

XTRA | 1/2019 | Themenblatt Nr. 1

Messtechnologie der XN-Serie

Datum: März 2019
Thema: Hämatologie; Messtechnologie der XN-Serie
Herausgeber: Marketing
Nummer: V2.0

1 Einleitung

Bei der Durchflusszytometrie mit einem Halbleiter-Laser werden die Zellen im Durchflusszytometer mit einem 663 nm Laserstrahl erfasst. Durch die Analyse des Vorwärts-Streulichts (FSC), Seitwärts-Streulichts (SSC) und der Seitwärts-Fluoreszenzlicht-Intensität (SFL) können die Zellen nach entsprechender Behandlung mit verschiedenen Reagenzien klassifiziert und gezählt werden. Die Intensitäten der Streulichtsignale (FSC, SSC) reflektieren die Oberflächenstruktur, Partikelgröße, Kernform, den Refraktionsindex und die Reflektivität der Zellen. Im Allgemeinen nimmt das FSC-Messsignal zu, je größer die Zellen werden. Das SSC-Messsignal ist intensiver, desto komplexer die intrazellulären Strukturen sind. Die Intensität des Seitwärts-Fluoreszenzlichtsignals reflektiert die Anfärbung von Nukleinsäuren in der Zelle mit einem Fluoreszenzfarbstoff – abhängig von der Permeabilität der Zellmembran, die durch das jeweilige Lysemittel erzeugt wird, und der Affinität des Farbstoffes. Die simultane Messung dieser drei Signalstärken dient in allen Sysmex XN-Systemen der Zählung und Differenzierung von weißen Blutzellen (inklusive der Erkennung von Anomalitäten), kernhaltigen Erythrozytenvorstufen, Retikulozyten und der durchflusszytometrischen Messung von Thrombozyten (PLT-O, PLT-F). Zur Verbesserung der Genauigkeit wird bei jeder Messung die Mantelstrom-Technologie eingesetzt, mit der Zellen mit Hilfe eines Hüllstromes einzeln und mittig durch die Messkapillare gelangen.

2 RBC/PLT Messkanal – Impedanztechnologie

Reagenz: Cellpack DCL/DST

Im RBC/PLT-Kanal werden Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) mit der Impedanztechnologie (DC = direct current, Gleichstrom) und mittels hydrodynamischer Fokussierung (Mantelstrom) anhand ihres Volumens voneinander unterschieden und gezählt. Hämatokrit (HKT), MCV, RDW-SD, RDW-CV, MicroR% und MacroR% sowie MPV, PCT, PDW, P-LCR entstammen ebenfalls dieser Messung.

Impedanztechnologie

Ein elektrisches Feld zwischen einer positiv und einer negativ geladenen Elektrode wird genutzt, um Anzahl und Volumen der durch dieses Feld fließenden Zellen zu bestimmen. Blutzellen sind schlechte elektrische Leiter. Aus diesem Grund wird eine Elektrolytlösung mit guter Leitfähigkeit als Verdünnungsreagenz verwendet, um die Zellen zu suspendieren. Die Suspension wird in die Messkammer eingespritzt. Jede Zelle, die die Messöffnung zwischen den Elektroden passiert, erzeugt eine momentane Erhöhung des elektrischen Widerstands. Diese wird als elektrischer Impuls gemessen, wobei die Impulshöhe sich proportional zum Volumen der Zelle verhält. Ein Mantelstrom (Hüllstrom), der die Zellen beim Durchtritt durch die Kapillare umhüllt, sorgt dafür, dass die Zellen einzeln und mittig durch die Kapillare fließen. So ist eine besonders genaue Messung möglich.

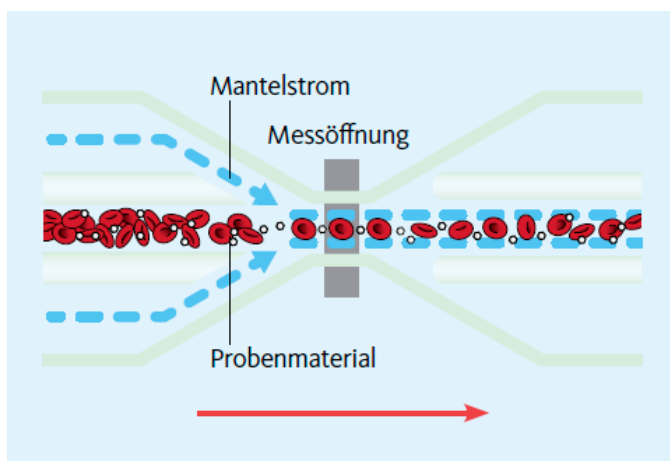


Abb. 1 Impedanztechnologie mit hydrodynamischer Fokussierung

Die Zählung der Zellen erfolgt nach dem Prinzip der „Absolutzählung“. Dies bedeutet, dass RBC- und PLT-Zahl in einem fest definierten Blutvolumen ausgezählt werden. Vorteil dieser Methode ist, dass keine regelmäßige benutzerseitige Kalibrierung erforderlich ist. Analysesysteme, die das relative Zählprinzip anwenden und die RBC-Zahl anhand der in einem vorgegebenen Zeitraum gezählten Impulse bestimmen, sind fehleranfälliger und erfordern eine regelmäßige Systemkalibrierung.

Hämatokrit

Der Hämatokrit (HKT, eng. HCT) ist ein Parameter, der den Anteil aller zellulären Bestandteile am Volumen des Blutes bezeichnet und damit hauptsächlich von der Erythrozytenkonzentration im Vollblut abhängig ist. Sysmex Hämatologiesysteme messen den Hämatokrit durch die Impedanzmessung und kumulative Impulshöhensummierung. Jede einzelne Zelle, die durch die Messöffnung tritt, erzeugt einen elektrischen Impuls, von dem angenommen wird, dass sich die Impulshöhe proportional zum Zellvolumen verhält. Aus der Kumulation der einzelnen Impulshöhen berechnet sich der Hämatokrit (Abb. 3). Die Konstante [k] bezeichnet einen Faktor, der die osmotische Wirkung des Reagenzes auf das Erythrozytenvolumen ausgleicht.

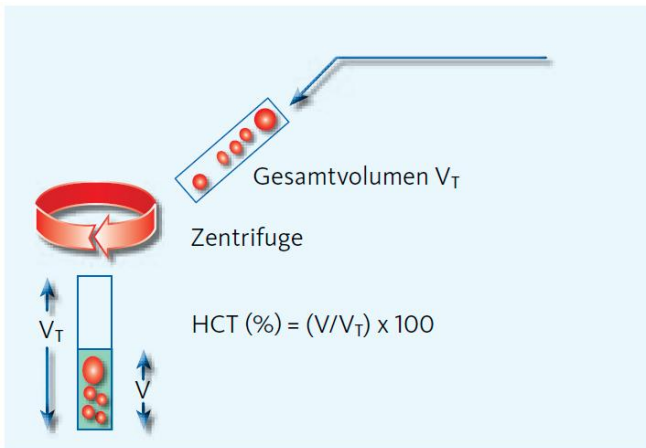


Abb. 2 Schematische Darstellung der HKT-Bestimmung durch Zentrifugieren

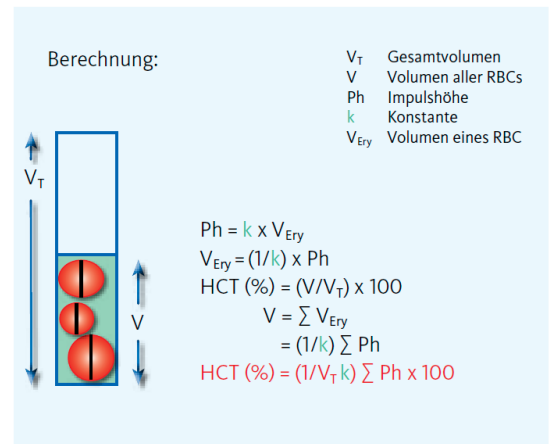


Abb. 3 Formel für die automatische HKT-Bestimmung

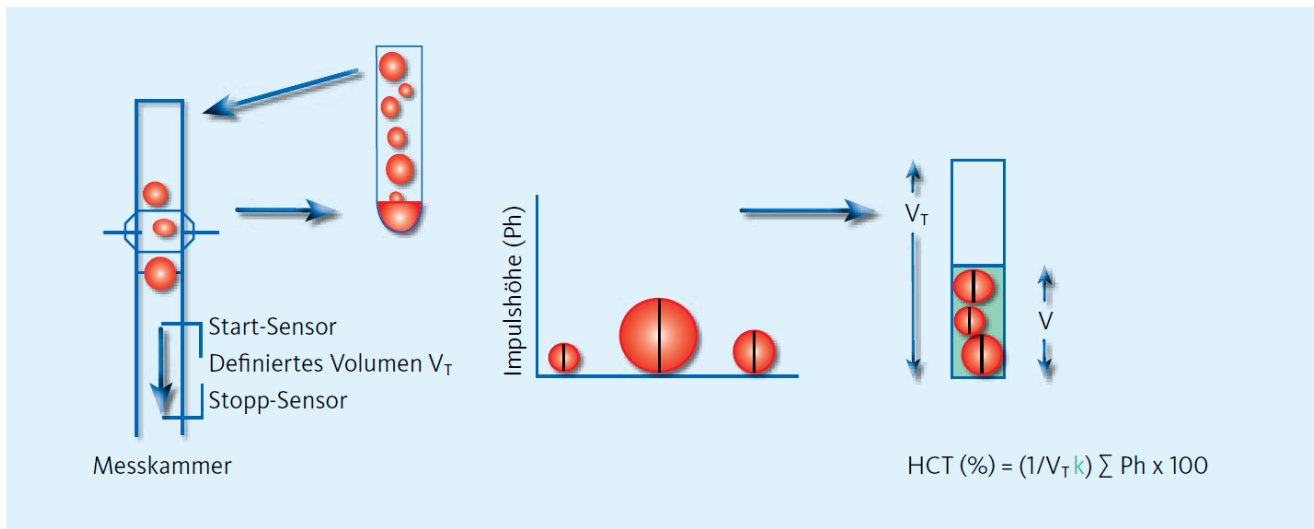


Abb. 4: Schematische Darstellung der automatischen HKT-Bestimmung: Kumulative Impulshöhensummierung (Formel siehe Abb. 3)

Erythrozyten

Die Zählung der Erythrozyten wird im CBC mittels der Impedanztechnologie gemessen. Die Unterscheidung von Thrombozyten erfolgt anhand ihres Volumens mittels Diskriminator wie in der RBC-Verteilungskurve (Histogramm) dargestellt (Abb. 5).

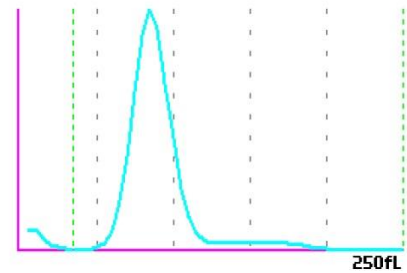


Abb. 5 RBC-Histogramm

Mittleres korpuskuläres Volumen

Das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) wird anhand der nachstehenden Formel aus den Parametern RBC und HKT berechnet:

$$\text{MCV (fL)} = \frac{\text{HKT}}{\text{RBC}}$$

Die Grenzwerte des Referenzbereichs (Normalbereich) für MCV sind altersabhängig. Als normozytär, mikrozytär und makrozytär werden Erythrozytenpopulationen mit normalem, erniedrigtem bzw. erhöhtem MCV bezeichnet.

Erythrozytenverteilungsbreite: RDW-SD und RDW-CV

Die Bestimmung der RDW-SD an Sysmex Hämatologiesystemen ist eine tatsächliche Messung der Breite der Erythrozytenverteilungskurve. Die Messung wird in 20 % relativer Höhe der Histogrammkurve über der Basislinie vorgenommen. Je weiter also die Kurve durch verschieden große Erythrozyten aufgespreizt ist, desto höher ist der RDW-SD-Wert.

Der RDW-CV wird durch Berechnung ermittelt. Die Formel lautet:

$$\text{RDW-CV} = \frac{1\text{SD}}{\text{MCV}} \times 100$$

RDW-CV und RDW-SD reflektieren die Größenvariation der Erythrozyten um den Mittelwert. Weil der 1SD durch den MCV geteilt wird, ist der RDW-CV abhängig von der durchschnittlichen Größe der Erythrozyten (MCV).

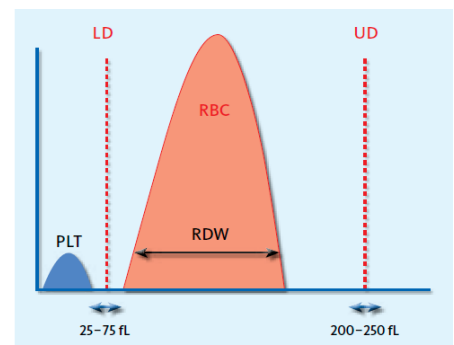


Abb. 6 Darstellung des RDW-Konzepts im Erythrozyten-Histogramm

Anteil Mikrozyten/Makrozyten - MicroR – MacroR

Erythrozyten und Thrombozyten werden im RBC/PLT-Kanal mittels Impedanztechnologie (auch DC-Widerstandsmessprinzips) gezählt. Dabei kommt die hydrodynamische Fokussierung zum Einsatz, sodass nur Einzelzellen den Detektor passieren und die resultierende RBC-Größenverteilung nahezu eine Gaußsche Verteilung aufweist. Die Werte der Parameter MicroR und MacroR werden aus beiden Enden des RBC-Histogramms ermittelt. Die RBC-Histogramme von Proben mit mikrozytischen RBC sind nach links verlagert und zeigen aufgrund der Zunahme kleiner RBC häufig eine Schulter auf der linken Seite. Bei Proben mit makrozytischen RBC zeigen die Histogramme rechts eine längere Flanke. Durch die Anwendung zweier verschiedener beweglicher Diskriminatoren im unteren und oberen Bereich des Histogramms kann eine mikrozytische und eine makrozytische RBC-Population bestimmt werden, und die resultierenden Parameter (MicroR und MacroR) geben diese Populationen als prozentualen Anteil an allen Erythrozyten an.

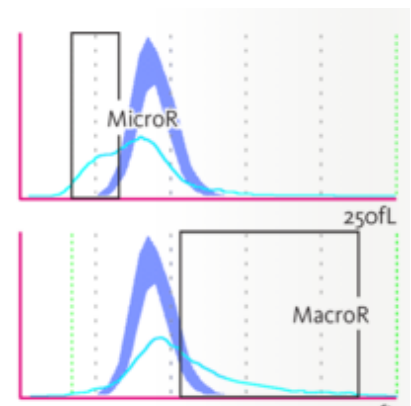


Abb. 7 Mikrozytische RBC (MicroR, oberes Diagramm) und makrozytische RBC (MacroR, unteres Diagramm) im RBC-Histogramm

Thrombozyten

Die Zählung der Thrombozyten erfolgt im CBC mittels der Impedanztechnologie nach dem Absolutmessprinzip. Die Trennung von Erythrozyten erfolgt anhand des Volumens durch einen Diskriminator, dargestellt in der Thrombozytenverteilungskurve (PLT-Histogramm, Diskriminator PU). Neben der Thrombozytenzahl gibt es verschiedene PLT-Zusatzparameter, die weitere Informationen aus dieser Messung liefern können: P-LCR, PDW, MPV und PCT.

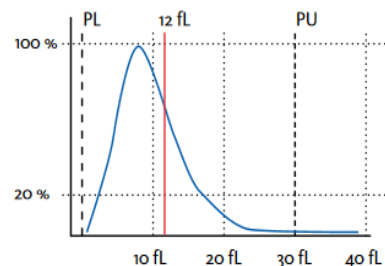


Abb. 8 PLT-Histogramm: Markierung des Diskriminators für P-LCR bei 12 fL (rot)

Mittleres Plättchenvolumen

Der MPV gibt eine Aussage über das mittlere Plättchenvolumen, gemessen zwischen dem unteren Diskriminator PL und dem oberen Diskriminator PU. Referenzbereich liegt bei 8 – 12 fL. Berechnet wird der MPV wie folgt: $MPV = PCT (\%) / PLT (\times 10^3/\mu L)$. Bei anormalen Kurvenverläufen aufgrund von Interferenzen kann dieser Parameter ggf. nicht angezeigt werden.

Anteil großer Thrombozyten

Der P-LCR (Platelet large cell ratio) gibt den Anteil der großen Thrombozyten mit einem Volumen > 12 fL aus dem PLT-Histogramm an. Neben den beiden flexiblen Diskriminatoren, die die Volumensverteilungskurve eingrenzen, gibt es zudem einen festen Diskriminator bei 12 fL (Abb. 8). Der Anteil der Thrombozyten > 12 fL im Verhältnis zur Gesamtzahl der Thrombozyten wird in % dargestellt. Bei anormalen Kurvenverläufen aufgrund von Interferenzen kann dieser Parameter ggf. nicht angezeigt werden.

Plättchenkrit

Der Plättchenkrit (PCT) entspricht der Summe der einzelnen Thrombozytenvolumina und ist somit das Äquivalent zum Hämatokrit der Erythrozyten (Impedanztechnologie und kummulative Impulshöhensummierung).

Thrombozyten-Verteilungsbreite

Der PDW-SD gibt die Verteilungsbreite der Thrombozyten, gemessen bei 20 % relativer Höhe der Kurvensumme, an (Abb. 9). Bei anormalen Kurvenverläufen aufgrund von Interferenzen kann dieser Parameter ggf. nicht angezeigt werden.

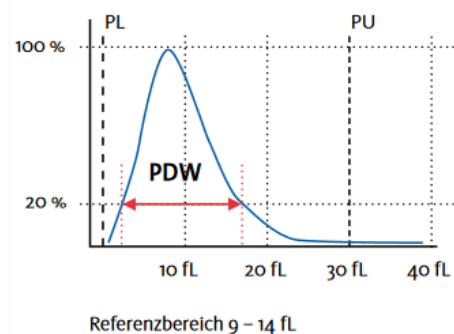


Abb. 9 PLT-Histogramm: Schematische Darstellung des PDW

3 Hämoglobin-Messkanal – SLS-Methode

Reagenz: Cellpack DCL/DST, Sulfolyser

Bei der SLS-Hämoglobin-Methode wird Natrium-Lauryl-Sulfat (SLS) zum Messen der Hämoglobinkonzentration verwendet. Diese Methode ist komplett cyanidfrei. Fette werden emulgiert, sodass es nur sehr selten zu einer Trübung und damit verbundenen falsch hohen HGB-Werten kommt. Es finden folgende Reaktionen statt:

Hämolytische Reaktion zwischen SLS und der Erythrozytenmembran: SLS bindet sich hauptsächlich durch Ionenbindung und teilweise durch hydrophobe Bindung an die Erythrozytenmembran. Dies führt zur Solubilisierung von Phospholipiden auf der Erythrozytenmembran und bewirkt den Austritt von Hämoglobin aus der roten Blutzelle.

1. Veränderung in der Globinstruktur durch SLS.
2. Oxidation des Hämeisens durch Sauerstoff: Zusammen mit der Veränderung der Struktur des Globins wird das zweiwertige Hämeisen einfach durch die Sauerstoffbindung an das Hämeisen oder den gelösten Sauerstoff in dreiwertiges Eisen umgewandelt.
3. Bindung von SLS: Die hydrophilen Gruppen des SLS binden sich an das dreiwertige Hämeisen und es entsteht stabiles SLS-Hämoglobin. Das Analysesystem misst die Absorption bei einer Wellenlänge von 555 nm.

Der Vorteil der SLS-Methode gegenüber anderen cyanidfreien Methoden besteht darin, dass sie in der Lage ist, die Hämoglobinderivate Desoxyhämoglobin, Oxyhämoglobin, Carboxyhämoglobin und Methämoglobin zu messen.

4 Die Erythrozytenindizes MCH, MCHC und MCV

Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt

Der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt (MCH) wird anhand der nachstehenden Formel aus den Parametern RBC und HGB berechnet:

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{HGB}}{\text{RBC}}$$

Die Referenzwerte für MCH sind altersabhängig. Der MCH verhält sich in der Regel proportional zum MCV. Die Zellgröße wird im Wesentlichen durch ihren Hämoglobingehalt bestimmt. Zellen mit einem normalen MCH werden als normochrom bezeichnet, Zellen mit niedrigem MCH als hypochrom.

Mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration

Der MCHC wird anhand der folgenden Formel aus den Parametern HKT und HGB errechnet:

$$\text{MCHC (g/dL)} = \frac{\text{HGB}}{\text{HKT}}$$

MCV – Mittleres korpuskuläres Volumen

Siehe Beschreibung RBC/PLT-Messkanal – Impedanztechnologie

5 Leukozyten

WNR-Kanal (Leukozytenzahl, Basophile, NRBC)

Reagenzien WNR-Kanal: Lycercell WNR, Fluorocell WNR

Die Zählung der Leukozyten, Differenzierung der Basophilen und die Zählung der kernhaltigen Erythrozyten (NRBC) erfolgt im WNR-Kanal mittels der Fluoreszenzdurchflusszytometrie anhand der Auswertung von Vorwärtsstreulicht- und Seitwärts-Fluoreszenzlichtsignalen mit einem Halbleiterlaser.

Im WNR-Kanal werden weiße Blutzellen (WBC, white blood cells) gezählt und eine Differentialzählung der Basophilen und kernhaltigen Erythrozyten (NRBC) durchgeführt. Lycercell WNR enthält eine oberflächenaktive Substanz zur Hämolyse der roten Blutzellen und durchdringt die Zellmembran der weißen Blutzellen. Dies führt zu Veränderungen der äußeren Form und inneren Struktur, die von den Zelleigenschaften jeder weißen Blutzelle abhängig sind. Dieser Messkanal differenziert Basophile von anderen weißen Blutzellen und zählt sie, indem die Unterschiede basierend auf Veränderungen im Vorwärts-Streulicht (FSC) erfasst werden. Fluorocell WNR färbt Nukleinsäuren der weißen Blutzellen und kernhaltigen Erythrozyten, abhängig von der Permeabilität und dem Grad der Anfärbbarkeit der Nukleinsäuren. Durch die Reagenzeinwirkung neigen die „eingefärbten“ Teile dazu, besser erhalten zu bleiben. Die weißen Blutzellen zeigen dabei eine stärkere Fluoreszenz als kernhaltige Erythrozyten (NRBC). Der WNR-Kanal nutzt diese Unterschiede, um kernhaltige Erythrozyten von weißen Blutzellen zu differenzieren und zählt beide Zellarten. Der WNR-Kanal ist Standard im CBC-Profil.

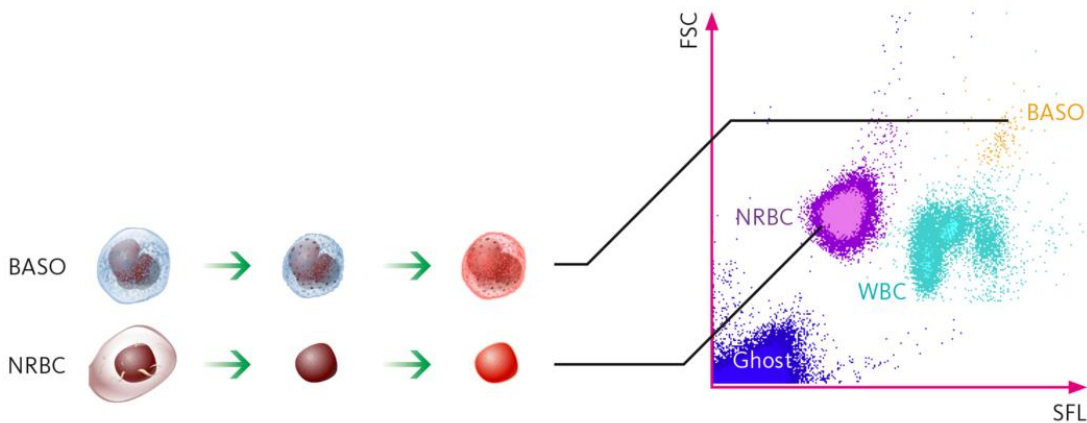


Abb. 10 WNR-Kanal mit NRBC

WDF-Kanal – Leukozytendifferenzierung

Reagenzien: Lycercell WDF, Fluorocell WDF

Der WDF-Kanal differenziert und zählt Neutrophile, unreife Granulozyten (IG), Lymphozyten, Monozyten und Eosinophile mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie anhand der Auswertung von Streulicht- und Fluoreszenzlichtsignalen mit einem Halbleiterlaser. Ebenso können in diesem Messkanal eine Vielzahl von Warnhinweisen auf abnormale Zellen ausgelöst werden. Mit der optionalen Lizenz „EIP“ können unter bestimmten Voraussetzungen die erweiterten Entzündungsparameter RE-LYMP, AS-LYMP sowie NEUT-RI und NEUT-GI angezeigt werden.

Die oberflächenaktiven Substanzen des Lycercell WDF bewirken die Hämolyse der Erythrozyten und durchdringen die Zellmembranen der weißen Blutzellen. Der Grad der Auswirkung und damit die Veränderung der Zellmorphologie hängen von den individuellen Eigenschaften des Typs der Leukozyten ab. Diese Unterschiede werden mit dem Seitwärts-Streulicht hervorgehoben. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorocell WDF dringt in die Zellen ein und färbt die Nukleinsäuren (vorwiegend zytoplasmatische RNA), abhängig von der Permeabilität der Zellmembran durch das in diesem Kanal eingesetzte Lyserreagenz. Durch die Auswertung der Fluoreszenzsignalintensität und der Streulichtmessung ist es möglich, verschiedene Leukozyten zu differenzieren und zu zählen.

Der DIFF-Modus der XN-Serie schließt die Zählung unreifer Granulozyten (IG) ein. Je nach Einstellung werden IG als Zusatzparameter (5-part DIFF) oder innerhalb der 100 % Differenzierung (6-part-DIFF) reportiert. Proben mit geringer Leukozytenkonzentration können in dem speziellen „Low WBC-Modus“ automatisch wiederholt werden (Reflextest*). Durch das 3-fache Zählvolumen erhöht sich die Zuverlässigkeit der Ergebnisse für alle Parameter einschließlich der Leukozytendifferenzierung. Der zusätzliche Modus für vorverdünnte Proben ist für die Analyse von Kapillarblutproben vorgesehen. Im Vorverdünnungsmodus ist ein Blutvolumen von lediglich 20 µL erforderlich.

(*nicht bei XN-1000 Pure)

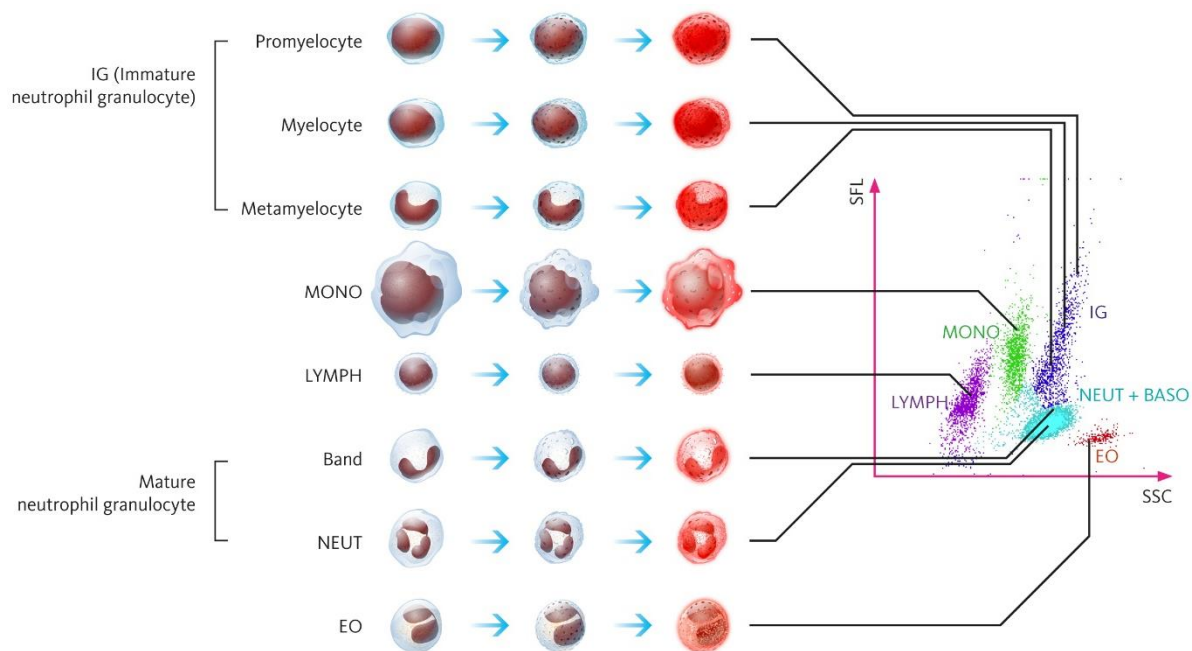


Abb. 11 WDF-Scattergramm: Differenzierung von Leukozyten

XN-20 only: WPC-Kanal – Leukozyten-Interpretationshinweise und Zählung der Stammzellen

Reagenzien: Lycercell WPC, Fluorocell WPC

Der WPC-Kanal ist ein Messkanal, der nur auf dem XN-20 Modul zur Verfügung steht. Im WPC-Kanal werden Blasten und anormale Zellen der Lymphozytenreihe erkannt. Die optionale Anwendung „XN Stem Cells“ nutzt diesen Messkanal und ermöglicht durch die Zählung von Human Progenitor Cells (HPC), die zum Monitoring des optimalen Apheresezeitpunktes bei einer peripheren Stammzell-Transplantation genutzt werden können.

Technologie: Die oberflächenaktiven Substanzen in Lycercell WPC bewirken eine Perforation von Leukozytenmembranen und die Hämolyse von Erythrozyten. Lycercell WPC bewirkt in Abhängigkeit vom Lipidgehalt der Leukozyten die Bildung von unterschiedlich großen Poren. Das Fluorochrom in Fluorocell WPC dringt je nach Ausprägungsgrad der Perforation in die Zelle ein und färbt hauptsächlich nukleäre DNA. Die durchflusszytometrische Analyse mittels Halbleiterlasertechnologie wertet Streulicht- und Fluoreszenzlichtsignalstärken aus. Der WPC-Kanal hilft im Zusammenspiel mit dem WDF-Kanal durch ein spezifisches Flaggging der Leukozyten in der Unterscheidung von malignen und reaktiven Geschehen.

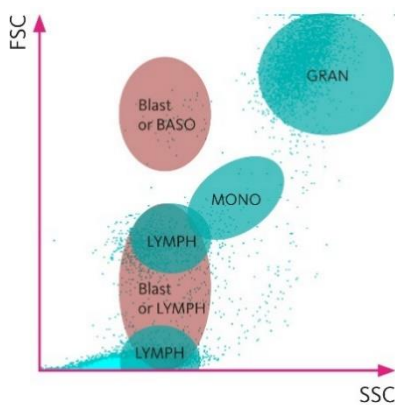


Abb. 12 WPC-Scattergramm FSC/SSC

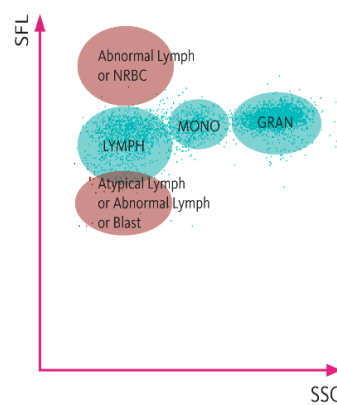


Abb. 13 WPC-Scattergramm SFL/SSC

XN Stem Cells (XN-20)

XN Stem Cells ist eine optionale Anwendung am XN-20 Analysesystem. XN Stem Cells werden mit dem XN-20 mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie im WPC-Kanal gezählt. Die HPC-Zählung ist nur im manuellen Modus auswählbar. Auf Knopfdruck werden vom Hämatologiesystem 190 µL Blut aspiriert. Aus dem Aliquot werden vier unabhängige Stammzellenzählungen vorgenommen und der Durchschnittswert gebildet. Die Anzahl der Stammzellen wird als absoluter Wert (HPC#) sowie als relativer Anteil (HPC% – bezogen auf die Leukozytenzahl) ausgegeben. Während der Analyse werden Vorwärtsstreulicht-, Seitwärtsstreulicht- und Seitwärtsfluoreszenzlichtsignale erfasst. Das Vorwärtsstreulicht-Signal (FSC) entspricht der Größe der Zelle und das Seitwärtsstreulichtsignal (SSC) der internen strukturellen Komplexität/Granularität.

Unreife Stammzellen unterscheiden sich durch ihre Membranlipidzusammensetzung von reiferen Vorläuferzellen. Die Stammzellmembranen sind relativ widerstandsfähig gegenüber der Permeabilisierung durch das WPC-Reagenz. Daher zeigen sich Stammzellen in der graphischen Darstellung mit einer mittleren Größe (mittelgroße FSC), einer geringen Granularität (geringe SSC) und einer relativ geringen Fluoreszenzintensität (geringe bis mittlere SFL). Mittels dieses fluoreszenzbasierten durchflusszytometrischen Verfahrens können im System drei Dimensionen genutzt werden, um Stammzellen zu erkennen und von anderen Zellen zu unterscheiden (Abb. 14). Zellpopulationen wie z. B. NRBC, myeloide Vorläuferzellen oder Lymphozyten, die morphologisch gesehen Stammzellen ähneln, stören die Stammzellenzählung nicht, da ihre Membranen anders zusammengesetzt sind.

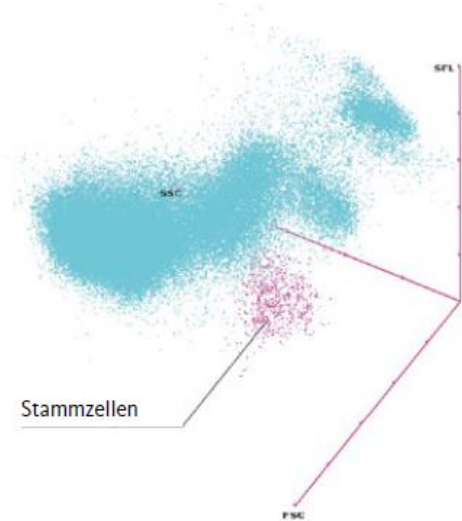


Abb. 14 Cluster von XN Stem Cells im 3D-Modell eines WPC-Kanal-Scattergramms

6 Retikulozyten-Messkanal

Reagenz: Cellpack DFL, Fluorocell RET

Der optionale Retikulozyten-Messkanal liefert eine Vielzahl von Parametern. Neben dem relativen und absoluten Anteil der Retikulozyten und deren Reifeparametern ergeben sich auch das Retikulozyten-Hämoglobin (RET-H_e), RBC-H_e, Delta-H_e, Hypo-H_e, Hyper-H_e und PLT-O (optische Thrombozyten).

Im RET-Kanal werden die Zellen mit Cellpack DFL behandelt und durch Fluorocell RET werden die Nucleinsäuren der roten und weißen Blutzellen sowie der Thrombozyten angefärbt. Zur Unterscheidung werden Vorwärtsstreulicht- und Seitwärts-Fluoreszenzlichtsignale ausgewertet. Leukozyten zeigen dabei sehr hohe Fluoreszenzlichtsignale und stören die Retikulozytenmessung in der Regel nicht. Die gleichzeitige Auswertung von Vorwärtsstreulicht- und Fluoreszenzlichtsignalstärke ermöglicht auch die gute Trennung von Thrombozyten und Erythrozyten.

Retikulozyten und Retikulozytenreifeparameter

Retikulozyten haben im Gegensatz zu reifen Erythrozyten Reste von Nucleinsäuren, die sich je nach Gehalt unterschiedlich stark anfärben. Retikulozyten können so in drei Reifestufen eingeteilt werden: LFR (low fluorescence reticulocyte) entspricht eher reifen Retikulozyten, während MFR (medium fluorescence reticulocyte) und HFR (high fluorescence reticulocyte) den unreifen Retikulozyten zugeschrieben werden. Der Parameter IRF (immature reticulocyte fraction) fasst die Parameter HFR und MFR zusammen.

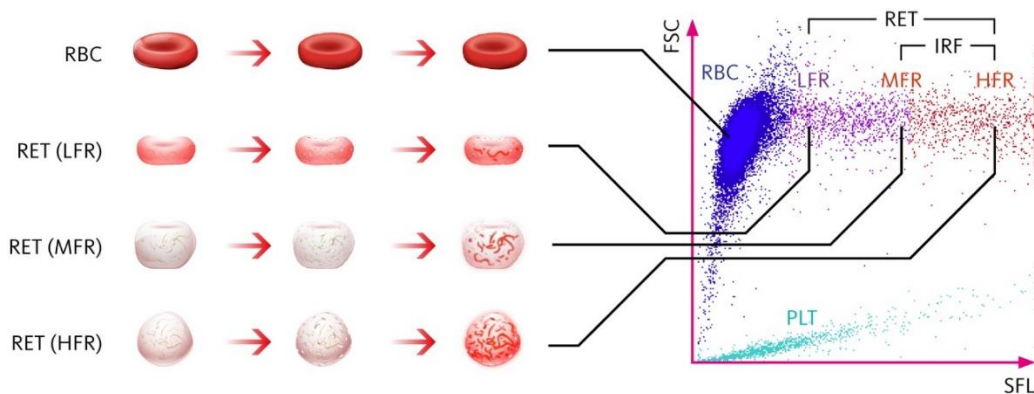


Abb. 15 RET-Scattergramm: Retikulozyten und Retikulozyten-Reifeparameter

RET-H_e, RBC-H_e, Delta-H_e – Hämoglobin-Äquivalente

Neben dem Fluoreszenzgehalt der Zellen wird das Vorwärtsstreulicht in einem bestimmten Winkel betrachtet. Aus dem *mittleren* Vorwärtsstreulicht der Retikulozyten ergibt sich das Retikulozyten-Hämoglobin-Äquivalent RET-H_e, aus dem *mittleren* Vorwärtsstreulicht der Erythrozyten das RBC-H_e. Das Delta-H_e wird aus diesen beiden Parametern berechnet ($\text{Delta-H}_e = \text{RET-H}_e - \text{RBC-H}_e$).

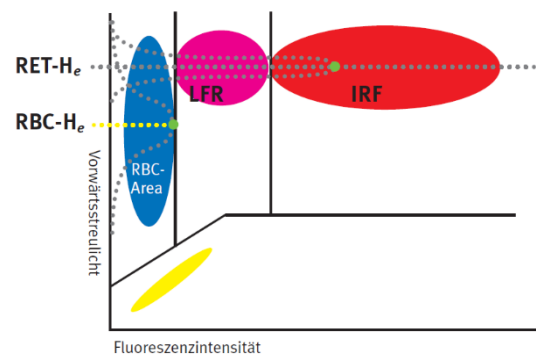


Abb. 16 RET-H_e und RBC-H_e

HYPO-H_e, HYPER-H_e– Anteil hypo- und hyperchrome Erythrozyten

Beide Parameter werden im Retikulozytenkanal adäquat zur RBC-H_e Messung ermittelt. Hypo-H_e (%Hypo-H_e), der Anteil hypochromer Erythrozyten bezeichnet den prozentualen Anteil der Erythrozyten mit einem HGB-Gehalt < 17pg. Aufgrund der ca. 120-tägigen Lebenszeit der Erythrozyten verändert sich dieser Wert verhältnismäßig langsam. Er spiegelt die Eisenversorgung der Erythropoese über die letzten drei bis vier Monate wider und ist damit ein guter Langzeitparameter. HYPER-H_e, der Anteil hyperchromer Erythrozyten - gibt den prozentualen Anteil der RBC mit zellulärem Hämoglobingehalt über 49 pg an.

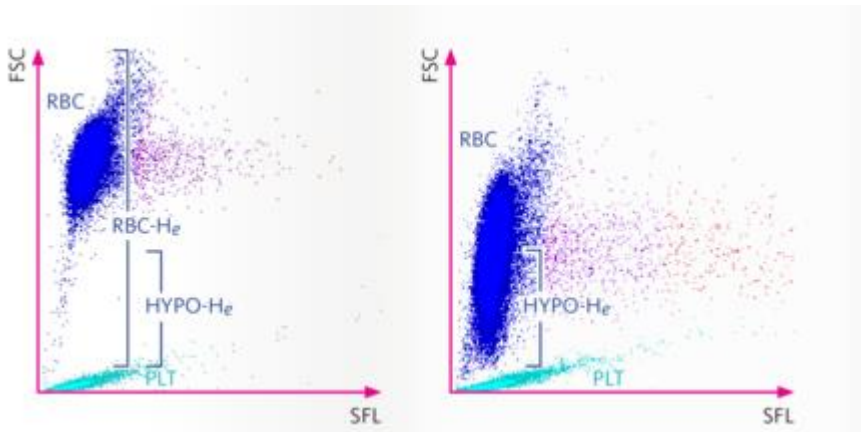


Abb. 17 RBC-H_e und HYPO-H_e

Fluoreszenz-optische Thrombozytenmessung PLT-O

Der PLT-O Wert gibt den Thrombozytenwert der fluoreszenz-optischen Messung der Thrombozyten aus dem RET-Kanal an. In diesem Messansatz wird die Anfärbung der Nukleinsäuren der Thrombozyten mit dem Flurocell RET genutzt. Unreife (große) Thrombozyten enthalten mehr Nukleinsäuren als reife Thrombozyten und als Erythrozyten. Durch die Auswertung von Vorwärtsstreulichtsignalen und Seitwärtsfluoreszenzlichtsignalen ist eine sehr gute Trennung dieser Zellklassen möglich.

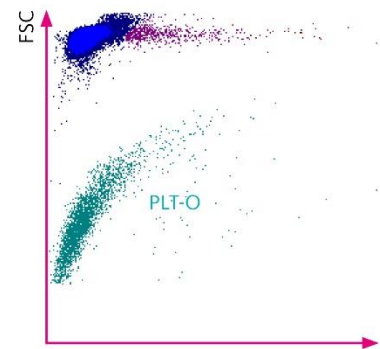


Abb. 18 PLT-O Scattergramm: Messung der fluoreszenz-optischen Thrombozyten aus dem Retikulozyten-Messansatz

7 Thrombozyten - PLT-F-Kanal

Reagenz: Cellpack DFL, Fluorocell PLT

Mit der optionalen Anwendung PLT-F kann ein Thrombozytenwert gemessen werden, der mit der Referenzmethode vergleichbar ist. Die fluoreszenzdurchflusszytometrische Messung PLT-F ermöglicht auch im Falle einer extremen Thrombozytopenie, oder wenn Interferenzen eine Routinemessung erschweren, einen sehr genauen Wert. Möglich ist dies zum einen durch den speziellen Fluoreszenzfarbstoff und zum anderen durch das 5-fach höhere Zählvolumen im Vergleich zur Impedanzzählung oder der PLT-O Zählung. Zusätzlich kann die Fraktion der unreifen Thrombozyten (IPF%) und die Anzahl der unreifen Thrombozyten (IPF #) bestimmt werden.

Technologie: Im PLT-F-Kanal wird Blut mit Cellpack DFL verdünnt und die Nucleinsäuren von Thrombozyten und anderen Zellen mit Fluorocell PLT gefärbt. Unreife Thrombozyten enthalten im Vergleich zu gleichgroßen Erythrozyten vermehrt Nucleinsäuren, die sich mit dem speziell auf Thrombozyten abgestimmten Fluorochrom stärker anfärben. Durch die Auswertungen von Streulichtsignal- und Fluoreszenzlichtsignalstärken können Thrombozyten und unreife Thrombozyten (immature platelet fraction, IPF) nahezu frei von Interferenzen ausgezählt werden.

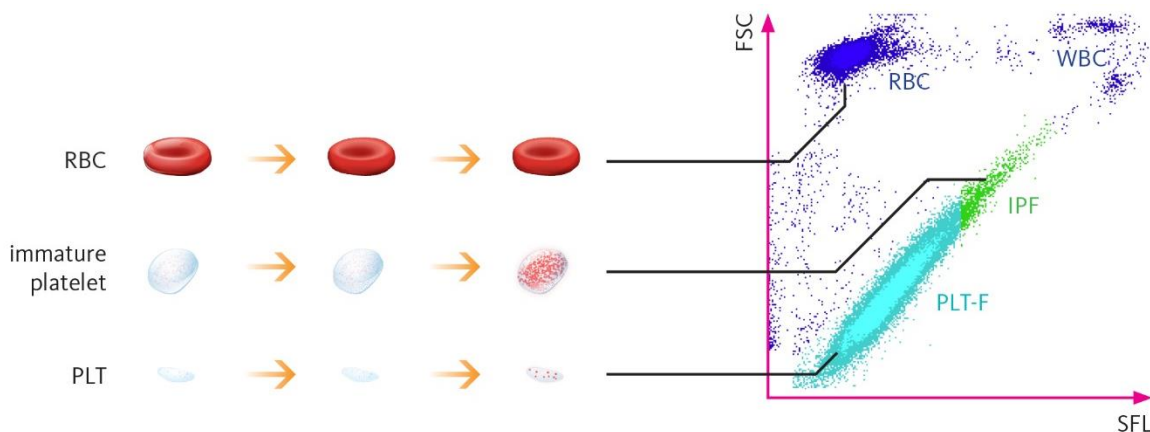


Abb. 19 PLT-F-Kanal: Messung der Fluoreszenz-optischen Thrombozyten (PLT-F) und unreifen Thrombozyten (IPF)

8 BF-Modus – Körperflüssigkeiten

Reagenz: Lysercell WDF, Fluorocell WDF (WDF-Kanal); Cellpack DCL (RBC/PLT-Kanal)

Im optionalen BF-Modus (Bodyfluid-Modus) können verschiedene Körperflüssigkeiten gemessen werden: Liquor (CSF), Synovialflüssigkeit, Pleurapunktat, Peritonealdialysat (CAPD) und Peritonealpunkate (Aszites). Das Zählvolumen in der automatischen BF-Messung ist dabei 3,5-mal so hoch wie das Zählvolumen der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

In der durchflusszytometrischen Messung zur Zählung von WBC-BF, TC-BF, Mononukleären- (MN) und Polymorphnukleären Zellen (PMN) werden die Zellen mit Lysercell WDF behandelt und die Nukleinsäuren der Zellen durch das Fluorocell WDF angefärbt. Ausgewertet werden Fluoreszenz- und Seitwärtsstreulichtsignalstärken. Erythrozyten werden im BF-Modus mit der Impedanzmessung im RBC/PLT-Messkanal gezählt.

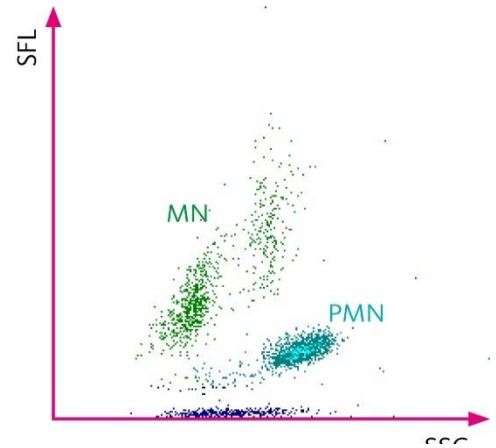


Abb. 20 WDF-BF Scattergramm: Zellzählung (WBC-BF und TC-BF sowie Differenzierung in mononukleäre und polymorphnukleäre Zellen

Verlinkungen zu weiterführender Literatur

Weitere Informationen finden Sie auf folgenden Seiten

- Informationen zum Blutbild und Parametern: www.sysmex.de/akademie/wissenszentrum
- Hämatologie-Themenblätter und Kunden-Artikel: www.sysmex.de/xtra
- Hämatologie-White Paper: www.sysmex.de/whitepaper
- Informationen zu XN Stem Cells: www.sysmex.de/stemcells

Anhang: Diagnostische Parameter im Vollblutmodus

Messkanal	Messprinzip	Analyse-Parameter	Bedeutung		
WNR Verdünnung 1:61	Fluoreszenz- Durchflusszytometrie mit einem Halbleiterlaser	WBC	Leukozyten		
		BASO#	Basophile		
		BASO%	Prozentualer Anteil der Basophilen		
		NRBC#	NRBC (kernhaltige Erythrozytenvorstufen)		
		NRBC%	Prozentualer Anteil NRBC		
		NEUT#	Neutrophile		
		NEUT%	Prozentualer Anteil Neutrophile		
		LYMPH#	Lymphozyten		
		LYMPH%	Prozentualer Anteil Lymphozyten		
		MONO#	Monozyten		
		MONO%	Prozentualer Anteil Monozyten		
		EO#	Eosinophile		
		EO%	Prozentualer Anteil Eosinophile		
		IG#	Unreife Granulozyten		
IG%	Prozentualer Anteil Unreife Granulozyten				
RE-LYMP#*	Anzahl reaktiver Lymphozyten				
RE-LYMP%*	Prozentualer Anteil der reaktiven Lymphozyten bezogen auf Leukozyten				
AS-LYMP#*	Anzahl antikörper-synthetisierender Lymphozyten				
AS-LYMP%*	Prozentualer Anteil antikörper-synthetisierender Lymphozyten bezogen auf Leukozyten				
NEUT-RI*	Reaktivitäts-Intensität von Neutrophilen				
NEUT-GI*	Granularitäts-Intensität von Neutrophilen				
WPC* Verdünnung 1:61		HPC#	hämatopoetische Vorläufer Zellen		
		HPC%	Prozentualer Anteil der hämatopoetischen Vorläufer Zellen		
RET* Verdünnung 1:204		RET#	Retikulozytenzahl		
		RET%	Prozentualer Anteil Retikulozyten bezogen auf Erythrozyten		
		IRF	Retikulozytenreifeindex		
		LFR	Low Fluorescence Reticulocyte (reife Retikulozyten)		
		MFR	Medium Fluorescence Reticulocyte (mittelreife Retikulozyten)		
		HFR	High Fluorescence Reticulocyte (unreife Retikulozyten)		
		RET-He	Retikulozyten-Hämoglobin Äquivalent		
		Delta-He	Delta-He wird durch die Gleichung $\Delta\text{He} = \text{RET-He} - \text{RBC-He}$ berechnet.		
		RBC-He	Hämoglobin-Äquivalent der reifen Erythrozyten		
		HYPO-He	Prozentualer Anteil hypochromer (reifer) Erythrozyten (geringe Vorwärtsstreulichtsignalintensität) bezogen auf normochrome Erythrozyten (normale Vorwärtsstreulichtsignalintensität) im RET-Scattergramm		
		HYPER-He	Prozentualer Anteil hyperchromer (reifer) Erythrozyten (erhöhte Vorwärtsstreulichtsignal-Intensität) bezogen auf normochrome Erythrozyten (normale Vorwärtsstreulichtsignal-Intensität) im RET-Scattergramm		
		PLT (PLT-O)	Thrombozytenzahl (RET-Kanal)		
		PLT (PLT-F)	Thrombozyten (PLT-F-Kanal)		
		PLT-F* Verdünnung 1:204		IPF#	Unreife Thrombozyten
IPF%	Prozentualer Anteil unreifen Thrombozyten bezogen auf Thrombozyten				
RBC	Erythrozyten (rote Blutzellen)				
HCT	Hämatokrit				
RBC/PLT Verdünnung 1:498	Mantelstrom Detektionsverfahren Impedanztechnologie	MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen		
		RDW-SD	Erythrozytenverteilungsbreite (Standardabweichung)		
		RDW-CV	Erythrozytenverteilungsbreite (Variationskoeffizient)		
		PLT (PLT-I)	Thrombozyten (RBC/PLT-Kanal)		
		MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen		
		PDW	Thrombozytenverteilungsbreite		
		PCT	Plättchenkrit		
		P-LCR	Prozentualer Anteil großer Thrombozyten		
		MicroR	Anteil Mikro RBC		
		MacroR	Anteil Makro RBC		
		RBC/ PLT & HGB	Berechnung	MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
				MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
		HGB Verdünnung 1:747	SLS-Hämoglobin- Verfahren	HGB	Hämoglobinkonzentration

Forschungsparameter im Vollblutmodus

Messkanal	Forschungsparameter	Bedeutung
WNR	WBC-N	Leukozyten (WNR-Kanal)
	TNC-N	Gesamtanzahl kernhaltiger Zellen (WBC#+NRBC#), (WNR-Kanal)
	BA-N#	Basophile (WNR-Kanal)
	BA-N%	Prozentualer Anteil Basophile (WNR-Kanal)
WDF	WBC-D	Leukozyten (WDF-Kanal)
	TNC-D	Gesamtanzahl kernhaltiger Zellen (WBC#+NRBC#), (WDF-Kanal)
	NEUT#&	Anzahl der NEUT# minus IG#
	NEUT%&	Prozentualer Anteil der NEUT# minus IG#, bezogen auf Leukozyten
	LYMP#&	Anzahl der LYMPH# minus HFCL#
	LYMP%&	Prozentualer Anteil der LYMPH minus HFCL, bezogen auf Leukozyten
	HFCL#	Anzahl Zellen im oberen LYMPH-Bereich des WDF-Scattergramms
	HFCL%	Prozentualer Anteil der Zellen im oberen LYMPH-Bereich des WDF-Scattergramms bezogen auf Leukozyten
	BA-D#	Basophile (WDF-Kanal)
	BA-D%	Prozentualer Anteil Basophile (WDF-Kanal)
	NE-SSC	Seitwärtsstreulichtintensität des NEUT-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	NE-SFL	Fluoreszenzlichtintensität des NEUT-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	NE-FSC	Vorwärtsstreulichtintensität des NEUT-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	LY-X	Seitwärtsstreulichtintensität des LYMPH-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	LY-Y	Fluoreszenzlichtintensität des LYMPH-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	LY-Z	Vorwärtsstreulichtintensität des LYMPH-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	MO-X	Seitwärtsstreulichtintensität des MONO-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	MO-Y	Fluoreszenzlichtintensität des MONO-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	MO-Z	Vorwärtsstreulichtintensität des MONO-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	NE-WX	Seitwärts-Streulichtverteilungsbreite des NEUT-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	NE-WY	Fluoreszenzlichtverteilungsbreite des NEUT-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	NE-WZ	Vorwärtsstreulichtverteilungsbreite des NEUT-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	LY-WX	Seitwärtsstreulichtverteilungsbreite des LYMPH-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	LY-WY	Fluoreszenzlichtverteilungsbreite des LYMPH-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	LY-WZ	Vorwärtsstreulichtverteilungsbreite des LYMPH-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	MO-WX	Seitwärtsstreulichtverteilungsbreite des MONO-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	MO-WY	Fluoreszenzlichtverteilungsbreite des MONO-Bereichs (WDF-Scattergramm)
	MO-WZ	Vorwärtsstreulichtverteilungsbreite des MONO-Bereichs (WDF-Scattergramm)

WPC*	WBC-P	Leukozyten (WPC-Kanal)
	TNC-P	Gesamtanzahl kernhaltiger Zellen (WBC#+NRBC#), (WPC-Kanal)
RET*	RET-Y	Vorwärtsstreulichtintensität im RET-Bereich (RET-Scattergramms)
	RET-RBC-Y	Vorwärtsstreulichtintensität im RBC-Bereich (reife Erythrozyten) (RET-Scattergramm)
	IRF-Y	Vorwärtsstreulichtintensität aus dem IRF-Bereich (RET-Scattergramm)
	RPI	Retikulozytenproduktionsindex
	RET-UPP	Wert im UPP-Bereich des RET-Scattergramms
	RET-TNC	Wert im TNC-Bereich des RET-Scattergramms
	RBC-O	Erythrozyten (RET-Kanal)
	FRC#	Fragmentozyten, gezählt in einem spez. Bereich unterhalb des RBC-Bereichs (RET-Scattergramm)
	FRC%	Prozentualer Anteil der Fragmentozyten, gezählt in einem spezifischen Bereich unterhalb des RBC-Bereichs (RET-Scattergramm)
PLT-F*	H-IPF	Prozentualer Anteil der Thrombozyten, die im Bereich der stärkeren Fluoreszenz-Lichtintensität innerhalb des IPF-Bereichs im PLT-F-Scattergramms erscheint, bezogen auf Thrombozyten

Diagnostische Parameter im Bodyfluid-Modus*

Messkanal	Messprinzip	Analyse-Parameter	Bedeutung
WDF Verdünnung 1:20	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie mit einem Halbleiterlaser	WBC-BF	Leukozyten (Körperflüssigkeit)
		MN#	Mononukleäre Zellen
		MN%	Prozentualer Anteil mononukleäre Zellen
		PMN#	Polymorphonukleäre Zellen
		PMN%	Prozentualer Anteil polymorphonukleäre Zellen
		TC-BF#	Gesamtanzahl kernhaltiger Zellen (Körperflüssigkeit)
RBC Verdünnung 1:498	Mantelstrom (DC)-Detektionsverfahren	RBC-BF	Erythrozyten (Körperflüssigkeit)

Forschungsparameter im Bodyfluid-Modus*

Messkanal	Forschungsparameter	Bedeutung
WDF	HF-BF#	Zellen mit stärkerer Fluoreszenz als im WBC-BF-Bereich des WDF-Scattergramms
	HF-BF%	HF-BF pro 100 WBC-BF
	NE-BF#	Zellen im NEUT-Bereich des WDF-Scattergramms
	NE-BF%	NE-BF pro 100 WBC-BF
	LY-BF#	Zellen im LYMPH-Bereich des WDF-Scattergramms
	LY-BF%	LY-BF-Zahl pro 100 WBC-BF
	MO-BF#	Zellen im MONO-Bereich des WDF-Scattergramms
	MO-BF%	MO-BF-Zahl pro 100 WBC-BF
	EO-BF#	Zellen die im EO-Bereich des WDF-Scattergramms
	EO-BF%	EO-BF-Zahl pro 100 WBC-BF
RBC	RBC-BF2	Erythrozyten (Körperflüssigkeiten) mit einer Anzeige von mindestens 100/ μ l

* optionale Parameter, nicht bei allen Analysesystemen vorhanden, je nach Konfiguration, Applikationen und Anwendungen.
Stand Juli 2018

Kontakt

- **Sysmex Deutschland GmbH** · Bornbarch 1, 22848 Norderstedt, Germany ·
Telefon +49 40 534102-0 · Fax +49 40 5232302 · xtra@sysmex.de · www.sysmex.de/xtra
- **Sysmex Suisse AG** · Tödistrasse 50 · 8810 Horgen ·
Telefon +41 44 718 38 38 · xtra@sysmex.ch · www.sysmex.ch/xtra ·
- **Sysmex Austria GmbH** · Odoakergasse 34-36 · 1160 Wien ·
Telefon + 43 1 486 16 31 · Telefax: + 43 1 486 16 31 25 · xtra@sysmex.at · www.sysmex.at/xtra