

## Tipps und Tricks für die Präanalytik des konventionellen Differenzialblutbildes

Xtra Austria | März 2012 | Nr. 2

Das Differentialblutbild ist eine Routineuntersuchung in der medizinischen Labordiagnostik und führt bei bestimmten Anämien und Leukämien entweder direkt zur Diagnostik oder zumindest zu den Untersuchungen, die dann die Diagnose endgültig sichern. In den meisten Fällen ist der Blutausstrich ein Spiegelbild des Knochenmarks.

Die Ausstrichqualität ist entscheidend für die Beurteilung der Zellen. Es ist wichtig, dass hierzu gut gereinigte und vor allem fettfreie Objektträger verwendet werden. Ansonsten werden die Ausstriche unregelmässig, es bilden sich Zellaggregationen und Farbniederschläge.

### Verwendung von Fingerblut für den Blutausstrich [1]

Den ersten Tropfen abwischen, nächsten Tropfen durch leichtes Berühren auf Objektträger nehmen und sofort ausstreichen. Nur ganz frisch austretende Blutstropfen können für Ausstriche verwendet werden, da beginnende Gerinnung die Qualität der Ausstriche beeinträchtigt.

### Blutausstriche aus Venenblut [1]

Blutausstriche aus EDTA-Venenblut lassen nur dann Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Patientenblutes zu, wenn die Blutprobe unmittelbar vor der Entnahme des Blutropfens zur Anfertigung des Ausstriches einwandfrei gemischt ist: z. B. 30mal kippen oder 5 min auf dem Rotor mischen. Die Blutausstriche sollten spätestens 3–4 Stunden nach der Blutentnahme hergestellt werden. Ansonsten findet eine Degeneration der Leukozyten statt und es kommt zu einer scheinbaren Vermehrung der stabkernigen Neutrophilen.

### Der Objektträgersausstrich und seine Auswertung [1], [2], [3]

Um geeignete Ausstriche zu erhalten, sind Geschick und Übung notwendig.

## Ausstrichs-Technik

1. Einen kleinen Tropfen Blut auf einen beschrifteten Objektträger bringen.
2. Einen zweiten Objektträger mit geschliffenem Rand in einem Winkel von 45° vor den Blutstropfen ansetzen und dann vorsichtig in den Blutstropfen führen.
3. Sobald sich das Blut über die ganze Kante verteilt hat, den geschliffenen Objektträger kontinuierlich über den beschrifteten Objektträger schieben.
4. Es sollen keine Stufen im Ausstrich entstehen.
5. Ein gut ausgestrichenes Präparat zeigt am Ende, wo der Objektträger schliesslich abhebt, ein bartförmiges Ausfransen des Blutmaterials.

Erst wenn der Ausstrich sorgfältig an der Luft getrocknet worden ist, kann er gefärbt werden.

## Blutausstrich auf Objektträger [5]

- Bei flacherem Objektträgerwinkel wird der Ausstrich dünner (Abb.1 A). An zu dünnen Stellen erscheinen die Erythrozyten grösser, sie weisen keine Delle auf und scheinen deshalb besser mit Hämoglobin gefüllt zu sein.
- Ein korrekter Ausstrich hat einen für die Mikroskopie zu dicken Bereich (Abb.1 C), einen optimalen, ausreichenden Differenzierungsbereich (Abb.1 B) sowie einen kurzen, für die Mikroskopie zu dünnen Bereich (Abb.1 A)
- Bei steilem Ausstreichen wird der Ausstrich dicker (Abb.1 C). An dickeren Stellen, wo es zu teilweiser Überlagerung von Zellen kommt, erscheinen die Zellen und Zellkerne kleiner. Viele Details sind nicht zu erkennen.



A. Ausstrich zu dünn: Zellen erscheinen zu gross; Erythrozyten ohne Delle



B. Guter Ausstrich: Zellen berühren sich nicht; Delle der Erythrozyten deutlich.



C. Ausstrich zu dick: Zellen erscheinen zu klein.

**Merke**

Bei einem niedrigen Hämatokritwert der Probe muss man dicker ausstreichen, hingegen bei einem hohen Hämatokritwert soll ein dünner Ausstrich erstellt werden.

**Tipps zu Ausstricherstellung**

- Fettfreie Objektträger verwenden
- Objektträger immer beschriften
- Bei Fingerblut nur ganz frisch austretende Blutstropfen für die Ausstricherstellung verwenden
- EDTA-Blut unmittelbar von der Ausstricherstellung gut mischen
- Objektträgerwinkel immer dem Hämatokritwert der Probe anpassen
- Auf bartförmiges Ausfransen des Blutmaterials am Ende des Präparats achten
- Nur gut an der Luft getrocknete Ausstriche färben

**Die panoptische Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa-Färbung)**

Die panoptische Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa-Färbung) enthält eine ausgewogene Mischung aus basischen (Methylenblau, Azur) und sauren Farbstoffen (Eosin). Diese Färbung beruht auf der unterschiedlichen Affinität der Farbstoffe zu den einzelnen Zellbestandteilen:

- Das Chromatin der Kerne, das aus DNS besteht, also sauer reagiert, färbt sich mit dem basischen Farbstoff Methylenblau an und wird als basophil bezeichnet.
- Die Zellbestandteile, die alkalisch reagieren und sich mit sauren Farbstoffen anfärben, bezeichnet man als azidophil, eosinophil, oxyphil.
- Diejenigen, die sich weder mit sauren noch mit alkalischen Farbstoffen anfärben, bezeichnet man als neutrophil.

**Prinzip der panoptischen Färbung von Blutausstrichen**

Farbstoff	Reaktion	Farbe	Angefärbte Struktur	Reaktion
Eosin	sauer	rot	Hämoglobin	basisch
Methylenblau	basisch	blau	RNS/DNS	sauer
Azur	basisch	graublau/violett	Primärgranula	sauer

### Tipps zur Pappenheimfärbung

- Verwenden Sie Finger- oder frisch entnommenes EDTA-Blut für die Ausstriche
- Passen Sie die Färbedauer den Farbstoffen und der Präparatdicke an.
- Achten Sie auf frische Färbelösungen. Niederschläge oder Farbschlieren können nicht nur bei ungenügender Spülung oder schmutzigen/fetten Objektträgern, sondern auch bei alten, nicht filtrierten Färbelösungen entstehen. In den Farbstofflösungen, im Puffer oder im Aqua dest. kann es bei nicht sachgemässer Aufbewahrung auch zu Bakterien- oder Pilzwachstum kommen.
- Achten Sie auf den pH-Wert. Eine leichte Verschiebung des pH-Wertes kann aus einem basisch reagierendem Zellbestandteil einen sauren machen, so dass er sich statt mit Eosin mit Methylenblau färbt und umgekehrt.
- Zu starke Blautönung (plumpes Chromatin, Granulation dunkel, grob) kann folgende Ursachen haben:
  - zu dicker Ausstrich
  - zu lange Färbung
  - ungenügendes Spülen
  - zu hoher pH-Wert der Farbstoff, des Puffers oder des Aqua dest.
  - alter Ausstrich
- Eine starke Rottönung (Kernchromatin blassblau, Erythrozyten leuchtend rot) hat ihre Ursachen in zu starker Ansäuerung, z.B.: infolge Einwirkung von Säuredämpfen auf die Farblösungen oder Puffer.
- Blasse Färbung von Kernen, Erythrozyten und Granula beruht auf zu schwacher (kurzer) Färbung in Bezug auf die Präparatdicke oder auf zu starker Spülung.
- Achten Sie darauf, dass die Färbelösung gleichmässig auf dem Präparat verteilt wird.

### Beurteilung gefärbter Ausstriche [1], [2]

Bei der Beurteilung der gefärbten Blutausstriche muss systematisch vorgegangen werden:

- Visuelle Betrachtung
  - Kontrolle der Beschriftung
  - Beachtung der Schichtseite
  - Grobe Beurteilung der Färbequalität
  - Feststellung geeigneter Abschnitte

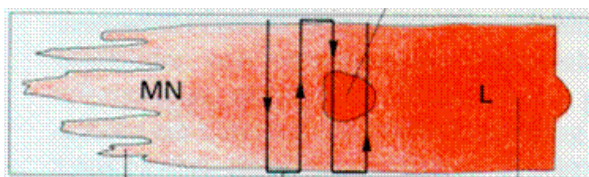
- Betrachtung des Präparates bei schwacher Vergrößerung (Objektiv 10x oder 20x)
  - Kontrolle der Ausstrichqualität – Keine Überlagerung und Zerquetschung von Zellen feststellbar? Ist die Färbung einwandfrei?
  - Beurteilung der Ausstrichdicke
  - Findung der richtigen Stelle für die Differenzierung. Es ist jene Stelle, wo die Erythrozyten beieinander liegen, ohne sich zu berühren, ca. 1 cm hinter dem Bartende.
  - Überprüfung auf Geldrollenbildung und Agglutinationen (z.B. als Folge von Kälteagglutininen)
- Betrachtung des Präparates mit der Ölimmersion (Objektiv 50x bzw.100x):

Erythrozytenmorphologie	Thrombozytenmorphologie	Leukozytenmorphologie
Grösse	Verteilung	Prozentuale Verteilung
Form	Aggregate	Morphologie
Farbe	Grösse	
Einschlüsse		
Vorstufen		

Um eine repetierte Durchmusterung der gleichen Felder zu vermeiden, schiebt man das Präparat in einer mäanderförmigen Kurve durch (Abb.2).

Die Verteilung der kernhaltigen Zellen im Ausstrich ist nicht gleichmässig, was physikalisch bedingt ist. Die kleinen Zellen, wie die Lymphozyten, sind im Zentrum und in den dickeren Bereichen des Ausstrichs stärker vertreten, während die grösseren Zellen wie die Neutrophilen (pathologische Verschiebung bis Blasten) und die Monozyten am Rand und am Ausstrichsende stärker vertreten sind.

Für eine korrekte Differenzierung muss im optimalen Bereich mikroskopiert werden. Zudem muss darauf geachtet werden, dass Zentrum als auch die Randbereiche in die mikroskopische Auswertung einbezogen werden.



**Abb.2:** Zellverteilung im Ausstrich 5) (M,N=Anreicherung von Monozyten und Neutrophilen, L=Anreicherung von Lymphozyten)

## Tipps für die Herstellung und Bewertung des Ausstrichs

Differenzierung: Zellart	Herstellung des Ausstrichs	Bewertung des Ausstrichs
Zu viele Lymphozyten	Ausstrich zu dünn	Differenzierung im zu dicken Teil des Ausstrichs
Zu wenige Monozyten	Ausstrich zu dünn	Differenzierung im zu dicken Bereich oder ohne Randbereich
Zu wenige Blasten oder pathologische Linksverschiebung	Ausstrich zu dünn	Differenzierung ohne Randbereich (Blasten oft nur am Rand)
Zu wenige Neutrophilen	Ausstrich zu dünn	Differenzierung im zu dicken Teil des Ausstrichs
Zu viele Neutrophilen	Kein Ausstrichfehler	Differenzierung im zu dünnen Teil des Ausstrichs
Zu viele Monozyten	Kein Ausstrichfehler	Differenzierung im zu dünnen Teil des Ausstrichs
Zu wenige Lymphozyten	Kein Ausstrichfehler	Differenzierung im zu dünnen Teil des Ausstrichs

### Merke

Je kleiner der Anteil einer Zellart ist, umso mehr Zellen müssen differenziert werden, um genaue Werte zu erhalten. Denn je geringer der prozentuale Anteil einer Zellart, umso grösser ihre Fehlerbreite. Die Rümke-Tabelle 4) erlaubt eine statistische Aussage über die Genauigkeit von Zählparametern:

A	n=100	n=200	n=500	n=1'000	n=10'000
0	0 – 3,9	0 – 1,8	0 – 0,7	0 – 0,4	0 – 0,1
1	0,0 – 5,4	0,1 – 3,6	0,3 – 2,3	0,5 – 1,8	0,8 – 1,3
5	1,6 – 11,3	2,4 – 9,0	3,3 – 7,3	3,7 – 6,5	4,5 – 5,5
10	4,9 – 17,6	6,2 – 15,0	7,5 – 13,0	8,2 – 12,0	9,4 – 10,7
15	8,6 – 23,5	10,4 – 20,7	12,0 – 18,4	12,8 – 17,4	12,8 – 17,4
20	12,7 – 29,2	14,7 – 26,2	16,6 – 23,8	17,6 – 22,6	19,2 – 20,8
30	21,2 – 40,0	23,7 – 36,9	26,0 – 34,2	27,2 – 32,9	29,1 – 31,0
40	30,3 – 50,3	33,2 – 47,1	35,7 – 44,4	36,9 – 43,1	39,0 – 41,0
50	39,8 – 60,2	42,9 – 57,1	45,5 – 54,5	46,9 – 53,1	49,0 – 51,0
70	60,0 – 78,8	63,1 – 76,3	65,8 – 74,0	67,1 – 72,8	69,0 – 70,9
80	70,8 – 87,3	73,8 – 85,3	76,2 – 83,4	77,4 – 82,4	79,2 – 80,8
90	82,4 – 95,1	85,0 – 93,8	87,0 – 92,5	88,0 – 91,8	89,3 – 90,6
100	96,4 – 100	98,2 – 100	99,3 – 100	99,6 – 100	99,9 – 100

**Tabelle 1:** Rümke-Tabelle: 95 %-Vertrauensgrenzen für den tatsächlichen Prozentsatz der Leukozyten. A = % Leukozyten einer Zellpopulation.

### Automatisierte Blutausstrich-Erstellung und Färbung

Der gesamte Vorgang der Ausstricherstellung und Färbung aus Vollblutproben kann beispielsweise mit dem Sysmex SP-1000i Ausstrich- und Färbeautomat beschleunigt und standardisiert werden. Das Blutvolumen, Wartezeiten, Ausstrichgeschwindigkeit und Anstellwinkel können flexibel eingestellt werden. Die Ausstrichgeschwindigkeit und der Anstellwinkel werden automatisch an den Hämatokritwert der jeweiligen Probe angepasst. Auch die Färbequalität-Standardisierung wird durch die Adaption hämatologischer Färbeverfahren mit flexibler Zeiteinstellung für Färbung, Spülung und Trocknung erreicht.

### Automatisierte Differenzierung

Die Technologie der CellaVision-Systeme bietet dem Labor eine automatisierte digitale morphologische Bestimmung.

Ein integriertes Mikroskop sucht und fokussiert die Leukozyten eines Blutausstrichs und fotografiert sie anschliessend digital. Die Zellen werden gezählt, vorklassifiziert und dokumentiert. Die Vorklassifizierung erfolgt in bis zu 18 verschiedene Gruppen. Der Anwender kontrolliert und korrigiert die Zugehörigkeit der Zellen einfach und schnell per Mausclick. Zudem wird von jedem Ausstrich auch ein rotes Blutbild erstellt und morphologische Veränderungen der Erythrozyten vermerkt. Alle Bilder und Ergebnisse werden in einer Datenbank gespeichert.

Durch die Automatisierung der Blutausstrichs-Erstellung, -Färbung und Differenzierung erreicht das Labor nicht nur eine Standardisierung während 24 Stunden am Tag. Viele präanalytische Fehlerquellen des konventionellen Differenzialblutbildes können vermieden oder sogar behoben werden.

### Literatur

[1] *Laboratoriumsmedizin; Hagemann P, Rosenmund K.* (1991): S. Hirzel Verlag Stuttgart.

[2] *Theml H.* (1998): Georg Thieme Verlag, Taschenatlas der Hämatologie, 4. vollständig überarbeitete Auflage.

[3] *Oertel J und B.* (2005): Hämatologische Diagnostik im Blutausstrich, Georg Thieme Verlag.

[4] *Rümke C. L, Z. Klein.* (1987): Statistische Betrachtungen über die Genauigkeit der Differenzierung und der Zählung von Leukozyten, Med. 42 : 173

[5] *Fehler bei der Herstellung von Blutausstrichen (Wedge Methode) und deren Bewertung; Sysmex Xtra 2/1998*