

Integrierte, automatisierte Gesamtlösung zur Zellanalytik in Körperflüssigkeiten

In immer mehr Laboratorien fallen Proben von Körperflüssigkeiten an, bei denen eine Zellanalytik durchgeführt werden muss. Die häufigste Untersuchung ist hierbei die Bestimmung der Anzahl der Leukozyten und oft auch der Erythrozyten. Auch die Zellmorphologie spielt eine wichtige Rolle, um Auffälligkeiten, wie z. B. Tumorzellen, zu erkennen und zu klassifizieren. Man denkt hier sicher zunächst an die Liquordiagnostik, aber auch andere Körperflüssigkeiten, wie z. B. Peritonealpunktate, Pleurapunktate oder Synovialflüssigkeiten, kommen zur Analyse ins Labor. Die unterschiedlichen Arten von Körperflüssigkeiten bedeuten natürlich andere Fragestellungen, und unterschiedliche Grenzwerte, z. B. für die Zahl der weißen Blutzellen, müssen berücksichtigt werden. Analysenergebnisse von unterschiedlichen Körperflüssigkeiten müssen daher auch unterschiedlich interpretiert werden.

Bei der Liquoranalytik besteht besonders die Gefahr von Fehlern bei der Präanalytik, wie z. B. bei der Probenentnahme, die zu Messinterferenzen führen können, die Beurteilung der Ergebnisse erschweren oder, viel schlimmer noch, Ergebnisse möglicherweise sogar verfälschen. Ein typisches Beispiel hierfür sind Einblutungen in die Probe. Es ist enorm wichtig, diese möglichen Einflüsse auf die Messergebnisse zu erkennen und entsprechende Handlungsanweisungen daraus abzuleiten, und das unabhängig von der Person, die für die Analytik verantwortlich ist. Eine standardisierte Gesamtlösung für die Zellanalytik in Körperflüssigkeiten geht folglich weit über die reine Zellzählung hinaus. Der gesamte Prozess spielt hier eine Rolle: von der Präanalytik einschließlich der Probenregistrierung des entsprechenden Materials bis hin zur – idealerweise – automatisierten morphologischen Bewertung (Abb. 1).

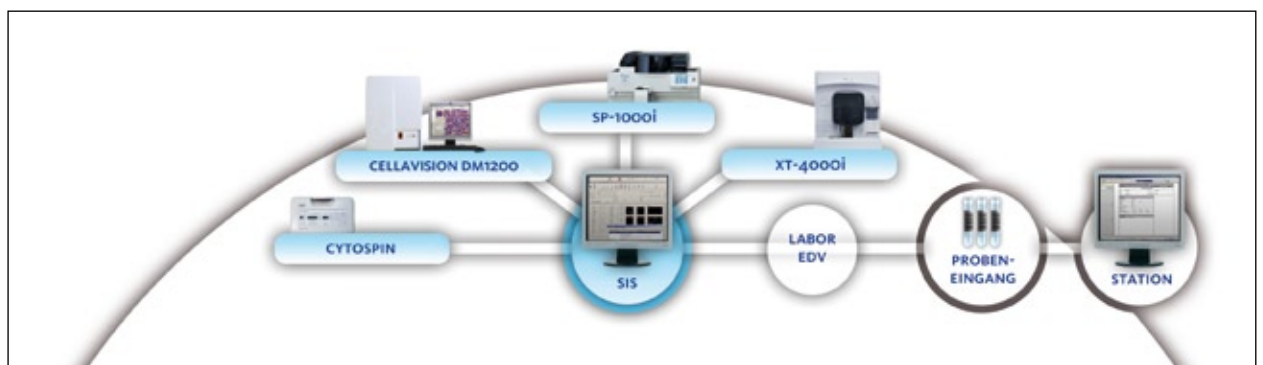


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Gesamtkonzeptes. Zentrales Steuerelement und einzige Datenverbindung zur Labor-EDV ist der Work Area Manager SIS. Eine zusätzliche Remote Review-Station bietet die Möglichkeit, auch räumlich entfernte Abteilungen oder Experten in die Bewertung der digitalisierten Zellbilder einzubinden.

1. Probeneingang: Registrierung der Proben im SIS (Sysmex Information System)

The screenshot displays the 'Collection Source Master' window in the SIS. On the left, a form contains patient information: Sample No. 623340914, Accession No. 1, Coll. Source 1 CSF (highlighted in a red box), Patient ID 111, Last Name Tester, First Name Willi, Sex 1 M, Birthday 01/01/1999, and Age. Below this is a table for test codes with 'bf Body Fluid' selected (highlighted in a blue box). On the right, the 'Collection Source Master' table lists codes and names: N/A, 1 CSF (highlighted in a red box), 2 Ascites, 3 Pleural Fluid, 4 CAPD Fluid, and 5 Synovial Fluid.

Abb. 2 Probenregistrierung der verschiedenen Körperflüssigkeiten im SIS. Durch wenige Mausklicks ist eine schnelle Erfassung der Probe mit Eingabe der Entnahmekategorie (roter Rahmen) und des Testcodes (blauer Rahmen) möglich. Alternativ können diese Daten mit der Anforderung automatisch über die Labor-EDV empfangen werden.

Ein standardisierter Arbeitsablauf für die verschiedenen Körperflüssigkeiten beginnt bereits bei der Abnahme des Materials. Das Probenröhrchen muss der Körperflüssigkeit entsprechend beschriftet werden, denn hinter den verschiedenen Materialien stehen fast immer unterschiedliche Fragestellungen und dem Material entsprechende Cut-Off-Werte für die Zellzahlen und deren Fraktionen. Messergebnisse bedürfen demnach einer unterschiedlichen Interpretation. SIS bietet daher schon beim Probeneingang im Labor

die Möglichkeit, die Probe gemäß ihrer Abnahmekategorie zu registrieren. Dies kann sowohl automatisch vom Laborinformationssystem aus erfolgen oder auch manuell im SIS durchgeführt werden (Abb. 2).

Durch diesen Schritt wird das Ergebnis der automatisierten Zellzählung und Differenzierung während der technischen Validierung dem Regelwerk der entsprechenden Körperflüssigkeit zugeordnet. So werden alle Körperflüssigkeiten gemäß ihrer Entnahmekategorie standardisiert bewertet und validiert.

2. Analytik: Messung am XE-5000 oder XT-4000i

Eine gute analytische Basis für die Messung von Körperflüssigkeiten ist für die richtige Diagnosestellung sowie die Therapie enorm wichtig. Dabei muss man die Vorteile, aber auch die Limitationen kennen, was für die Kammerzählung und die automatisierte Zählung gleichermaßen gilt. Der XE-5000 und der XT-4000i basieren auf der gleichen analytischen Plattform, und es wurden verschiedene Studien im Vergleich zur Kammerzählung durchgeführt (siehe Literaturverzeichnis). Die Studien zeigen eine sehr gute Korrelation für Leukozyten (WBC), polymorphkernige Zellen (PMN) und mononukleare Zellen (MN) mit der Kammer und dem Zytopräparat, sowie sehr gute negativ-prädiktive Werte für den normalen WBC-Bereich ($WBC < 6 \text{ Zellen}/\mu\text{L}$).



Abb. 3 XT-4000i



Abb. 4 XE-5000

Der XE-5000 und der XT-4000i bieten neben der Zellzählung des peripheren Blutes eine Zellzählung und Differenzierung in folgenden Körperflüssigkeiten an:

1. Liquor
2. Peritonealpunkate (Aszites)
3. Pleurapunktate
4. Synovialflüssigkeiten
5. Flüssigkeit aus der kontinuierlichen ambulanten Peritonealdialyse (CAPD-Flüssigkeit)

Hierfür gibt es an beiden Systemen auf Basis der Fluoreszenzdurchflusszytometrie einen speziellen Body-Fluid-Modus. Die Messungen können aus dem Entnahmeröhrchen erfolgen und benötigen keine spezielle Probenvorbereitung. Die automatisierte Methode bietet dem Labor entscheidende Vorteile:

- eine Standardisierung der Zählung und somit eine mögliche Reduktion von Fehlerquellen durch Materialverdünnung oder subjektiver Beurteilung verschiedener Anwender
- eine deutliche Reduktion des zeitlichen Aufwands
- Verfügbarkeit der automatisierten Analyse rund um die Uhr, Ergebnisse innerhalb von ca. 1,5 Minuten nach Ansaugung

Ein speziell im Body Fluid-Modus erhöhtes Zählvolumen sorgt für eine geringe Impräzision der Resultate selbst in niedrigen Zellkonzentrationsbereichen, wie sie z.B. bei der Messung von Liquor beobachtet werden.

Die nachstehenden Parameter sind im Rahmen einer Body-Fluid-Analyse am XE-5000 bzw. XT-4000i erhältlich:

- Zellzahl (TC-BF)
- Fraktion mononukleärer Zellen (MN#, MN%)
- Fraktion polymorphnukleärer Zellen (PMN#, PMN%)
- Zusatzparameter: Eosinophile (EO-BF#, EO-BF%)
- Zusatzparameter: hochfluoreszierende Zellen (HF-BF#, HF-BF%)
- Erythrozyten (RBC-BF)

3. Bewertung der Messergebnisse: Standardisierte technische Validierung durch das SIS-Regelwerk für Körperflüssigkeiten

Die technische Validierung nimmt eine zentrale Stellung im Workflow ein, denn hier findet eine Bewertung der Ergebnisse bezüglich ihrer Plausibilität und Qualität statt. Jede Analytik ist von Natur aus gewissen Interferenzen ausgesetzt, die im schlechtesten Fall sogar das Ergebnis verfälschen können. Daher trägt eine zuverlässige Erkennung innerhalb einer standardisierten Lösung zur Qualität der Ergebnisse und letztendlich zur Sicherheit beim Anwender bei.



Abb. 5 Darstellung der Ergebnisse im SIS. Neben numerischen Werten und grafischen Darstellungen werden Handlungshinweise angezeigt, die sich aus dem Regelwerk ergeben.

Darüber hinaus liefern XE-5000 und XT-4000i wertvolle Zusatzparameter, wie z. B. die Anzahl hochfluoreszierender Zellen (z. B. Plasmazellen, Makrophagen, Mesothelien, Tumorzellen) oder EO-BF (Eosinophile in der Körperflüssigkeit), die im SIS-Regelwerk für entsprechende Handlungshinweise berücksichtigt werden können (Abb. 5).

Im SIS-Regelwerk für Körperflüssigkeiten werden alle wichtigen Geräteinformationen mit Expertenwissen sinnvoll kombiniert. Mit Hilfe von mehr als 30 Regeln, die auf die einzelnen Körperflüssigkeiten speziell zugeschnitten sind, wird jede Probe automatisch ausgewertet und der validierenden Person so dargestellt, dass sich weitere Arbeitsabläufe durch konkrete Hinweise (z. B. »RBC vorhanden → Cytospin«) einfacher ableiten lassen. Die folgenden Aktionen können durch das SIS-Regelwerk für Körperflüssigkeiten angezeigt werden:

- Aufforderung zur Herstellung eines Cytospin-Präparates
- Hinweise zur morphologischen Bewertung der Zellen (z. B. »Verdacht auf Tumorzellen«)
- Hinweis und Handlungsanweisung zur Korrektur der Zellzahl aufgrund einer Einblutung
- Hinweis auf Kammerzählung als Alternative bei detektierten Interferenzen

Gerade für akkreditierte Laboratorien ist es wichtig, Arbeitsabläufe so weit wie möglich zu standardisieren. SIS ermöglicht zu jeder Zeit eine gleichbleibende Qualität der Analysen, unabhängig davon, ob die Probe während des Routinebetriebes oder des Bereitschaftsdienstes gemessen wird.

Eine standardisierte technische Validierung bedeutet im Einzelnen:

- Einfache und sichere Interpretation der Ergebnisse, basierend auf klinischem und technologischem Expertenwissen
- Erkennung und Minimierung von Interferenzen
- Hinweise auf die Präsenz auffälliger Zellen, wie z. B. Tumorzellen oder Plasmazellen, zur Unterstützung bei der morphologischen Beurteilung
- Steuerung analytischer Alternativen, wie z.B. die Herstellung eines Cytospin-Präparates
- Zeitersparnis innerhalb der Routine durch Minimierung manueller Nacharbeit, wie z. B. Kammerzählung

Beispiel: Liquor mit Einblutung

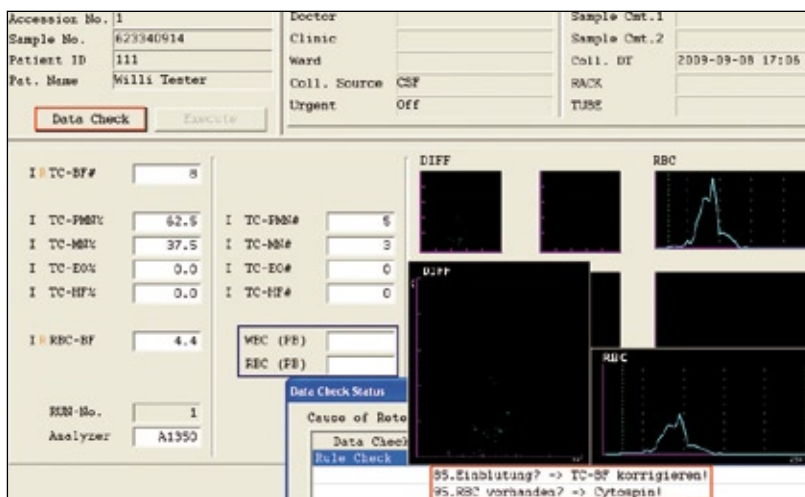


Abb. 6 Ergebnisdarstellung einer Liquormessung am SIS mit entsprechenden Regelnamen

Abb. 6 zeigt innerhalb der grafischen Oberfläche von SIS das Beispiel einer Liquormessung. Die Probe wurde vor der Messung im SIS als Material »CSF« (cerebrospinal fluid) registriert. Die Zellzahl ist mit 8 Zellen/ μL mäßig erhöht. 62,5% der Zellen sind polymorphnukleär, die übrige Fraktion ist mononukleär. Eosinophile Granulozyten und hochfluoreszente Zellen wurden nicht detektiert. Aller-

dings ist der Erythrozytenwert mit $4.4 \times 10^3/\mu\text{L}$ extrem hoch und weist auf eine Einblutung hin. Die DIFF- und die RBC-Grafiken zeigen eine regelgerechte Verteilung der Zellen. Mit der Einblutung gelangen auch Leukozyten in den Liquor. Daher ergibt es ab einem relevant hohen RBC-BF-Wert Sinn, eine Korrektur der WBC-Zahl vorzunehmen.

Mit einem Mausklick auf die Schaltfläche »Data Check« öffnet sich ein Dialogfenster, in dem die Regeln angezeigt werden, die bei diesem Beispiel verletzt wurden. Regel 85 im Liquor gibt hier den Hinweis, aufgrund der Einblutung die Zellzahl zu korrigieren. Eine entsprechende Rechenformel im SIS wird diese Korrektur nach manueller Eingabe der Leukozyten- und Erythrozytenzahl aus dem peripheren Blut (WBC-PB und RBC-PB) vornehmen.



Abb. 7 Ergebnisdarstellung der Liquormessung am SIS nach Eingabe der Leukozyten- und Erythrozytenwerte aus dem peripheren Blut und dementsprechender Korrektur der Zellzahl (TC-BF)

In Abb. 7 wird das gleiche Ergebnis nach Eingabe der Leukozyten- und Erythrozytenzahl aus dem peripheren Blut dargestellt. Danach wird der TC-BF-Wert automatisch um die aus der Einblutung im Liquor vorhandenen Leukozyten korrigiert – in diesem Fall ändert sich die Zahl von 8 Zellen/ μ L auf 2 Zellen/ μ L.

4. Weiterführende Diagnostik:

Automatisierte digitale Morphologie mit CellaVision® DM96 oder DM1200



Abb. 8 CellaVision® DM 1200 mit Body-Fluid-Software

Wird im Rahmen der Zellzählung einer Körperflüssigkeit eine morphologische Auswertung notwendig, wird in SIS ein entsprechender Kommentar angezeigt. Außerdem wird gleichzeitig das entsprechende Profil am CellaVision® DM96 bzw. DM1200 angefordert (Abb. 8 und Abb. 9).



Abb. 9 CellaVision® DM 96 mit Body-Fluid-Software

Beide Systeme führen sowohl im peripheren Blutausstrich als auch im Cytospin-Präparat aus Körperflüssigkeiten eine automatisierte Bildanalyse durch. Im Body-Fluid-Modus wird hierbei neben einer Digitalisierung des gesamten Cytospin-Präparates auch eine Vorklassifizierung der Zellen in folgende Subpopulationen durchgeführt:

- Neutrophile Granulozyten
- Eosinophile Granulozyten
- Lymphozyten
- Makrophagen
- Andere Zellen (Mesothelien, Tumorzellen, u. a.)

Sämtliche Zellbilder und der komplette digitalisierte Probenbereich des Cytospin-Präparates können langfristig gespeichert werden und sind folglich jederzeit für das autorisierte Laborpersonal verfügbar. Ein Fernzugriff von z. B. externen Abteilungen auf alle Daten ist über eine »Remote Review«-Station einrichtbar. Infolgedessen wird z. B. die Ansicht und Diskussion besonderer Fälle mit einem räumlich entfernten Experten möglich.



Abb. 10 gefärbtes Cytospinpräparat

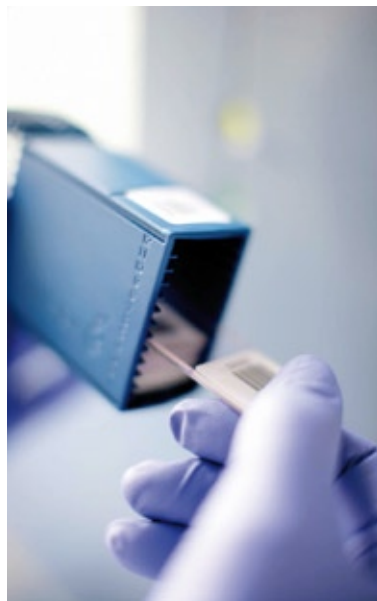


Abb. 11 Bestückung des DM-Magazins

Nach der Herstellung und Färbung des Präparates wird dieses in einem Magazin platziert. Die Färbung ist mit dem Ausstrich- und Färbeautomat SP-1000i ebenfalls automatisierbar und zeigt daher eine gleichbleibende Qualität. Dies optimiert die anschließende Vorklassifizierung der Zellen innerhalb der DM96/DM1200-Analytik.

Die Analyse der Objektträger startet, nachdem der DM96 oder DM1200 mit dem Magazin

(siehe Abbildung 11) beladen wurde. Nach der automatischen Abarbeitung kann der Benutzer die einzelnen Zellfraktionen bequem am Monitor beurteilen und gegebenenfalls mit wenigen Mausklicks reklassifizieren. Die Darstellung der Zellbilder am Bildschirm erlaubt außerdem die zeitgleiche Betrachtung durch mehrere Personen und ermöglicht somit einen oft wertvollen Meinungs austausch unter Kollegen.

Ein Durchmustern der gesamten Probenregion in 10-facher und 50-facher Vergrößerung ist genauso möglich wie eine Markierung von interessanten Regionen innerhalb des Zellbereiches. Diese Regionen von Interesse (region of interest, ROI) können per Mausklick jederzeit auf die Bildschirmoberfläche zurückgeholt werden. Ein mehrfaches, zeitaufwändiges Durchmustern des Gesamtpräparates entfällt damit und sorgt für weitere Zeitersparnis.

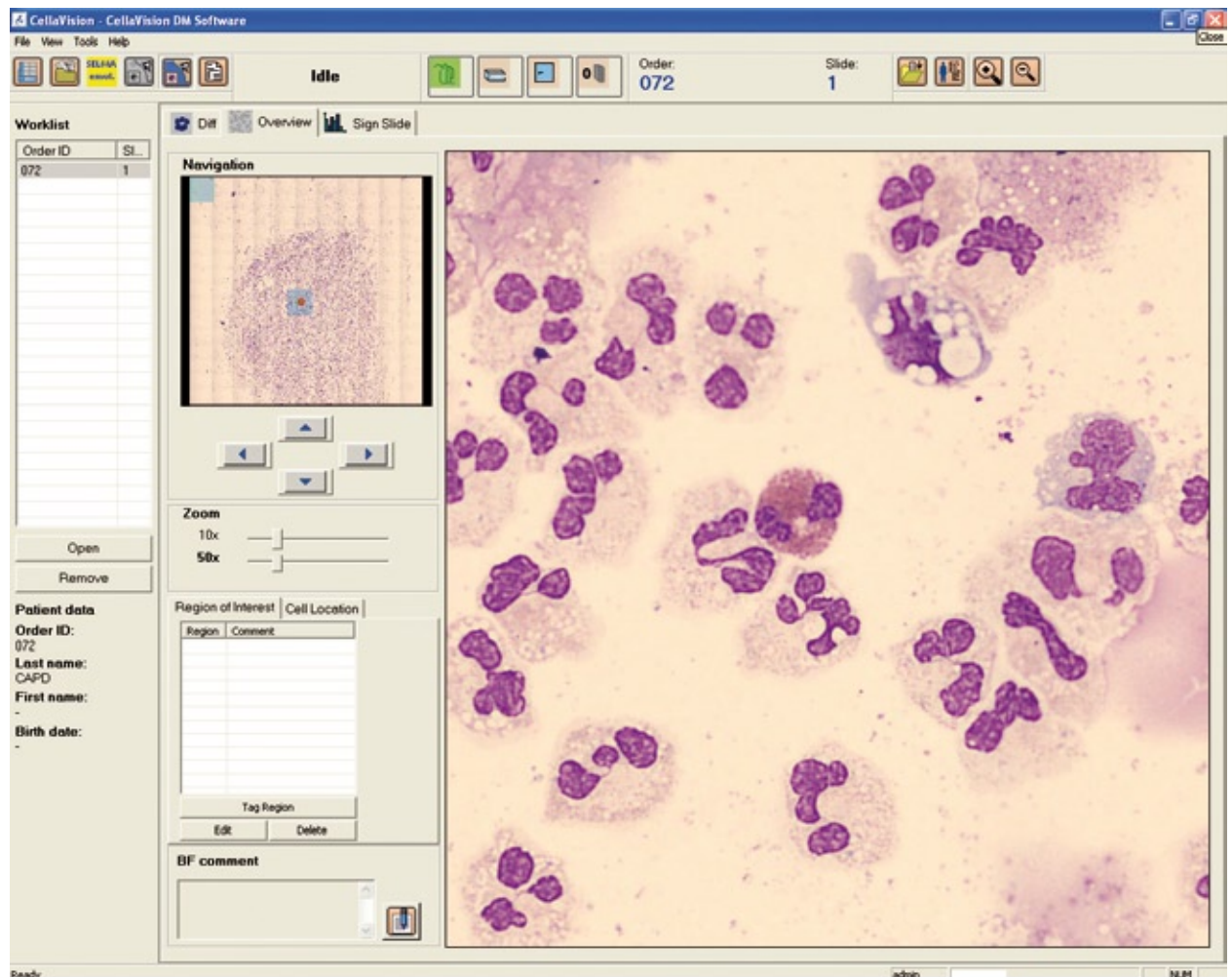


Abb. 12 Übersichtsdarstellung eines digitalisierten Cytospin-Präparates (CAPD – bakterielle Peritonitis) am DM96 oder DM1200. Das Navigationsfenster links oben zeigt das komplette digitalisierte Präparat – die Region innerhalb des roten Feldes wird rechts in 10- bzw. 50-facher Vergrößerung angezeigt. Mit Hilfe der Pfeiltasten kann man den gesamten Zellbereich durchmustern.

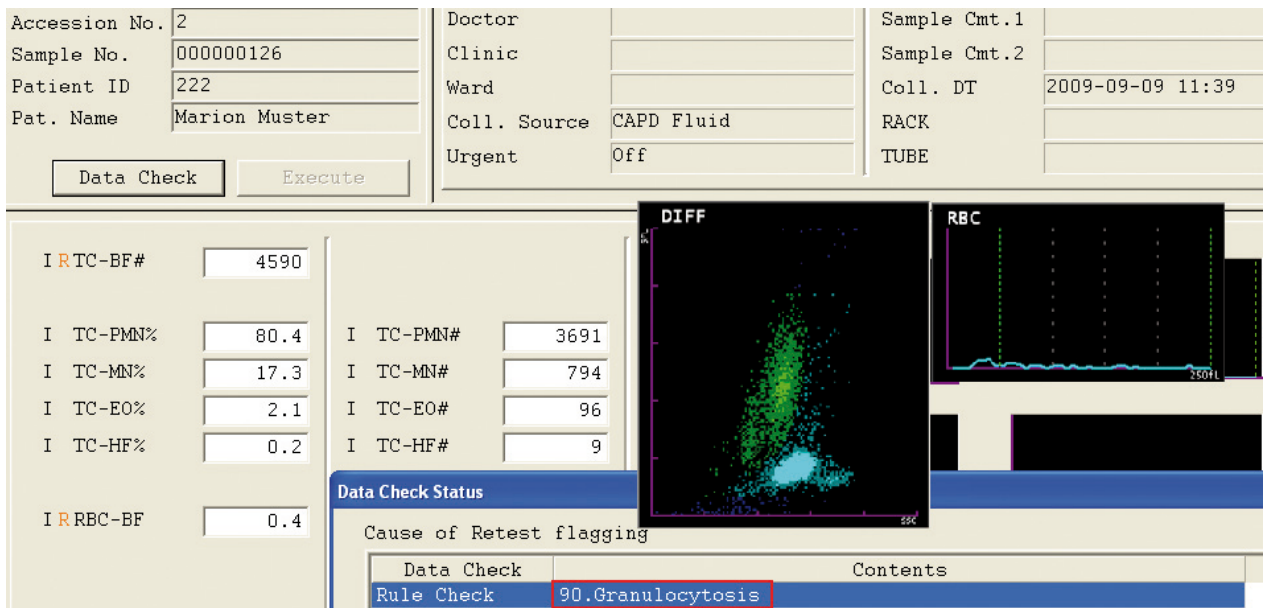


Abb. 13 Die auf Knopfdruck einblendbaren Ergebnisse von SIS mit dem Kommentar »Granulozytose«

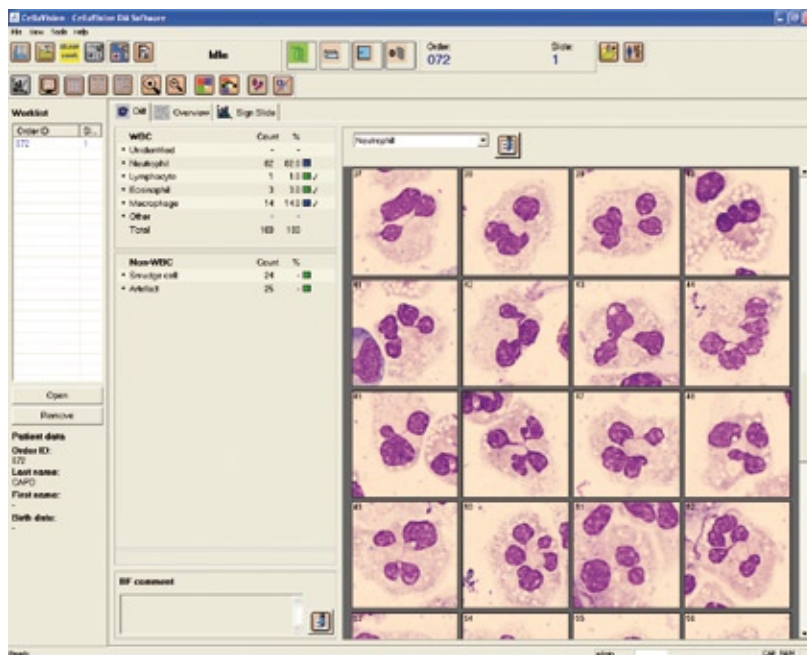


Abb. 14 Ergebnisanzeige aus der Analyse eines Cytospin-Präparates (CAPD – bakterielle Peritonitis) am DM96 oder DM1200 mit Darstellung der neutrophilen Granulozyten

Per Knopfdruck können die in SIS bewerteten und validierten Ergebnisse auf dem Bildschirm des DM96 oder DM1200 einblendbar werden (Abb. 14). Dadurch ist jederzeit ein papierloser, bequemer Datentransfer innerhalb dieser Lösung in Echtzeit möglich.

Die numerischen Ergebnisse der DM-Analyse werden nach Freigabe durch den Benutzer automatisch an das SIS gesendet. So entsteht ein konsolidiertes Endergebnis aus Patientendaten, automatisierter Zell-

zählung und der morphologischen Bewertung. Am Ende dieses Workflows steht das automatische Versenden der gesamten Daten zum Laborinformationssystem (LIS) über die SIS-Schnittstelle. Dementsprechend wird mit einer Vernetzung aller genannten Komponenten ein vollständig integrierter, automatisierter Arbeitsfluss für die schnelle und standardisierte Zellanalyse von Körperflüssigkeiten rund um die Uhr möglich.

Literatur

- [1] *Klas Boer, Thomas Deufel, Mike Reinhoefer.*
Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in CSF.
Clinical Biochemistry 42 (2009) 684-691
- [2] *R de Jonge, R. Brouwer, C. Fleming, M. De Frankrijker, J.G. Boonstra, J. Lindemans.*
Evaluation of the new body fluid mode on the Sysmex XE-5000 to count leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and serous fluids.
Introduced on the IFCC in Amsterdam, June 2007
- [3] *Birgit Fernandes, Anita Magnusson, Kjell Kalén, Jon Nordin and Soheir Beshara.*
Automated analysis of cerebrospinal fluid.
Introduced on the ISLH in Las Vegas, 2009