

# Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie (xs-Serie)

Die jüngsten Mitglieder der x-CLASS, die Geräte der xs-Serie (xs-800i und xs-1000i), verwenden modernste Messtechnologien zur Analyse der hämatologischen Parameter des Routinelabors. Auch bei diesen Geräten setzt SYSMEX die bewährte Mehrkanal-Messtechnologie mit speziell dafür entwickelten Reagenzien ein. Aus einem angesaugten Blutvolumen von nur 20 µL werden insgesamt 24 Parameter analysiert. Dazu benutzen die Geräte der xs-Serie vier verschiedene Messkanäle:

- RBC/PLT- Kanal
- Hämoglobin-Kanal
- WBC-Kanal (Bestimmung im Modus »CBC«)
- DIFF-Kanal

Zu den Ergebnissen gehören beim xs nicht einfach nur Zahlenwerte, sondern auch Histogramme und ein Scattergramm, die wichtige zusätzliche Informationen liefern. So können zum Beispiel die Zellverteilungen und die Lage von abnormalen Zellen beurteilt werden. Die Geräte prüfen automatisch den Kurvenverlauf der Histogramme und geben dem Anwender Warnhinweise bei abnormaler Verteilung. Im Nachfolgenden werden die Methoden der einzelnen Messkanäle erläutert:

## **1. RBC/PLT- Kanal: Impedanzmessung mittels hydrodynamischer Fokussierung**

Die Erythrozyten und Thrombozyten werden gemeinsam in einer Messkammer analysiert, da sie sich aufgrund ihrer physiologischen Größenunterschiede eindeutig voneinander trennen lassen. Von dem angesaugten Gesamtblutvolumen (20 µL) werden für die Erythrozyten-/Thrombozytenanalyse 4 µL benutzt. Diese werden zusammen mit CELLPACK in einer Mischkammer in einem Verhältnis von 1:501 verdünnt. Ein fest definierter Teil dieser Verdünnung (10,3 µL) wird in die Messkammer eingespritzt und durch eine Kapillaröffnung gesaugt. Wenn Zellen durch die Messöffnung treten, erzeugen sie eine elektrische Widerstandsänderung, die als elektrischer Impuls gemessen wird. Das Gerät misst die Anzahl der Impulsänderungen in einer vorgegebenen Zeit, dabei ist die Größe des analysierten Impulses direkt proportional zur Größe der Zelle, die die Messöffnung passiert hat. Mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung, einem zylindrisch umhüllenden Mantelstrom, wird gewährleistet, dass die Partikel die Messöffnung zentral und einzeln passieren. Dies verhindert Störsignale, die durch Doppeldurchtritte (Koinzidenzen) oder Rezirkulationen entstehen könnten. Somit wird auch bei extremen Zellkonzentrationen ein genaues Zählergebnis gewährleistet (Abb. 1 und 2).

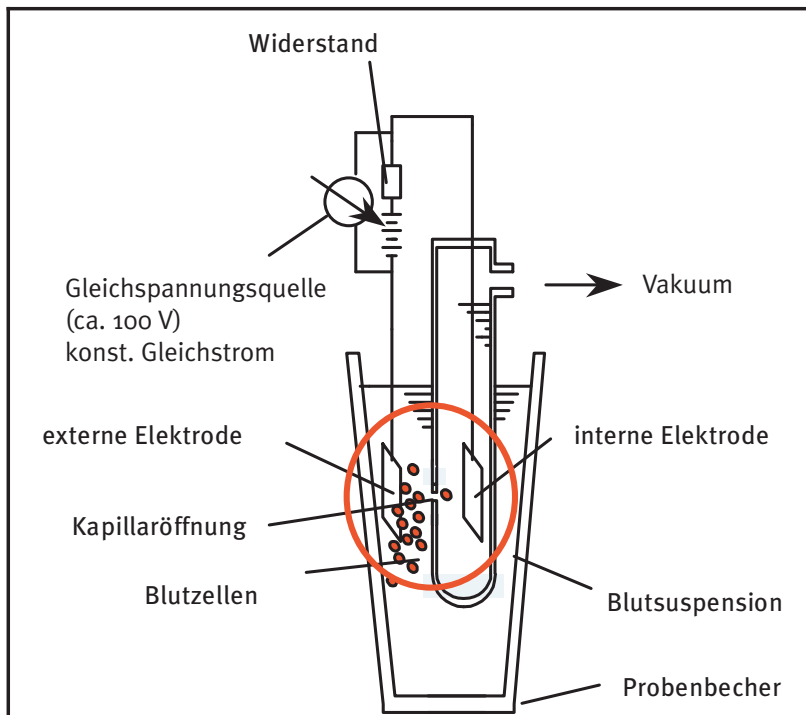


Abb. 1 Schematische Darstellung des Widerstandsmessprinzips

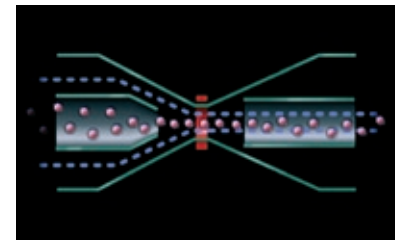


Abb. 2 Zentralstrahlprinzip mit hydrodynamischer Fokussierung

Die Zellverteilungen der Erythrozyten und Thrombozyten werden als separate Histogramme dargestellt.

In dem RBC/PLT-Kanal wird auch der Hämatokrit ermittelt. Die Messmethode dafür heißt »kumulative Impulshöhensummierung«. Jede Zelle, die aufgrund ihres Zellimpulses als Erythrozyt klassifiziert worden ist, wird dazu herangezogen. Die Erythrozytenindizes MCV, MCH und MCHC werden aus den Parametern Erythrozyten, Hämatokrit und Hämoglobin berechnet.

## 2. Hämoglobin-Kanal: SLS-Hämoglobin-Methode

Für die SYSMEX SLS-Hämoglobin-Methode wird das Reagenz SULFOLYSER eingesetzt. Bestandteil dieses Reagenzes ist Natrium-Lauryl-Sulfat (SLS), welches z. B. auch in Seifen enthalten ist. Der Verdünnung des RBC/PLT-Messansatzes wird SULFOLYSER zugesetzt, sodass eine Endverdünnung von 1:751 entsteht. SLS löst die Lipoproteine in der Zellmembran der Erythrozyten und setzt das Hämoglobin frei. Die hydrophoben Gruppen des SLS binden sich an den Globinanteil und bewirken so eine Konformitätsänderung im Hämoglobinmolekül. Dadurch wird die Oxidation des zweiwertigen Eisens möglich. Durch die Oxidation des Eisens entsteht Methämoglobin. Hydrophile Bestandteile des Natrium-Lauryl-Sulfates können nun an das entstandene dreiwertige Eisen binden. Auf diese Weise entsteht ein stabiler Farbkomplex (SLS-Hb), der photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 555 nm gemessen wird.

Diese von SYSMEX angewandte Methode ist cyanidfrei und enthält keine weiteren giftigen Substanzen. Trübungen auf Grund von Fetten werden durch die seifenartige Eigenschaft des Reagenzes stark reduziert. Durch die in einem separaten Messkanal stattfindende Hämoglobinnmessung und die hohe Verdünnung der Probe sind die Ergebnisse auch bei einer extremen Leukozytose verlässlich.

Die vom ICSH (International Council for Standardisation in Haematology) empfohlene internationale Standardmethode ist die Cyanidmessmethode. Die SYSMEX SLS-Hämoglobin-Methode wird bereits seit Anfang der 90er Jahre als Standard in Hämatologieanalysen angewendet und mehrere Studien belegen die exzellente Korrelation der beiden Methoden.<sup>2,3</sup>

### 3. WBC-Zählung im CBC-Modus: Durchflusszytometrie

Für die Zählung der Leukozyten im CBC-Modus (CBC – Complete Blood Count; Kleines Blutbild) werden 11 µL Blut mit dem Reagenz STROMATOLYSER-4DL vermischt, sodass eine Verdünnung von 1:92 entsteht. Alle Erythrozyten werden in diesem Messansatz lysiert. Die Leukozyten und Thrombozyten bleiben in ihrer natürlichen Größe erhalten. 95 µL dieses Messansatzes werden unter Verwendung des Halbleiterlasers durchflusszytometrisch analysiert. Es wird dabei das Vorwärtsstreulicht der durch die Durchflusszelle tretenden Partikel gemessen. Es wird dabei das Vorwärtsstreulicht der durch die Durchflusszelle tretenden Partikel gemessen. Das Vorwärtsstreulicht reflektiert die Zellgröße, somit steigt die Vorwärtsstreulichtintensität mit der Größe des Partikels an (Abb. 3). Die Größenverteilung der Leukozyten wird in einem Histogramm dargestellt.

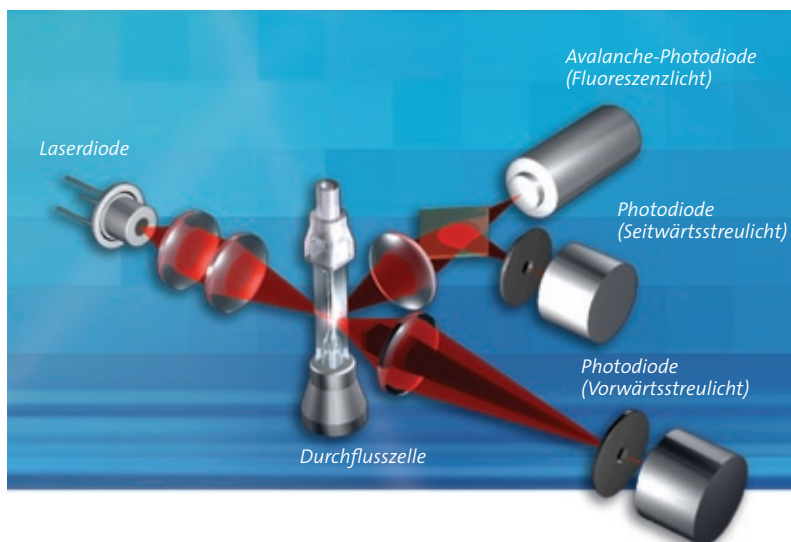


Abb. 3 Optisches System der xs-Serie

#### 4. WBC-Zählung und -Differenzierung im CBC + DIFF-Modus: Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Wenn an den Geräten der xs-Serie eine Probe im CBC + DIFF-Modus (Großes Blutbild) gemessen wird, dann wird die Anzahl der Leukozyten sowie die Leukozytendifferenzierung im DIFF-Kanal bestimmt.

Für die Messung werden zwei Reagenzien benötigt. STROMATOLYSER-4DL, mit dem das Blut in einer Verdünnung von 1:94 versetzt wird, lysiert alle Erythrozyten und perforiert die Zellmembranen der Leukozyten. Der Fluoreszenzfarbstoff STROMATOLYSER-4DS kann dadurch in die Zellen eindringen. STROMATOLYSER-4DS ist ein Polymethin-Fluoreszenzfarbstoff, der Nukleinsäuren im Kern und Zytoplasma der Leukozyten anfärben kann, wodurch Rückschlüsse auf die Zellaktivität und den Reifegrad möglich sind. Nach der Inkubationszeit werden 95 µL des Reagenz/Blut-Gemisches unter Verwendung des Halbleiterlasers durchflusszytometrisch analysiert. Es werden die Fluoreszenzintensität und das Seitwärtsstreulicht der Zellen gemessen.

Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zum RNA/DNA-Gehalt der Zelle und gibt Informationen über die Zellaktivität und Zellreife wieder. Die Seitwärtsstreulichtintensität ist abhängig von der Granulation der Zelle und der Größe oder Lobularität des Kerns, reflektiert also die interne Zellstruktur. Aufgrund dieser Zellinformationen ist es möglich, 5 separate Zellpopulationen im DIFF-Kanal darzustellen: Lymphozyten (pink), Monozyten (grün), Neutrophile (türkis), Basophile (gelb) und Eosinophile (rot). Die Informationen beider Messsignale werden im DIFF-Scattergramm dargestellt (Abb. 4).

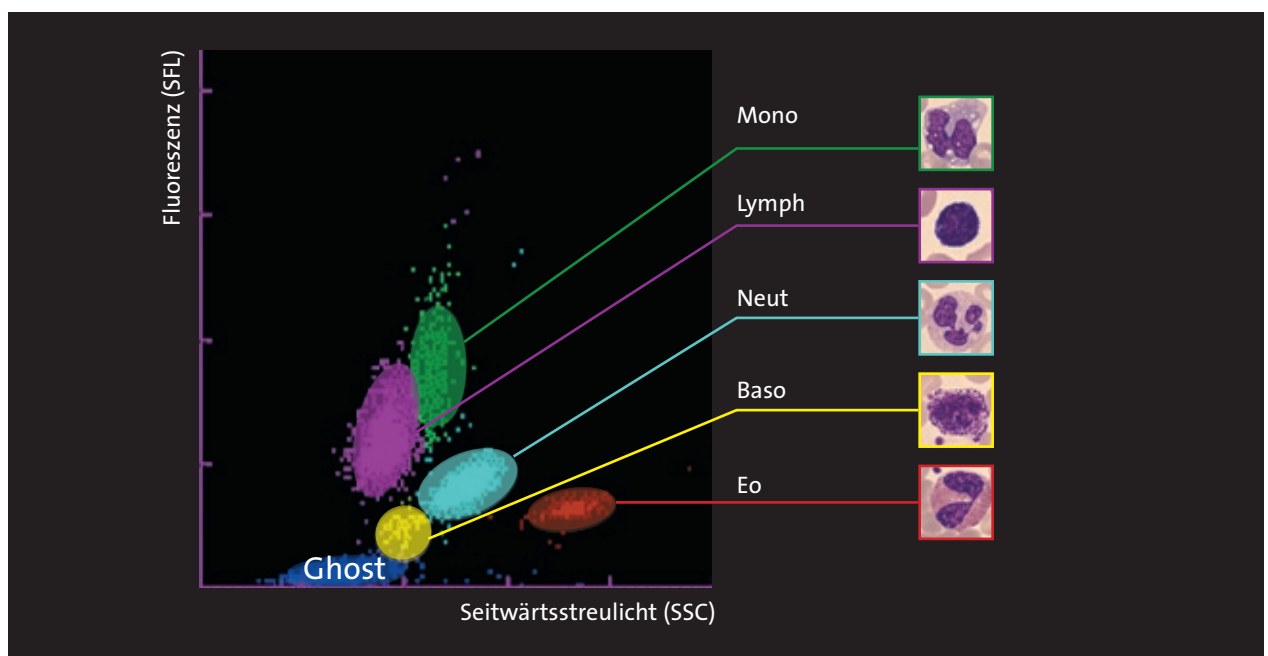


Abb. 4 Normale Zellverteilung im DIFF-Kanal

## Warnhinweise und deren Interpretationsmöglichkeiten

Aus dem Wissen über die Reaktionsabläufe im Gerät ergibt sich eine Reihe von Interpretationsmöglichkeiten für das Scattergramm und die Histogramme, die automatisch mit jeder Messung erstellt und in der Browseransicht angezeigt werden. Die Geräte der xs-Serie geben 3 Histogramme aus, jeweils eines für PLT, RBC und die WBC-Messung im CBC-Modus. Das PLT-Histogramm erfasst Thrombozyten in einem Bereich von 2–30 fL. Damit können die Thrombozyten, deren physiologisches Volumen etwa zwischen 8 und 12 fL liegt (entspricht einer Größe von ca. 1–4 µm), genauestens erfasst werden. Der Messbereich wird von sogenannten »Diskriminatoren« begrenzt, wobei der obere flexible Diskriminator die optimale Abtrennung zu den Erythrozyten setzt. Im RBC-Histogramm werden die Erythrozyten, deren Volumen zwischen 80–100 fL liegt (entspricht einer durchschnittlichen Erythrozytengröße von 7–8 µm), im Messbereich zwischen 25–250 fL erfasst.

Es gibt zwei einfache Grundregeln zur Beurteilung der Histogramme, durch die auf einen Blick erkannt werden kann, ob die Zellverteilung normal ist:

1. Die Verteilungskurve beginnt und endet an der Basislinie.
2. Die Verteilungskurve liegt innerhalb der Diskriminatoren.

Abnormale Histogramme werden vom Gerät automatisch mit Warnhinweisen gekennzeichnet: »PLT Abnormale Verteilung« und »RBC Abnormale Verteilung«. Die Ursachen für diese Flags können abnormale Höhen der Histogrammkurve an den Diskriminatoren sowie

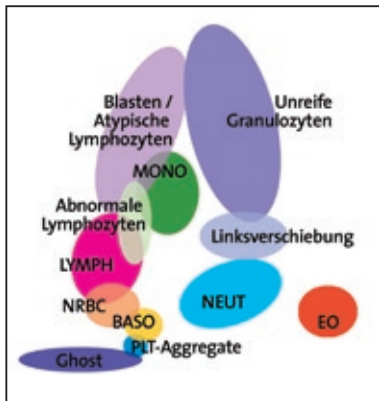


Abb. 5 Flaggingbereiche für abnormale Zellen im DIFF-Scattergramm

Mehrfachpeaks oder extreme Verteilungsbreiten sein. Das Flag »PLT-Clumps (s)?« wird aus numerischen Daten und dem Verlauf der PLT-Histogrammkurve ausgelöst.<sup>4</sup>

Zur Interpretation des DIFF-Scattergramms ist es notwendig, die Verteilung der normalen Leukozyten zu kennen. Abnormale Zellen werden im DIFF-Scattergramm nämlich an spezifischen Stellen aufgrund ihres Fluoreszenzverhaltens festgestellt (Abb. 5).

■ »Linksverschiebung?«

Das Flag »Linksverschiebung?« bezeichnet nur die stabkernigen Granulozyten. Diese liegen aufgrund einer erhöhten Fluoreszenzintensität oberhalb der normalen Neutrophilenpopulation.

■ »Unreife Granulozyten?«

Unreife Granulozyten (Metamyelozyten, Myelozyten und Promyelozyten) weisen eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität auf und befinden sich deswegen oberhalb der normalen Neutrophilenpopulation.

■ »Atypische Lymphozyten?«

Das Flag »Atypische Lymphozyten?« bildet eine zweite pinkfarbene Population im linken oberen Teil des Scattergramms. Diese Zellen weisen eine stark erhöhte Fluoreszenz aufgrund erhöhter Zytoplasmaaktivität auf. Antikörper produzierende B-Lymphozyten lösen dieses Flag aus und kommen z. B. bei Patienten mit reaktiven Erkrankungen und bei Vorhandensein von Plasmazellen vor.

■ »Blasten?«

Blasten enthalten durch ihre Proliferationsaktivität häufig einen hohen Anteil an Nukleinsäuren und färben sich daher intensiv mit dem Fluoreszenzfarbstoff an. Sie liegen deswegen auch im oberen Teil des Scattergramms, wo sich Zellen mit erhöhter Fluoreszenzintensität befinden.

■ »Abnormale Lymphozyten?«

Morphologisch abnormale Lymphozyten zeigen im DIFF-Kanal im Vergleich zu normalen Lymphozyten häufig ein leicht erhöhtes Seitwärtsstreulichtsignal, welches durch eine veränderte Struktur, Dichte oder Granularität der Zellen ausgelöst wird. Dies führt dazu, dass das Flag zwischen der Population der Lymphozyten und Monozyten generiert wird.

■ »NRBC?«

Unreife erythrozytäre Vorstufen werden in dem Bereich zwischen der Ghost- und der Lymphozytenpopulation erfasst. Das Zytoplasma wird lysiert und nur der Kern färbt sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff an. Wenn eine vermehrte Anzahl von Zellen in diesem Bereich liegt, sollte eine Korrektur der Leukozytenzahl vorgenommen werden.

Korrigierte WBC-Zahl = WBC-Zahl der automatisierten Messung x 100 / NRBC (im Ausstrich) + 100

■ »PLT-Clumps?«

Das Detektionsgebiet für Thrombozytenaggregate liegt im DIFF-Kanal zwischen den Bereichen der Ghost-Wolke und der basophilen Granulozyten. Bei vermehrtem Auftreten von Thrombozytenaggregaten ist der Thrombozytenwert falsch niedrig. Daher sollten die Ergebnisse durch eine Messung aus einer erneuten Blutentnahme überprüft werden. Bei Auftreten einer EDTA-Unverträglichkeit kann die Messung der Thrombozyten aus Citratblut helfen, richtige Ergebnisse zu erzielen.

Ausführliche Beschreibungen zu den Warnhinweisen, erläutert an Befundbeispielen, finden Sie in der Fallsammlung »Klinische Fallbeispiele der xs-Serie« und im Anwenderhandbuch.<sup>4,5</sup>

## Literatur

- 1) Thrombozytenverteilungskurven: Interpretationen, Möglichkeiten und Grenzen; *SYSMEX XTRA 11/2000*
- 2) Recommendation for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition); *J. Clin Patholog. 1996; 49:271-274*
- 3) Lewis et al; Lauryl sulphate haemoglobin: a non-hazardous substitute for HiCN in haemoglobinometry; *Clin Lab Haematology 1991; 13:279-290*
- 4) *XS-1000i/XS-800i Gebrauchsanweisung, Revisionsstand September 2005; Kapitel 11: Technische Daten*
- 5) *Sammelordner: Klinische Fallbeispiele der XS-Serie; SYSMEX 2007*

## Gerätespezifikationen<sup>4</sup>

<b>Abmessung der Haupteinheit inkl. Sampler</b>	Breite	320 mm	
	Höhe	503 mm	
	Tiefe	385 mm	
<b>Gewicht der Haupteinheit inkl. Sampler</b>		ca. 24 kg	
<b>Peripheriegeräte</b>	Drucker Handbarcodeleser		
<b>Anzeigebereich</b>	WBC	0,0 – 999,99 x 10 <sup>3</sup> /μL	
	RBC	0,0 – 99,99 x 10 <sup>6</sup> /μL	
	HGB	0,0 – 30,0 g/dL	
	HCT	0,0 – 100,0 %	
	PLT	0 – 9.999 x 10 <sup>3</sup> /μL	
<b>Angesaugtes Blutvolumen</b>	manueller, offener Modus vorverdünnter Modus	ca. 20 μL vorverdünnte Proben im Verdünnungsverhältnis 1:7, ca. 70 μL werden angesaugt	
<b>Durchsatz</b>	manueller, offener Modus vorverdünnter Modus	ca. 60 Proben / Stunde ca. 55 Proben / Stunde	
<b>Datenspeicherkapazität</b>	Analysendaten	10.000 Proben	
	Patientendaten	5.000 Personen	
	Auftragsdaten	1.000 Proben	
	Qualitätskontrolldateien	21 Dateien	
<b>EDV</b>	bidirektional	selektiv	
<b>Leerwertgrenzen</b>	WBC	0,1 x 10 <sup>3</sup> /μL	
	RBC	0,02 x 10 <sup>6</sup> /μL	
	HGB	0,1 g/dL	
	PLT	10 x 10 <sup>3</sup> /μL	
<b>Linearität im Vollblutmodus</b>	WBC	0 – 100,00 x 10 <sup>3</sup> /μL 100,01 – 310,00 x 10 <sup>3</sup> /μL 310,01 – 400,00 x 10 <sup>3</sup> /μL	± 0,3 x 10 <sup>3</sup> /μL oder ± 3% ± 6% ± 11%
	RBC	0,0 – 8,00 x 10 <sup>6</sup> /μL	± 0,03 x 10 <sup>6</sup> /μL oder ± 3%
	HGB	0,0 – 25,0 g/dL	± 0,2 g/dL oder ± 2%
	HCT	0,0 – 60,0 %	± 1 % HCT oder ± 3%
	PLT	0 – 2.000 x 10 <sup>3</sup> /μL 2.001 – 5.000 x 10 <sup>3</sup> /μL	± 10 x 10 <sup>3</sup> /μL oder ± 5% ± 16%

<b>Parameter</b>	Vollblutmodus und Vorverdünnungsmodus	WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, NEUT#, LYMPH#, MONO#, EO#, BASO#, NEUT%, LYMPH%, MONO%, EO%, BASO%, RDW-SD, RDW-CV, PDW, MPV, P-LCR, PCT
<b>Qualitätskontrolle</b>	$\bar{X}$ - oder L-J-Kontrolle $\bar{X}_M$ (XbarM) Kontrollmaterial: - e-CHECK (XS) - e-CHECK (XE)	20 Dateien, 38 Parameter, 300 Punkte 1 Datei, 42 Parameter, 300 Punkte  Kontrolle aller Parameter in drei Konzentrationsbereichen
<b>Verbrauchsmaterial</b>	CELLPACK STROMATOLYSER-4DL und 4DS  SULFOLYSER CELLCLEAN	Verdünnungsflüssigkeit Analyse von WBC, BASO, NEUT, LYMPH, MONO, EO HGB-Reagenz Reinigungsmittel
<b>Wartung</b>	Täglich: - Shutdown - Wasserfalle kontrollieren Wöchentlich: - Spülzyklus	Dauer ca. 3 min   Dauer ca. 15 min
<b>Reagenzienmanagement</b>	Funktionen	Reagenz erfassung Verfallsdatumsüberprüfung Reagenzienprotokollanzeige Restvolumenanzeige
<b>Online-Services</b>		
IQAS ONLINE:	Datenvergleich der Qualitätskontrollmessungen mit dem Gruppenmittelwert aller Teilnehmer	
REMOTE MONITORING:	Das Gerät sendet die Fehlerdateien zur Analyse automatisch beim Durchführen des Shutdowns	
C-RAS:	Central Remote Access, direkter Zugriff durch DFÜ auf den PC des Gerätes zu Servicezwecken	