

XE-2100: Bedeutung der Fluoreszenz-markierten Thrombozyten-Bestimmung im Vergleich zur CD-61-markierten Thrombozyten-Bestimmung

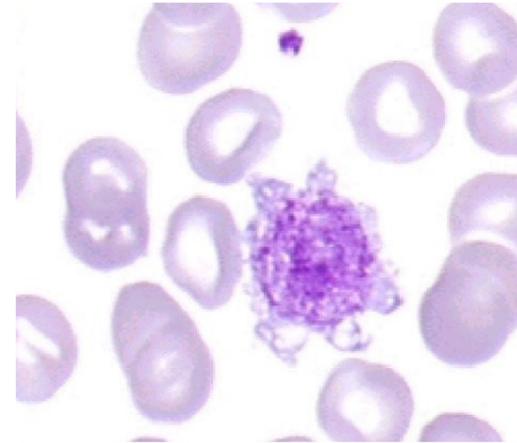


Abb. 1: Riesenthrombozyt

Die vollautomatische Zählung der Thrombozyten mit einem nach dem Widerstands- oder dem optischen Messprinzip arbeitenden Hämatologiesystem ist heute in allen hämatologischen Laboratorien diagnostischer Standard. Einer der wichtigsten Gründe ist neben der Zeitersparnis der deutlich geringere statistische Fehler aufgrund der wesentlich größeren Zahl der untersuchten Zellen.

Automatische Messprinzipien sind:

a) Das Widerstands-Messprinzip ist eine Volumen-Messung, die durch die Verwendung einer hydrodynamischen Fokussierung eine noch genauere Präzision aufweisen kann.

b) Das rein optische Messprinzip (Streulicht-Messung) ist eine Größen- und Granularitätsmessung.
c) Das optische Messprinzip in Kombination mit Fluoreszenz-Markierung ist in der Lage, neben der Größe der Zelle auch den RNA / DNA-Gehalt der Zelle zu berücksichtigen.

d) Das optische Messprinzip in Kombination mit CD61-Markierung ist eine Antigen-spezifische Membran-Erkennung. Diese ist heute die Referenz-Methode für die Thrombozytenzählung (nicht beeinflussbar durch morphologische Änderungen). Diese Methode ist halbautomatisch (zeitaufwändig) und mit hohen Kosten behaftet.

Die automatische Zählung der Thrombozyten kann mit einem messtechnischen Problem behaftet sein (Richtigkeitsproblem), wenn die Thrombozyten ein größeres Volumen haben als 30 fl (Pseudothrombopenie) oder wenn die Erythrozyten kleiner sind als 25 fl (Pseudothrombozytose). Gleichermaßen können andere, sehr kleine Partikel wie WBC-Fragmente oder

andere „Nicht-Zell-Anteile“ als Thrombozyten gezählt werden. Dieses Problem besteht dann, wenn man nur nach Volumen bzw. Größe zwischen Thrombozyten und Erythrozyten trennt (Impedanz- und (in machen Fällen auch) Streulicht-Verfahren).

Klinisch relevante Richtigkeits-Probleme der Thrombozytenzählung können entstehen bei:

- Myelodysplastischen Syndromen, in den meisten Fällen Thrombozytopenien mit Dysplasiezeichen wie z. B. degranulierte Thrombozyten (Streulicht-Richtigkeitsproblem) oder Fragmentozyten (Impedanz- und Streulicht-Richtigkeitsproblem).
- Hämolytischen Anämien mit Erythrozyten-Fragmentierung (Impedanz- und Streulicht-Richtigkeitsproblem).
- Immunthrombozytopenie (ITP), einer Thrombozytopenie im therapeutischen Bereich. Häufig geht diese Erkrankung mit dem Vorkommen von Riesenthrombozyten einher (Impedanzrichtigkeitsproblem).
- Aplastischem Knochenmark mit einer Thrombozytopenie im therapeutischen Bereich; das Vorkommen von Riesenthrombozyten ist möglich (Impedanzrichtigkeitsproblem).

Diese Richtigkeitsprobleme machen es schwierig, eine richtige klinische Entscheidung bei thrombopenischen Proben im therapeutischen Bereich (Thrombozyten-Transfusion) zu treffen, wenn ein messtechnisches Problem besteht. Die Analyse der Kurvenform erlaubt es, eine Fehlmessung zu erkennen. Die korrekte Thrombozytenzahl muss unter diesen Gegebenheiten in der Zählkammer ermittelt werden. Der statistische Fehler ist durch die geringe Zellzahl natürlich größer und die Methode ist zeit- und personalaufwändig.

Der XE-2100 bietet als diagnostisches Feature, die Thrombozyten auf zwei verschiedene Weisen messen zu können:

1. Impedanzmessung der Thrombozyten mit der bewährten hydrodynamischen Fokussierung.
2. Optische Messung der Thrombozyten mittels Fluoreszenzmarkierung.

Für die optische Fluoreszenzmarkierte Thrombozytenmessung wird ein neuartiger, patentierter Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der speziell für Dioden-Laser entwickelt wurde. Die RNA-haltigen Thrombozyten werden spezifisch angefärbt. Mehr als 30.000 Zellen pro Probe werden durchflusszytometrisch mittels Halbleiterlasertechnologie erfasst. Diese RNA/DNA Färbung versetzt den XE-2100 in die Lage, Riesenthrombozyten (gleiches Volumen wie Erythrozyten, aber Unterscheidung durch RNA) und Fragmentozyten (haben keine RNA) richtig einzuordnen (siehe Abb. 2 und Abb. 3).

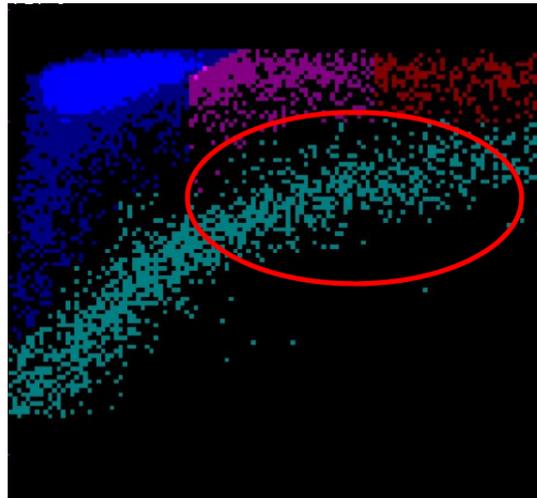


Abb. 2: Riesenthrombozyten
x-Achse Fluoreszenzaktivität
y-Achse Vorwärtsstreulicht

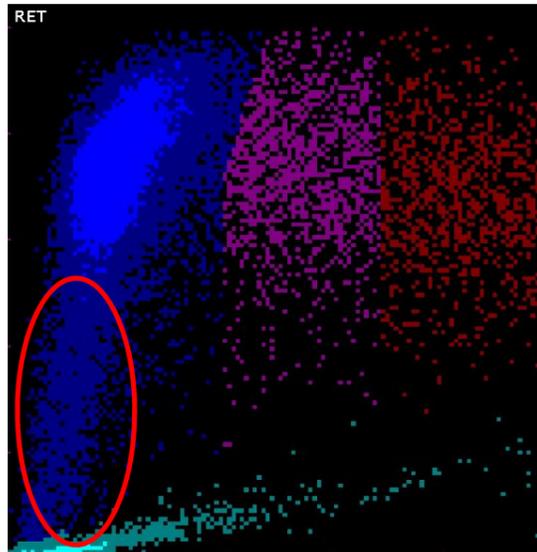


Abb. 3: Fragmentozyten
x-Achse Fluoreszenzaktivität
y-Achse Vorwärtsstreulicht

Diese kostengünstige, vollautomatisierte, fluoreszenzmarkierte Thrombozyten-Messung zeigt eine exzellente Korrelation mit der zeitaufwändigen und teureren Referenzmethode "Immunflusszytometrische Thrombozyten-

Bestimmung mittels CD 61".

Dr. S.J. Machin et al von der Universität London (UCLH) zeigten in ihren publizierten Studien (Literatur 1. und 2.), dass eine exzellente Korrelation besteht zwischen der fluoreszenzmarkierten Thrombozytenmethode am XE-2100 und der Referenz, der durchflusszytometrischen RBC Ratio Methode mittels Anti-CD61- FITC (Becton Dickinson) und Epics XL-MCL Durchflusszytometer.

In "Improved Platelet Counting on XE-2100" (1.) wird eine Korrelation zwischen der CD61-Methode und der hydrodynamisch fokussierten Impedanzmessung am XE-2100 über $100 \times 10^3 \text{ PLT} / \mu\text{L}$ von $R^2 = 0.98$ und unter $100 \times 10^3 \text{ PLT} / \mu\text{L}$ von $R^2 = 0.78$ gezeigt. Die Korrelation zwischen der CD61-Methode und der flu-

oreszenzmarkierten Methode zeigt ein $R^2 = 0.97$ bei $\text{PLT} > 100 \times 10^3 / \mu\text{L}$ und ein $R^2 = 0.95$ bei $\text{PLT} < 100 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (siehe Abb. 4 und Abb. 5). In (2.) illustrieren Dr. Machin et al an 58 thrombopenischen Proben ($< 50.000 / \mu\text{L}$) die Auswirkung auf

die Entscheidung für die Thrombozytentransfusion nach der Impedanz-Methode (mit Richtigkeitsproblemen) und nach der Fluoreszenz-Methode versus CD61, bei einer Transfusionsgrenze von $10.000 / \mu\text{L}$ und $20.000 / \mu\text{L}$ PLT.

Abb. 4 zeigt die Auswirkung auf die Transfusionsentscheidung (Grenze $20.000 / \mu\text{L}$) bei Impedanz-Messung mit Richtigkeitsproblemen versus CD61. 8 Patienten würden unnötig transfundiert werden, da die PLT unterschätzt wurden (wahrscheinlich durch Riesenthrombozyten) und 7 Patienten würden keine Transfusion bekommen, da die PLT überschätzt wurden (wahrscheinlich durch RBC-Fragmente), obwohl sie Blutungsprobleme haben können.

Abb. 5 zeigt die Auswirkung auf die Transfusionsentscheidung (Grenze $20.000 / \mu\text{L}$) bei Fluoreszenzmarkierter Thrombozyten-Messung versus CD61. Keiner der Patienten würde unnötig transfundiert wer-

den, weder bei der Grenze $20.000 / \mu\text{L}$ noch bei $10.000 / \mu\text{L}$, denn es gab kein Problem, die Riesenthrombozyten zu bestimmen. 2 Patienten würden keine Transfusion bekommen bei einer Grenze von $10.000 / \mu\text{L}$.

Diskussion

Die Studien zeigen, dass auch im thrombopenischen therapeutischen Bereich die Fluoreszenzmarkierte Thrombozyten-Methode (PLT-FL) eine exzellente Korrelation mit der CD61-Methode aufweist.

Weiterhin demonstrieren die Genauigkeit und Richtigkeit der PLT-FL, dass man überlegen könnte, die Transfusionsgrenze von $10.000 / \mu\text{L}$ auf $5.000 / \mu\text{L}$ zu reduzieren, ohne eine Erhöhung der Risiken für spontane Blutungen einzugehen (3.). Dieses hätte natürlich eine Reduzierung von Spendern, Kosten und Alloimmunisation zur Folge.

Literatur

1. Machin S.J. et al: „Improved Platelet Counting on XE-2100“, SYSMEX Journal International Vol. 9 No. 2 (1999)
2. Machin S.J. et al: „New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter—the XE-2100™“ Clinical and Laboratory Haematology Vol. 23 No. 6, December 2000
3. Harrison P. et al: Immunoplatelet counting: „A proposed new reference procedure“. Submitted for publication, 1999.

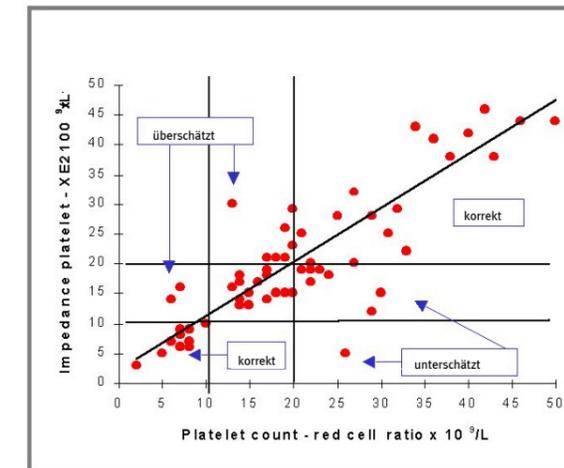


Abb. 4: Impedanz PLT-Wert versus CD-61

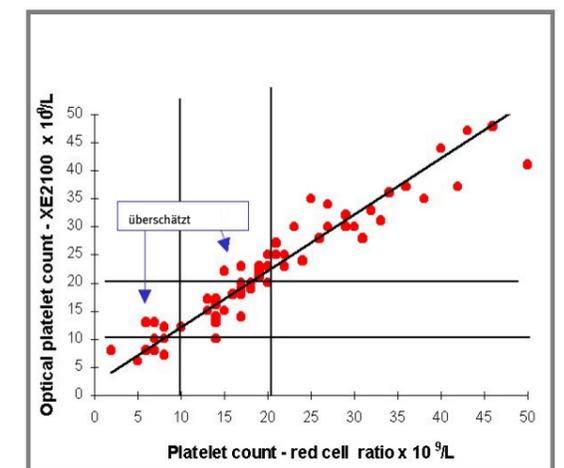


Abb. 5: Fluoreszenz PLT-Wert versus CD-61