlich dafür können verschiedene Leukämieformen, Infekte oder Vitamin-B₁₂ Mangel sein (Frick, 2003). Sie imponieren mit abnormer Chromatinstruktur beziehungsweise fehlender Segmentation, die oft auch ein toxisch granuliertes Zytoplasma haben kann (Gerok et al., 2003) Diese morphologische Auffälligkeit könnte ein Grund für die erschwerte Erkennung oder Fehlzuzuordnung durch die automatischen Differenzierungssysteme sein.

4.2.1.2 Differenzierung von Lymphozyten

Bei der Lymphozytendifferenzierung zeigen die durchflusszytometrischen Systeme untereinander und im Vergleich mit der mikroskopischen Analyse hervorragende Übereinstimmungen. Die beste Übereinstimmung der Lymphozytendifferenzierung mit der mikroskopischen Analyse besteht mit dem Differenzierungsergebnis des Coulter LH 750, gefolgt vom Ergebnis des Sysmex XE 2100. In der grafischen Darstellung der Korrelation der Geräte untereinander und mit der mikroskopischen Differenzierung fallen nur einige Probenausreißer auf (s. Anh. Abb. 2a-f)). Ein häufiger Grund für abweichende Ergebnisse bei der Lymphozytendifferenzierung ist das Auftreten von Blasten. Diese werden mikroskopisch auch als solche erkannt und richtig eingeordnet, von den Differenzierungsautomaten aber häufig als reife Zellpopulation den Lymphozyten zugeordnet.

In der vorliegenden Untersuchung erfolgte in zwei Fällen die Zuordnung von Blasten zu Zellreihen des peripheren Blutbildes, die meisten wurden den Lymphozyten zugeordnet. Allerdings wurde in beiden Fällen durch einen morphologischen Hinweis, wie z. B. „atypische Lymphozyten“, „Lymphoblasten“ oder „Monoblasten“ das Vorhandensein von Blasten angezeigt. Das pathologische Blutbild wäre also aufgrund der qualitativen Warnhinweise der mikroskopischen Nachdifferenzierung, unabhängig vom Ergebnis der quantitativen Differenzierung, zugeführt worden. Dieser Sachverhalt wird auch in der Literatur beschrieben. Demnach ist die Detektion von abnormen Lymphozyten und Lymphoblasten am verlässlichsten, wenn die Lymphozytenzählung und der Flagghinweis zusammen betrachtet werden (Stamminger et al., 2002). Weiterhin wird durch Burchert-Graeve et al. (1996) beschrieben, dass bei einem Auftreten von über 5% Blasten die Zuordnung von Monozyten und Lymphozyten durch die hämatologischen Analysesysteme (in diesem Fall durch den Abbott Cell Dyn 3500) erschwert wird, ein Warnhinweis wird jedoch in 10 von 11 Fällen gesetzt wird.

Ein weiterer Grund für Abweichungen der relativen und absoluten Lymphozytenanteile sind die beim Anfertigen des Blutausriches entstehenden sog. Kernschatten. Als solche werden sich in Auflösung befindliche oder zerstörte

Zellen angesehen, die als leicht lädierbare Lymphozyten gedeutet werden (Müller et al., 1970). Diese können bei der mikroskopischen Analyse des Ausstriches nach früheren Differenzierungsregeln nicht mit berücksichtigt werden. Da die maschinelle Differenzierung unabhängig vom Ausstreichvorgang ist, werden diese Zellen als intakte Zellen differenziert. Charakteristisch aber differenzialdiagnostisch nicht verwertbar ist das Auftreten von Gumprechtschen Kernschatten bei den chronisch lymphatischen Leukämien (CLL) (Halleck et al., 2002). Mikroskopisch findet man vor allem kleine Lymphozyten. Das Zytoplasma dieser Lymphozyten imponiert schmal, ungranuliert und saumartig. Der Kern erscheint mit dichtem, scholligen Kernchromatin (Fuchs, 2003). Daneben sieht man verstrichene chromatinfarbene Zellkerne, die Gumprechtschen Kernschatten. Diese sind Zellfragmente, die während des automatischen Färbe- und Ausstrichprozesses durch mechanische Scherkräfte, beim Ausstreichen der Zellen entstehen. Kernschatten sind häufig auch bei akuten Leukämien, niedrig malignen Non Hodgkin Lymphomen oder bei Virusinfektionen mit Lymphozytose zu finden (Diem et al., 2005). Da der Färbe- und Ausstrichprozess erst nach der durchflußzytometrischen Analyse stattfindet, wird von den automatischen Differenziergeräten der komplette Zellpool ausgewertet, während bei der mikroskopischen Auswertung ein Teil der Zellen, nämlich jene, die zu Kernschatten ausgestrichen wurden, nach den gängigen Differenzierungsregeln nicht mehr differenziert werden können. Dadurch erhöht sich der relative Anteil der Neutrophilen im Ausstrich, weil Lymphozyten durch die Ausstrichtechnik „verschwinden“ (DGHO, 2001). Dies erklärt unter anderem, weshalb die in dieser Untersuchung verwendeten Geräte eine von der mikroskopischen Auswertung abweichende Verteilung der Zellen des weißen Blutbildes aufweisen können. Das stellt auch in den Routinenlaboratorien ein Problem dar, da so stabile Zellpopulationen häufig quantitativ überschätzt und fragile Zellreihen häufig prozentual unterschätzt werden (Diem et al., 2005).

Das Auftreten von Kernschatten muss auch bei der computerassistierten mikroskopischen Differenzierung berücksichtigt werden, so z. B. durch eine gesonderte Rubrik, in die die mikroskopisch erfassten Kernschatten eingeordnet werden. Die Kernschatten können dann noch einmal visuell überprüft werden und mit als Befund ausgegeben werden. Sie können aber auch per Mausclick

bei Vorliegen einer CLL den Lymphozyten zugeordnet werden und somit wie bei der herkömmlichen mikroskopischen Differenzierung „mitgezählt“ werden.

In einem Blutbild kommt es zu abweichenden Angaben zwischen maschineller und mikroskopischer Differenzierung. Bei diesem Patienten liegt ein für eine infektiöse Mononukleose charakteristisches Differenzialblutbild vor. Die infektiöse Mononukleose („Pfeiffersches Drüsenfieber“) ist eine akute, sich in der Regel selbst limitierende, gutartige Erkrankung junger Erwachsener und Kinder nach vorangegangenen Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (Hickey et al., 1997), wobei es zur virus-induzierten Transformation von T-Lymphozyten kommt. Da die transformierten Zellen den Monozyten morphologisch in gewisser Weise ähnlich sein können, wurde der Erkrankung der oben genannte Name gegeben, Die automatischen Differenzierungssysteme geben dabei unterschiedliche Monozyten- und Lymphozytenanteile an: Der LH 750 differenziert 38% Monozyten und 46% Lymphozyten, der Sapphire Cell Dyn 9% Monozyten und 72% Lymphozyten sowie der Sysmex XE 2100 34% Monozyten und 56% Lymphozyten.

Mit der computerassistierten Mikroskopie konnten 53% Monozyten und 22% Lymphozyten differenziert werden (s. Abb. 23). Zusätzlich fielen 10% Eosinophile auf, welche durch den Sapphire Cell Dyn nicht erkannt wurden. Die anderen Geräte fanden 6% Eosinophile. Trotz der abweichenden quantitativen Analyse wurde durch alle Geräte ein „Ly/ Mo/ Blasten“ Warnhinweis gegeben, so dass eine mikroskopische Kontrolle des Blutbildes in jedem Falle erfolgt wäre.

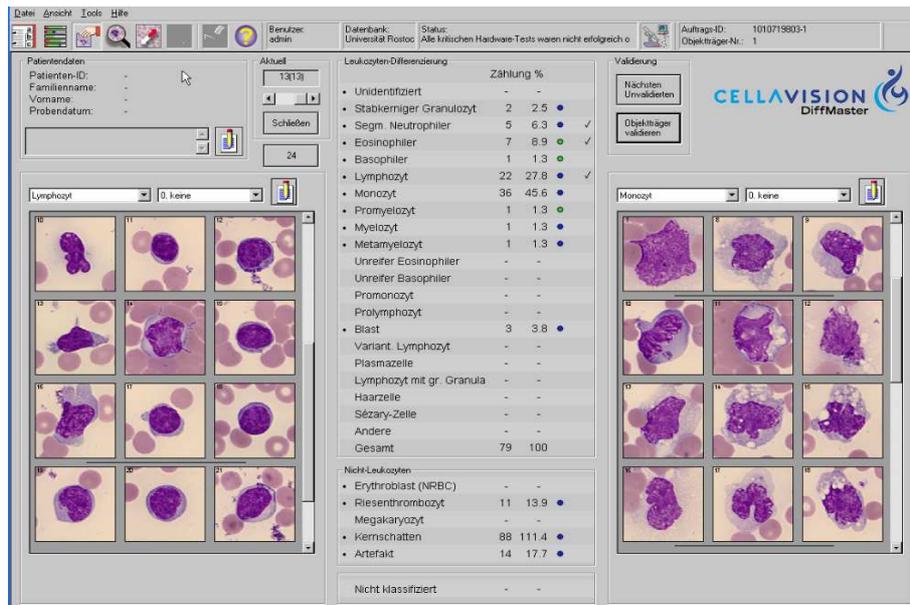


Abb. 23

Bildschirmpräsentation eines Blutbildes mit der Diagnose einer infektiösen Mononukleose

Typisch für die Diagnose der infektiösen Mononukleose ist das Auftreten aktiver, transformierter lymphoider Zellformen, die sich im Verlauf der Erkrankung morphologisch sehr eindrücklich verändern können; ihre Variabilität reicht von gereizten Lymphozyten (Lüthi et al., 2004) mit nur geringfügigen zytoplasmatischen Ausziehungen bis zu großen deformiert lymphoblastisch anmutenden Zellen, den sogenannten „Pfeifferzellen“. Über ein Drittel der im peripheren Blutbild auftretenden Lymphozyten können als gereizt, mit basophilem Zytoplasma und eingekerbten Zellrändern beschrieben werden (Cohen, 2006). In der Literatur wird beschrieben, dass Zellen, die sich zu Beginn der Erkrankung noch uniform lymphozytisch zeigen, im Verlauf pleomorph und mononukleär aussehen und in Größe und Form stark variieren. Diese Veränderungen beruhen auf der lymphozytären Aktivierung („Transformation“) im Rahmen des infektiösen Geschehens (Kahl; Freund, 2010). Die starken Abweichungen der Geräte untereinander erklären sich durch die stark veränderte Morphologie dieser lymphatischen Zellen. Die der apparativen Differenzierung zugrunde liegenden Algorithmen sind unterschiedlich und daher auch nur bedingt geeignet monozytenähnliche morphologische Veränderungen korrekt zuzuordnen.

Auch die im Rahmen des infektiösen Geschehens vorhandenen apoptoti-

schen Lymphozyten können von den Differenzierungsautomaten nicht immer zugeordnet werden (Taga et al., 2002). Hinweis für apoptische Zellen findet man allerdings in den Scattergrammen der einzelnen Analysesysteme. Ein morphologischer Warnhinweis oder quantitativer Vermerk für das Auftreten apoptotischer Lymphozyten wird von den Differenzierungsautomaten nicht gegeben.

Bei Untersuchungen mit Vorläufergeräten des XE 2100 der Firma Sysmex wurde gezeigt, dass apoptotische Lymphozyten nicht korrekt detektiert werden. Dadurch wurde offensichtlich die Unterscheidung zwischen Lymphozyten und Monozyten erschwert (Taga et al., 2002). Vorgänger der Coulter- und der Celdyn-Geräte zeigen apoptotische Zellen durch einen gesonderten Cluster im Scattergram an. Das Auftreten von apoptotischen Lymphozyten ist zwar ein unspezifisches Ereignis, kann jedoch als zusätzlicher Hinweis auf eine infektiöse Mononukleose gewertet werden (Aulesa et al., 2005; Taga et al., 2002).

Bei der Makroglobulinämie Waldenström, einer seltenen Form der B-Zell Neoplasie älterer Menschen, kommt es zum Auftreten eines monoklonalen Serumparaproteins des IgM Types mit oder ohne Hyperviskositätssyndrom. Zusätzliche Symptome sind Anämien und Thrombozytopenien, wobei die Ausprägung von der Ausdehnung des Tumors und der Höhe der IgM Konzentration abhängig ist (Vijay et al., 2007).

In der vorliegenden Untersuchung haben alle Geräte bei einem Patienten mit einer Makroglobulinämie Waldenström die Neutropenie richtig erkannt (s. auch Ergebnisteil, Kapitel 3.3, Blutbild 16). Die prozentualen Angaben zur Lymphozytenverteilung gehen allerdings auseinander. Dabei differenzieren die drei automatischen Analysesysteme etwa 10% mehr Lymphozyten als bei der mikroskopischen Differenzierung. Auffallend ist in diesem Ausstrich die Zellkernkerbung der Lymphozyten. Zudem fällt ein hoher Anteil an Riesenthrombozyten auf, welche möglicherweise von den Analyseautomaten den Lymphozyten zugeordnet wurden.

4.2.1.3 Differenzierung von Monozyten

Die Übereinstimmung der Differenzierungsergebnisse ist bei den Monozyten geringer als bei der Neutrophilen- und der Lymphozytendifferenzierung. Die Monozytendifferenzierung des Sysmex XE 2100 korreliert mit der Mikroskopie noch relativ gut ($r=0,788$), gefolgt vom Sapphire CellDyn. Der Coulter LH 750 korreliert bezüglich der Monozyten schlechter ($r=0,633$), was auch für Vorläufermodelle bereits aus der Literatur bekannt ist. So gibt z. B. Bhuta et al. (2003) eine Korrelation mit $r=0,43$ an. Auch bei Vorgängermodellen der Sysmexgeräte zeigen sich nur mäßig gute Korrelationen ($r=0,831$ für den Sysmex SF 3000 und $r=0,579$ für den Sysmex NE 1500) (Korninger et al., 1998). Andere Autoren beschreiben bei den Vorgängermodellen lediglich schlechte Korrelationen, ohne dass Korrelationskoeffizienten berechnet wurden (Warner et al., 1990). Von der technisch-methodischen Verbesserung der Analysegeräte und der zugrunde liegenden besseren Informationsverarbeitung (Zuordnungsalgorithmus) hat die apparative Monozytendifferenzierung offensichtlich deutlich profitiert.

Die Ursachen für abweichende Monozytenergebnisse sind vielfältig. Ursächlich für eine Erhöhung der Monozytenzahl sind Lagerungseinflüsse auf die Blutproben, insbesondere die Temperatur (Bartels et al., 1998). Dabei kommt es zu einer Verschiebung von Granulozyten zu Monozyten durch Degranulation. Dieses Phänomen tritt dann auf, wenn die Proben bei Temperaturen oberhalb der Raumtemperatur gelagert werden (Bartels et al., 1998). Vermieden werden kann dies durch Lagerung der Proben bei Kühlschranktemperatur (Theodorsen et al., 1994). Zudem spielt auch die Dauer der Lagerung eine entscheidende Rolle. Schon nach einigen Stunden beginnen degenerative Veränderungen der Blutzellen, wobei solche Veränderungen bei Monozyten bereits relativ früh auftreten (Theodorsen et al., 1994).

Hedberg et al. (2009) hingegen berichtet, dass die Parameter des Differentialblutbildes, mit Ausnahme der eosinophilen Granulozyten, für 48 Stunden bei Raumtemperatur stabil bleiben sollen.

Die in dieser Untersuchung verwendeten Proben wurden, wie auch von Imeri et al. (2008) empfohlen, maximal 4 Stunden bei Kühlschranktemperatur gelagert, um das Auftreten falsch hoher Monozytenzahlen und anderer Verände-

rungen des Blutbildes zu minimieren.

Ein weiteres Problem könnte durch die in dieser Studie als Referenz zugrunde gelegte Mikroskopie sein. Goossens et al. (1991) ermitteln einen Variationskoeffizienten von 6% bei der mikroskopischen Monozytenzählung bei der Differenzierung auf 100 Leukozyten (Grimaldi et al., 2005). In der vorliegenden Studie wurden zu jedem Blutbild 2x200 Zellen mikroskopiert. Auch Houwen (2001) zeigt eine hohe statistische Unsicherheit bei der Monozytenzählung. Dadurch kommt es folglich auch zu einer geringeren Übereinstimmung zwischen der Differenzierung durch die in der Studie verwendeten Geräten und der Mikroskopie. Die Unsicherheit in der richtigen Zuordnung von Monozyten ist möglicherweise durch die z.T. schwierige Unterscheidung zwischen kleinen Monozyten und großen Lymphozyten und der in der Regel geringen Anzahl dieser Zellpopulation im Differentialblutbild (Referenzwert Monozyten: 0-12%) bedingt (Grimaldi et al., 2005; Johnson et al., 2002; Houwen, 2001; Rümke, 1985), was allein schon eine größere Streuung des Zählergebnisses begünstigt. Hier werden die Grenzen der herkömmlichen mikroskopischen Analyse erreicht.

Demgegenüber hat die computergestützte und reproduzierbar validierbare Mikroskopie mit dem Cellavision-System den Vorteil, dass sich die Zuordnung anhand der digitalisierten Zellbilder überprüfen und korrigieren lässt, so dass die hier dargestellten Ergebnisse dahingehend interpretiert werden dürfen, dass die unterschiedliche Ergebnisse für die Monozytenanteile in der Blutprobe zu Lasten der verfügbaren Differenzierungsautomaten gehen.

4.2.1.4 Differenzierung von eosinophilen Granulozyten

Die apparative Differenzierung der eosinophilen Granulozyten stimmt mit der digitalisierten mikroskopischen Differenzierung sehr gut überein ($r=0,802$ bis $0,940$), wobei der Sysmex XE 2100 die beste Übereinstimmung zeigt.

Allerdings zeigt sich bei der apparativen Differenzierung mit dem LH 750 gegenüber den anderen Geräten eine auffällige Abweichung, welche der grafischen Darstellung der Eosinophilenmessung (s. Anh. Abb. 4d, 4e) zu entnehmen ist (Probe 34). Der Coulter LH 750 fehlinterpretiert die in dieser Pro-

be vorhandenen eosinophile Granulozyten als granulozytäre Vorstufen. Die mikroskopische Analyse stimmt mit dem Sysmex XE 2100 und dem Sapphire Cell Dyn überein. In einem Fall sieht man bei einer Probe eines Patienten aus der Onkologie eine Eosinophilie, die durch die Differenzierautomaten qualitativ erfasst wurde, jedoch mit prozentualen Abweichungen von bis zu 10% auffällt. In der grafischen Darstellung fällt diese Probe daher als Ausreißer auf (Probe 49, Ergebnisteil Abb 4 a-c). Die Eosinophilie wird durch den Sysmex XE 2100 und den Coulter LH 750 quantitativ korrekt erkannt und auch ein entsprechender Warnhinweis gegeben. Der Sapphire Cell Dyn kann die eosinophilen Granulozyten richtig interpretieren, ein Warnhinweis wird jedoch nicht gesetzt.

Ansonsten gibt es eine gute Übereinstimmung im Hinblick auf die Eosinophiliendifferenzierung beim XE 2100 und dem LH 750 ohne auffällige Ausreißer, was den Beobachtungen von Tsuda entspricht (Tsuda et al, 1999). Nur in einem Fall (Probe 139, Ergebnisteil, Abb. 18) kommt es bei allen Geräten zu einer Abweichung von rund 10%. In diesem Fall handelt es sich um eine Eosinophilie, welche durch die Geräte auch gemessen wurde. Ein Warnhinweis wird erneut nur durch den Sysmex XE 2100 und den Coulter LH 750 gegeben.

4.2.1.5 Differenzierung von basophilen Granulozyten

Die Ergebnisse der Differenzierung von basophilen Granulozyten stimmen nur geringfügig überein: Die Korrelationskoeffizienten betragen daher nur 0,078 bis 0,338. Eine solche unzureichende Übereinstimmung der verschiedenen Analysesysteme und der Mikroskopie ist aus der Literatur bekannt (Lehto et al., 2008, Tsuda et al., 1999, Picard et al., 1999, Lamp, 1996, Buttarello et al., 1992). Der Grund hierfür ist das seltene Vorkommen von basophilen Granulozyten im peripheren Blutaussstrich und die damit verbundene statistische Unsicherheit (Picard et al., 1999). Bei Auftreten von über 2% basophilen Granulozyten verbessert sich auch der Korrelationskoeffizient deutlich (Grimaldi et al., 2000). Zu einem erhöhten Anteil an basophilen Granulozyten kommt es z. B. bei der Ketoazidose. Zudem sind basophile Granulozyten differenzial-

diagnostisch bei der CML⁸ von Bedeutung. Fraglich ist, inwieweit die Genauigkeit der Bestimmung basophiler Granulozyten durch die automatischen Analysensysteme im klinischen Alltag und für die Diagnostik von wirklicher Bedeutung ist.

4.3 Möglichkeiten und Grenzen der computerassistierte Mikroskopie (Diffmaster^R)

Die computerassistierte Mikroskopie (Diffmaster^R; Cellavision) ist zeitsparend und ermöglicht die valide reproduzierbare Erstellung eines Blutbildes (Parker et al., 2004), unabhängig von der Erfahrung des Laboranten (Kratz et al., 2005). Die erfassten digitalen Bilder der kernhaltigen Zellen in einem Blutaussstrich werden den verschiedenen Zellpopulationen zugeordnet und abgespeichert. Vor der Freigabe wird die automatisch erfolgte Zuordnung durch, in der Blutbildmorphologie erfahrene, Labormitarbeiter validiert und die Zellen gegebenenfalls neu zugeordnet. Nach der Freigabe des Blutbildes kann dies nicht mehr verändert werden, es sei denn man lässt es noch einmal differenzieren. Durch telemedizinische Funktionen können die gespeicherten Blutbilder als E-Mail versandt und so über lange Distanzen ausgetauscht und gegebenenfalls neu validiert werden (Riley et al., 2002; Beksac et al., 1997).

Dieses Verfahren ist ein Quantensprung in der Qualitätssicherung und im Qualitätsmanagement der morphologischen Blutbilddiagnostik.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten auch Erfahrungen gemacht werden, die die Grenzen des Systems aufweisen.

Bei leukopenen Proben, z.B. von onkologischen Patienten unter zytoreduktiver Therapie, gelang es mit der computerassistierte Mikroskopie nicht in jedem Fall 2x200 Zellen zur Differenzierung im Ausstrichpräparat zu finden. In solchen Fällen ist die apparative durchflusszytometrische Differenzierung natürlich überlegen, da sehr viel mehr Zellen in einem vergleichsweise größeren Blutvolumen untersucht werden.

In diesen Fällen war eine vergleichende Analyse mit der computerassistierte

⁸ Chronisch myeloische Leukämie

Mikroskopie ist nicht möglich, da die wenigen gefundenen Zellen keine Basis für ein aussagekräftiges Differentialblutbild ergeben und damit nicht für die maschinelle Differenzierung als Referenz genutzt werden können (Tohyama et al., 2005).

Leukopene Proben sind im labormedizinischen Alltag generell ein Problem, da hier die mikroskopische Differenzierung als auch die computerassistierte mikroskopische Differenzierung an ihre Grenzen stößt (Kratz et al., 2005).

In meiner Untersuchung war in 17 Fällen keine ausreichende Anzahl an Zellen zur Analyse des Differentialblutbildes vorhanden, so dass diese Proben aus der vergleichenden Untersuchung heraus fielen.

Auch bei nicht leukopenen Blutbildern kann die computerassistierte Mikroskopie an Ihre Grenzen stoßen. Wenn Zellen fragil sind und durch das automatische Ausstrichverfahren ihre zelluläre Integrität verloren geht, kann häufig auch mit der computerassistierten Mikroskopie nicht die ausreichende Anzahl an Zellen erfasst werden, um eine repräsentative Zellzuordnung zu gewährleisten.

Von den im Ergebnisteil (S.45) erwähnten Ausstrichen der Proben 121 und 171 konnte nur der zweite von den üblicherweise doppelt analysierten Ausstrichen differenziert werden, da im ersten Ausstrich Zellgrenzen, wohl auch durch die Zerstörung der Zellstruktur während des Ausstreichvorganges, nicht erkennbar waren und demzufolge eine Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Populationen nicht möglich war. Somit erfolgte bei diesen Proben nur eine mikroskopische Differenzierung von 200 Zellen. Das kann zu deutlichen prozentualen Abweichungen bei der Differenzierung führen, da bei der automatischen durchflusszytometrischen Differenzierung nicht nur ein Gesichtsfeld von 200, sondern circa 8000 Leukozyten analysiert werden. Durch diesen numerischen Unterschied kann es zu einer Verschiebung der relativen Anteile der Zellen kommen oder Zellen, die nur in kleiner Population auftreten, können mikroskopisch gar nicht erfasst werden.

Ein weiteres Problem stellt die genaue Zuordnung der Zellen zu „variant lymphocytes“ bzw „atypische Lmphozyten“ und „Lymphoblasten“ dar. Auf dieses Problem wurde auch schon durch Kratz et al. (2005) hingewiesen. Für solche Fälle sind entsprechende verbindliche „Reviewkriterien“ zu definieren“,

damit geschultes Laborpersonal solche Blutbilder noch einmal validiert hätte.

4.4 Verweigerung der Erstellung von Differenzialblutbildern durch automatischen Analysesysteme

In fünf Fällen wird die Analyse durch den Sysmex XE 2100 verweigert. In einem Fall handelt es sich um ein Blutbild von einem Patienten mit der Diagnose Plasmozytom. Der Coulter LH 750 und der Sapphire Cell Dyn ermitteln eine Linksverschiebung mit unreifen Granulozyten im peripheren Blutaussstrich, was auch durch einen morphologischen Warnhinweis zum Ausdruck gebracht wird. Der Sysmex XE 2100 verweigert die Neutrophilen- und Lymphozytendifferenzierung, Monozyten werden falsch hoch angegeben. Auch in einem weiteren Fall, bei dem diagnostisch ein Plasmozytom vorliegt, wird die Analyse durch das Sysmex-Gerät verweigert.

Bei einem Blutbild, das von einem Patienten mit Non Hodgkin Lymphom stammt, wird durch das Sysmex-Gerät eine Differenzierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten verweigert. Die beiden anderen Geräte messen gleichsinnig eine Lymphopenie bei Neutrophilie.

Bei einem anderen Ausstrich von einem Patienten mit der klinischen Diagnose eines Plasmozytoms wird die Auswertung durch den Sysmex XE 2100 im Hinblick auf die neutrophilen Granulozyten und die Lymphozyten verweigert. Monozyten werden um 15% zu hoch gemessen. Mikroskopisch besteht eine extreme, wahrscheinlich pathologische Linksverschiebung mit 15% stabkernigen Neutrophilen, 15% Metabmyelozyten, 13% Myelozyten und 1% Promyelozyten im mikroskopischen Ausstrich (s. Abb. 24). Sowohl der Coulter LH 750 als auch der Sapphire Cell Dyn haben hier eine richtige quantitative Einteilung des reifen peripheren Blutbildes vorgenommen und den morphologischen Hinweis auf eine pathologische Linksverschiebung mit unreifen Granulozyten gegeben.

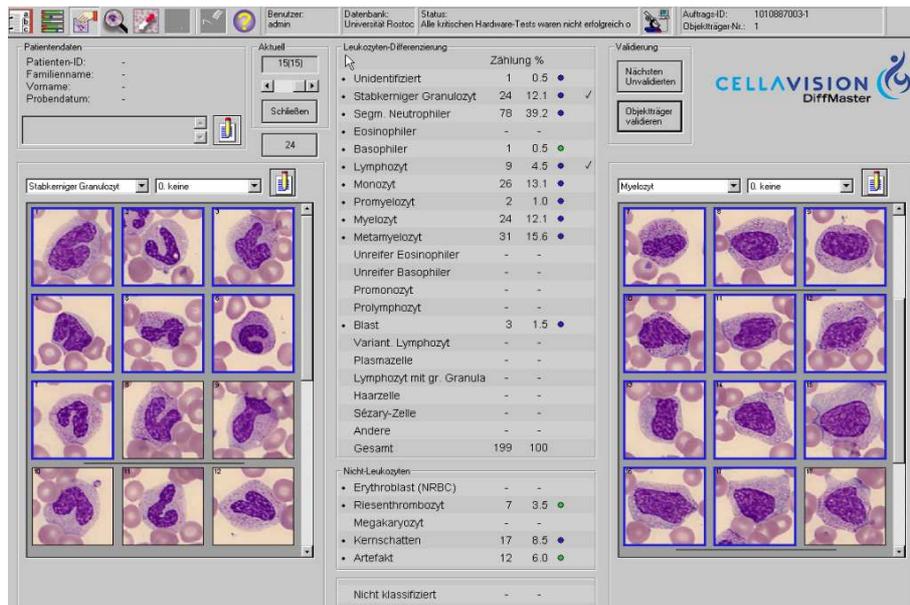


Abb. 24

Bildschirmpräsentation eines Blutbildes bei einem Patienten mit der klinischen Diagnose eines Plasmozytoms.

Dargestellt werden sowohl stabkernige Granulozyten als auch Myelozyten im Sinne einer pathologischen Linksverschiebung

In einem weiteren Fall (Diagnose CMML, CML), der aus der Auswertung herausgenommen werden musste, da der Sysmex XE 2100 die Analyse verweigert, liegt wiederum eine pathologische Linksverschiebung mit einem prozentualen Anteil von 36% granulozytären Vorstufen vor (s. Abb. 25). Zudem fallen in diesem Blutbild Blasten auf. Der Sysmex XE 2100 verweigert bei diesem Blutbild die Zelldifferenzierung komplett. Der Coulter LH 750 und der Sapphire Cell Dyn differenzieren das weiße Blutbild und ermitteln dabei einen, im Vergleich zur Mikroskopie, höheren Monozytenanteil von 11% bzw. 24% bei einem mikroskopisch ermittelten prozentualen Anteil von lediglich 2%. Eventuell ist anzunehmen, dass in diesem Fall ein Teil der unreifen granulozytären Vorstufen durch die Geräte als Monozyten fehldifferenziert wurden. Ursache dafür könnte die Zellkernform der unreifen Zellen sein. Ein pathologischer Warnhinweis wurde durch die Geräte nicht gegeben.

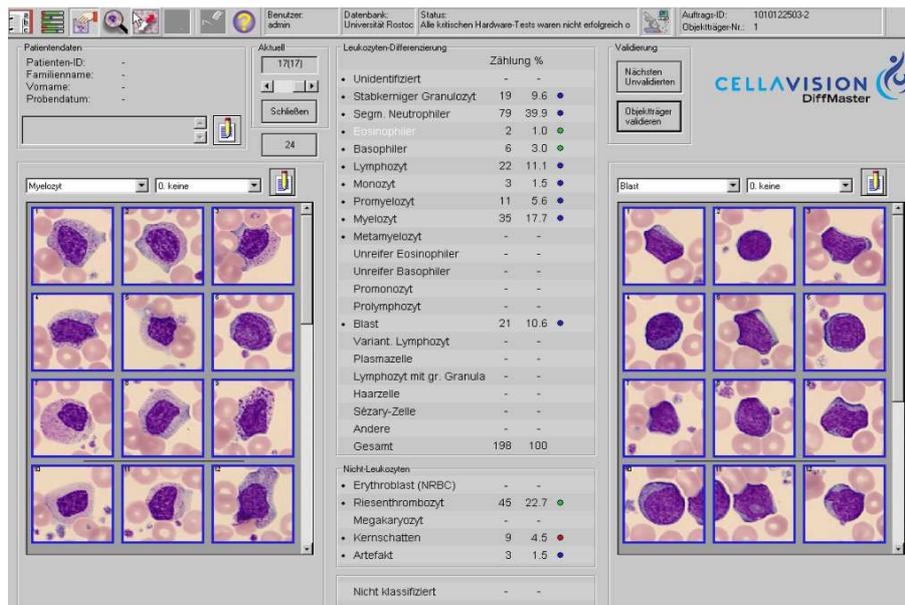


Abb. 25

Bildschirmpräsentation eines Blutbildes bei einem Patienten mit der Diagnose einer CMML, CML. Dargestellt werden Myelozyten und Blasten

In zehn Fällen wird die Analyse der Blutbilder durch den Sapphire Cell Dyn verweigert. Dabei werden in 4 Fällen durch den Sapphire Cell Dyn niedrigere Leukozytenwerte angegeben, die anderen Geräte messen in diesen Fällen erhöhte Leukozytenwerte, und in zwei Fällen zusätzlich eine Thrombozytose, die weder durch den Sysmex XE 2100 noch durch den Coulter LH 750 bestätigt werden kann. In drei Fällen geben die anderen Geräte diverse Warnhinweise, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich um pathologische Blutbilder handelt.

Eine Verweigerung der Analyse eines pathologischen Blutbildes durch ein hämatologisches Analysesystem ist einer falschen Zuordnung oder Bewertung in jedem Fall vorzuziehen. Auch wenn die Geräte in einem solchen Fall keine diagnostischen Hinweise geben, so wird die Probe jedoch zwingend einer mikroskopischen Differenzierung zugeführt. Somit können pathologische Proben nicht übersehen werden. Die Verweigerung wird daher vom Labor als sehr ernster Hinweis auf das Vorliegen eines pathologischen Differenzialblutbildes gewertet, auch wenn sie einen zusätzlichen Arbeitsgang erfordert.

4.5 Sensitivität und Spezifität morphologischer Warnhinweise von hämatologischen Differenzierungsautomaten

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Beurteilung, ob die Geräte morphologisch auffällige Proben erkennen und richtig bewerten können. Die Erfassung qualitativ pathologischer Blutbilder ist ein wichtiges Kriterium der mikroskopischen Differenzierung. Sie ist entscheidend für die Diagnosestellung und die Therapie- bzw. Rezidivkontrolle. Idealerweise sollten die automatischen Analysensysteme alle morphologisch auffälligen Blutproben mit einem morphologischen Warnhinweis versehen und so eine mikroskopische Nachdifferenzierung durch qualifizierte Labormitarbeiter veranlassen (Fernandes et al., 2007).

Im Folgenden soll diskutiert werden, in wie viel Prozent der Fälle die Geräte morphologisch auffällige Proben erkennen und in welchen Fällen und wie oft solche Proben nicht erkannt werden, es also zu falsch negativen Ergebnissen kommt. Des Weiteren werden auch Art und Häufigkeit der falsch positiven Ereignisse hinterfragt, da diese zu einer zusätzlichen Personalbindung durch eine unnötige Nachdifferenzierung führt.

Vergleicht man die von den Differenzierungsautomaten „geflagten“ Differenzialblutbilder mit den mikroskopischen Befunden, so lassen sich anhand der richtig und falsch gegebenen Warnhinweise die Sensitivitäten, Spezifitäten und Effizienzen für die Erkennung pathologischer Blutbilder bzw. normaler Blutbilder errechnen (s. Methodenteil).

Werden die Warnhinweise im Allgemeinen betrachtet, so erreicht der Coulter LH 750 die höchste Sensitivität und Effizienz, der Sysmex XE 2100 die höchste Spezifität. Für den Hinweis „unreife Gran/Linksverschiebung“ erreicht der Sysmex XE 2100 die höchste Sensitivität, Spezifität und Effizienz. Für den Warnhinweis Blasten/atypische Lymphozyten erreicht wiederum der Sysmex XE 2100 die höchste Sensitivität, der Coulter LH 750 die höchste Effizienz und der Sapphire Cell Dyn die höchste Spezifität.

Bei der Erkennung pathologischer Blutbilder erreicht der Sysmex XE 2100 eine Sensitivität von 84,7% und eine Spezifität von 87,2%, wohingegen der Coulter LH 750 eine Sensitivität von 92,2% und eine Spezifität von 70,5% er-

reicht. Ähnlichen Ergebnisse werden von früheren Geräten der Coulterserie berichtet (Picard et al., 1999). Die Sensitivität ist hierbei etwa gleich hoch, die Effizienz konnte allerdings von 82,3% auf 88,3% verbessert werden. Der Sapphire Cell Dyn schneidet bei der Betrachtung aller untersuchter Proben stets etwas schlechter ab (s. Ergebnisteil, Kap. 3.4, Tab. 9). Es ist an dieser Stelle zu vermerken, dass das Gerät allerdings eine sehr gute Spezifität mit 97,4% erreicht. Die Sensitivität liegt aber nur bei 71,0%. Die Arbeit von Kang et al. (2007) zeigt ähnliche Ergebnisse im Hinblick auf die Spezifität, die Sensitivitäten sind teils abweichend, wobei die Ergebnisse in der Literatur geringfügig besser ausfallen (s. Anh. Tab. 4). Der Sysmex XE 2100 und der Coulter LH 750 zeigen in meiner Untersuchung bei Betrachtung der allgemein morphologischen Warnhinweise sogar bessere Ergebnisse, als bisher in der Literatur beschrieben (s. Anh. Tab. 4). Der Sysmex XE 2100 zeigt die höchste Sensitivität, ähnlich wie auch von anderen Autoren mitgeteilt (Kang et al., 2007, Ruzicka et al., 2001). Dieses geht aber wegen eines relativ hohen Anteils falsch positiver Warnhinweise zu Lasten der Spezifität (Bourner et al., 2005). Dieser Sachverhalt findet sich auch bei einem Nachfolgermodell der Sysmexreihe (Sysmex XS-1000i). Auch hier erreicht das Gerät eine sehr hohe Sensitivität bei mäßiger Spezifität (Siekmeier et al., 2001). In dieser Untersuchung konnte im Hinblick auf die allgemein morphologischen Warnhinweise dennoch eine hervorragende Spezifität erreicht werden, mit 87,2% (s. auch Ruzicka et al., 2001). Auch der Coulter LH 750 erreicht hervorragende Sensitivitäten beim gesamten Kollektiv.

Insgesamt erreichen die Geräte bezogen auf alle untersuchten Proben Effizienzen zwischen 75,8% und 88,3% für allgemeine Warnhinweise. Die höchste Effizienz erreicht in unserer Untersuchung der Coulter LH 750 (88,3%) gefolgt vom Sysmex XE 2100 (85,2%).

Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass den bisher publizierten Daten und dieser Untersuchung unterschiedliche Patientengruppen zugrunde liegen. In der vorliegenden Arbeit werden sowohl onkologische Patienten vor und unter zytoreduktiver Therapie sowie ein breit gefächertes Klientel von Notaufnahmepatienten und Patienten mit Leukozytose untersucht. Dieser Ansatz wurde gewählt, um möglichst eine hohe Anzahl an

„Problempollen“ zu erfassen. In anderen Studien werden keine derartigen Selektionen vorgenommen. Aus diesen Gründen sind die hier ermittelten und mitgeteilten Sensitivitäten, Spezifitäten und Effizienzen nur begrenzt mit früheren Untersuchungen (Lamp, 1996) oder den Ergebnissen anderer Autoren vergleichbar.

Wie schon in der Literatur beschrieben, werden auch in dieser Arbeit pathologische Blutproben mit nur einer geringen Zahl an auffälligen Zellen oder morphologischen Veränderungen häufig nicht als pathologisch erkannt. Daher ist es wichtig die qualitativen und quantitativen Hinweise, welche durch die Analysensysteme gegeben werden, im Kontext zu betrachten. Qualitative oder quantitative Warnhinweise sollten nicht isoliert betrachtet werden, da sonst die Gefahr besteht, dass pathologische Proben nicht erkannt werden. Die Nachdifferenzierungskriterien der hämatologischen Labore sollten daher sowohl quantitative als auch qualitative Kriterien berücksichtigen.

Anhand der Analyse, der in dieser Arbeit erfassten morphologische Warnhinweise, wird deutlich, dass eine gute Sensitivität in der Regel mit einer weniger guten Spezifität einhergeht. Das bedeutet eine vermehrte Anzahl an nachzudifferenzierenden Proben, was eine höhere Personalbindung im hämatologischen Labor bedeutet, da zwar alle richtig positiven bzw. pathologischen Blutbilder erfasst werden, andererseits aber auch mehr falsch positiv bzw. nicht pathologische Blutbilder der Nachdifferenzierung zugeführt werden. Entscheidet man sich für ein Gerät mit höherer Spezifität, so sinkt im Gegenzug die Sensitivität. Mikroskopisch auffällige Proben werden dann um einen gewissen Prozentsatz häufiger als falsch negativ bzw. als nicht pathologisch eingestuft und demnach auch nicht nachdifferenziert, es sei denn, die Probe wird aufgrund festgelegter numerischer Kriterien, wie z. B. Neutropenie oder Lymphozytose mikroskopisch nachbearbeitet.

4.5.1 Sensitivität und Spezifität der morphologischen Warnhinweise

4.5.1.1 Blasten / Abnorme Lymphozyten

Die Erkennung von Blasten im peripheren Blutaussstrich ist von essentieller Bedeutung bei der Diagnostik akuter Leukämien (Tohyama et al., 2005). Daher ist die Erkennung von Blasten und atypischen Lymphozyten als morphologischer Warnhinweis mit Bestandteil des Gerätevergleichs dieser Arbeit.

Der Sysmex XE 2100 erreicht die höchste Sensitivität bei der Erkennung von Blasten durch Kennzeichnung des Differenzierungsergebnisses mittels des qualitativen Warnhinweises „Blasten“, was möglicherweise an dem speziellen IMI-Kanal liegt, mit dem der Sysmex XE-2100 arbeitet. Dabei werden in diesen Kanal unreife Leukozyten detektiert und im Scattergram dargestellt, wobei die Blasten sich in einem gesonderten Bereich präsentieren. Dieses steht im Einklang mit den bisher publizierten Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Kang et al., 2007). Allerdings werden diesen Berichten nach bei onkologischen Patienten nur Sensitivitäten um 47,0% erreicht (Tohyama et al., 2005). Beim gesamten Patientenkollektiv in dieser Arbeit und anderen Studien ohne Patientenselektion werden höhere Sensitivitäten erreicht (vgl. Ruzicka et al., 2001; Kang et al., 2008). Die Spezifitäten bewegen sich unabhängig des Patientenkollektives zwischen 84,00% und 97,00%, wobei der Sapphire Cell Dyn die höchste Spezifität aber auch die niedrigste Sensitivität aufweist. Auch der Coulter LH erreicht lediglich eine Sensitivität von 47,4%, die Spezifität hingegen ist hervorragend mit 96,4%. Die Effizienz liegt beim Sapphire Cell Dyn und beim Coulter LH 750 bei 92%, der Sysmex XE 2100 erzielt eine Effizienz von 83%.

Tohyama et al. (2005) berichten von einer Fehlinterpretation von Monozyten und unreifen Granulozyten als Blasten unter Chemotherapie. Die automatischen Analysesysteme teilen die Zellen abhängig von Zellgröße, Form, Kern-Plasmarelation und Oberflächenbeschaffenheit in sogenannten Scattergrammen ein. Pathologische Zellen, wie z. B. unreife Leukozyten unter Chemotherapie, werden der Population zugeordnet, denen sie auf Grund ihrer Zellbeschaffenheit und Größe am ehesten entsprechen, es sei denn es werden noch andere Zellqualitäten aufgrund chemischer und physikalischer Eigen-

schaften mit erfasst. Hierbei können Fehlzuordnung nicht immer ausgeschlossen werden (Jung et al., 2010; Tohyama et al., 2005; Lamp, 2000).

Bei der Detektion der Blasten ist es für den klinischen Alltag von wesentlicher Bedeutung, dass auch eine geringe Anzahl von atypischen Zellen erkannt und geflagt werden, um so z. B. residuale Leukämiezellen nach Therapie zu erkennen und so den Therapieerfolg zu bewerten. Die morphologische Bewertung von Blutbildern ist hierfür nicht ausreichend. Weiterführende diagnostische Methoden, wie z. B. die Fluoreszenz in situ hybridization (FISH), Polymerase Ketten Reaktion (PCR) oder Durchflusszytometrie mit Antikörpermarkierung (Raanani et al., 2004), führen zu deutlich höheren Sensitivitäten, sind jedoch kosten- und zeitintensiv und somit für den täglichen klinischen Routinegebrauch zu aufwendig (Tohyama et al., 2005).

Die Weiterentwicklung und Verbesserung der Erkennung von Blasten durch hämatologische Analysesysteme bleibt somit eine wichtige Aufgabenstellung für die Weiterentwicklung hämatologischer Differenzierautomaten (Ward et al., 2000), damit ein kosteneffizientes Arbeiten in den Laboren und eine schnelle und genaue Diagnostik in Zukunft noch verbessert wird.

4.5.1.2. Unreife Granulozyten / Linksverschiebung

Unter dem Warnhinweis „unreife Granulozyten“ werden alle granulozytären Vorstufen (Metamyelozyten, Myelozyten, Promyelozyten) zusammengefasst. Bei einer „Linksverschiebung“ kommt es zu einem vermehrten Auftreten von stabförmigen Granulozyten (>8%). Diese Einteilung der Warnhinweise ist für alle automatischen Analysesysteme gleich.

Die Zählung unreifer Granulozyten und stabförmiger Neutrophilen und deren morphologischer Warnhinweis durch die in dieser Arbeit untersuchten Analysesysteme ist von Bedeutung für die Differenzierung von hämatologische und nichthämatologische Erkrankungen, im Besonderen bei der Diagnostik akuter inflammatorischer Prozesse (Briggs et al., 2003; van der Meer et al., 2006), bakterieller Infektionen und Sepsis, akuter Transplantationsabstoßungen (Buttarelli et al., 2008), und daher ein weiteres wichtiges Kriterium für die Evaluierung der Analysesysteme.

Der Hinweis auf das Vorliegen von unreifen Granulozyten bzw. einer Linksverschiebung wird durch den Sysmex XE 2100 mit einer hervorragenden Sensitivität und Spezifität angegeben (zwischen 70% und 98%). Der Sapphire Cell Dyn erreicht im Hinblick auf die unreifen Granulozyten lediglich eine Sensitivität von 31 % mit einer hervorragenden Spezifität von 93,8%.

Im Hinblick auf die Linksverschiebung erreicht der Sapphire Cell Dyn moderate Ergebnisse mit einer Sensitivität von 72% und einer Spezifität von 76% (s. Ergebnisteil, Tab. 10). Mit dem Coulter LH 750 werden für die Anzeige einer Linksverschiebung Sensitivitäten und Spezifitäten zwischen 60% und 85% erreicht, somit ist die Rate der falsch negativen Blutbilder deutlich geringer, jedoch die Rate der falsch positiven Blutbilder gering erhöht.

Andere Untersucher können für den Sysmex XE 2100 ähnlich gute Ergebnisse mit Sensitivitäten und Spezifitäten über 80% (Kang et al., 2008; Field et al., 2006; Ruzicka et al., 2001) berichten. Auch im Hinblick auf die Korrelation mit der manuellen Mikroskopie als Referenzmethode, wie sie in dieser Arbeit verwendet wird, konnten andere Arbeiten gute Übereinstimmungen mit Korrelationskoeffizienten über 0,8 verzeichnen (Fernandes et al., 2007; Field et al., 2006).

Dennoch muss diese Form der Referenzmethode kritisch betrachtet werden, denn es dienen lediglich 2x200 Zellen pro Blutausschlag zur Differenzierung. Bei der Betrachtung von Ereignissen mit lediglich einer geringen Anzahl von Zellen, wie es z. B. bei unreifen Granulozyten der Fall ist, ist die visuelle Auszählung deutlich im Nachteil, da pro Gesichtsfeld nur wenige Zellen auftreten und somit eine präzise Zählung der Zellen erschwert wird (Pierre, 2002). Eine höhere Sensitivität kann somit durch einen höheren Anteil an den zu flaggenden Zellen erreicht werden, in diesem Fall stabförmige neutrophile Granulozyten, Metamyelozyten, Myelozyten und Promyelozyten (Siekmeier et al., 2001). Dieser Kritikpunkt wurde auch schon in anderen Arbeiten angebracht (Fernandes et al., 2007) und stattdessen die Durchflusszytometrie als Referenzmethode angewandt (Terstappen et al., 1990, Fernandes et al., 2007). Bei der Durchflusszytometrie werden zu dem antikoagulierten Blut bestimmte mit einem Farbstoff versehene Antikörper gegeben. Diese binden an bestimmte Oberflächenantigene und danach erfolgt abhängig von der Färbung der Zellen die Einordnung in bestimmte Kategorien. Unreife Granulozyten werden dabei

durch eine fehlende Anfärbung mit CD 16-fluorescein isothiocyanat detektiert und gezählt (Fujimoto et al., 2000), da unreifen Granulozyten CD 16 Antigene fehlen und eine Anfärbung mit Anti CD 16, neben anderen Antikörpern, nicht möglich ist (Fernandes et al., 2007). Der Durchfluss an Zellen ist dabei um ein vielfaches höher als bei der manuellen Mikroskopie und somit in einem Vergleich mit der automatischen Mikroskopie der manuellen Mikroskopie vorzuziehen (Fernandes et al., 2007). Allerdings sind solche Methoden nicht routinefähig und kostenintensiv.

Butarello et al. (1992) kommen zu dem Schluss, dass die Zählung der unreifen Granulozyten durch die Analysesysteme nicht als Screeningmethode für akute Infekte genutzt werden sollte, da im klinischen Alltag bessere Screeningmethoden auf entzündliche Prozesse und Infektionen, wie das CRP, Procalcitonin, Blutkulturen etc. zur Verfügung stehen (Clyne et al., 1999; Hausfather et al., 2002). Auch andere Arbeitsgruppen (Ansari-Lari et al., 2003, Cornbleet et al., 2002) geben an, dass die Sensitivitäten bei der Erkennung von inflammatorischen Geschehnissen durch den Nachweis von unreifen Granulozyten im peripheren Blutaussstrich nicht ausreichend sind, um diese Methode als Standarddiagnostik anwenden zu können.

Dennoch kann das Vorhandensein von unreifen Granulozyten und Linksverschiebungen im Kontext mit der klinischen Anamnese und anderen diagnostischen Verfahren zum Beweis der Diagnose eines inflammatorischen Prozesses oder einer Sepsis mit herangezogen werden (Briggs et al., 2003; Wile et al., 2001; Seebach et al., 1997) und ist somit ein wichtiger Gesichtspunkt der Differentialblutbildanalyse.

5. Zusammenfassung

Die Anforderung eines „kleinen Blutbildes“ und eines „Differenzialblutbildes“ sind wohl die wichtigsten und häufigsten Laboraufträge. Dabei ist die Nutzung automatisierter Analysesysteme für die Anforderung eines „kleinen Blutbildes“ und eines „Differenzialblutbildes“ sowie die Mikroskopie ein nicht wegzudenkender Teil des hämatologischen Laboralltages.

Hierfür stehen unterschiedliche hämatologische Analysesysteme, die nach unterschiedlichen methodisch-technologischen Ansätzen arbeiten, zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit werden die folgenden Gerätesysteme untereinander und mit der mikroskopischen Differenzierung verglichen: das Gerät XE 2100 von Sysmex (Norderstedt), der Coulter LH 750 (Coulter-Beckman, Krefeld) und der Sapphire Cell-Dyn (Abbott, Wiesbaden). Die mikroskopische Differenzierung erfolgt computerassistent durch den Cellavision Diffmaster (Sysmex, Norderstedt).

Ziel der Arbeit ist es, die richtige Differenzierung der einzelnen Leukozytenpopulationen, die Anzeige morphologischer Warnhinweise und die richtige Messung von Parametern des „kleinen Blutbildes“ mit Hilfe der automatischen Analysesysteme zu untersuchen und zu vergleichen.

Eine solche vergleichende Untersuchung zur Zuverlässigkeit der automatischen Analysesysteme ist insofern schwierig, da die zu ermittelnden Parameter nicht nur rein numerisch sondern auch morphologisch und somit subjektiv definiert sind und eigentlich nur unauffällige Blutbilder gut unter den zu untersuchenden Differenzierungsautomaten vergleichbar sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine sehr gute Korrelation der, durch alle Geräte, gemessenen Kenngrößen des kleinen Blutbildes bestätigt werden.

Für die quantitative und qualitative Zuordnung der einzelnen Leukozytenpopulationen zeigen die untersuchten Analysesysteme unterschiedliche Übereinstimmungen.

Die Geräte erreichen im Vergleich untereinander und mit der computerassistenten Mikroskopie gute lineare Korrelationen für die neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Für die Monozyten und eosinophilen Granulozyten können noch akzeptable bis gute Korrelationen erzielt werden. Für die basophilen Granulozyten zeigt keines der untersuchten Geräte eine lineare Kor-

relation. Bei der Untersuchung zeigt sich, dass besonders leukopene Proben bei der Differenzierung durch automatische Analysesysteme und durch die computerassistierte Mikroskopie ein Problem darstellen, da in diesen Fällen kaum genug Zellen für eine valide und repräsentative Differenzierung gefunden werden können.

Weiterer Schwerpunkt der vorgelegten Arbeit ist die Frage, inwiefern die Geräte morphologisch auffällige Proben erkennen. Anhand falsch oder richtig erkannter morphologischer Warnhinweise lassen sich Spezifität, Sensitivität und Effizienz für die Erkennung unauffälliger und pathologischer Blutbilder errechnen, wobei die Sensitivität zu Lasten der Spezifität und umgekehrt geht. Hier erreicht der Coulter LH 750 im Hinblick auf allgemein pathologische Blutbilder und der Erkennung von Blasten/atypischen Lymphozyten die höchste Effizienz, der Sysmex XE 2100 bei der Erkennung von unreifen Granulozyten und pathologischen Linksverschiebungen. Für die Erkennung von Erythroblasten erweisen sich der Sapphire Cell-Dyn und der Coulter LH 750 als ungeeignet.

Insgesamt sind alle in dieser Arbeit untersuchten Geräte für die Erkennung pathologischer Blutbilder durch Angabe von Warnhinweisen tauglich. Es sollten keine einzelnen Warnhinweise isoliert betrachtet werden, da die Nachdifferenzierungskriterien der hämatologischen Labore so gestaltet sind, dass sie sowohl quantitative als auch qualitative Kriterien berücksichtigen und eine pathologische Probe so in der Regel erkannt wird, z.B. auf Grund anderer Geräteflags (Qualitative Warnhinweise) oder aufgrund numerische Kriterien (Quantitative Warnhinweise).

Die automatischen Analysesysteme stellen eine deutliche Arbeitserleichterung für klinische Routinelaboratorien dar.

Durch die zufriedenstellende Fähigkeit der Geräte auffällige Zellen zu erkennen kann sich eine mikroskopische Nachdifferenzierung auf Blutbilder beschränken, die die qualitativen und / oder die quantitativen Nachdifferenzierungskriterien erfüllen. Die automatischen Analysesysteme können somit eine verlässliche Vorauswahl für eine notwendige mikroskopische Nachdifferenzierung treffen und so helfen, Personalkosten einzusparen, die Qualität zu verbessern und ein zeiteffizientes Arbeiten zu ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

Abbe E.: Über Blutkörperchenzählung. Sitzungsber. der Gesellsch. f. Medizin u. Naturw. in Jena Bd. 29. 1878

Abbe E.: Gesammelte Abhandlungen, Zweiter Band: Wissenschaftliche Abhandlungen aus verschiedenen Gebieten. Patentschriften. Gedächtnisreden, Verlag Gustav Fischer, Jena 1906

Abbott GmbH & Co. KG, Abbott Diagnostics, Max-Planck-Ring 2, 65205 Wiesbaden, info-diagnostik.de@abbott.com

Amouroux I., Balay M., Marfaing-Koka A.: Evaluation of the blood analyzer Beckman Coulter LH 750: analytic performance, decision rules. Ann Biol Clin (Paris). 2003 Sep-Oct; 61(5):576-84

Ansari-Lari M.A., Kickler T.S., Borowitz M. J.: Immature granulocyte measurement using the Sysmex XE-2100: relationship to infection and sepsis. Am J Clin Pathol 2003; 120:795-799

Aulesa C., Pastor I., Naranjo D., Piqueras J., Galimany R.: Validation of the Coulter LH 750 in a Hospital Reference Laboratory. Laboratory Hematology 2003; 9:15-28

Aulesa C., Pastor I., Naranjo D., Galimany R.: Application of receiver operating characteristics curve (ROC) analysis when definitive and suspect morphologic flags appear in the new Coulter LH 750 analyzer. Laboratory Hematology 2004; 10(1):14-23

Aulesa C., Prieto M., Pinadero M., Mainar I.: Apoptosis in infectious mononucleosis: its detection with the Beckman Coulter GenS hematology analyzer. Laboratory Hematology 2005; 11(1):1-7

Autenrieth, H.: Zeittafel. In: Borovicz.ny, K.-G., Schipperges H. Siedler E. (Hrsg.). Einführung in die Geschichte der Hämatologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974; 149-154

Avenarius H.J.: Unter welchen Bedingungen ist der Einsatz von Pattern-Recognition-Systemen zur Differenzierung von Leukozyten sinnvoll? Lab Med 1995; 19, 425-429

Bain Barbara J., F.R.A.C.P., F.R.C.Path.: Diagnosis from the Blood Smear. N Engl J Med 2005; 353: 498-507

Barnes P.W., McFadden S.L., Machin S.J., Simon E.: The International Consensus Group for Hematology, Review: Suggested Criteria for Action Following Automated CBC and WBC Differential Analysis. Laboratory Hematology 2005; 11: 83-90

Bartels P.C.M., Schoorl M.: Time dependent increase of differential monocyte count on the Sysmex NE-8000. Clin. Lab. Haem. 1998; 20, 165–168

Beckman Coulter: Technical Application Information. Coulter 3-D VCS technology:<http://www.beckman.com/resourcecenter/literature/DiagLit/ClinLitList.asp?ProductCategoryID=HEMA>

Beksac M., Baksac M.S., Tipi V.B., et al.: An artificial intelligent diagnostic system on differential recognition of hematopoietic cells from microscopic images. Cytometry 1997;30: 145-150

Bhuta U.M., Ulstein H.: Evaluation of the Beckman Coulter AcT 5 diff AL Hematology Analyzer in a Hospital Setting, Lab Hematol 2003, 9(3): 167-174

Boroviczeny Ch. G.: Entwicklung der Blutzellanalytik. In Boll I., Heller S. (Hrsg.): Praktische Blutzell Diagnostik. Springer Berlin 1991; 2-6

Bourner G., Dhaliwal J., Sumner J.: Performance evaluation of the latest fully automated hematology analyzers in a large, commercial laboratory setting: a 4-way, side-by-side study. *Lab Hematol.* 2005; 11(4):285-97

Brecher G., Anderson R.E., Mc Mullen P.D.: When to do diffs how often should differential Counts be repeated? *Blood Cells.* 1980; 6: 431-439

Briggs C., Kunka S., Fujimoto H., Hamaguchi Y., Davis B.H., Machin S.J.: Evaluation of immature granulocyte counts by the XE-IG master: upgraded software for the XE-2100 automated haematology analyzer. *Lab Hematol.* 2003;9(3):117-24

Burchert-Graeve M., Kock R.: Automated leucocyte differentials in 292 patients with leucopenia: an evaluation of the Abbott CELL-DYN 3500 (CD3500) haematology analyser. *Clin Lab Haematol.* 1996 Dec; 18(4):253-9

Buttarelo M., Gadotti M., Lorenz C., Toffalori E., Ceschini N., Valentini A., Rizzotti P.: Evaluation of automated hematology analyzers. A comparative study of differential counts (imprecision and inaccuracy). *Am J Clin Pathol.* 1992 Mar; 97 (3): 345-352 in Van der Meer et al. Does the band cell survive the 21st Century? *Eur J Haematol* 2006; 76: 251-254

Ceelle H., Dinkelaar R.B., van Gelder W.: Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM 96, *J Clin Pathol* 2007; 60: 72-79

CELL DYN Sapphire: Bedienungsanleitung 56-0302/R1- 2005

Chin Yee I., Keeney M., Johnson K., Brown W., Wolfe N. & Kaplan S.: White blood cell flagging rates of the Coulter LH 750 analyzer compared with the Coulter GENÆS haematology analyzer; *Laboratory Hematology* 7, 2001; 211–216

Clyne B., Olshaker JS.: The C-reactive protein. J Emerg Med. 1999; 17:1019-1025

Cohen, J.I.: "Epstein-Barr Virus" in „Clinical Hematology“, Young, Gerson, High, Elsevier 2006; 956-966

Cornbleet P.J.: Clinical utility of the band count. Clin Lab Med. 2002; 22:101-136

Coulter Electronics, Inc.: Coulter Counter Model S-Plus IV with Three-Population Differential: Product Reference Manual, PN 423560B. Hialeah, FL: Coulter Electronics, Inc., 1983

Coulter, W. H.: High speed automatic blood cell counter and cell size analyser. Proc Natl Electr Conf 1956; 12, 1034–1042

Cornet E., Perol J.-P., Troussard X.: Performance evaluation and relevance of the CellaVisionTMDM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases, Int. Jnl. Lab. Hem. 2008; 30, 536–542

DGHO: Empfehlungen des Arbeitskreises "Laboratorium" der DGHO: Kernschatten im Blutausschlag. 2001, 12

Diem, Binder, Bettelheim: Kernschatten im Blutausschlag. JLAB Med 2005; 29(5): 333-334

DiffMaster Octavia Cytologica 2.0.: Benutzerhandbuch PM-10004-03 2002-07-09

Dörner K.: Klinische Chemie und Hämatologie, Thieme Stuttgart, Auflage 5, 2003

Ehrlich P.: Beitrag zur Kenntnis der Anilinfärbung und ihre Verwendung in der mikroskopischen Technik. Arch Mikr Anat 1877; 13:263-277

Ehrlich P.: Histologie und Klinik des Blutes. Berlin, Germany: August Hirschwald; 1891

Fernandez T., Domack L.B., Montes D., Pineiro R., Landrum E. & Vital E.: Performance evaluation of the Coulter LH 750 hematology analyzer; Laboratory Hematology 7 2001; 217–228

Fernandes B., Hamaguchi Y.: Automated Enumeration of Immature Granulocytes. Am J Clin Pathol 2007; 128: 454-463

Field D., Taube E., Heumann S.: Performance evaluation of the immature granulocyte parameter on the Sysmex XE-2100 automated hematology analyzer. Lab Hematol. 2006;12(1):11-4

Frick P.: Blut- und Knochenmarksmorphologie. Thieme, Köln 2003. S. 29

Fuchs R.: Manual zum Mikroskopierkurs Hämatologie, 2003,. Nora-Verlag , S. 350 ff

Fujimoto H., Sakata T., Hamaguchi Y, et al.: Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. Cytometry. 2000;42:371-378

Gerlach D.: Geschichte der Mikroskopie. Verlag Harri Deutsch 2009; 24-25

Gerlach D. (Hrsg.): Die Anfänge der histologischen Färbung und der Mikrophotographie, Joseph von Gerlach als Wegbereiter., Verlag Harri Deutsch 1998; 1, 3-4

Gerok W., Huber C., Meinertz T., Zeidler H. (Hrsg.): Die Innere Medizin, Urban & Fischer 2003; Roche- Lexikon Medizin, 5., 72, 11

Goossens W., Van Hove L., Ver Wilghen R.L.: Monocyte counting: discrepancies in results obtained with different automated instruments. *Journal of Clinical Pathology* 1991; 44, 224-227

Grimaldi E., Carandente P., Scopacasa F., Romano M.F., Pellegrino M., Bisogni R., De Caterina M.: Evaluation of the monocyte counting by two automated haematology analysers compared with flow cytometry. *Clin. Lab. Haem.* 2005; 27, 91-97

Grimaldi E, Scopacasa F.: Evaluation of the Abbott CELL-DYN 4000 hematology analyzer. *Am J Clin Pathol.* 2000; 113(4), 497-505

Gruber R., Ziegler-Heitbrock H.W.: Immunologische Diagnostik. In Scriba P.C. (Hrsg.), Müller F., Seifert O. (Gründungshrsg.): Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik. 73. Auflage. Springer, Berlin 2000; 173-176

Hallek M.; Bergmann M.; Emmerich B.: Chronische lymphatische Leukämie: Aktualisierte Vorschläge zu Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl* 2002; 99(19): A-1294 / B-1083 / C-1010

Hausfater P., Garric S., Ayed S.B., et al.: Usefulness of procalcitonin as a marker of systemic infection in emergency department patients: a prospective study. *Clin Infect Dis.* 2002;34: 895-901

Hedberg P, Lehto T.: Aging stability of complete blood count and white blood cell differential parameters analyzed by Abbott CELL-DYN Sapphire hematology analyzer. *Int J Lab Hematol.* 2009 Feb;31(1):87-96. Epub 2008 Jan 7

Hickey S.M., Strasburger V.C.: What every pediatrician should know about infectious mononucleosis in adolescents. *Pediatric Clinics of North America* 1997; 44, 1541–1556

Houwen B.: The differential cell count. *Lab Haem* 2001; 7, 89-100

Hulst van de, H.D.: *Light Scattering by small particles*, Dover Publications, Inc., New York, 1981

Igout J., Fretigny M., Vasse M., Callat M.P., Silva M., Willemont L., Gelle M., Lenormand B.: Evaluation of the coulter LH 750 haematology analyzer compared with flow cytometry as the reference method for WBC, platelet and nucleated RBC count; *Clin. Lab. Haem.* 2004; 26, 1–7

Imeri F., Herklotz R., Risch L., Arbetsleitner C., Zerlauth M., Risch G.M., Huber A.R.: Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: a stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clin Chim Acta.* 2008 Nov; 397(1-2):68-71. Epub 2008 Jul 25.

Johnson M., Samuels C., Jozsa N., Gorney K.: Three way evaluation of high-throughput haematology analyzers-Beckman Coulter LH 750, Abbott Cell Dyn 4000, and Sysmex XE 2100. *Lab Haem* 2002; 8 230-238

Jung S., Chae H., Lim J., Oh E.-J., Kim Y., Park Y.-J., Han K.: Differential Blast Counts Obtained by Automated Blood Cell Analyzers. *Korean J Lab Med* 2010; 30: 540-6

Kahl C., Freund M.: Peripheral blood alterations in a patient with infectious mononucleosis. *Br J Haematol.* 2010 May 5

Kang S.-H., Kim H.-K., Ham C.K., Lee D.S., Cho H.-I.: Comparison of four hematology analyzers, CELL-DYN Sapphire, ADVIA 120, Coulter LH 750, and Sysmex XE-2100, in terms of clinical usefulness. *Int J Lab Hematol.* 2008 Dec; 30(6):480-6

Knoll M., Ruska E.: *Das Elektronenmikroskop.* *Z. Physik* 78, 1932; 318-339

Kohlhaas K., Köhler E., Fiedler H.: Statistische Auswertverfahren für Methodenvergleiche. Lab Med 1993; 17, 582-583

Korninger L., Mustafa G., Schwarzingler I.: The haematology analyser SF-3000: performance of the automated white blood cell differential count in comparison to the haematology analyser NE-1500. Clin Lab Haematol.1998; 20: 81-86

Kratz A., Bengtsson H.-I., Casey J.E., Keefe J.M., Beatrice G.H., Grzybek D.Y., Lewandowski K.B., Van Cott E.M.: Performance Evaluation of the CellaVision DM96 System WBC Differentials by Automated Digital Image Analysis Supported by an Artificial Neural Network, Am J Clin Pathol 2005; 124:770-781

Kroschinsky F., Schäkel U., Ehninger G.: Leukozytose - Ursachen und Differentialdiagnostik. Internist 2007; 48:1239-1254

Lamp D.: Methodenvergleich von vier Durchflusszytometern der neueren Generation in der Routinediagnostik eines normalen hämatologischen Labors. Göttingen 1996

Leeuwenhook A.: Microscopical observations. Philos Trans R Soc Lond 1674; 9:121-128

Lehner J., Greve B., Cassens U.: Automatisierte hämatologische Analytik in kleinen, mittleren und großen Laboratorien sowie in der Transfusionsmedizin. J Lab Med 2008; 32(2): 78-91

Lehto T, Hedberg P.: Performance evaluation of Abbott CELL-DYN Ruby for routine use. Int J Lab Hematol. 2008 Oct;30(5):400-7

Linssen J., Jennissen V., Hildmann J., Reisinger E., Schindler J., Malchau G., Nierhaus A., Wielckens K.: Identification and Quantification of High Fluorescence-Stained Lymphocytes as Antibody Synthesizing/Secreting Cells Using the Automated Routine Hematology Analyzer XE-2100. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2007; 72B:157–166

Longanbach S.A., Chapman D.H., Bourlier Waldron K., Miers M.K.: Automated Cell Counting Instrumentation and Point of Care Testing. In Rodak B.F., Fritsma G.A., Doig K. (Hrsg.): *Hematology Clinical Principles and Applications*. Band 3. Saunders Elsevier 2007; 541- 561

Lüthi U., Huber A.R.: Blasten im peripheren Blutausschlag. *Therapeutische Umschau* 2004, Band 61, Heft 2; 125-129

Maedel L.B., Doig K.: Examination of the Peripheral Blood Smear and Correlation with the Complete Blood Count. In Rodak B.F., Fritsma G.A., Doig K. (Hrsg.): *Hematology Clinical Principles and Applications*. Band 3. Saunders Elsevier 2007; 175- 185

Merck E.: *Hämatologische Labormethoden*. 4. Auflage. Merck, Darmstadt, 1986

Mullaney, P.F., Dean P.N.: The small angle light scattering of biological cells. Theoretical considerations. *Biophys. J.* 1970; 10:764-772

Müller D., Ferger W., Mißmahl H.P.: Entstehung und Bedeutung der Gumprecht'schen Kernschatten bei chronisch lymphatischer Leukämie. *Blut*, Band XXI, Heft 4, Oktober 1970, 201-209

Ost V., Neukammer J., Rinneberg H.: Flow Cytometric Differentiation of Erythrocytes and Leukocytes in Dilute Whole Blood by Light Scattering. *Cytometry* 1998; 32, 191-197

Park Y., Song J., M.D., Song S, Song K. S., M.D., Ahn M. S., Yang M-S, Kim I., M.T., Choi J. R.: Evaluation of the Abbott Cell-Dyn Sapphire Hematology Analyzer. Korean J Lab Med 2007; 27:162-8

Parker E.M., Foti J.A., Wilbur D.C.: FocalPoint slide classification algorithms show robust performance in classification of highgrade lesions on SurePath liquid-based cervical cytology slides. Diagn Cytopathol 2004; 30: 107-110

Passing H, Bablok: A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. J Clin Chem Clin Biochem. 1983 Nov;21(11):709-20

Picard F., Gicquel C., Marnet L., Guesnu M. and Levy J.P.: Preliminary Evaluation of the New Hematology Analyzer COULTER® GEN•S™ in a University Hospital Clin Chem Lab Med 1999; 37(6):681–686

Pierre RV: Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. Clin Lab Med. 2002 Mar;22(1):279-97

Piersing W.: Mikroskop und Mikroskopie- ein wichtiger Helfer auf vielen Gebieten- Definition, Geschichte, Daten, Literatur, GRIN Verlag 2009; 6

Prochaska G.: Physiologie oder Lehre von der Natur des Menschen. 1820; 330-331; 339-341

Raanani P., Ben-Bassat I.: Detection of minimal residual disease in acute myelogenous leukemia. Acta Haematol 2004;112: 40-54

Riley R.S., Ben-Ezra J.M., Massey D., et al.: The virtual blood film. Clin Lab Med 2002; 22: 317-345

Romeis B.: Mikroskopische Technik, Neubearb. u. hrsg. von Böck, 17. Aufl. Urban und Schwarzenberg 1989; 2, 28-29

Ruzicka K., Veitl M., Thalhammer- Scherrer R., Schwarzinger I.: The New Hematology Analyzer Sysmex XE- 2100- Performance Evaluation of a Novel White Blood Cell Differential Technology. Arch Pathol Lab Med. 2001; 125: 391-396

Rümke C.L.: Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts. Blood Cells 1985; 11:311-314.

Schlenke P., Frohn C., Kluter H., et al. Evaluation of a flow cytometric method for simultaneous leukocyte phenotyping and quantification by fluorescent microspheres. Cytometry. 1998; 33:310-317

Schneider W.; Der Technicon H*1-Hämatologie Analysator: Das Ergebnis einer langjährigen Erfahrung mit Durchflusszytometrie und Zytochemie (Teil 1). Extracta Diagnostica 1989; 3 (4): 172-81

Seebach J.D., Morant R., Ruegg R., et al.: The diagnostic value of the neutrophil left shift in predicting inflammatory and infectious disease. Am J Clin Pathol. 1997; 107:582-591

Shelat S.G., Canfield W., Shibutani S.: Differences in detecting blasts between ADVIA 2120 and Beckman-Coulter LH750 hematology analyzers. Int J Lab Hematol 2010 Feb; 32(1 Pt 2):113-6.

Seeger H.T., Poppy U.: Zellzähl- und Differenzierungsgeräte. In Boll I., Heller S. (Hrsg.): Praktische Blutzell Diagnostik. Springer Berlin 1991; 116- 161

Siekmeier R., Bierlich A., Jaroß W.: The White Blood Cell Differential: Three Methods Compared. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.2001 May; 39(5):432–445

Stamminger G., Auch D., Diem H., Sinha P.: Performance of the XE-2100 leucocyte differential. Clin Lab Haematol. 2002 Oct; 24(5):271-80

Sysmex DEUTSCHLAND GmbH, Bornbach 1, 22848 Norderstedt, Germany,
www.sysmex.de

Taga K., Sawaya M., Yoshida M., Kaneko M., Okada M., Taniho M.:
Comparison of automated haematology analysers for detection of apoptotic
lymphocytes, 2002

Terstappen L.W., de Grooth B.G., Nolten G.M., ten Napel C.H., van Berkel
W., Greve J.: Physical discrimination between human T-lymphocyte
subpopulations by means of light scattering, revealing two populations of T8-
positive cells. *Cytometry*. 1986 Mar;7(2):178-83

Thom R.: Rationalisierung hämatologischer Untersuchungen. In : Haeckel R.
(Hersg.): Rationalisierung des medizinischen Labors. GIT Verlag Ernst
Giebeler, Darmstadt 1979; 222-295

Tohyama K., Shiga S., Itose Y., Uchihashi K., Ohkura M., Takahashi K., Itoh
M., Ichiyama S., Hamaguchi Y.: Improved Detection of Minimal Acute Myeloid
Leukemia Cells by the Use of the Combined Parameters of XE-2100
Hematology Analyzer. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2005; 66B:18–24

Theodorsen L., Holter R., Akselberg K. & Lande K.: Comparison of five
automated Haematology Analysers. *Sysmex Journal International* 1994; 4,
73–82

Theodorsen L.: Evaluation of monocyte counting with two automated
instruments by the use of CD14-specific immunomagnetic Dynabeds. *Clin.
Lab. Haem.* 1995; 17, 225-229

Tsuda I., Hino M., Takubo T., Katagami T., Kubota H., Kawai S., Tatsumi N.:
First basic performance evaluation of the XE-2100 haematology analyser. *J
Autom Methods Manag Chem.* 1999; 21(4):127-33

Tsuruda K., Tsuji T., Usui T., Kitajima S., Kihara A., Murai M., Kasada Y., Li Q., Yamada Y., Kamahiri S.: Evaluation and Clinical Usefulness of the Automated Hematology Analyzer Sysmex XE 2100. *Sysmex J Int* 1999;9: 129 - 138

Van der Meer W., van Gelder W., de Keijzer R., Willems H.: Does the band cell survive the 21st Century? *Eur J Haematol* 2006; 76: 251- 254

Vierordt, K.: Zählungen der Blutkörperchen des Menschen. *Archiv für physiologische Heilkunde* 1852, 11: 327-332

Vijay A., Gertz M.-A.: Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2007; 109: 5096-5103

Vives-Corrons J.L., Besson I., Jou J.M., Gutierrez G.: Evaluation of the Abbott Cell-DYN 3500 hematology analyzer in university hospital. *Am J Clin Pathol*. 1996 May; 105(5):553-9

Waggoner, A.S.: In "Applications of Fluoreszenz in Biomedical Sciences" (D.L. Taylor, A.S. Waggoner, R.F. Murphy, F. Lanni, R.R. Birge, eds.), Liss, New York 1986; 3-28

Ward P.C.J.: The CBC at the Turn of the Millennium: An Overview *Clinical Chemistry* 2000; 46:8(B) 1215–1220

Warner BA, Reardon DM, Marshall DP: Automated haematology analysers: a four-way comparison. *Med Lab Sci* 1990 Oct; 47(4):285-96

Walters J., Garrity P.: Performance Evaluation of the Sysmex XE-2100 Hematology Analyzer. *Laboratory Hematology* 2000; 6:83- 92

Wile M.J., Homer L.D., Gaehler S., et al.: Manual differential cell counts help predict bacterial infection: a multivariate analysis. *Am J Clin Pathol.* 2001; 115: 644-649

Wintrobe M.M.: *Blood pure and eloquent.* New York, Mc Graw-Hill, 1980

Anhang

Tabellen

- T1** Zusammenfassung der nach Passing-Bablok berechneten Korrelationen der mikroskopisch beziehungsweise mit unterschiedlichen hämatologischen Differenzierungsautomaten ermittelten relativen und absoluten Leukozytenanteile im Differenzialblutbild
- T2** Darstellung der Proben mit prozentualen Abweichungen zwischen Mikroskopie und Geräten

Abbildungen

- A1** Prozentuale Leukozytenverteilung
- A2** Relativanteil der Erythrozytenzahlen
- A3** Hämoglobinmessung
- A4** Hämatokritmessung
- A5** Relativanteil der Thrombozyten
- A6** Relativanteil der Neutrophilen
- A7** Relativanteil der Lymphozyten
- A8** Relativanteil der Monozyten
- A9** Relativanteil der Eosinophilen

T1

Zusammenfassung der nach Passing-Bablok berechneten Korrelationen der mikroskopisch beziehungsweise mit unterschiedlichen hämatologischen Differenzierungsautomaten ermittelten relativen und absoluten Leukozytenanteile im Differenzialblutbild

	Neutrophile				Lymphozyten			
	r	Regression	r	Regression	r	Regression	r	Regression
	%		Abs.		%		Abs.	
Sysmex XE 2100 - LH 750	0,93	$Y = 1,000 * X - 2,500$	0,99	$Y = 0,966 * X - 0,084$	0,98	$Y = 1,062 * X + 0,508$	0,98	$Y = 1,075 * X + 0,023$
Sysmex XE 2100 - Sapphire	0,95	$Y = 1,000 * X + 0,000$	0,99	$Y = 1,000 * X + 0,000$	0,99	$Y = 1,000 * X + 0,000$	0,99	$Y = 1,018 * X - 0,034$
Sapphire CELL DYN - LH 750	0,96	$Y = 1,000 * X - 2,000$	0,99	$Y = 0,966 * X - 0,046$	0,98	$Y = 1,014 * X + 0,916$	0,98	$Y = 1,055 * X + 0,043$
Mikroskopie - Sysmex XE 2100	0,91	$Y = 1,050 * X - 9,800$	0,94	$Y = 0,962 * X - 0,179$	0,93	$Y = 1,122 * X + 1,756$	0,83	$Y = 1,100 * X + 0,280$
Mikroskopie - LH 750	0,93	$Y = 1,000 * X - 3,000$	0,94	$Y = 1,000 * X - 0,100$	0,94	$Y = 1,000 * X + 2,000$	0,82	$Y = 1,000 * X + 0,270$
Mikroskopie - Sapphire	0,94	$Y = 1,020 * X - 6,900$	0,94	$Y = 0,965 * X - 0,164$	0,93	$Y = 1,095 * X + 1,905$	0,83	$Y = 1,084 * X + 0,292$

	Monozyten				Eosinophile			
	r	Regression	r	Regression	r	Regression	r	Regression
	%		Abs.		%		Abs.	
Sapphire CELL DYN - LH 750	0,65	$Y = 1,000 * X + 1,000$	0,69	$Y = 1,083 * X + 0,025$	0,81	$Y = 1,000 * X + 0,000$	0,80	$Y = 1,000 * X + 0,000$
Mikroskopie - Sysmex XE 2100	0,78	$Y = 1,000 * X + 1,000$	0,79	$Y = 1,143 * X + 0,029$	0,86	$Y = 1,000 * X + 0,000$	0,83	$Y = 1,000 * X + 0,000$
Mikroskopie - LH 750	0,63	$Y = 1,000 * X + 0,000$	0,67	$Y = 1,000 * X + 0,000$	0,80	$Y = 1,000 * X + 0,000$	0,88	$Y = 1,000 * X + 0,000$
Mikroskopie - Sapphire	0,73	$Y = 1,000 * X + 0,000$	0,79	$Y = 1,000 * X + 0,100$	0,82	$Y = 1,000 * X + 0,000$	0,87	$Y = 1,000 * X + 0,000$

T2

Darstellung der Proben mit prozentualen Abweichungen zwischen Mikroskopie und Geräten

		Neu [%]	Ly [%]	Mono [%]	Eo [%]	Baso [%]
Probe 6	Mikroskopie	57	44	0	1	1
	Sysmex XE 2100	42	58	1	0	0
	Coulter LH 750	46	52	2	0	0
	Sapphire Cell Dyn	40	59	1	0	0
Probe 7	Mikroskopie	87	2	10	1	1
	Sysmex XE 2100	83	7	8	3	0
	Coulter LH 750	90	3	5	2	1
	Sapphire Cell Dyn	70	12	16	2	0
Probe 9	Mikroskopie	75	11	10	4	1
	Sysmex XE 2100	58	27	11	4	0
	Coulter LH 750	62	24	11	3	1
	Sapphire Cell Dyn	58	27	11	4	0
Probe 11	Mikroskopie	83	6	12	0	0
	Sysmex XE 2100	69	8	22	0	0
	Coulter LH 750	72	9	19	0	0
	Sapphire Cell Dyn	72	8	19	0	0
Probe 12	Mikroskopie	90	4	6	1	1
	Sysmex XE 2100	77	15	8	0	0
	Coulter LH 750	79	13	8	0	0
	Sapphire Cell Dyn	76	15	9	0	0
Probe 14	Mikroskopie	9	70	8	1	0
	Sysmex XE 2100	5	82	13	0	0
	Coulter LH 750	6	87	6	1	0
	Sapphire Cell Dyn	5	84	7	2	3
Probe 16	Mikroskopie	39	36	18	3	2
	Sysmex XE 2100	34	48	13	4	2
	Coulter LH 750	38	46	12	4	1
	Sapphire Cell Dyn	36	49	10	5	1
Probe 28	Mikroskopie	93	6	3	0	0
	Sysmex XE 2100	83	9	8	0	0
	Coulter LH 750	84	8	7	0	1
	Sapphire Cell Dyn	83	9	7	1	0
Probe 34	Mikroskopie	63	18	6	14	1
	Sysmex XE 2100	60	20	4	16	0
	Coulter LH 750	79	18	3	0	1
	Sapphire Cell Dyn	59	22	5	15	0
Probe 35	Mikroskopie	81	9	8	3	0
	Sysmex XE 2100	68	16	12	3	0
	Coulter LH 750	72	13	13	3	0
	Sapphire Cell Dyn	71	12	13	3	0
Probe 37	Mikroskopie	75	3	26	0	1
	Sysmex XE 2100	45	28	27	0	1
	Coulter LH 750	53	6	41	0	0
	Sapphire Cell Dyn	40	40	16	4	2
Probe 41	Mikroskopie	33	41	15	0	0
	Sysmex XE 2100	18	62	16	0	4
	Coulter LH 750	29	60	10	1	1
	Sapphire Cell Dyn	12	62	24	0	3

		Neu [%]	Ly [%]	Mono [%]	Eo [%]	Baso [%]
Probe 49	Mikroskopie	66	9	6	20	0
	Sysmex XE 2100	58	23	9	10	0
	Coulter LH 750	59	21	8	10	1
	Sapphire Cell Dyn	59	22	9	10	0
Probe 52	Mikroskopie	56	20	5	2	1
	Sysmex XE 2100	39	38	21	2	0
	Coulter LH 750	44	26	28	1	2
	Sapphire Cell Dyn	41	29	30	2	0
Probe 64	Mikroskopie	47	26	26	1	0
	Sysmex XE 2100	39	31	30	1	0
	Coulter LH 750	46	27	26	0	1
	Sapphire Cell Dyn	46	36	16	1	0
Probe 93	Mikroskopie	85	11	4	0	1
	Sysmex XE 2100	59	33	6	1	0
	Coulter LH 750	61	33	5	1	0
	Sapphire Cell Dyn	61	33	5	1	0
Probe 121	Mikroskopie	49	46	7	1	2
	Sysmex XE 2100	15	81	4	0	0
	Coulter LH 750	18	80	1	0	0
	Sapphire Cell Dyn	16	81	2	0	1
Probe 124	Mikroskopie	67	20	10	4	1
	Sysmex XE 2100	60	16	12	2	1
	Coulter LH 750	6	25	69	0	1
	Sapphire Cell Dyn	59	28	10	2	1
Probe 139	Mikroskopie	57	28	7	20	1
	Sysmex XE 2100	38	47	4	11	0
	Coulter LH 750	58	20	7	16	0
	Sapphire Cell Dyn	38	46	4	10	1
Probe 171	Mikroskopie	39	46	14	1	1
	Sysmex XE 2100	62	30	7	1	0
	Coulter LH 750	67	27	5	0	0
	Sapphire Cell Dyn	62	30	7	1	1
Probe 232	Mikroskopie	30	57	13	2	1
	Sysmex XE 2100	17	74	7	1	1
	Coulter LH 750	20	73	6	1	1
	Sapphire Cell Dyn	17	73	8	2	0
Probe 254	Mikroskopie	84	11	5	3	1
	Sysmex XE 2100	59	31	7	3	1
	Coulter LH 750	62	28	7	3	1
	Sapphire Cell Dyn	59	30	7	4	0
Probe 368	Mikroskopie	88	4	8	0	1
	Sysmex XE 2100	64	8	28	0	1
	Coulter LH 750	71	5	24	0	0
	Sapphire Cell Dyn	87	6	6	0	0
Probe 381	Mikroskopie	63	29	8	3	1
	Sysmex XE 2100	29	67	2	1	0
	Coulter LH 750	30	64	3	1	1
	Sapphire Cell Dyn	29	64	3	1	3

Prozentuale Leukozytenverteilung

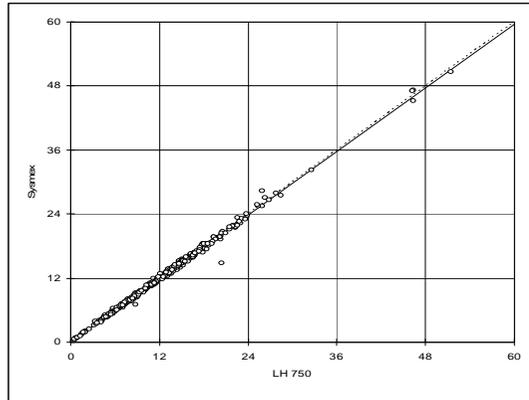


Abbildung A1a

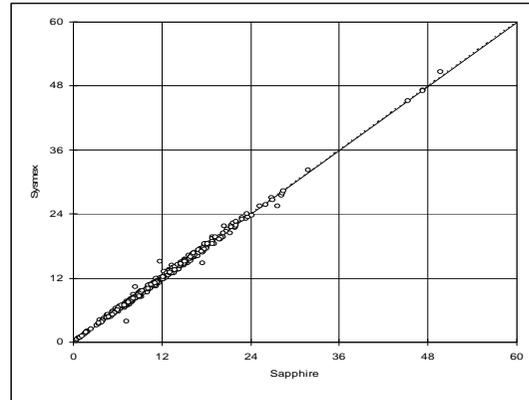


Abbildung A1b

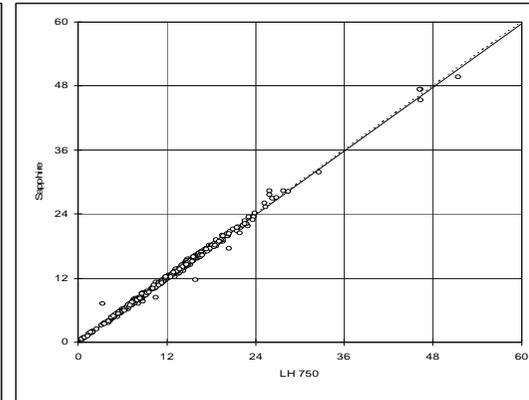


Abbildung A1c

Abb. A1 a-c

Darstellung der Vergleiche zwischen Leukozytenzahlen, die mit den durchflußzytometrischen Analysesystemen ermittelt wurden

Relativanteil der Erythrozyten

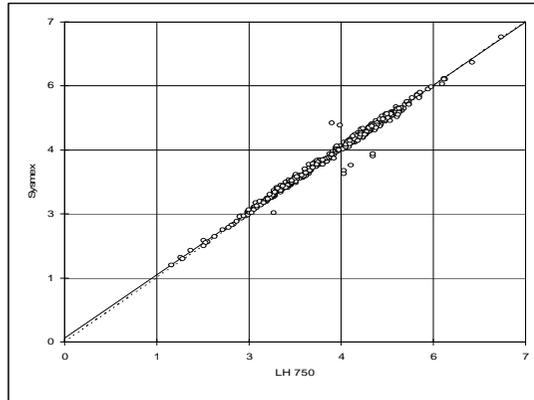


Abbildung A2a

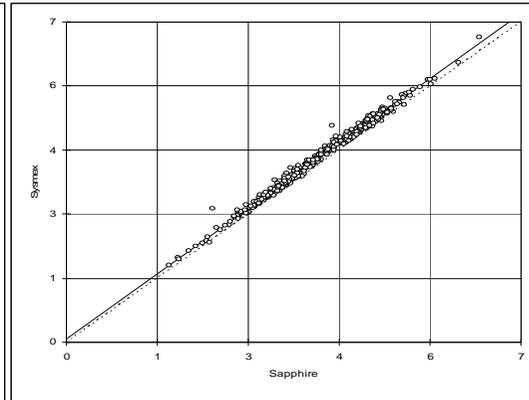


Abbildung A2b

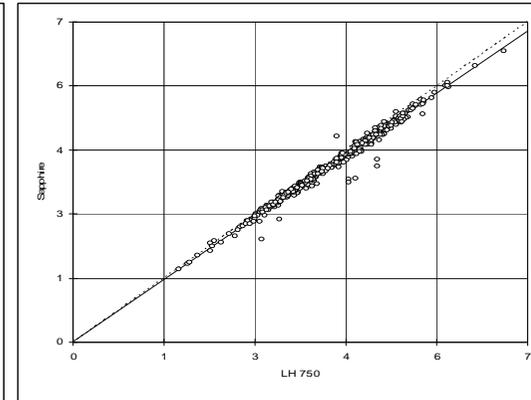


Abbildung A2c

Abb. A2 a-c

Darstellung der Vergleiche zwischen Erythrozytenzahlen, die mit den durchflußzytometrischen Analysesystemen ermittelt wurden

Hämoglobinmessung

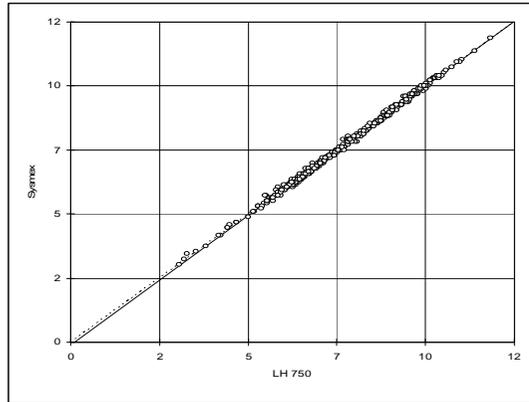


Abbildung A3a

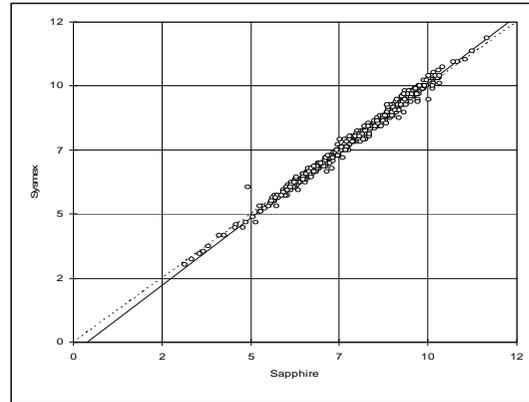


Abbildung A3b

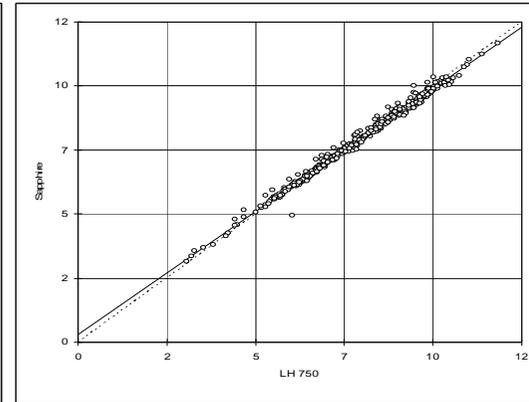


Abbildung A3c

Abb. A3 a-c

Darstellung der Vergleiche zwischen Hämoglobinwerte, die mit den durchflußzytometrischen Analysesystemen ermittelt wurden

Hämatokritmessung

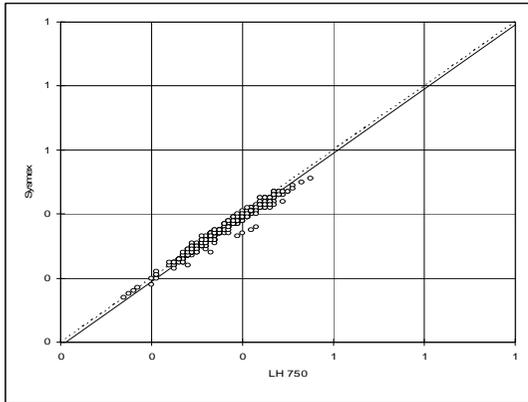


Abbildung A4a

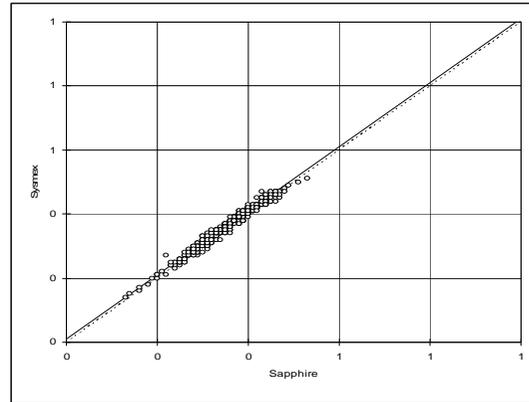


Abbildung A4b

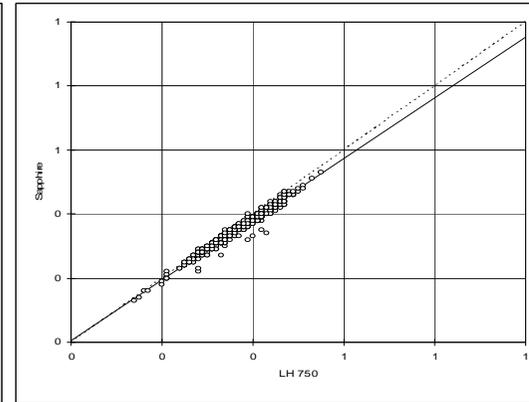


Abbildung A4c

Abb. A4 a-c

Darstellung der Vergleiche zwischen Hämatokritwerte, die mit den durchflußzytometrischen Analysesystemen ermittelt wurden

Relativanteil der Thrombozyten

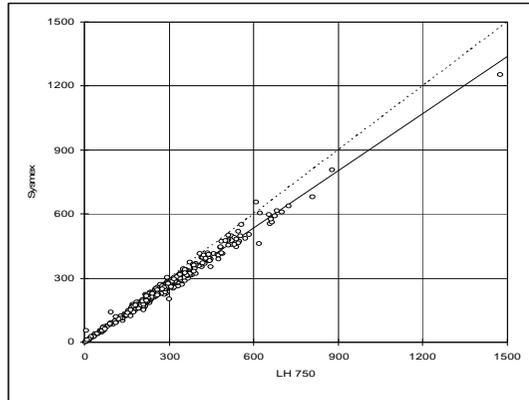


Abbildung A5a

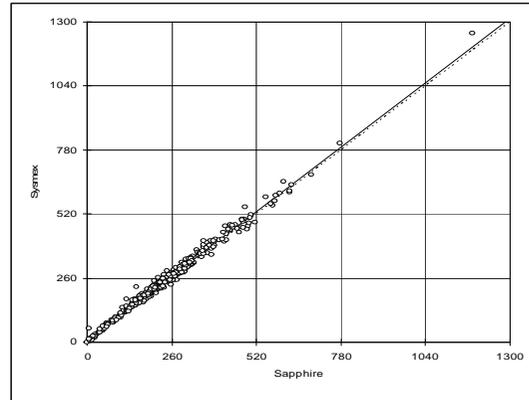


Abbildung A5b

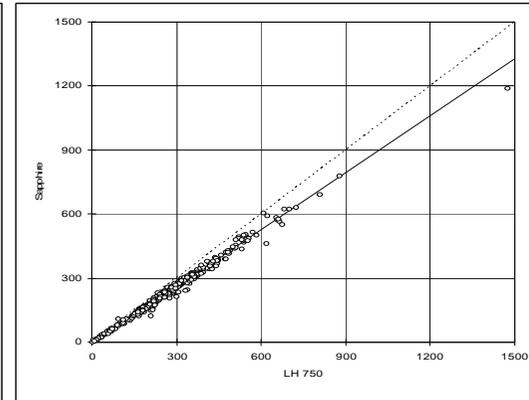


Abbildung A5c

Abb. A5 a-c

Darstellung der Vergleiche zwischen Thrombozytenwerten, die mit den durchflußzytometrischen Analysesystemen ermittelt wurden

Relativanteil der Neutrophilen

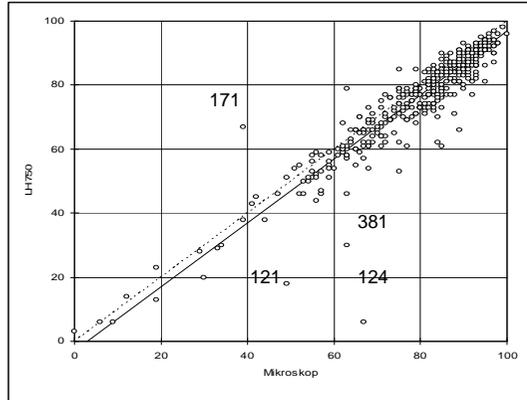


Abbildung A6a

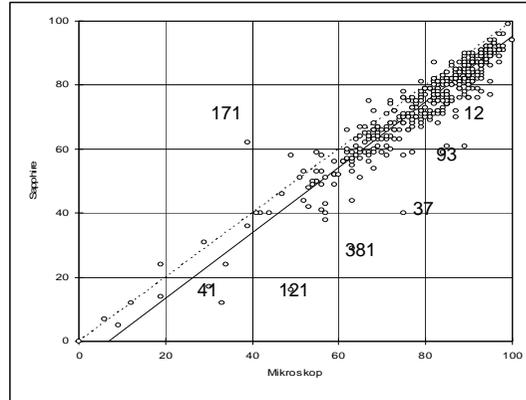


Abbildung A6b

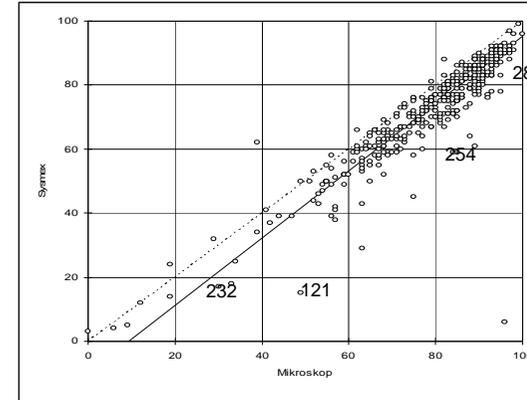


Abbildung A6c

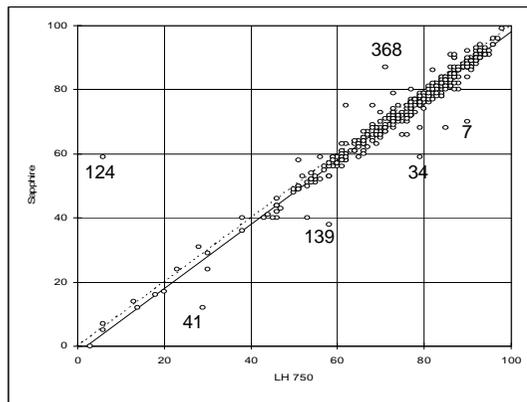


Abbildung A6d

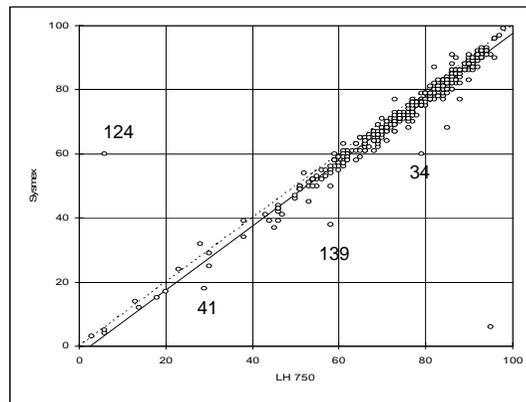


Abbildung A6e

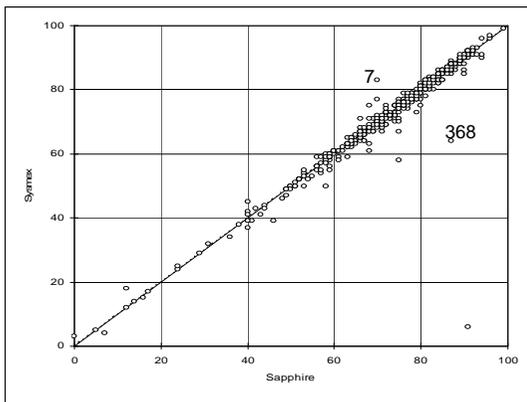


Abbildung A6f

Abb. A6 a-f

Darstellung der Vergleiche zwischen Neutrophilenzahlen, die mit den zytometrischen Analysesystemen (Sysmex XE 2100, Sapphire Cell Dyn, Coulter LH 750) ermittelt wurden und mittels mikroskopischer Auswertung. Die in den einzelnen Grafiken angegebenen Zahlen bezeichnen die Proben, die eine Abweichung von mehr als 10% aufweisen, auf die in der Arbeit näher eingegangen wird.

Relativanteil der Lymphozyten

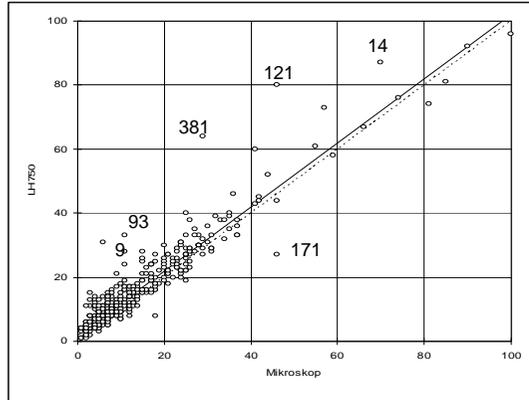


Abbildung A7a

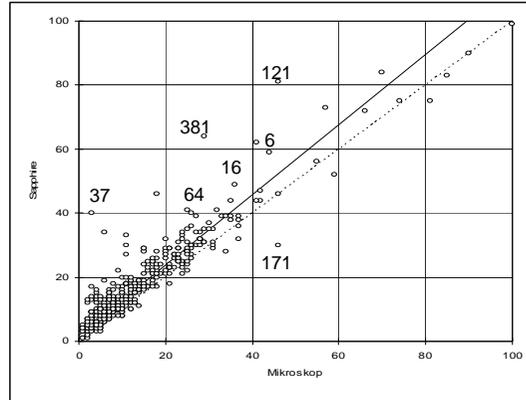


Abbildung A7b

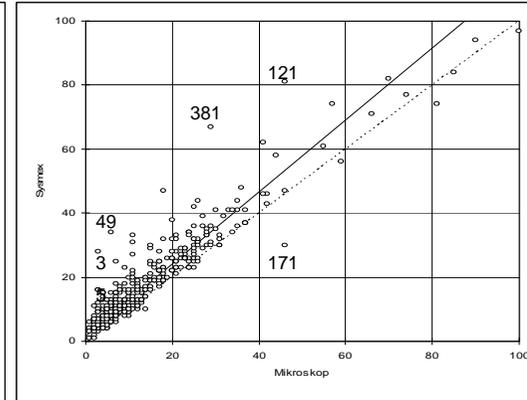


Abbildung A7c

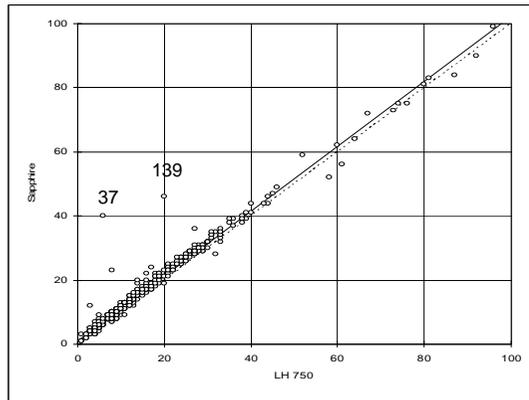


Abbildung A7d

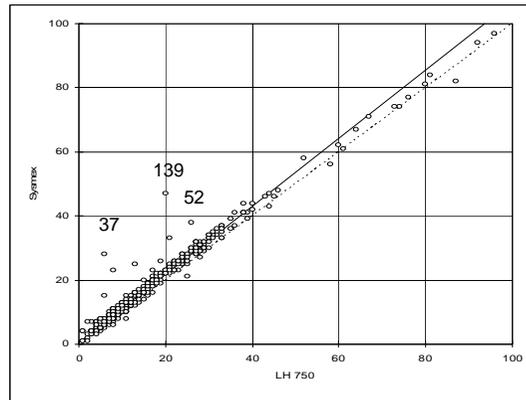


Abbildung A7e

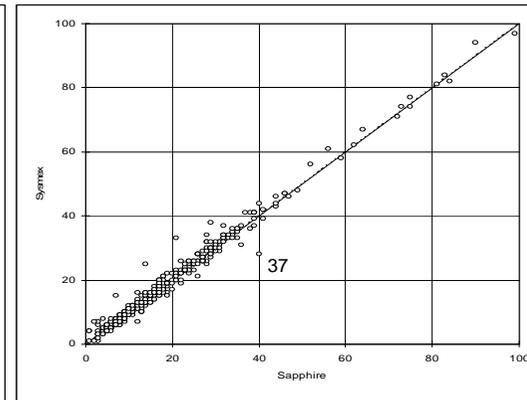


Abbildung A7f

Abb. A7 a-f

Darstellung der Vergleiche zwischen Lymphozytenzahlen, die mit den zytometrischen Analysesystemen (Sysmex XE 2100, Sapphire Cell Dyn, Coulter LH 750) ermittelt wurden und mittels mikroskopischer Auswertung. Die in den einzelnen Grafiken angegebenen Zahlen bezeichnen die Proben, die eine Abweichung von mehr als 10% aufweisen, auf die in der Arbeit näher eingegangen wird.

Relativanteil der Monozyten

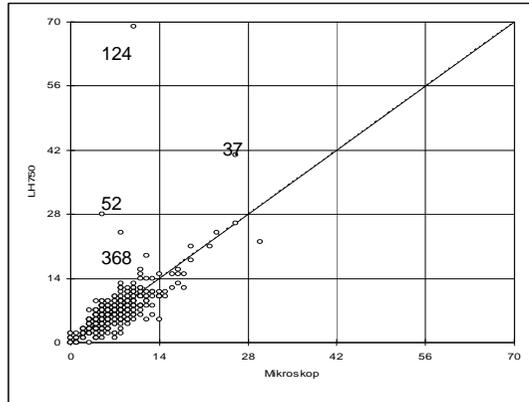


Abbildung A8a

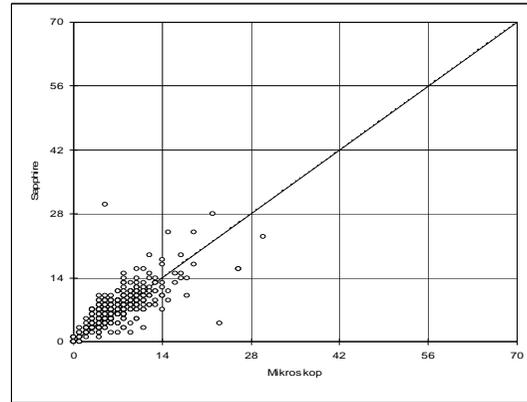


Abbildung A8b

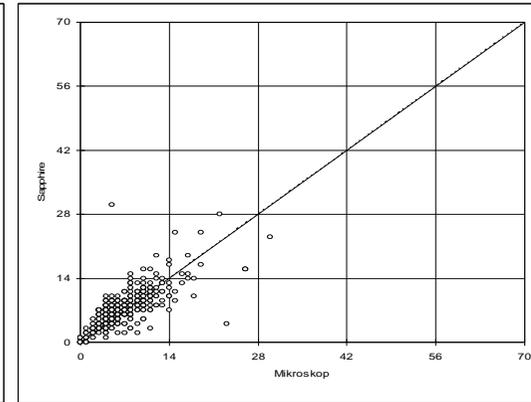


Abbildung A8c

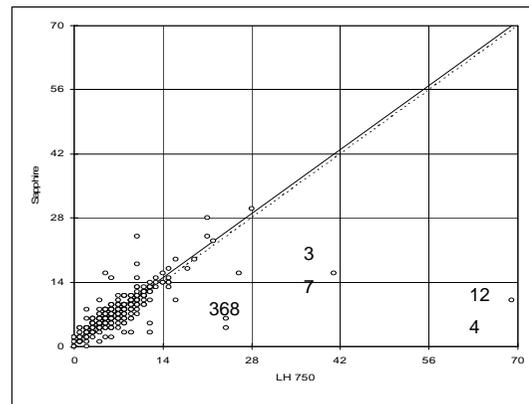


Abbildung A8d

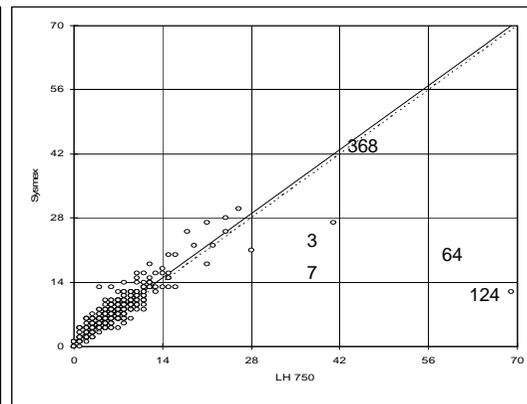


Abbildung A8e

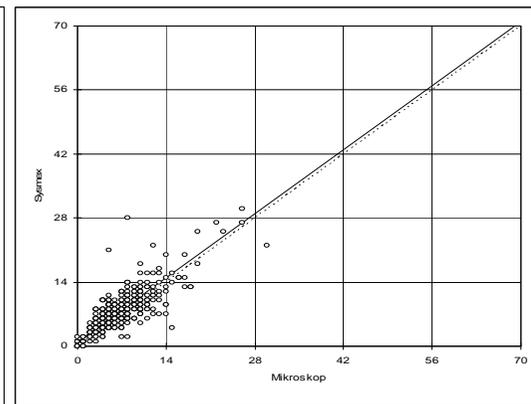


Abbildung A8f

Abb. A8a-f

Darstellung der Vergleiche zwischen Monozytenzahlen, die mit den zytometrischen Analysesystemen (Sysmex XE 2100, Sapphire Cell Dyn, Coulter LH 750) ermittelt wurden und mittels mikroskopischer Auswertung. Die in den einzelnen Grafiken angegebenen Zahlen bezeichnen die Proben, die eine Abweichung von mehr als 10% aufweisen, auf die in der Arbeit näher eingegangen wird.

Relativanteil der Eosinophilen

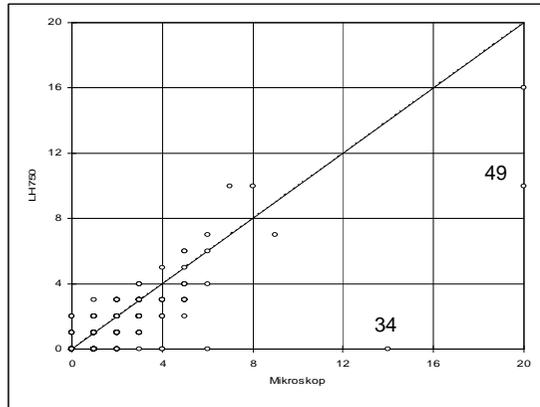


Abbildung A9a

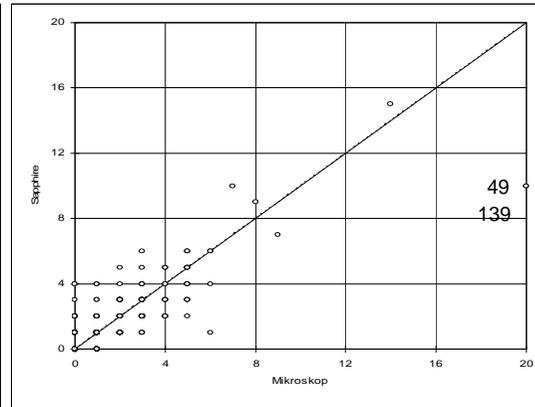


Abbildung A9b

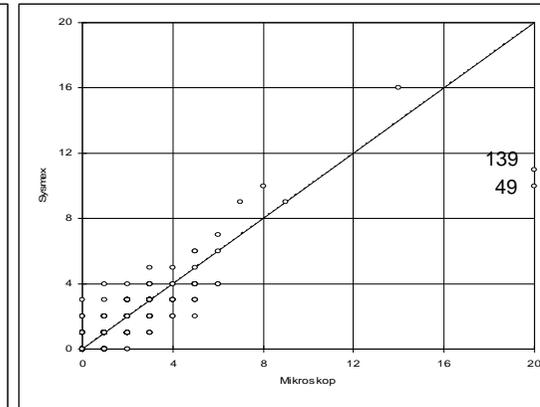


Abbildung A9c

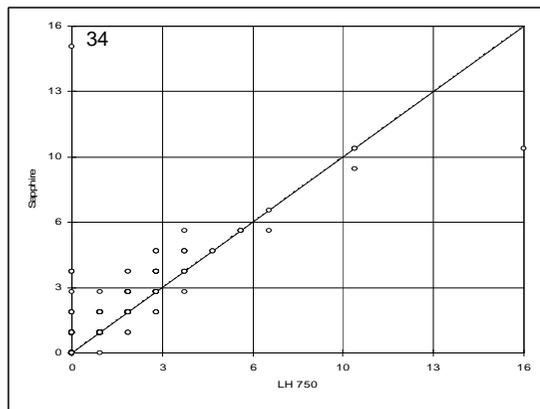


Abbildung A9d

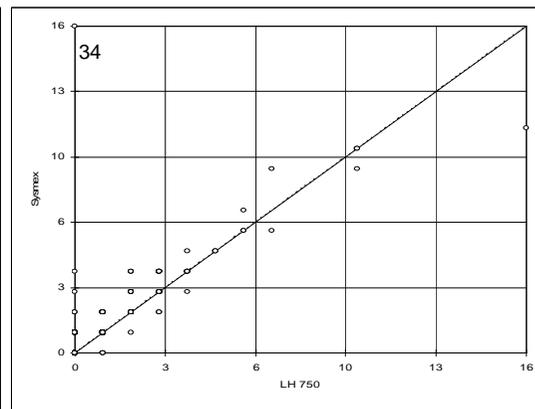


Abbildung A9e

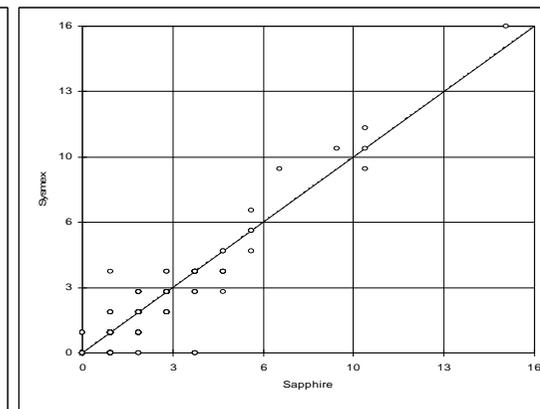


Abbildung A9f

Abb. A9 a-f

Darstellung der Vergleiche zwischen Eosinophilenzahlen, die mit den zytometrischen Analysesystemen (Sysmex XE 2100, Sapphire Cell Dyn, Coulter LH 750) ermittelt wurden und mittels mikroskopischer Auswertung. Die in den einzelnen Grafiken angegebenen Zahlen bezeichnen die Proben, die eine Abweichung von mehr als 10% aufweisen, auf die in der Arbeit näher eingegangen wird.

Thesen

1. Die Anforderung eines „kleinen Blutbildes“ und eines „Differenzialblutbildes“ sind einer der wichtigsten und häufigsten Laboraufträge im klinischen Alltag.
2. Die Nutzung automatisierter Analysesysteme für die Erbringung der Kenngrößen eines „kleinen Blutbildes“ und eines „Differenzialblutbildes“ ist heute aus Qualitäts- und Kostengründen aus dem Laboralltag nicht mehr wegzudenken.
3. Automatische Analysesysteme ermöglichen eine schnelle, zeitsparende und damit wirtschaftliche Bearbeitung von Blutbildanforderungen.
4. Die gebräuchlichsten Analysesysteme, die von der Industrie für die vergleichende Untersuchung zur Verfügung gestellt wurden, unterscheiden sich im wesentlichen durch die verschiedenen methodisch-technologischen Ansätze und die darauf basierenden Auswertalgorithmen für die Identifizierung herkömmlich morphologisch charakterisierter Zellpopulationen.
5. Die Geräte zeigen beim Vergleich eine hervorragende Übereinstimmung der Kenngrößen des Kleinen Blutbildes, was u.a. auf die Vergleichbarkeit der von den Geräten verwendeten Methoden und Technologien zurück geführt werden kann.
6. Für die apparative Differenzierung von mikroskopisch unauffälligen Blutbildern sind die Geräte ebenfalls sehr gut geeignet, was für alle untersuchten Differenzierungsautomaten vergleichbar gilt.
7. In Übereinstimmung mit der Literatur werden für die automatischen Analysesysteme im Vergleich untereinander und im Vergleich mit der computerassistierten Mikroskopie gute lineare Korrelationen für die neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten erreicht. Für die Populationen der Monozyten und der eosinophilen Granulozyten werden noch akzeptable bis gute Korrelationen gefunden. Für die basophilen Granulozyten lassen sich unter

anderem aufgrund ihrer geringen Zahl keine zufriedenstellenden linearen Korrelationen errechnen.

8. Ein generelles Problem bei der Differenzierung durch automatische Analysesysteme als auch bei der mikroskopischen Differenzierung stellen leukopene Proben dar, da in diesen Proben keine repräsentativen Zellanteile für eine valide Differenzierung gefunden werden.
9. Anhand falsch oder richtig erkannter morphologischer Warnhinweise lassen sich Spezifität, Sensitivität und Effizienz für die Erkennung unauffälliger und pathologischer Blutbilder errechnen, dabei geht bekanntermaßen die Sensitivität zu Lasten der Spezifität und umgekehrt.
10. Insgesamt sind die automatischen Analysesysteme für die Erkennung von pathologischen Blutbildern durch die Angabe von Warnhinweisen geeignet. Dabei werden die Ergebnisse besser, wenn man die Warnhinweise nicht inhaltlich betrachtet, sondern eine Probe immer dann mikroskopisch nachdifferenziert wird, wenn eine Hinweis gegeben wird, unabhängig davon ob diese Meldung sich auf ein qualitatives oder quantitatives Merkmal bezieht.
11. Auf eine mikroskopische Nachdifferenzierung aufgrund quantitativer oder qualitativer Warnhinweise kann letztlich nicht verzichtet werden. Die automatischen Analysesysteme können jedoch eine sichere Vorauswahl treffen. Über die Anzahl der in einem Labor nachzudifferenzierenden Blutbilder entscheiden letztlich die vom Labor gesetzten quantitativen Grenzen.
12. Eine wesentliche arbeitstechnische und ökonomisch wirksame Verbesserung sowie eine damit einhergehende Qualitätsverbesserung der Blutbilddifferenzierung ist die Einführung der computergestützten Mikroskopie mit Digitalisierung und automatischer rechnergestützter Zuordnung der Leukozyten zu normalen und pathologischen Zellpopulationen.
13. Die Limitationen des Diffmaster sind wesentlich abhängig von der Ausstrichqualität und der Färbequalität. Die automatisierte Ausstrichtechnologie

kann zu erheblichen Anteilen an zerstrichenen Zellen führen, wobei sich die relative Populationsverteilung relevant verändern kann; ein Problem das auch von der konventionellen Mikroskopie bekannt ist.

14. Ein weiterer Vorteil des Diffmaster ist die Archivierbarkeit der digitalisierten Differentialblutbilder einschließlich von Ausstricharealen zur Beurteilung der Erythrozytenmorphologie.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Dörre
Vorname	Julia
Straße	Tannenhofweg 41
Wohnort	40627 Düsseldorf
Geboren am	14.01.1984
Geburtsort	Ueckermünde
Familienstand	ledig
Kinder	Adam Johann Dörre, geb. 03.10.2009

Schulbildung

1990 – 1994	Grundschule Eggesin
1994 – 1998	Gymnasium Eggesin
1998 – 2003	Albert-Schweitzer Gymnasium Ueckermünde
2003	Abitur
2001 – 2002	Austauschschuljahr USA Pinelands Regional Highschool, Tuckerton, New Jersey

Studium

2003 – 2005	Vorklinisches Studium der Humanmedizin, Universität Rostock
2005	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2005 – 2009	Klinisches Studium der Humanmedizin, Universität Rostock
2009	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

08.2008 – 12.2008: Universitätsspital Zürich, Schweiz

Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe

12.2008 – 03.2009: KMG Kliniken Güstrow, Lehrkrankenhaus der Universität

Rostock, Abteilung für Allgemeinchirurgie

03.2009 – 07.2009: Universität Rostock, Klinik für Innere Medizin

Abteilung Kardiologie und Pneumologie

Berufserfahrung

seit 2010

Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe

SANA Krankenhaus Benrath, Düsseldorf

Düsseldorf, 10.05.2012

Julia Dörre

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die hier vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Düsseldorf, den 10.05.2012

Julia Dörre

Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. med. Schuff-Werner für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung, unendliche Geduld und geopfert Zeit, ohne die diese Dissertationsschrift niemals zu Stande gekommen wäre.

Dank geht zudem an Frau Gennies, die immer dafür sorgte, dass keine E-Mail unbeantwortet blieb.

Ich möchte mich auch bei den medizinisch-technischen Assistentinnen des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock bedanken, für ihre Unterstützung und Hilfe beim Umgang mit den Analysesystemen im Labor.

Bei der statistischen Auswertung standen mir Frau Drotzinger und Frau Stoltenow mit Ihrem Wissen als medizinische Dokumentare stets zur Seite, dafür vielen lieben Dank.

Herrn Dr. med. Peter Kohlschein möchte ich für die Hilfe bei der Visualisierung der mikroskopischen Befunde danken.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich von ganzen Herzen für die fortwährende Unterstützung und den unermüdlichen Glauben an mich.

Meinem Freund Michael und meinem Sohn Adam Johann danke ich für die Liebe und Motivation, die sie mir während dieser Zeit entgegengebracht haben.