

XT-2000iV – Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Tierblutanalytik

Der Begriff »Fluoreszenz-Durchflusszytometrie« ist denjenigen, die SYSMEX bereits als Partner für die Untersuchung von Vollblut aus der Humanmedizin kennen, sicherlich geläufig. Eine fluoreszenz-durchflusszytometrische Retikulozytenzählung ist seit 1989 Standard an allen SYSMEX Hämatologieautomaten mit Retikulozytenanalyse. Bis zur Einführung des xE-2100 im Jahre 1999 in der Humanmedizin hatte sich diese Technologie soweit fortentwickelt, dass sie neben der Retikulozytenzählung sowohl für die Differenzierung und Zählung von Leukozyten als auch für eine spezielle Thrombozyten-Diagnostik erfolgreich eingesetzt werden konnte. Die dabei gewonnenen Informationen gehen weit über eine schlichte Zellzählung hinaus. Sie können dem Kliniker wichtige Hilfestellungen bei der Diagnose und Unterscheidung unterschiedlicher Erkrankungen geben.

Seit 2005 steht diese Technologie mit dem XT-2000iV Hämatologieautomaten nun auch für die Tierblutanalytik zur Verfügung. Die Software wurde speziell an die Bedürfnisse des veterinärmedizinischen Labors angepasst und kommt dem Anwender mit einer außerordentlichen Flexibilität entgegen: Neben den bisher acht vordefinierten Tierprofilen gibt es die Möglichkeit, für nahezu alle weiteren Tierarten Analysenprofile manuell anzulegen. Einmal erstellte Profile können abgespeichert werden und stehen für jede weitere Messung ohne manuelle Vor- oder Nacharbeit zur Verfügung.

Durchflusszytometrie

Als Durchflusszytometrie wird die Messung von Zellen und anderen Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom bezeichnet. Dabei werden unterschiedliche optische Informationen von Zellen und anderen Partikeln, die in diesem sehr feinen Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden, erfasst. Die hieraus resultierende Streuung des Lichts wird durch die Größe und Form der Zelle, sowie durch die Struktur der Zellmembran und der intrazellulären Bestandteile beeinflusst.

Eine Trennung einzelner Zellpopulationen ist bereits basierend auf zwei Streulichtgrößen möglich:

- Die Intensität des Vorwärtsstreulichts bzw. Niedrigwinkel-Streulichts wird als Maß für die Größe des Partikels genutzt. Neben der Größe beeinflussen aber auch die Form oder der Refraktionsindex die Intensität des Vorwärtsstreulichts.
- Das Seitwärtsstreulicht bzw. Großwinkel-Streulicht liefert hingegen Informationen über die innere Beschaffenheit und Struktur des Partikels. Es wird dabei maßgeblich von der An- oder Abwesenheit von Granulae beeinflusst.

Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

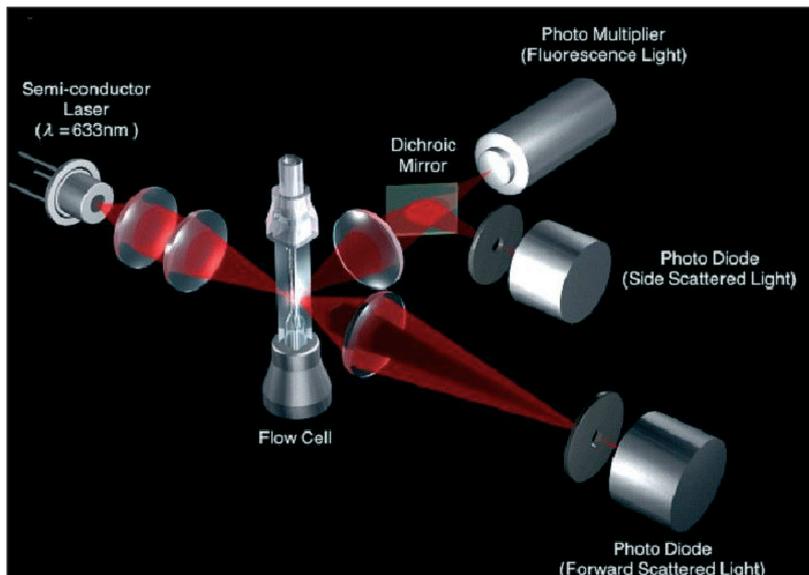


Abb. 1: Durchflusszelle und optisches System

An SYSMEX Geräten wird ein zusätzliches Lichtsignal analysiert, das Seitwärts-Fluoreszenzlicht. Hierfür wird mit einem geeigneten Reagenz die Membran der Zelle so perforiert, dass ein spezieller Fluoreszenzfarbstoff in die Zelle eindringen und, ohne die Zelle zu zerstören, Bestandteile innerhalb der Zelle anfärben kann. Der Farbstoff, der für den jeweiligen Messkanal eingesetzt wird (Polymethin-Farbstoffgruppe), färbt sowohl die Nukleinsäuren

der zytoplasmatischen Zellorganellen als auch die des Kerns an. Die gemessene Fluoreszenzintensität wird neben dem Vorwärts- oder Seitwärtsstreulichtsignal zur Differenzierung von Leukozyten eingesetzt und erlaubt Rückschlüsse auf die Teilungs- und Zytoplasma-Aktivität der detektierten Zellen, auch und gerade unter pathologischen Bedingungen. Je höher der intrazelluläre RNA-Gehalt der Zelle ist, z. B. bei unreifen Zellen oder Antikörper-produzierenden Lymphozyten, desto höher ist auch das Fluoreszenzsignal. Partikel ohne oder Zellen mit nur geringfügigem Nukleinsäuregehalt färben sich nicht oder nur sehr schwach an. Dies gilt z. B. für Lipide, lyseresistente Erythrozyten oder Retikulozyten. Die Messung bzw. Differenzierung der Leukozyten wird daher durch diese Partikel nicht gestört.

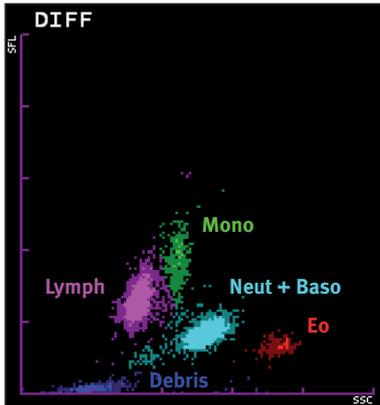


Abb. 2: Beispiel einer Humanblutprobe im DIFF-Scattergramm

Die Leukozyten-Differenzierung

Messprinzip: Erythrozyten werden lysiert und die Leukozytenmembranen so perforiert, dass SYSMEX' spezieller Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung der intrazellulären Nukleinsäuren in die Zelle eindringen kann. Die Fluoreszenzintensität (side fluorescence, SFL) der DNA und RNA im Kern und in den zytoplasmatischen Zellorganellen ermöglicht zusammen mit der Analyse des Seitwärtsstreulichts (side scatter, SSC) eine genaue Differenzierung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile (inklusive Basophile) und Eosinophile. Eosinophile Granulozyten können sehr gut von anderen Zellpopulationen getrennt werden, da in ihnen durch Reagenzeinwirkung die Granula kristallisiert und das Laserlicht somit stärker gestreut wird. Eosinophile haben dadurch das intensivste Seitwärtsstreulichtsignal aller Leukozyten.

Weiterhin bleibt in diesem Messkanal die Zellgröße unberücksichtigt. Dies bietet dem Anwender einige für die Routine sehr gut nutzbare Vorteile:

- Partikel wie Lipide, lyseresistente Erythrozyten oder Verunreinigungen durch nicht-zelluläre Partikel werden weder mitgezählt noch interferieren sie mit der Leukozytendifferenzierung. Aufgrund ihres sehr geringen oder gar nicht vorhandenen Nukleinsäuregehalts fallen sie in den sogenannten »Ghost«-Bereich (Debris) des DIFF-Scattergramms.
- Eine altersbedingte Schwellung der Zellen hat keinen Einfluss auf die Differenzierung, da nur innere Bestandteile jeder Zelle messtechnisch erfasst werden.

Die genutzten *Messsignale* sind: Fluoreszenzintensität (RNA/DNA Gehalt) – Y-Achse und Seitwärtsstreulicht (innere Struktur, Dichte, Granularität) – X-Achse.

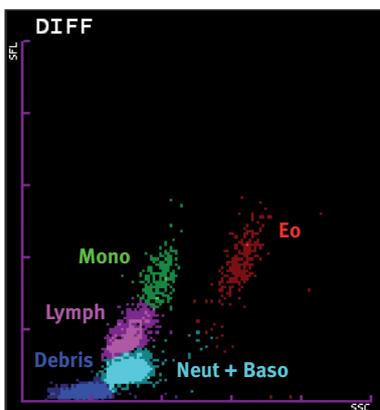


Abb. 3: Beispiel einer Katzenblutprobe im DIFF-Scattergramm

Die eosinophilen Granulozyten zeigen im Vergleich zur Humanblutprobe eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität, was auf die spezielle Beschaffenheit dieser Zellen bei Katzen zurückzuführen ist. Neutrophile Granulozyten haben dagegen ein ähnliches Seitwärtsstreulichtverhalten wie Lymphozyten und werden durch die unterschiedliche Fluoreszenzintensität voneinander getrennt. XT-2000iV bietet mit dem speziell für die hämatologischen Charakteristika von Katzenblutzellen entwickelten Algorithmus verlässliche Ergebnisse für diese Tierart. Ähnliches gilt für alle vordefinierten Tierartenprofile, die das Gerät bietet.

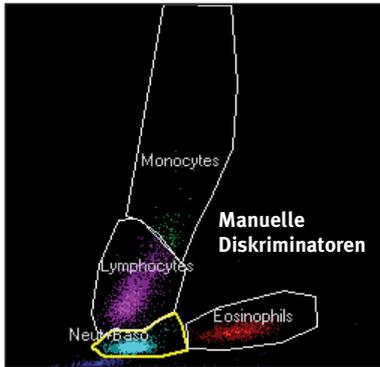


Abb. 4: Beispiel einer Schafblutprobe im DIFF-Scattergramm

Die flexible Software des XT-2000iV erlaubt dem Anwender, neben den vordefinierten 8 Tierarten auch Blute jeder denkbaren anderen Tierart zu messen und maßgeschneiderte Profile anzulegen. Hierfür können die Diskriminatoren, die die einzelnen Zellpopulationen eingrenzen und damit zuordnen, manuell mit der Computer-Maus gezogen werden. Ist ein Analysenprofil einmal erstellt, kann das neue Profil im Analysengerät gespeichert werden und steht für jede weitere Blutanalyse dieser Spezies automatisch und ohne weitere manuelle Arbeit für die Messung zur Verfügung. Solche Profile sind nicht nur einfach zu erstellen und ohne großen Aufwand an die Referenzwerte (z. B. die manuelle Zählung) anpassbar,

die Erfahrungen zeigen auch ihre sehr gute Qualität in puncto Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Bei hochpathologischen Blutproben mit extremen hämatologischen Veränderungen beeinträchtigen diese (z. B. das Vorhandensein vieler blastärer Zellen) natürlich das Ergebnis und machen eine morphologische Beurteilung unter dem Mikroskop unerlässlich. Allerdings kann auch bei diesen Proben die Flexibilität des Gerätes hilfreich sein, um beispielsweise die abnormalen Zellen quantitativ erfassen zu können.

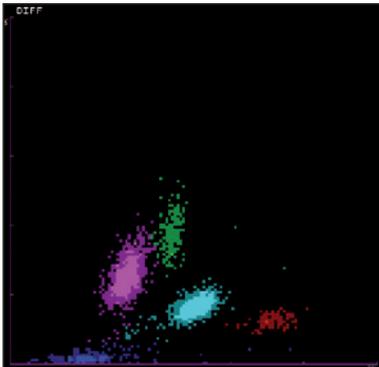


Abb. 5: Scattergramm des DIFF-Kanals bei einer Affenblutprobe

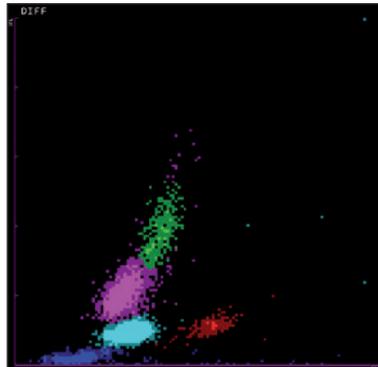


Abb. 6: Scattergramm des DIFF-Kanals bei einer Hundebloodprobe

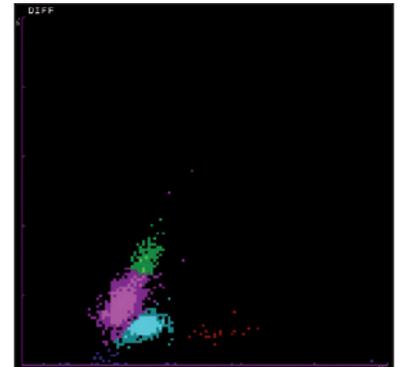


Abb. 7: Scattergramm des DIFF-Kanals bei einer Rattenblutprobe

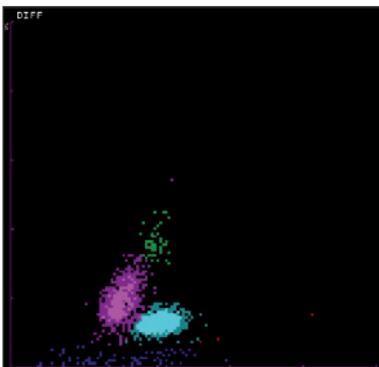


Abb. 8: Scattergramm des DIFF-Kanals bei einer Mausblutprobe

Fluoreszenz-optische Messung von Thrombozyten

Die Fluoreszenzanfärbung von Nukleinsäuren ist auch eine exzellente Möglichkeit, Erythrozyten- und Thrombozytenpopulationen messtechnisch voneinander zu unterscheiden, insbesondere wenn durch die Widerstandsmessung keine verlässlichen Ergebnisse ermittelt werden können.

Dies ist typischerweise fast immer der Fall bei der Messung von Katzenbluten. Das mittlere Erythrozytenvolumen ist bei der ausgewachsenen Katze relativ gering (MCV: 39 – 55 fL¹). Thrombozyten hingegen können in unterschiedlichsten Größen auftreten und auch das Vorkommen von Riesenthrombozyten ist bei der Katze keine Seltenheit. Erlaubt die Gerätetechnologie nur eine Trennung auf Grund der unterschiedlichen Größe beider Populationen (z. B. Impedanzmessung), so stößt man hier sehr schnell an die Grenzen der Analytik. Die Trennung und Zählung der Thrombozyten ist in manchen Fällen durch das Auftreten von Mikrozyten oder Riesenthrombozyten so stark eingeschränkt, dass die Ergebnisse nicht mehr zu verwenden sind (siehe Abb. 11, 13). Einige veterinärmedizinische Laboratorien bestimmen daher die Thrombozyten von Katzen mit der extrem zeitaufwändigen Zählung in der Kammer.

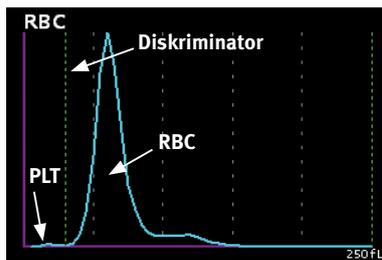


Abb. 9 Normales RBC-Histogramm einer gesunden Ratte

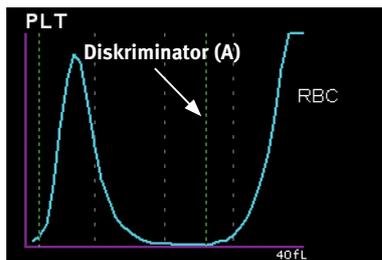


Abb. 10 Normales PLT-Histogramm einer gesunden Ratte

Abbildung 9 zeigt ein normales RBC-Histogramm einer gesunden Ratte ohne sichtbare Interferenzen; die Histogrammkurve beginnt und endet an der Basislinie. *Methode:* Impedanzmessung (Widerstandsmessprinzip)

Die Abbildung 10 zeigt ein normales PLT-Histogramm einer gesunden Ratte; die Histogrammkurve beginnt und endet an der Basislinie. A ist ein flexibler Diskriminator, der die Populationen von Erythrozyten und Thrombozyten trennt. Eine Trennung ist umso erfolgreicher, je ausgeprägter das Tal zwischen PLT und RBC der Histogrammkurve zu sehen ist und desto eher die Tal-Linie wieder zur Basis zurück kommt. Dies entspricht einem klar erkennbaren physiologischen Größenunterschied zwischen beiden Zelltypen. *Methode:* Impedanzmessung (Widerstandsmessprinzip)

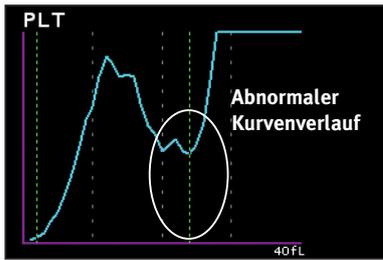


Abb. 11 Typische PLT-Histogrammkurve einer Katzenblutprobe mit einer abnormalen Verteilung

Abbildung 11 zeigt eine typische PLT-Histogrammkurve einer Katzenblutprobe mit einer abnormalen Verteilung auf Grund von Riesenthrombozyten und Mikrozyten. Stark gezackte Kurvenverläufe können ebenfalls ein Hinweis auf Thrombozytenaggregate sein. Das Thrombozytenergebnis ist in solchen Fällen meist nicht verlässlich. *Methode:* Impedanzmessung (Widerstandsmessprinzip)

Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes, der gleichzeitig für die Retikulozytendiagnostik eingesetzt wird, können auch die RNA-Bestandteile von großen oder unreifen Thrombozyten angefärbt werden. Dabei zeigen diese Thrombozyten in der Auswertung der Fluoreszenzintensität stets deutlich höhere Messsignale als vergleichbar große Erythrozyten und ermöglichen so eine ausgezeichnete Trennung beider Zellpopulationen. Speziell bei Tierarten mit physiologischen Charakteristika wie Erythrozyten und Thrombozyten vergleichbarer Größe und damit überlappende Detektion in der Impedanzmessung (Katze, aber auch bei anderen Tierarten wie Schaf oder Ziege) bietet die fluoreszenz-optische Messmethode der Thrombozyten eine verlässliche Zählung.

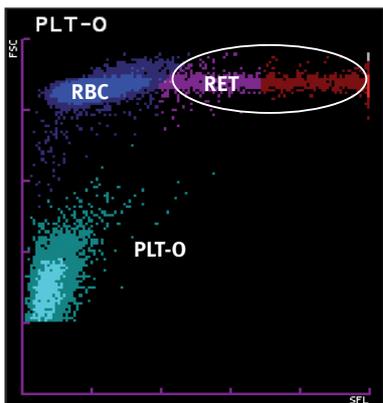


Abb. 12: Scattergramm des RET-Kanals nach Messung der Blutprobe einer Ratte; Bestimmung von Retikulozyten und fluoreszenz-optischen Thrombozyten (PLT-O)

Messprinzip: Retikulozyten sind unreife Erythrozyten mit Resten von Ribonukleinsäure im Zellplasma. Mit zunehmender Reife der Zelle nimmt der Gehalt an RNA ab. Im RET-Kanal des XT-2000iV werden die Membranen von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten so vorbereitet, dass SYSMEX' spezifischer Fluoreszenzfarbstoff in die Zelle eindringen kann und die enthaltenen Nukleinsäuren anfärbt. So können Retikulozyten auf Grund ihres erhöhten Fluoreszenzsignals (SFL) von reifen Erythrozyten unterschieden und zusätzlich in drei Reifestufen eingeteilt werden (LFR, MFR, HFR – low, medium and high fluorescence ratio). Auch Thrombozyten enthalten analog zu den Retikulozyten je nach Reifegrad mehr oder weniger RNA, deren Anteil in unreifen oder großen Thrombozyten am höchsten ist. Durch die Fluoreszenzanfärbung

ist eine sehr gute Trennung zu vergleichbar großen Erythrozyten ohne RNA-Gehalt möglich. Leukozyten werden in Kern und Plasma angefärbt und liegen auf Grund des im Vergleich deutlich höheren Fluoreszenzsignals außerhalb des Anzeigebereichs dieses Scattergramms. Sie können allerdings in einer separaten Ansicht beurteilt werden. *Genutzte Messsignale:* Vorwärtsstreuung (Größe/Refraktionsindex) – Y-Achse; Seitwärts-Fluoreszenz-Intensität (RNA/DNA Gehalt) – X-Achse

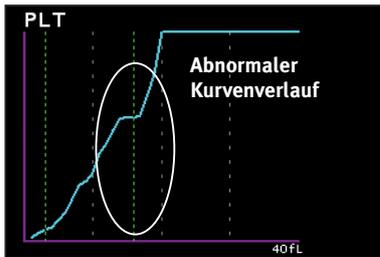


Abb. 13 PLT-Histogramm einer Katzenblutprobe mit Riesenthrombozyten und Mikrozyten

- Die Abbildung 13 zeigt das PLT-Histogramm einer Katzenblutprobe mit Riesenthrombozyten und Mikrozyten:
- abnormales Thrombozytenhistogramm
 - keine Trennung von PLT und RBC möglich auf Grund überlappender Größenbereiche
 - Das Thrombozytenergebnis (PLT-I = $117 \times 10^3/\mu\text{L}$) ist unzuverlässig.

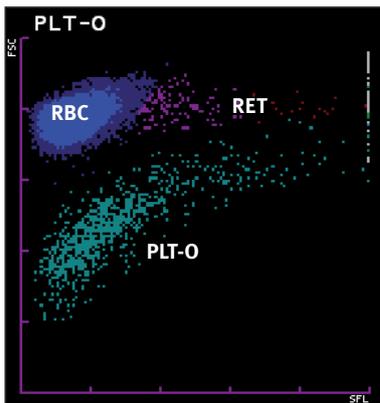


Abb. 14 RET/PLT-O-Scattergramm der gleichen Katzenblutprobe

- Die Abbildung 14 zeigt das RET/PLT-O-Scattergramm der gleichen Katzenblutprobe:
- erfolgreiche Trennung von Riesenthrombozyten und Erythrozyten gleicher Größe in der fluoreszenz-optischen Messung
 - Der Messwert der PLT-O-Messung ist deutlich höher als der der Impedanzmessung (PLT-O = $317 \times 10^3/\mu\text{L}$).
 - XT-2000iV kann so eingestellt werden, dass je nach Tierart automatisch der optische Thrombozytenwert (PLT-O) als Standard-PLT-Ergebnis angegeben wird. Ein manuelles Umschalten ist jedoch auch nach der Messung möglich.

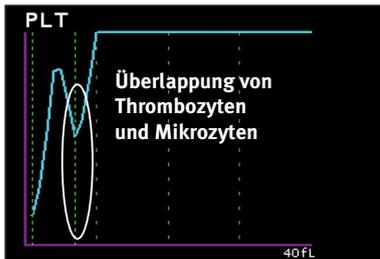


Abb. 15: Thrombozytenhistogramm einer Alpakablutprobe

Abbildung 15 zeigt ein Thrombozytenhistogramm einer Alpakablutprobe:

- unsaubere Trennung der Thrombozyten und Erythrozyten in der Impedanzmessung auf Grund extremer Mikrozytose (MCV = 17,7 g/dL).

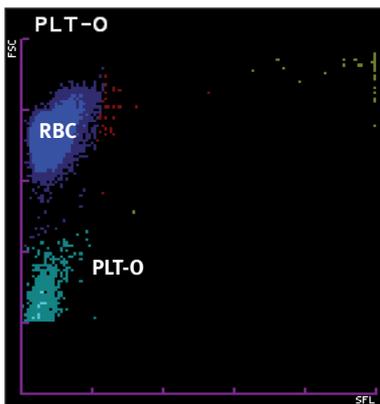


Abb. 16: RET/PLT-O-Scattergramm der gleichen Alpakablutprobe

Abbildung 16 zeigt das RET/PLT-O-Scattergramm der gleichen Alpakablutprobe:

- Erythrozyten und Thrombozyten können mit der fluoreszenz-optischen Messung trotz der extremen Mikrozytose deutlich besser voneinander getrennt werden.
- Das Analysenprofil wurde manuell eingerichtet (manuelles Gating²). Es steht dem Labor nun für alle weiteren zu messenden Alpakablutproben zur Verfügung.

Auswahl von PLT-I und PLT-O*

Thrombozytenwerte (PLT) können entweder mit der Impedanzmessung (PLT-I) oder mit der fluoreszenz-optischen Methode bestimmt werden. Welcher Wert übertragen wird, hängt von der Einstellung des Gerätes bzw. von den physiologischen Gegebenheiten der zu messenden Tierart ab. Für Tierarten mit stark überlappenden Normalbereichen für Erythrozyten und Thrombozyten (kleine Paarhufer oder Katzen) empfiehlt sich die Standardeinstellung des fluoreszenz-optischen Wertes. Für alle anderen Tierarten sollte im Regelfall der Impedanzmesswert PLT-I ausreichend sein. Weiterhin kann der zu reportierende PLT-Wert manuell nach der Messung für jede Probe individuell festgelegt werden. Hierzu steht eine einfache Umschalttaste zur Verfügung, die das jeweils andere PLT-Ergebnis zu reportieren erlaubt.

(*Die Auswahl von PLT-O ist nur in den Profilen »CBC + RET« und »CBC + DIFF + RET« möglich.)

Weitere Messmethoden des XT-2000iV im Überblick

■ Gesamtleukozytenzahl und Quantifizierung von basophilen Granulozyten

Im WBC/BASO-Kanal des XT-2000iV wird der Gesamtleukozytenwert und die Anzahl der Basophilen

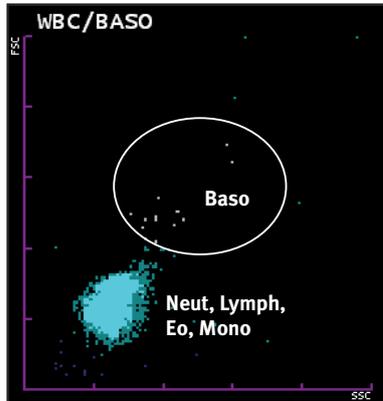


Abb. 17: WBC/BASO-Scattergramm einer Katzenblutprobe

ermittelt. Ein saures Reagenz bewirkt hier die komplette Lyse von Erythrozyten. Leukozyten werden mit Ausnahme der Basophilen bis auf den Kern geschrumpft. Die basophilen Granulozyten bleiben annähernd intakt, werden fixiert und erscheinen im Scattergramm deutlich höher positioniert als die verbleibenden Zellkerne der restlichen Leukozyten. So wird zum einen die Summe der Zellkerne plus der Basophilen als Gesamtleukozytenwert (WBC) angegeben. Zum anderen werden die im Blut enthaltenen, zahlenmäßig sehr geringen basophilen Granulozyten auf Grund des entstandenen Größenunterschiedes sehr präzise bestimmt (Abb. 17: WBC/BASO Kanal).

■ Hämoglobin-Methode

Zur Hämoglobinbestimmung setzt SYSMEX ein eigenes Reagenz (enthält Natrium-Lauryl-Sulfat, SLS) in einem von allen anderen Parametern vollkommen separierten Kanal ein. Dies macht die Hämoglobinmessung äußerst zuverlässig, genau und gleichzeitig wenig anfällig für störende Einflüsse.

Bei der SYSMEX SLS-Hämoglobin-Methode werden die roten Blutzellen lysiert und das Hämoglobin freigesetzt. Das zweiwertige Eisen des Hämoglobin-Moleküls wird zu dreiwertigem Eisen oxidiert; der hieraus entstandene, stabile Farbkomplex SLS-Hb kann photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 555 nm gemessen werden. Diese Methode ist zyanidfrei und enthält keine weiteren giftigen Substanzen. Trübungen auf Grund von Fetten werden durch die seifenartige Eigenschaft des Reagenzes stark reduziert. Durch die separate Hämoglobin-Messung sind die Ergebnisse auch bei einer extremen Leukozytose zuverlässig.

■ Erythrozyten- und Thrombozytenzählung durch Impedanzmessung mit hydrodynamischer Fokussierung

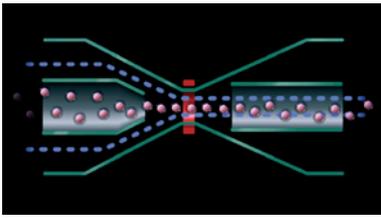


Abb. 18: Hydrodynamische Fokussierung

Der für die RBC- und PLT-Messung vorgesehene, exakt verdünnte Probenanteil wird in die Messkammer injiziert. Anschließend passiert diese verdünnte Probe mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung die Messöffnung. Der zylindrisch umhüllende Mantelstrom sorgt dafür, dass die Partikel den Messwandler optimal mittig und nicht nahe der Wandung oder in einem ungünstigen Winkel erreichen, was die Messsignale abändern und damit verfälschen

würde. Wenn Zellen durch die Messöffnung treten, erzeugen sie eine elektrische Widerstandsänderung, die als elektrischer Impuls gemessen wird. Die Größe des Impulses ist direkt proportional zur Zellgröße. Die Histogramme für RBC und PLT werden separat dargestellt und ergeben sich aus der Größenverteilung der gemessenen Impulse. Neben einer optimalen und gut reproduzierbaren Impulsgröße für jede gemessene Zelle minimiert der Mantelstrom die Verstopfungsgefahr: Die passierenden Zellen kommen nicht in Kontakt mit den Wandungen der Messöffnung und können diese somit auch nicht verstopfen.

Literatur

1. Schalm's Veterinary Haematology; Wiley; 5. Ausgabe, 2000
2. XT-2000iV – Messen Sie einfach, was Sie wollen! SYSMEX XTRA Vol. 11 Nr. 1, 2007