

Das neue CellaVision® DM1200 automatisiert die manuelle Differenzierung

Die Rolle der manuellen Differenzierung im Labor

Antoni van Leuwenhoek war der Erste, der vor mehr als 300 Jahren Blutzellen unter dem Mikroskop beobachtete und beschrieb. Paul Ehrlich entdeckte Ende des 19. Jahrhunderts, dass gewisse Farbstoffe dabei helfen können, Zelldetails wahrzunehmen. Damit konnte er erstmals die fünf Haupttypen der Blutzellen beschreiben. Das ursprüngliche Protokoll zur Doppelfärbung von Blutaussstrichen wurde 1889 von C. Khentsinsky entwickelt und in der Folge dann 1891 von L. Romanowsky und noch einmal 1902 von G. Giemsa modifiziert. Diese Protokolle werden bis heute bei der Färbung von peripheren Blutaussstrichen angewendet.

Auch die Art und Weise, mit der ein manuelles Differenzialblutbild der Leukozyten erstellt wird, hat sich seitdem kaum geändert. Was sich während des letzten Jahrhunderts verbessert hat, sind hauptsächlich Qualität und Ergonomie der Mikroskope. Die manuelle Differenzierung hat als unentbehrliche Ergänzung zum Blutzellzählgerät weiterhin einen großen Einfluss auf Arbeitsabläufe und Kosten im klinischen Labor.

Aufgrund des starken Kostendrucks sind die Laboratorien bemüht, die Zahl der durchgeführten Differenzierungen zu verringern und gleichzeitig die Auswirkungen auf die Qualität der Patientenversorgung so gering wie möglich zu halten. Die Entscheidung darüber, ob eine manuelle Differenzierung vorgenommen wird, hängt von Kriterien wie den Ergebnissen des großen Blutbilds, Warnhinweisen des Blutzellzählgeräts, der Krankengeschichte usw. ab.

Manuelle Differenzialblutbilder sind schwierig und arbeitsaufwändig, pro Ausstrich benötigt man zwischen 2 und 10 Minuten. Viel Erfahrung und Übung sind notwendig, bis man die ausreichende Kompetenz erworben hat. Das empfohlene Vorgehen zur Durchführung der manuellen Differenzierung ist in der Literatur gut beschrieben, aber die Zuweisung der einzelnen weißen Blutkörperchen ist abhängig von der subjektiven Einschätzung diverser Zellmerkmale durch eine/n MTA, oft beeinflusst von der Erscheinung der Zelle im Vergleich zu anderen Zellen auf dem Objektträger. Häufig treten untypische Formen eines Zelltyps auf, zum Beispiel aufgrund der bestehenden Krankheit oder der Behandlung dieser Krankheit, und die Zelle muss dann anhand der »Gesellschaft, in der sie sich befindet« bestimmt werden.

Laboratorien haben ein großes Interesse daran, die Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse zu verbessern, da es nicht selten ist, dass sich MTAs über die Bestimmung einer Zelle uneins sind.

Digitale Bilderfassung

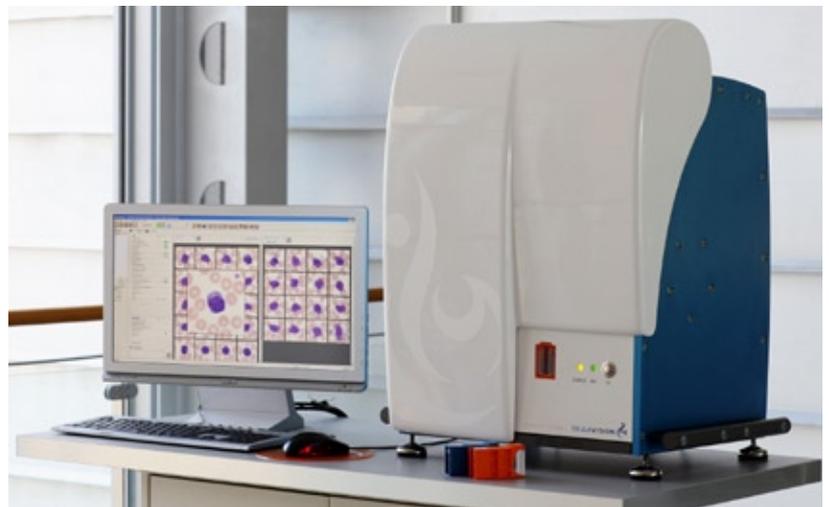
Selbst die einfachsten Bildanalyse-Systeme müssen ein optisches System von höchster Qualität besitzen, mit einer Digitalkamera sowie schnellen, präzisen und zuverlässigen Mechanismen für die Bewegung und Handhabung der Objektträger. Die erhaltenen Bilder müssen gut genug sein, um vom künstlichen neuronalen Netzwerk vorklassifiziert werden zu können, aber auch MTAs und Hämatologen müssen Details der Feinstruktur der Zellen erkennen können, beispielsweise Einschlüsse und die Chromatinstruktur.

Es ist außerdem wichtig, dass die Systeme gut etablierten Laborpraktiken und -protokollen folgen, zum Beispiel dem Protokoll H-20A des CLSI (amerikanisches Clinical and Laboratory Standards Institute, ehemaliges NCCLS).

Ein neues Bildanalyse-System von CellaVision

CellaVision® DM1200

CellaVision® DM1200 ist ein automatisches Bildanalyse-System zur Zellerkennung, das aus einem automatisierten Mikroskop, einer qualitativ sehr hochwertigen Digitalkamera und einem Computersystem besteht. Das System benutzt eine umfangreiche Bilderfassungs- und Klassifizierungssoftware, um die Zellen eines gefärbten Blutaussstriches zu erfassen und vorzuklassifizieren. DM1200 erkennt automatisch die Zellen auf dem Objektträger, und von jeder erkannten Zelle wird mit hochentwickelten Bildverarbeitungsverfahren ein Bild aufgenommen, analysiert und vorklassifiziert. Die Zahl der zu analysierenden Leukozyten kann vom Benutzer eingestellt werden.



Zur Durchführung eines Differenzialblutbilds wird ein dünner Film aus peripherem Blut auf einem Glasobjektträger ausgestrichen und nach dem May-Grünwald-Giemsa-Protokoll oder dem Wright-Protokoll gefärbt.

Das Analysensystem übernimmt die Bildaufnahme und Vorklassifizierung der Zellen und der Anwender überprüft anschließend die vorgeschlagene Einordnung der einzelnen Zellen und modifiziert sie, falls nötig. Der Anwender kann außerdem bei Bedarf zusätzliche Beobachtungen und Kommentare hinzufügen.

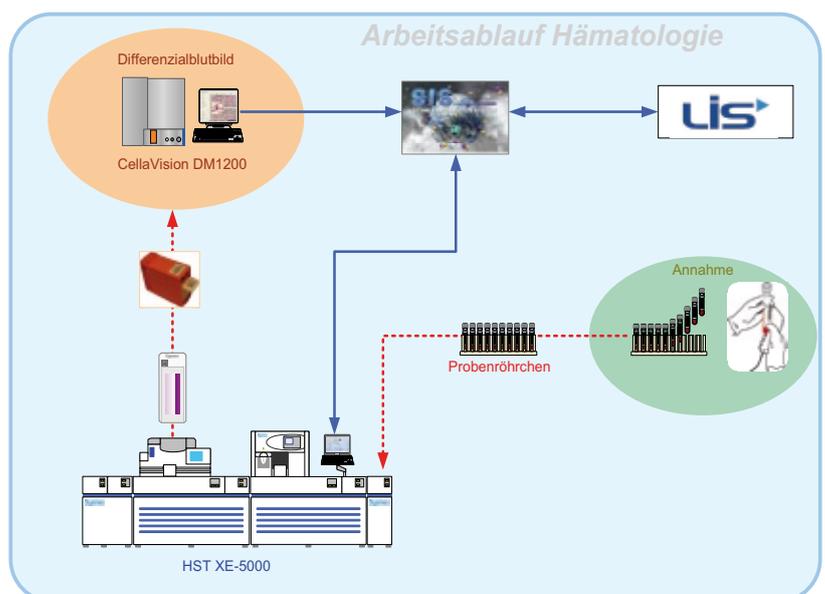
CellaVision® DM1200 übernimmt die vorläufige Einordnung in 12 Leukozytenkategorien (segmentkernige und stabkernige neutrophile Granulozyten, eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, atypische Lymphozyten, Plasmazellen, Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten und Blasten). Zusätzlich zu den Leukozyten nimmt das System noch die Vorklassifizierung in folgende fünf Klassen vor: Kernschatten, Artefakte, Riesenthrombozyten, Thrombozytenaggregate und kernhaltige Erythrozytenvorstufen (angegeben als Zahl der Erythrozytenvorstufen pro 100 Leukozyten). Zellen, deren Vorklassifizierung nicht eindeutig möglich ist, werden in die Kategorie »Nicht identifiziert« eingeordnet.

DM1200 liefert auch eine Übersicht, anhand derer die Erythrozyten-Morphologie beurteilt werden kann. Hierzu werden 35 Bilder aus dem optimalen Bereich für die Erythrozytenuntersuchung ausgewählt, die anhand der folgenden Eigenschaften vorcharakterisiert werden: Polychromasie, Hypochromasie, Anisozytose, Makrozytose, Mikrozytose und Poikilozytose.

Das System bietet weiterhin Funktionalitäten, mit denen der Anwender die Effizienz und Einheitlichkeit bei der Abschätzung der Thrombozytenzahl verbessern kann. Alle Bilder und Ergebnisse werden in einer Datenbank gespeichert.

Einbindung in integrierte Laborlösungen von SYSMEX

CellaVision® DM1200 lässt sich ausgezeichnet in die aufeinander abgestimmten Laborlösungen von Sysmex einbinden, was diverse Vorteile mit sich bringt. Die Einbindung des CellaVision® DM1200 verbessert den Arbeitsablauf und die Datenflüsse im hämatologischen Labor, wodurch bei der Leukozytendifferenzierung ein hohes Maß an Einheitlichkeit erreicht wird.



Beschreibung des Arbeitsablaufs und des Datentransfers

Die Auftragsinformation gelangt vom LIS über das Sysmex Information System (SIS) zum Hämatologiegerät XE-5000. Die Analysenergebnisse des Gerätes werden an das SIS zurückgesendet, um sie nach festgelegten Regeln zu untersuchen. Wenn beispielsweise Ergebnisse des großen Blutbilds des XE-5000 vom SIS als abnorm identifiziert werden, wird eine Anforderung an das Ausstrich- und Färbegerät SP-1000i gesendet, welches dann einen gefärbten peripheren Blutausstrich der betreffenden Probe(n) anfertigt. Die Objektträger werden mittels CellaVision® DM1200 analysiert und die Ergebnisse werden nach der Verifizierung an das SIS zurückgeschickt. Das DM1200 ist also mit Probenanalyse und Datentransfer vollständig in die Sysmex Hämatologie-Lösung integriert. Es wird nur eine bestehende Verbindung zwischen SIS und dem LIS benötigt.

Digitale Objektträger

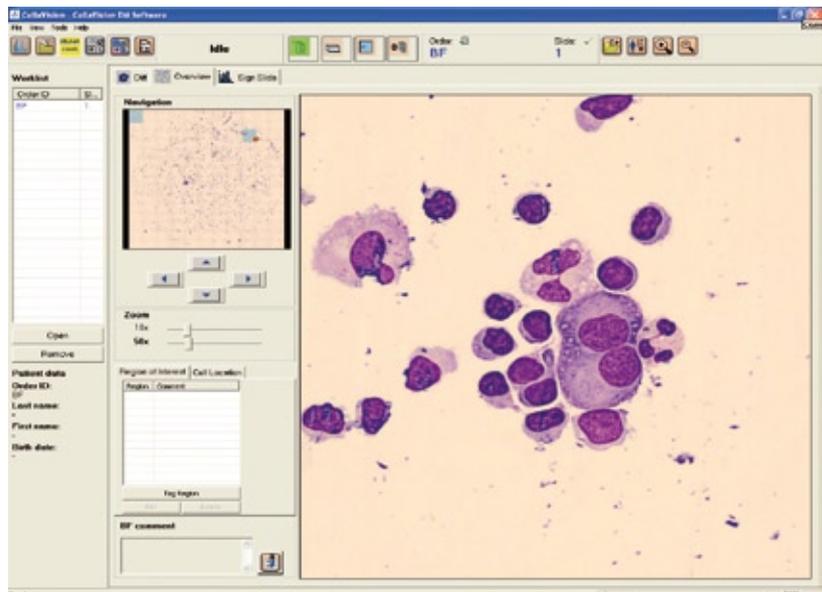
Nur für Forschungs- und Ausbildungszwecke

Mit CellaVision® DM1200 kann man digitale Bilder selbst ausgewählter Bereiche einer Probe aufnehmen, die »digitale Objektträger« genannt werden. Die Digitalisierungsfunktion wurde ursprünglich für Blutausstriche entwickelt, kann aber auch mit anderen Probenarten (zum Beispiel aus Pathologie und Zytologie oder mit Knochenmarkproben) für Forschungs- und Ausbildungszwecke angewendet werden. Sie liefert einen nützlichen Überblick über die Probe und ermöglicht die Diskussion zwischen Ärzten unabhängig vom Aufenthaltsort. Interessierende Bereiche können markiert, kommentiert und in Präsentationen und Schulungsmaterialien exportiert werden.

Körperflüssigkeiten

Optional erhältliche Software (ab 2. Quartal 2010)

Die Körperflüssigkeiten-Funktion von CellaVision führt auf einem Zytozentrifugen-Objektträger eine automatische Vordifferenzierung der kernhaltigen Zellen durch und erlaubt die Digitalisierung des gesamten Probenbereichs. Das vorläufige Ergebnis muss durch MTAs verifiziert werden.



Falls die Einordnung geändert werden muss, können die Zellen einfach mit der Maus in die richtige Klasse gezogen werden.

Interessierende Bereiche (ROI, regions of interest) können markiert und Kommentare hinzugefügt werden. Außerdem ist es möglich, Bilder zu speichern und innerhalb eines Netzwerks zur Verfügung zu stellen. Der Zugriff auf Bilder aus der Patientengeschichte und die Möglichkeit zur Kooperation in Echtzeit sorgen für eine genaue und standardisierte Analyse.

Objektträger mit Körperflüssigkeitsproben werden mit der Zytozentrifuge vorbereitet und nach May-Grünwald-Giemsa oder Wright gefärbt. Nach der Verarbeitung der Objektträger kann der Benutzer die Zellen auf dem Monitor auf verschiedene Weisen betrachten und überprüfen. So ist es möglich, die gezählten Zellen nach Zellklassen geordnet oder im Vergleich mit einer anderen Zellklasse zu betrachten oder sich alle Zellklassen im Vollbildmodus anzeigen zu lassen.

Die digitalen Scans des gesamten Probenbereichs können mit 100- und 500-facher Vergrößerung angezeigt werden. Im Digitalscanmodus kann der gesamte Probenbereich des Objektträgers angezeigt werden. Die interessierenden Bereiche (ROI) können markiert und für eine Überprüfung durch die Pathologie oder zu Ausbildungszwecken gespeichert werden. Die interessierenden Bereiche werden im JPEG-Format abgespeichert und können mit jeder passenden Anwendung geöffnet werden.

Nutzung des künstlichen neuronalen Netzwerks

Künstliche neuronale Netzwerke sind Modelle aus der Informationsverarbeitung, die die Art, in der das menschliche Gehirn Informationen verarbeitet, simulieren sollen. Es handelt sich um relativ grobe Modelle auf Grundlage der neuronalen Struktur des Gehirns, die aus vielen stark miteinander vernetzten Verarbeitungselementen (Neuronen) bestehen, die bei der Lösung spezifischer Probleme zusammenarbeiten.

Die CellaVision® DM-Analysensysteme verwenden künstliche neuronale Netzwerke, die mit tausenden von Zellbildern trainiert worden sind, die vorher von einem Expertengremium klassifiziert wurden. Für jede Zelle wurden mehr als 300 verschiedene Aspekte wie Form, Farbe, Größe und Kern-Plasma-Verhältnis identifiziert, die für die Einordnung der Zelle in eine von 17 Zellkategorien herangezogen wurden. Die verschiedenen Aspekte der Zellen stellen den Input in das künstliche neuronale Netzwerk dar und die Vorklassifizierung der Zellen ist als dessen Output anzusehen.

Auswirkungen der Technologie

Eine ausgefeilte Technologie hat wenig Nutzen, wenn sie nicht routinemäßig von allen in Frage kommenden Nutzern sicher angewendet werden kann. Die MTAs und Pathologen müssen bei der Arbeit mit digitalen Bildern sicher sein, dass die Qualität der betrachteten Aufnahme für die Differenzierung winziger Zelleinschlüsse ausreicht. Die Bedienung der Software muss einfach zu erlernen und effizient sein, sie muss schnelle Überprüfungen und schnelle Entscheidungen ermöglichen. Die Funktionen der Software müssen auch flexibel genug sein, um an unterschiedliche Laboratorien und Laborverfahren, Patientenkollektive und Laborsysteme angepasst werden zu können.

Da eine natürliche Unsicherheit gegenüber jeder Veränderung besteht, besonders bei einem Verfahren wie dem Differenzialblutbild, das seit über 100 Jahren mehr oder weniger unverändert durchgeführt wird, muss diese Technologie wichtige neue Möglichkeiten für MTAs und Pathologen bieten, die den Arbeitsvorgang beschleunigen, die Verlässlichkeit der Ergebnisse erhöhen und die körperlichen Belastungen durch 8 Stunden mikroskopische Untersuchungen täglich verringern. Die Vorteile dieser Technologie für das Hämatologielabor sind vielfältig und wesentlich, für die Arbeitsabläufe, die MTAs, die Ärzte und die Patienten. Diese Vorteile können in vier Kategorien eingeteilt werden: Effizienz, Kompetenz, Zusammenarbeit und Konnektivität.

Effizienz

Automatisierte digitale morphologische Bestimmung mit CellaVision® DM1200

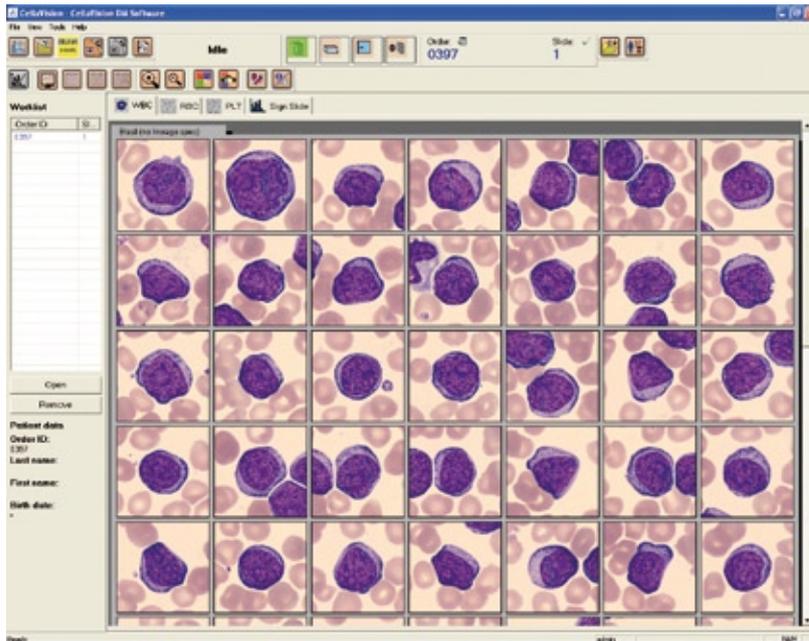


Das Gerät wird mit den mit Barcodes markierten Objektträgern beladen. Das System bewegt die Objektträger automatisch unter die Mikroskoplinsen, fügt Immersionsöl hinzu, lokalisiert die Zellen, nimmt eine Vorklassifizierung vor und zeigt die hochaufgelösten Bilder sortiert dem Benutzer, so dass dieser das Differenzialblutbild schnell validieren kann.

Wenn die MTAs alle Zellen zusammen auf einem Bildschirm betrachten können, können sie sofort abschätzen, ob die jeweilige Probe stark genug von der Norm abweicht, um nochmals genauer überprüft werden zu müssen.

Die Netzwerkanbindung führt ebenfalls zu einer höheren Effizienz, da der Personaleinsatz flexibler gestaltet werden kann. Wenn mehrere in Verbindung stehende Laboratorien diese Systeme einsetzen, können die Objektträger an einem oder mehreren Orten gescannt werden und an einem anderen Ort überprüft werden. Hierdurch ist es nicht mehr nötig, in jedem kleinen Labor morphologische Expertise vorzuhalten, und die Bildung von »Kompetenzzentren« wird erleichtert.

Kompetenz



Die Reproduzierbarkeit manueller Differenzierungen zwischen verschiedenen MTAs ist ein Problem: Die Stichprobengröße ist jeweils klein und die Zellidentifizierung ist per se ein subjektiver Vorgang, vor allem wenn man bedenkt, dass die morphologische Expertise in den meisten Laboratorien auf viele Mitarbeitende verteilt ist. Diese Variabilität hat zur Auswirkung, dass es für MTAs, Laboratorien und Ärzte schwierig ist, das Vertrauen in die ermittelten Ergebnisse

zu erhalten. Wie bei vielen Testverfahren besteht das Hauptziel darin, die Ergebnisse konsistent zu erzielen und die Zahl falsch-negativer Ergebnisse so gering wie möglich zu halten.

Die Software des CellaVision® DM1200 enthält mehrere Funktionen, die MTAs dabei helfen, die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit ihrer Zellbestimmungen zu erhöhen:

1. Die Ansicht der Zellen in Gruppen und der direkte Vergleich nebeneinander ermöglichen eine bessere Bewertung der einzelnen Patientenproben.
2. Das Gerät bietet die Erstellung einer Zell-Referenzbibliothek, die neben der Ansicht einer Zellgruppe auf dem Bildschirm geöffnet werden kann. Diese Online-Bibliothek wird aus den eigenen Bildern des jeweiligen Labors erstellt.
3. Da auch Zugriff auf in der Vergangenheit erstellte Bilder von Proben des Patienten besteht, kann man die Zellen der aktuellen Analyse mit denen vom Vortag, der vergangenen Woche oder aus dem letzten Jahr vergleichen. Auch damals vom Untersucher gemachte Kommentare sind zusammen mit den alten Bildern sichtbar.

Zusammenarbeit

Ein wichtiger Teil der Beurteilung eines Blutausstrichs besteht darin, zu entscheiden, welche Objektträger man zur weiteren Beurteilung an eine Person mit mehr Expertise, sei es im gleichen Labor oder an anderer Stelle, weiterleitet. Bisher musste dann der Objektträger selbst transportiert werden, was zu deutlichen Verzögerungen bei der Lieferung des abschließenden Ergebnisses an den Arzt führte. Hier ist jetzt eine große Verbesserung erreicht worden.

Beispielsweise nehmen in einem Labor mehrere MTAs gleichzeitig Differenzierungen vor, so dass bei einem zweifelhaften Blutaussstrich der erste Schritt vermutlich eine direkte Konsultation zwischen MTAs, Vorgesetzten und/oder Pathologen ist. Da die Zahl der Benutzer, die gleichzeitig die Patientenbilder betrachten können, nicht begrenzt ist, kann diese Diskussion durchgeführt werden, ohne dass dafür überhaupt jemand zum Labor gehen muss. Sollte ein Vorgesetzter oder Hämatologe einen Objektträger selbst überprüfen müssen, kann er die Bilder bequem von seinem Büro aus aufrufen, ohne dass der Blutaussstrich transportiert werden muss. Hierfür wird die Softwarefunktionalität CellaVision® Remote Review eingesetzt. Die Bilder können auch einfach aus der Software per E-Mail verschickt werden. Diese effiziente Art der Konsultation ist auch hervorragend geeignet für die Weiterbildung der MTAs, die oftmals nach Weiterleiten eines Blutaussstrichs das Endergebnis der Bewertung nicht erfahren.

Konnektivität

Eine manuelle Differenzierung wird aufgrund der Ergebnisse und Warnhinweise des Hämatologiegeräts angefordert. Damit MTAs fundiert über die Prüfung eines Blutaussstrichs entscheiden können, benötigen sie Zugang zu den Ergebnissen des Blutzellzählgeräts. Üblicherweise benötigen sie dafür einen Ausdruck oder müssen ein separates SIS/LIS-Terminal nutzen. Die automatisierte digitale morphologische Bestimmung liefert die Möglichkeit, diese Konnektivität komfortabler zu realisieren: Über die DM-Software können die Benutzer während der Überprüfung des Blutaussstrichs einen Browser öffnen, in dem sie die numerischen Ergebnisse, Warnhinweise, Scattergramme und Histogramme des Hämatologiesystems betrachten können.

Zusammenfassung

Bildanalyse, Kommunikation und Vernetzung sind neue Labortrends überall auf der Welt. Die Einführung der digitalen CellaVision-Morphologiesysteme im Routinelabor bietet Vorteile wie Rückverfolgbarkeit der Ergebnisse, schnellere Analysen, einen höheren Automatisierungsgrad und eine bessere Standardisierung der manuellen Leukozytendifferenzierung.

Die Technologie des CellaVision® DM1200 bietet dem Hämatologielabor ein neues, leistungsfähiges Werkzeug. Für die automatisierte digitale morphologische Bestimmung sprechen Einsparungen beim Arbeitsaufwand, eine höhere Ergebnisqualität und ein neuer Nutzwert für das Labor.

Kurz zusammengefasst:

Weniger Arbeitsaufwand

- MTAs benötigen weniger Zeit für die Auswertung eines Blutausstrichs.
- Neue MTAs können schneller geschult werden.
- Die Überprüfung der Morphologie kann für mehrere Standorte zentralisiert werden.
- Flexiblere Einsatzmöglichkeiten des Personals, z. B. durch die Remote Review Software
- Verbesserte Ergonomie im Vergleich zum Mikroskop

Höhere Qualität

- Größere Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen MTAs, Schichten und Standorten
- Verbesserte Funktionalitäten zur Bewertung der Kompetenz und zu Schulungszwecken
- Genauere Zellbestimmung
- Bessere Ergebnisse bei Patienten mit Leukopenien
- Beschleunigte Bearbeitungszeit (TAT)

Neuer Nutzwert für das Labor

- Echtzeitzugriff auf die Patientenbilder auch außerhalb des Labors
- Die Notwendigkeit, selbst zum Mikroskop zu gehen, um die entsprechenden Objektträger von dort zu holen, entfällt.
- Möglichkeit zum Vergleich mit früheren Aufnahmen von Proben des gleichen Patienten

CellaVision® DM1200 ist ein Produkt von CellaVision AB, Lund (Schweden).

Literatur

- [1] Hagner R, Wilson P. Automated digital cell morphology; taking the »manual« out of the manual differential.
In: Ward-Cook KM, Lehmann CA, Schoeff LE, Williams RH (eds.). *Clinical diagnostic technology – the total testing process: volume 3, the post-analytical phase*. Washington, DC: AACC Press, 2006. © American Association for Clinical Chemistry.
- [2] C. Briggs, I. Longair, M. Slavik, K. Thwaite, R. Mills, V. Thavaraja, A. Foster, D. Romanin, S. J. Machin.
Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellaVision® DM96 automated image analysis system.
Int. Jnl. Lab. Hem. 2009, 31, 48–60.
- [3] Ceelie H, Dinkelaar RB, van Gelder W. Automated peripheral blood differential counting with the CellaVision™ Diffmaster Octavia and CellaVision™ DM96. A comparison with manual differentiation. *Lab Hematol* 2005;Vol 11, Issue 4.