

Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie (XT-Serie)

Seit Einführung der vollautomatischen Hämatologie-Analysengeräte der XT-Serie erfüllen diese höchste Anforderungen im hämatologischen Routinelabor. Wie alle Geräte der X-CLASS verwenden sie die besondere Technologieplattform von SYSMEX – die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Auch bei diesen Geräten setzt SYSMEX die bewährte Mehrkanalmesstechnologie mit speziell dafür entwickelten Reagenzien ein.

XT-2000i und XT-1800i verwenden identische Messtechniken und Gerätespezifikationen. Der einzige Unterschied zwischen beiden Geräten besteht darin, dass der XT-2000i einen zusätzlichen Retikulozytenkanal besitzt und somit weitere Parameter bestimmen kann. Folgende Messkanäle werden von den Geräten der XT-Serie benutzt:

- RBC/PLT-Kanal
- Hämoglobin-Kanal
- WBC/BASO-Kanal
- DIFF-Kanal
- RET-Kanal (nur verfügbar am XT-2000i)

Analysenergebnisse der XT-Serie beinhalten nicht einfach nur Zahlenwerte, sondern auch Histogramme und Scattergramme, die wichtige zusätzliche Informationen liefern. So werden zum Beispiel die Zellverteilungen und die Lage von abnormalen Zellen im Scattergramm sowie der Kurvenverlauf der Histogramme bei jeder Probe beurteilt und der Anwender automatisch durch interpretative Meldungen auf Abnormalitäten hingewiesen. 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 werden für die Erythrozyten-/Thrombozytenanalyse 4 μL benutzt. Diese werden zusammen mit CELLPACK, dem Verdünnungsreagenz, in einer Mischkammer in einem Verhältnis von 1:500 verdünnt. Ein fest definiertes Volumen dieser Verdünnung wird in die Messkammer eingespritzt und durch eine Kapillaröffnung gesaugt. Wenn Zellen durch diese 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 Zellgröße, die die Messöffnung passiert hat.

Mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung, einem die Zellen zylindrisch umhüllenden Mantelstrom, wird gewährleistet, dass die Partikel die Messöffnung zentral und einzeln passieren. Dieses verhindert Störsignale, die durch Doppeldurchtritte (Koinzidenzen) oder Rezirkulationen entstehen könnten. Somit wird auch bei extremen Zellkonzentrationen ein genaues Zählergebnis gewährleistet. Gleichzeitig wird durch die HDF die Messöffnung permanent gespült, wodurch Verstopfungen minimiert werden (Abb. 1 und 2).

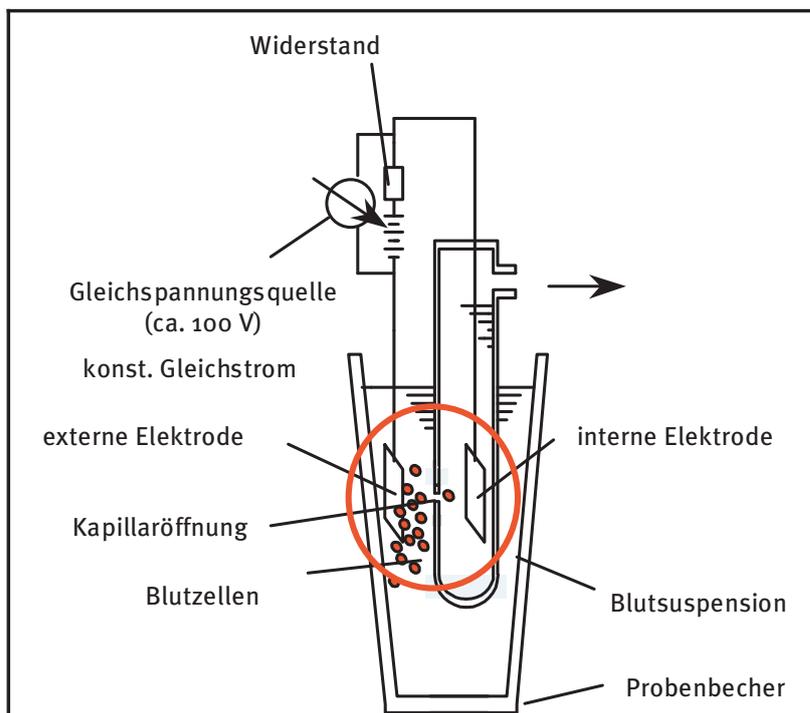


Abb. 1 Schematische Darstellung des Widerstandsmessprinzips

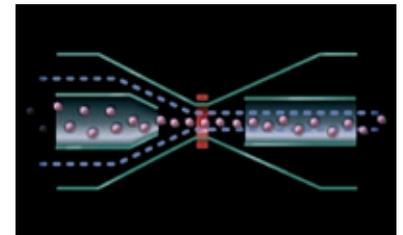


Abb. 2 Zentralstrahlprinzip mit hydrodynamischer Fokussierung

Die Zellverteilungen der Erythrozyten und Thrombozyten werden als separate Histogramme dargestellt. Im RBC/PLT-Kanal wird aus der Summe der Einzelimpulse auch der Hämatokrit ermittelt. Die hierbei verwendete Messmethode heißt »kumulative Impulshöhensummierung«. Die Erythrozytenindizes MCV, MCH und MCHC werden aus den Parametern RBC, 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), ein Tensid, welches z. B. auch in Seifen enthalten ist. Einem Teil des angesaugten Blutes werden **CELLPACK** und **SULFOLYSER** zugesetzt, sodass eine Endverdünnung von 1:500 entsteht. SLS löst die Lipoproteine in der Zellmembran aller Zellen und setzt das Hämoglobin der Erythrozyten frei. Die hydrophoben Gruppen des SLS binden an den Globinanteil und bewirken so eine Konformitätsänderung im Hämoglobinmolekül. Dadurch wird die Oxidation des zweiwertigen Eisens möglich und es entsteht Methämoglobin. Hydrophile Bestandteile des Natrium-Lauryl-Sulfates können nun an das entstandene dreiwertige Eisen im Methämoglobinkomplex binden. Auf diese Weise entsteht ein stabiler Farbkomplex (SLS-Hb), der photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 555 nm gemessen wird.

Diese von **sysmex** angewendete 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 in einem separaten Messkanal stattfindende Hämoglobinmessung und die hohe Verdünnung der Probe sind die Ergebnisse auch bei einer extremen Leukozytose verlässlich.

Die vom ICSH (International Council for Standardization in Haematology) empfohlene internationale Standardmethode ist die Zyanidmessmethode. Die **sysmex** SLS-Methode wird bereits seit Anfang der 90er Jahre als Standard in Hämatologieanalysen angewendet und mehrere Studien belegen die exzellente Korrelation der beiden Methoden. [1,2]

Weitere Messkanäle

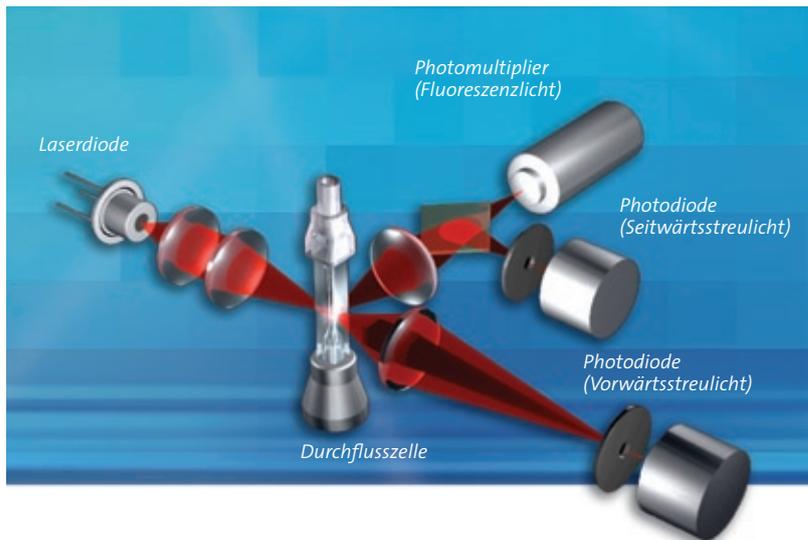


Abb. 3 Optisches System der XT-Serie

eines Halbleiterlasers bestrahlt (Abb. 3). Je nach Streuwinkel des erfassten Lichtes kann man auf unterschiedliche Zelleigenschaften schließen:

- Vorwärtsstreuung – Zellgröße
- Seitwärtsstreuung – innere Zellstruktur, Komplexität
- Seitwärts-Fluoreszenzlicht – RNA-/DNA-Gehalt der Zelle

Für alle im Nachfolgenden beschriebenen Messkanäle wird die Durchflusszytometrie benutzt. In jedem Messkanal erfolgt zunächst eine spezifische Reagenzreaktion, die die natürlichen Eigenschaften der Blutzellen hervorhebt. Nach der Inkubation wird das mit Reagenzien verdünnte Blut in einer Durchflusszelle analysiert. Beim Passieren der Durchflusszelle werden die Zellen mit monochromatischem Licht

3. WBC/BASO-Kanal: Durchflusszytometrie

Die Zählung der Leukozyten und Basophilen findet im WBC/BASO-Kanal statt. Dazu werden Blut und das Reagenz STROMATOLYSER-FB in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt. Durch das verwendete Reagenz werden alle Erythrozyten in diesem Messansatz lysiert. Des Weiteren bewirkt das saure Reagenz eine Schrumpfung der Leukozyten. Nur die basophilen Granulozyten bleiben unbeeinflusst und werden stabilisiert, sodass sie in ihrer Größe und Struktur erhalten bleiben.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse werden das Vorwärts- und das Seitwärtstreulicht gemessen. Das Vorwärtstreulicht reflektiert die Zellgröße, während das Seitwärtstreulicht die innere Struktur und Komplexität von Zellen wiedergibt. Durch die vorangegangene Behandlung der Zellen mit dem Reagenz entsteht zwischen Leukozyten und Basophilen sowohl ein signifikanter Größenunterschied als auch ein Unterschied in der Struktur der Zelle. Dies ermöglicht eine verlässliche Zählung



Abb. 4 Leukozyten nach Einwirkung des STROMATOLYSER-FB

auch von so selten im Blut vorkommenden Zellen wie den Basophilen (Abb. 4). Durch diese beiden Eigenschaften werden die Zellen eindeutig voneinander getrennt und im WBC/BASO-Scattergramm in separaten Populationen dargestellt.

4. DIFF-Kanal: Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Im DIFF-Kanal werden vier Zellpopulationen der Leukozyten bestimmt: Neutrophile, Eosinophile, Lymphozyten und Monozyten. Für die Messung wird ein Reagenziensystem, bestehend aus einer Kombination von Lysereagenz und Fluoreszenzfarbstoff, verwendet und mit dem Blut 1:51 verdünnt. Die erstgenannte Reagenzkomponente, STROMATOLYSER-4DL, lysiert während dieses Vorganges alle

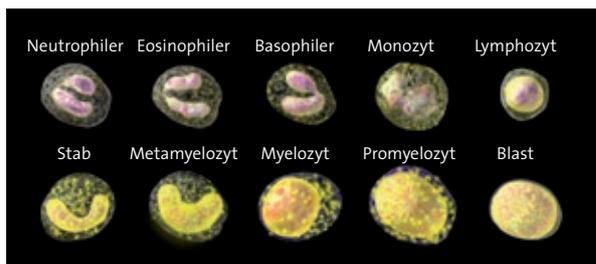


Abb. 5 Leukozyten nach Einwirkung von STROMATOLYSER-4DS & -4DL

Erythrozyten und perforiert die Zellmembranen der Leukozyten. Der Fluoreszenzfarbstoff STROMATOLYSER-4DS kann anschließend in die Zellen eindringen. Bei diesem Prozess bleiben die Zellen intakt. 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 (Abb. 5). Nach der Inkubationszeit wird die Probe 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 Zellreife und Zellaktivität 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, die Zellpopulationen der Leukozyten separat im DIFF-Kanal darzustellen: Lymphozyten (pink), Monozyten (grün), Neutrophile (türkis) und Eosinophile (rot). Insbesondere die Granula der Eosinophilen reagiert stark mit dem Reagenz, was zu ihrem deutlich höheren Seitwärtsstreulichtsignal führt. Eosinophile können so von den anderen Zellen klar abgetrennt werden.

Die zusätzliche Software XT-IG MASTER erlaubt die Quantifizierung einer weiteren Leukozytenpopulation im DIFF-Kanal. Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten werden zusammengefasst als Parameter »IG« (Immature Granulocytes = unreife Granulozyten) gezählt. Dieser kann als vollwertiger Analyseparameter an die Labor-EDV übertragen werden.

5. RET-Kanal: Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

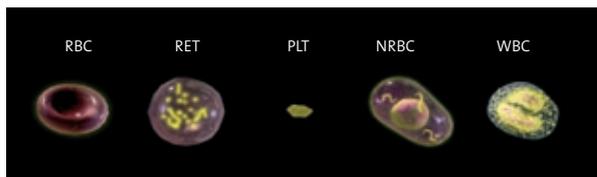


Abb. 6 Einwirkung von RETSEARCH (II) auf die Zellen

Auch in diesem Messkanal für die Bestimmung der Retikulozyten und ihrer Altersstufen wird das Blut mit einem spezifischen Reagenziensystem inkubiert. RETSEARCH (II) besteht aus einem Lyse-reagenz, welches die Membranen aller Blutzellen perforiert, und einem Fluoreszenzfarbstoff, der

anschließend in die Zellen eindringt und an die vorhandenen Nukleinsäuren in Zellkern und Zytoplasma bindet (Abb. 6).

In der Durchflusszelle werden das Vorwärtsstreulicht und die Fluoreszenzintensität analysiert. Auf Grund des deutlich höheren Nukleinsäuregehalts werden kernhaltige Zellen wie Leukozyten und Erythroblasten intensiver angefärbt und klar von den Retikulozyten getrennt. Erythrozyten dagegen enthalten so gut wie gar keine Nukleinsäuren und können deswegen klar von den Retikulozyten unterschieden werden. Mit der Reifung der Retikulozyten nimmt der RNA-Gehalt in der Zelle kontinuierlich ab, sodass sich Retikulozyten in drei Altersstufen einteilen lassen:

- Gruppe der »reifen« Retikulozyten (LFR – Low-Fluorescence Reticulocyte)
- Gruppe der »halbreifen« Retikulozyten (MFR – Medium-Fluorescence Reticulocyte)
- Gruppe der »unreifen« Retikulozyten (HFR – High-Fluorescence Reticulocyte)

Für den XT-2000i ist seit kurzem auch eine optionale Software, der XT-RET MASTER, verfügbar. Damit lässt sich ein weiterer Parameter aus diesem Messkanal bestimmen: der Hämoglobingehalt der Retikulozyten. Ausgehend von der Analyse der Vorwärtsstreulichtsignale der Retikulozyten wird deren Hämoglobingehalt ermittelt und als Parameter RET-H_e an die Labor-EDV übertragen. In einem separaten Themenblatt finden Sie Beispiele der klinischen Anwendung des Parameters RET-H_e.^[3]

Warnhinweise und deren Interpretationsmöglichkeiten

Aus dem Wissen über die Reaktionsabläufe im Gerät ergeben sich eine Reihe von Interpretationsmöglichkeiten für die Scattergramme und Histogramme, die automatisch mit jeder Messung erstellt und in der Browseransicht angezeigt werden.

Die Geräte der XT-Serie geben 2 Histogramme aus, jeweils eins für Thrombozyten (PLT) und Erythrozyten (RBC). 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, mit denen 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 (Flags) gekennzeichnet: »PLT Abnormale Verteilung« und »RBC Abnormale Verteilung«.

Die Ursachen für diese Flags können abnormale Höhen der Histogrammkurve an den Diskriminatoren sowie Mehrfachpeaks oder extreme Verteilungsbreiten sein. Der Warnhinweis »PLT-Clumps (s)?« wird aus numerischen Daten und dem Verlauf der PLT-Histogrammkurve ausgelöst.

Zur Interpretation des DIFF-Scattergramms ist es notwendig, die Verteilung der normalen Leukozyten zu kennen. Morphologisch abnormale Zellen werden im DIFF-Scattergramm nämlich an spezifischen Stellen aufgrund ihres Fluoreszenzverhaltens dargestellt (Abb. 7).

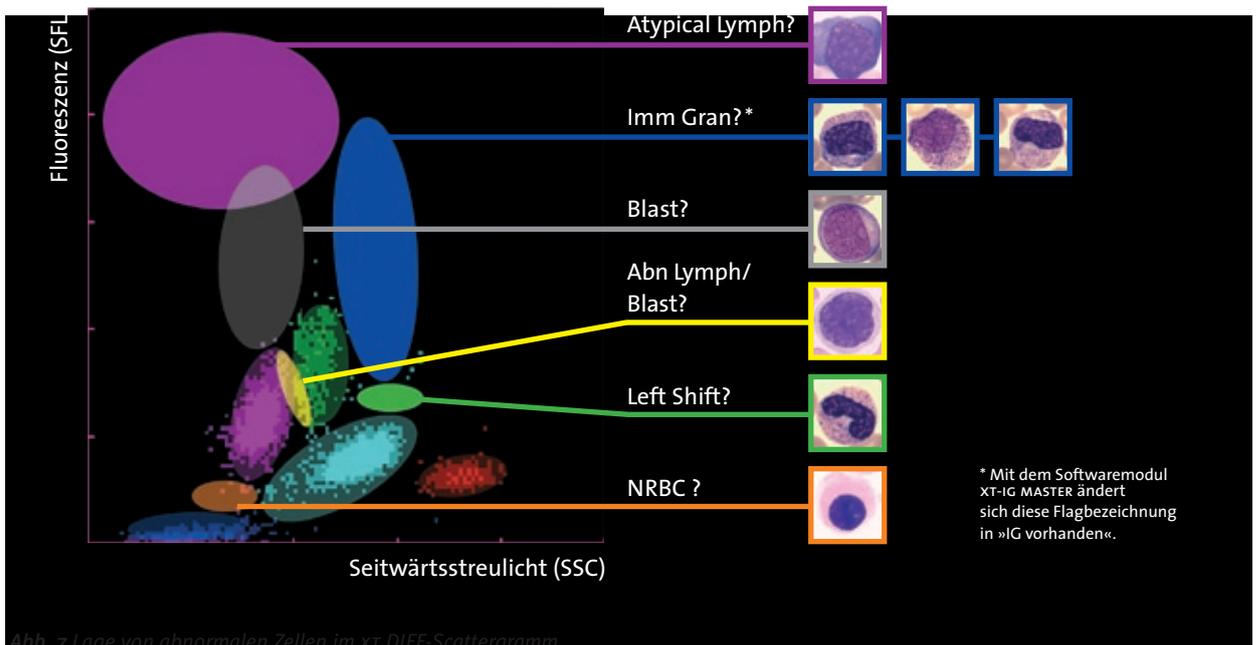


Abb. 7 Lage von abnormalen Zellen im XT-DIFF-Scattergramm

■ »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. Bei einem XT-Gerät mit installierter XT-IG MASTER Software ändert sich dieser Warnhinweis in »IG vorhanden« und es wird ein Zahlenwert übertragen.

■ »Atypische Lymphozyten?«

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

■ »Blasten?«

Blasten enthalten durch ihre Proliferationsaktivität häufig einen hohen Anteil Nukleinsäuren und färben sich deswegen intensiv mit dem Fluoreszenzfarbstoff an. Aufgrund dieses hohen Fluoreszenzsignals liegen sie auch im oberen Teil des Scattergramms.

■ »Abnormale Lymphozyten/Blasten?«

Sich in der Zone zwischen der Lymphozyten- und der Monozytenpopulation befindende Zellen sind in der Regel morphologisch abnormale Lymphozyten, in Ausnahmefällen auch Blasten. Häufig zeigen diese Zellen ein leicht erhöhtes Seitwärtsstreulichtsignal, welches durch eine veränderte Struktur, Dichte oder Granularität der Zellen ausgelöst wird.

■ »NRBC?«

Unreife erythrozytäre Vorstufen werden in dem Bereich zwischen der Ghost- und der Lymphozytenpopulation erfasst. Das Zytoplasma wird lysiert, aber der nukleinsäurehaltige Kern färbt sich mit dem Fluoreszenzfarbstoff an. Wenn eine vermehrte Anzahl von Zellen in diesem Bereich liegt, sollte eine manuelle 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 neutrophilen Granulozyten.

Weitere Beschreibungen über Leukozytenflagging am XT finden Sie auch in einem bereits erschienenen Artikel: »Leukozytendifferenzierung mit der XT-Serie: Verdachtsmeldungen des Gerätes im Vergleich zum mikroskopischen Bild«, welches Sie gern bei der SYSMEX DEUTSCHLAND GMBH anfordern können. [4]

Gerätespezifikationen [5]

Abmessung der Haupteinheit inkl. Sampler	Breite	530 mm
	Höhe	630 mm
	Tiefe	720 mm
Abmessung des Kompressors	Breite	280 mm
	Höhe	400 mm
	Tiefe	355 mm
Gewicht der Haupteinheit inkl. Sampler		59 kg
Gewicht des Kompressors		17 kg
Peripheriegeräte	Drucker Handbarcodeleser	
Anzeigebereich	WBC	0,0 – 999,99 x 10 ³ /μL
	RBC	0,0 – 99,99 x 10 ⁶ /μL
	HGB	0,0 – 30,0 g/dL
	HCT	0,0 – 100,0 %
	PLT	0 – 9.999 x 10 ³ /μL
Angesaugtes Blutvolumen	manueller, offener Modus	85 μL
	geschlossener Modus	150 μL
	vorverdünnter Modus	vorverdünnte Proben im Verdünnungsverhältnis 1:5, 85 μL werden angesaugt
Durchsatz	ca. 80 Proben/Stunde	
Datenspeicherkapazität	Analysendaten	10.000 Proben
	Patientendaten	5.000 Personen
	Auftragsdaten	1.000 Proben
	Qualitätskontrolldateien	21 Dateien
LIS	bidirektional	selektiv

Leerwertgrenzen	WBC RBC HGB PLT	0,1 x 10 ³ /μL 0,02 x 10 ⁶ /μL 0,1 g/dL 10 x 10 ³ /μL
Linearität im Vollblutmodus		
WBC	0 – 100,00 x 10 ³ /μL 100,01 – 310,00 x 10 ³ /μL 310,01 – 400,00 x 10 ³ /μL	± 0,3 x 10 ³ /μL oder ± 3% ± 6% ± 11%
RBC	0,0 – 8,00 x 10 ⁶ /μL	± 0,03 x 10 ⁶ /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 ³ /μL 2.001 – 5.000 x 10 ³ /μL	± 10 x 10 ³ /μL oder ± 5% ± 16%
Parameter	XT-1800i Vollblutmodus	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
Parameter	XT-2000i Vollblutmodus	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, RET#, RET%, IRF, LFR, MFR, HFR, PLT-O
Qualitätskontrolle	\bar{X} - oder L-J-Methode \bar{X}_M (XbarM) Kontrollmaterial: e-CHECK (XE)	20 Dateien, 38 Parameter, 300 Datenpunkte 1 Datei, 42 Parameter, 300 Punkte Kontrolle aller Parameter in drei Konzentrationsbereichen
Verbrauchsmaterial	CELLPACK STROMATOLYSER-FB STROMATOLYSER-4DL und 4DS SULFOLYSER RET-SEARCH (ii) CELLCLEAN	Verdünnungsflüssigkeit Analyse von WBC und BASO Analyse von NEUT, LYMPH, MONO, EO HGB-Reagenz Analyse der Retikulozyten (nur XT-2000i) Reinigungsmittel
Wartung	Täglich: - Shutdown - Wasserfalle kontrollieren Monatlich: - Abfallkammer reinigen	Dauer ca. 15 min Dauer ca. 15 min
Reagenzienmanagement	Funktionen	Reagenz erfassung Verfallsdatumsüberprüfung Reagenzienprotokollanzeige Restvolumenanzeige
Zusätzliche optionale Softwaremodule	XT-IG MASTER XT-RET MASTER	Zur Quantifizierung der IG (Immature Granulocytes) Zur Bestimmung des Retikulozyten-hämoglobins am XT-2000i
Online-Services (folgende Module stehen zur Verfügung)		
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	

Literaturangaben

- [1] *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*
- [2] *Lewis et al; Lauryl sulphate haemoglobin: a non-hazardous substitute for HiCN in haemoglobinometry; Clin Lab Haematology 1991; 13:279-290*
- [3] *XT-2000i RET MASTER klinischer Nutzen, Sysmex Xtra, Vol. 12 Nr. 1, 2008*
- [4] *Leukozytendifferenzierung mit der XT-Serie: Verdachtsmeldungen des Gerätes im Vergleich zum mikroskopischen Bild, Sysmex Xtra, Vol. 7 Nr.2, 2003*
- [5] *Gebrauchsanweisung XT-Serie, Revisionsstand 2.0, April 2003; Kapitel 14: Technische Daten*