

# Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie (XE-2100D)



Abb. 1 XE-2100D

In Laboratorien mit hohem Durchsatz an Hämatologieproben hat sich seit seiner Einführung im Jahr 2004 der XE-2100D als vollautomatisches Analysengerät etabliert. Wie bei allen anderen Geräten der x-CLASS wird auch bei diesem Gerät die besondere Technologieplattform von SYSMEX – die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie – in Kombination mit der bewährten Mehrkanalmesstechnologie verwendet.

Folgende Messkanäle finden am XE-2100D Verwendung:

- RBC/PLT-Kanal
- Hämoglobin-Kanal
- WBC/BASO-Kanal
- DIFF-Kanal

Analysenergebnisse des XE-2100D beinhalten nicht 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. Der Anwender wird 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  $\mu\text{L}$  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. Dabei ist die Größe des analysierten Impulses direkt proportional zur Größe der Zelle, die die Messöffnung passiert hat. Das Gerät misst dabei auch die Anzahl der Impulsänderungen in einer vorgegebenen Zeit.

Mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung (HDF), einem die Zellen zylindrisch umhüllenden Mantelstrom, erzeugt durch das Reagenz CELLSHEATH, wird gewährleistet, dass alle Zellen die Messöffnung einzeln und zentriert passieren. Dieses Verfahren verhindert Störsignale, die durch Doppeldurchtritte (Koinzidenzen) oder Rezirkulationen von Zellen entstehen könnten. Damit wird auch bei extremen Zellkonzentrationen ein genaues Zählergebnis gewährleistet. Gleichzeitig wird durch die HDF die Messöffnung permanent gespült, und somit werden Verstopfungen minimiert (siehe Abb. 2 und 3).

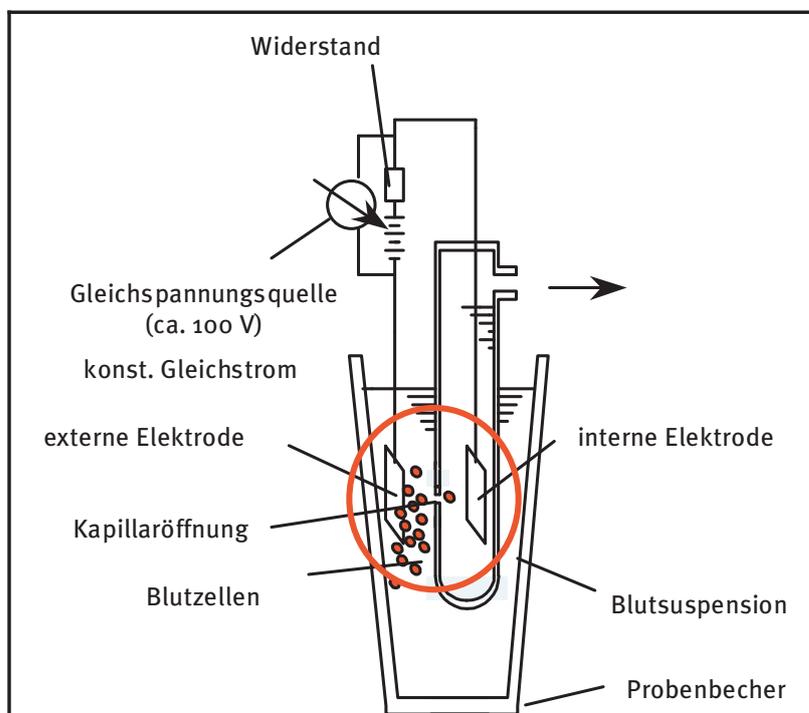


Abb. 2 Schematische Darstellung des Widerstandsmessprinzips

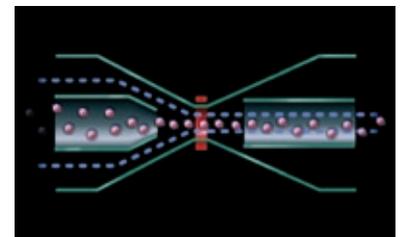


Abb. 3 Zentralstrahlprinzip mit hydrodynamischer Fokussierung

Die Zellverteilungen der Erythrozyten und Thrombozyten werden in zwei unterschiedlichen Histogrammen dargestellt. Im RBC/PLT-Kanal wird aus der Summe aller Einzelimpulse auch der Hämatokrit ermittelt. Diese 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. Wichtiger Bestandteil dieses Reagenzes ist das Natrium-Lauryl-Sulfat (SLS), ein Tensid, welches z.T. auch in Seifen enthalten ist. Einem definierten Teil des angesaugten Blutes werden CELLPACK und SULFOLYSER zugesetzt, sodass eine Verdünnung 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 sich an den Globin-Anteil 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 sich nun an das entstandene dreiwertige Eisen im Methämoglobin-komplex binden. Der auf diese Weise entstandene stabile Farbkomplex (SLS-Hb) ist photometrisch analysierbar mit einem Absorptionsmaximum von 555 nm.

Diese von SYSMEX angewendete Methode ist zyanidfrei und enthält auch keine weiteren giftigen Substanzen. Trübungen auf Grund von Fetten werden durch die seifenartige Eigenschaft des Reagenzes bis auf ein Minimum reduziert. Durch die in einem separaten Messkanal stattfindende Hämoglobinmessung und die 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 60er Jahre als Standard an allen Hämatologieanalysen angewendet und mehrere Studien belegen die exzellente Korrelation der beiden Methoden. [1,2]

## Weitere Messkanäle

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 Durch-

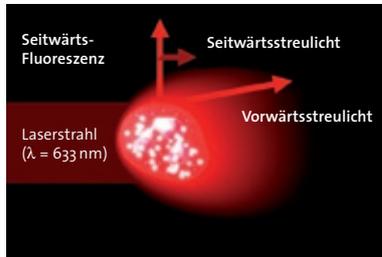


Abb. 4 Laser-Durchflusszytometrie: Optisches Verhalten einer Zelle im Laserlicht

flusszelle analysiert. Beim Passieren der Durchflusszelle werden die Zellen mit monochromatischem Licht eines Halbleiterlasers bestrahlt. Je nach Streuwinkel des erfassten Lichts kann man auf unterschiedliche Zelleigenschaften schließen (Abb. 4):

- Vorwärtsstreulicht – Zellgröße
- Seitwärtsstreulicht – interne Zellstruktur, Komplexität
- Seitwärts-Fluoreszenzlicht – RNA-/DNA-Gehalt der Zelle

### 3. WBC/BASO-Kanal: Durchflusszytometrie

Die Zählung der Leukozyten und basophilen Granulozyten findet im WBC/BASO-Kanal statt. Dazu werden vom Gerät Blut und das Reagenz STROMATOLYSER-FB in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt. Durch das 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 (Abb. 5).

Bei der durchflusszytometrischen Analyse werden sowohl Vorwärts- als auch Seitwärtsstreulicht gemessen. Das Vorwärtsstreulicht reflektiert die Zellgröße, während das Seitwärtsstreulicht die innere Struktur und Komplexität von Zellen wiedergibt. Durch die vorangegangene Behandlung der Zellen mit dem Reagenz entsteht zwischen Basophilen und übrigen Leukozyten sowohl ein signifikanter Größenunterschied als

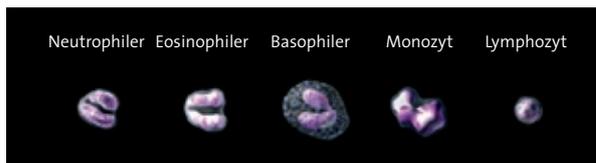


Abb. 5 Leukozyten nach Einwirkung des STROMATOLYSER-FB

auch ein Unterschied in der Struktur der Zelle. Durch die Verwendung dieser beiden Eigenschaften werden die Zellen eindeutig voneinander getrennt, zuverlässig gezählt und im WBC/BASO-Scattergramm in separaten Populationen dargestellt.

#### 4. DIFF-Kanal: Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Im DIFF-Kanal werden die verbleibenden 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 erste Reagenzkomponente, STROMATOLYSER-4DL, lysiert während dieses Vorgangs alle Erythrozyten und perforiert die Zellmembranen der Leukozyten. Der Fluoreszenzfarbstoff, STROMATOLYSER-4DS, kann somit in die Zellen eindringen. Bei diesem Prozess bleiben die Zellen weitestgehend intakt. STROMATOLYSER-4DS ist ein Polymethin-Fluoreszenzfarbstoff, der Nukleinsäuren im Kern und Zytoplasma der Leukozyten anfärbt, wodurch Rückschlüsse auf die Zellaktivität und den Reifegrad möglich sind (Abb. 6). Nach der Inkubationszeit wird die Probe unter Verwendung des Halbleiterlasers durchflusszytometrisch analysiert.



Abb. 6 Leukozyten nach Einwirkung von STROMATOLYSER-4DS & -4DL

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 dagegen 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 separiert 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.

Des Weiteren ist im DIFF-Kanal des XE-2100D die Quantifizierung einer weiteren Leukozytenpopulation routinemäßig möglich. Bei Vorhandensein von Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten werden diese zusammengefasst als Parameter »IG« (Immature Granulocytes = unreife Granulozyten) gezählt und als vollwertiger Analyseparameter an die Labor-EDV übertragen.

## Übersicht über 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 für jeden Patienten angezeigt werden.

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  $\mu\text{m}$ ), 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  $\mu\text{m}$ ), 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. [3]

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 festgestellt (Abb. 7).

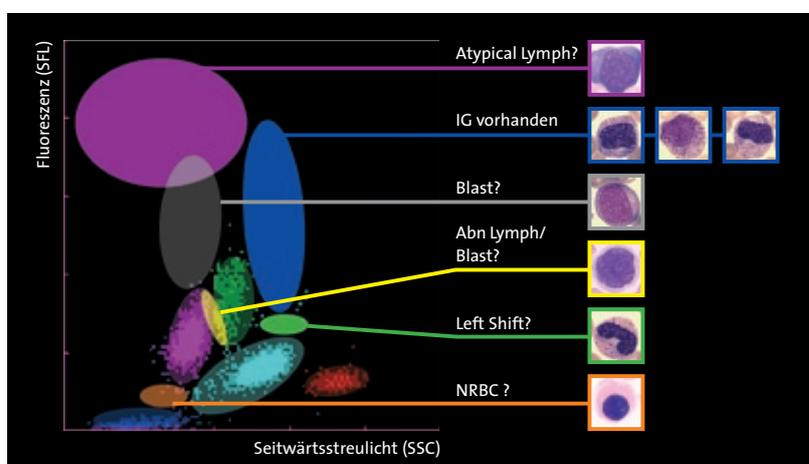


Abb. 7 Lage von abnormalen Zellen im XE-2100D DIFF-Scattergramm

- »Linksverschiebung?«  
Das Flag »Linksverschiebung?« steht für 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. Dieses Flag erscheint, wenn die Population normaler Neutrophiler nicht eindeutig von abnormalen Zellen getrennt werden kann.
- »Unreife Granulozyten vorhanden«  
Bei korrekter Trennung der Neutrophilen von unreifen Zellen wird der Zahlenwert ermittelt und an die Labor-EDV ausgegeben. Der Warnhinweis kann anwenderspezifisch eingestellt werden und ersetzt dann »Unreife Granulozyten?«.
- »Atypische Lymphozyten?«  
Der Warnhinweis »Atypische Lymphozyten?« resultiert aus einer zweiten pinkfarbenen Population im linken oberen Teil des Scattergramms. Diese Zellen weisen eine stark erhöhte Fluoreszenz aufgrund erhöhter Zytoplasmaaktivität auf. Z.B. Antikörper-produzierende B-Lymphozyten lösen dieses Flag aus und können bei Patienten mit reaktiven Erkrankungen und 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 Monozytenpopulation befindende Zellen sind in der Regel morphologisch abnormale Lymphozyten oder 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-Wolke und der Lymphozytenpopulation erfasst. Das Zytoplasma solcher Zellen 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.

## Gerätespezifikationen [4]

<b>Abmessung der Haupteinheit inkl. Sampler</b>	Breite	706 mm	
	Höhe	711 mm	
	Tiefe	912 mm	
<b>Abmessung des Kompressors</b>	Breite	195 mm	
	Höhe	333 mm	
	Tiefe	395 mm	
<b>Gewicht der Haupteinheit inkl. Sampler</b>		93 kg	
<b>Gewicht des Kompressors</b>		15,5 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	130 μL	
	geschlossener Modus	200 μL	
	vorverdünnter Modus	vorverdünnte Probe im Verdünnungsverhältnis 1:5	
<b>Durchsatz</b>	ca. 150 Proben/Stunde		
<b>Datenspeicherkapazität</b>	Analysendaten	10.000 Proben	
	Patientendaten	5.000 Personen	
	Auftragsdaten	1.000 Proben	
	Qualitätskontrolldateien	11 Dateien	
<b>LIS</b>	bidirektional	selektiv	
<b>Leerwertgrenzen</b>	WBC	0,1 x 10 <sup>3</sup> /μL	
	DIFF-WBC	0,2 x 10 <sup>3</sup> /μL	
	RBC	0,02 x 10 <sup>6</sup> /μL	
	HGB	0,1 g/dL	
	PLT	5 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 – 440,00 x 10 <sup>3</sup> /μL	± 0,2 x 10 <sup>3</sup> /μL oder ± 2% ± 6% ± 11%
	RBC	0,00 – 8,00 x 10 <sup>6</sup> /μL	± 0,03 x 10 <sup>6</sup> /μL oder ± 2%
	HGB	0,0 – 25,0 g/dL	± 0,2 g/dL oder ± 2%
	HCT	0,0 – 75,0 %	± 1 % HCT oder ± 2%
	PLT	0 – 1.000 x 10 <sup>3</sup> /μL 1.001 – 5.000 x 10 <sup>3</sup> /μL	± 10 x 10 <sup>3</sup> /μL oder ± 5% ± 6%
	<b>Parameter</b>	Vollblutmodus	WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT, NEUT#, LYMPH#, MONO#, EO#, IG#, BASO#, NEUT%, LYMPH%, MONO%, EO%, BASO%, IG%, RDW-SD, RDW-CV, PDW, MPV, P-LCR, PCT
Vorverdünnungsmodus		WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT	

## Gerätespezifikationen

<b>Qualitätskontrolle</b>	$\bar{X}$ - oder L-J-Methode $\bar{X}_M$ (XbarM) Kontrollmaterial: e-CHECK (xE)	20 Dateien, 28 Parameter, 300 Datenpunkte 1 Datei, 28 Parameter, 300 Punkte Kontrolle aller Parameter in drei Konzentrationsbereichen
<b>Verbrauchsmaterial</b>	CELLPACK CELLSHEATH STROMATOLYSER-FB STROMATOLYSER-4DL und 4DS SULFOLYSER CELLCLEAN	Verdünnungsflüssigkeit Reagenz für die hydrodynamische Fokussierung Analyse von WBC und BASO Analyse von NEUT, LYMPH, MONO, EO, IG HGB-Reagenz Reinigungsmittel
<b>Wartung</b>	Täglich: - Shutdown - Wasserfalle kontrollieren Monatlich: - Abfallkammer reinigen	Dauer ca. 15 min Dauer ca. 15 min
<b>Reagenzienmanagement</b>	Funktionen	Reagenz erfassung Verfallsdatumsüberprüfung Reagenzienprotokollanzeige Restvolumenanzeige
<b>Online-Services</b>		
<b>(folgende Module stehen zur Verfügung)</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	

## Literatur

- [1] Recommendation for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition); J Clin Pathol 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] Thrombozytenverteilungskurven: Interpretationen, Möglichkeiten, Grenzen; SYSMEX XTRA Vol. 4, No. 2, 2000
- [4] Gebrauchsanweisung XE-2100D, Revisionsstand 1.0, April 2004; Kapitel 16: Technische Informationen