

Messtechnologie der XN-Serie

Xtra Vol. 17.1 | 2013 | Nr. 01

Einführung

Wie werden Leukozyten an Ihrem hämatologischen Analysegerät gezählt und differenziert? Diese Frage ist oftmals nicht mehr ohne weiteres zu beantworten, denn seit den Anfängen der automatisierten Zählung in den 50er Jahren haben sich die Messtechnologien immens weiterentwickelt. Gerade in den letzten 10 – 20 Jahren konnten sich vielfältige Methoden etablieren. Infolgedessen variieren die an den Systemen eingesetzten Technologien bei den verschiedenen Herstellern und sind sogar manchmal von System zu System unterschiedlich.

Eine grundlegende Neuerung im Bereich der hämatologischen Differenziersysteme stellte die Einführung der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie im Jahr 1999 am Sysmex XE-2100 dar. Halbleiterlasertechnologie, spezifische Lyse und eine Anfärbung von Nukleinsäuren in Kern und Plasma mit einem Fluoreszenzfarbstoff inklusive der Auswertung der Fluoreszenzlichtempfänger in unterschiedlichen Winkeln ergaben sowohl für die Leukozytendifferenzierung als auch für die Retikulozyten- und Thrombozytenanalytik eine Vielzahl neuer Informationen und ein hohes Maß an Genauigkeit – nicht nur bei unauffälligen Proben, sondern auch bei Vorhandensein von Interferenzen oder pathologischen Zellen.

Die neueste Sysmex Gerätegeneration, die XN-Serie, baut auf dieser Technologie auf. Alle Stand-Alone-Konzepte XN-1000, XN-2000 und XN-3000 sowie die fließend konfigurierbaren Automationskonzepte des XN-9000 arbeiten ebenfalls auf Basis der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Durch den Einsatz neuer Reagenzien und der Weiter- bzw. Neuentwicklung verschiedener Messkanäle im Vergleich zu den Systemen XE-2100 und XE-5000 ergeben sich bei der XN-Serie eine Vielzahl neuer Möglichkeiten.

Kernhaltige Erythrozyten (NRBC) werden zum Beispiel bei jedem kleinen Blutbild automatisch gemessen. So werden Reflextests oder die manuelle Zählung im Ausstrich eingespart und die Turnaround-Zeit deutlich reduziert.

Extrem niedrige Leukozytenergebnisse werden im „Low WBC-Modus“ automatisch mit der 3-fachen Menge des Auszählvolumens kontrolliert (Reflextest), damit ermöglicht dieser Modus ebenfalls die Leukozytendifferenzierung dieser Patienten.

Ausgeprägte Thrombozytopenien erfordern eine Messung frei von Interferenzen. Mit dem für die XN-Serie neu entwickelten Reagenz für den Messkanal PLT-F können Plättchen nahezu unbeeinflusst von Mikroerythrozyten oder WBC-Fragmenten gemessen werden. Als Reflextest kann die PLT-Zählung im PLT-F Kanal automatisch gesteuert werden.

Eine Innovation ist das neue 3-dimensionale Flagging. Es ermöglicht eine hohe Sensitivität bei WBC-Anomalien und kann durch eine spezielle Konturenerkennung der Punktwolken z.B. Hinweise auf verschiedene Lymphozytenpopulationen geben. Dies beschleunigt die Entscheidung über weitere Schritte und kann zu kürzeren Turnaround-Zeiten führen. Erste Studien zeigen eine deutlich niedrigere Ausstrichrate ohne Sensitivitätsverlust (Briggs et al. 2012).

Die Bestimmung von Körperflüssigkeiten im Messkanal BF ist schon mit der kleinsten Gerätekonfiguration möglich. Das im Vergleich zur Kammerzählung 3,5-fach höhere Zählvolumen ermöglicht eine standardisierte Messung unterschiedlicher Körperflüssigkeiten mit hoher Aussagekraft im klinisch relevanten Bereich. Der Zeitaufwand für dieses besondere Probenmaterial kann daher enorm reduziert werden, zumal direkt und ohne Probenvorbereitung gemessen wird. Für alle Messmodi und Profile gilt als maximales Ansaugvolumen 88µl.

Ebenfalls neu ist das automatisierte Rerun- und Reflextesting durch ergebnisabhängige Regelkriterien. Das intelligent gesteuerte XN-Software-Konzept standardisiert und optimiert Arbeitsabläufe. Es steuert das komplette Reflextesting einschließlich Ausstricherstellung. Turnaround-Zeiten werden verkürzt und ermöglichen dem Personal den Fokus auf fachbezogene Tätigkeiten zu richten.

Die Idee der XN-Serie löst die diagnostischen Funktionalitäten vollständig vom Durchsatz. Diagnostische Informationen, die bisher nur großen Laboratorien zur Verfügung standen, können durch die modularen Möglichkeiten bereits mit der kleinsten Konfiguration genutzt werden.

Messkanäle und Prinzipien

Messprinzip der Durchflusszytometrie mit einem Halbleiterlaser

Bei der Durchflusszytometrie mit einem Halbleiter-Laser werden die Zellen durch Bestrahlung mit einem 663 nm Laserstrahl und Analyse des Vorwärts-Streulichts (FSC), des Seitwärts-Streulichts (SSC) und des Seitwärts-Fluoreszenzlichts (SFL) gezählt und klassifiziert. Die Intensität der zwei Streulichtarten (FSC und SSC) reflektiert die Oberflächenstruktur der Zelle, die Partikelgröße, die Kernform, den Brechungsindex und die Reflektivität der Zellen. Im Allgemeinen ist das FSC-Messsignal bei größeren Zellen stärker; das SSC-Messsignal wird stärker, wenn die intrazellulären Strukturen komplexer werden. Die Intensität des Seitwärts-Fluoreszenzlichts reflektiert hauptsächlich Typ und Anzahl der Nukleinsäuren und Zellorganellen. Diese drei Messsignale werden verwendet, um weiße Blutzellen, kernhaltige Erythrozytenvorstufen, Retikulozyten und Thrombozyten zu differenzieren und zu zählen, und um anomale und unreife Zellen mithilfe intelligenter Algorithmen zu detektieren.

Standardmessung von Erythrozyten und Thrombozyten im RBC/PLT Kanal

Im RBC/PLT-Kanal werden Erythrozyten und Thrombozyten mit der Impedanzmessung (DC = direct current, Gleichstrom) und mit hydrodynamischer Fokussierung (Mantelstrom) anhand ihrer Größe voneinander unterschieden und gezählt.

Ein elektrisches Feld zwischen einer positiv und einer negativ geladenen Elektrode wird genutzt, um Zahl und Größe der durch dieses Feld fließenden Zellen zu bestimmen. Blutzellen sind schlechte elektrische Leiter. Aus diesem Grund wird eine isotonische Elektrolytlösung mit guter elektrischer Leitfähigkeit als Verdünnungsreagenz verwendet, um die Zellen zu suspendieren. Diese Suspension wird in die Messkammer eingespritzt. Jede Zelle, die die Messöffnung zwischen den Elektroden passiert, erzeugt eine momentane Erhöhung des elektrischen Widerstands. Diese wird als elektrischer Impuls gemessen, wobei die Impulshöhe sich proportional zur Größe der Zelle verhält.

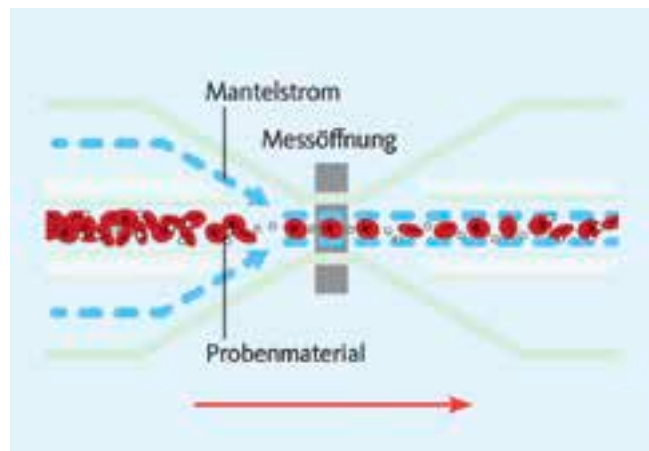


Abb.1 »Impedanzmessprinzip mit hydrodynamischer Fokussierung

Reagenz: CELLPACK DCL/DST

Hämoglobinmessung im HGB Kanal

Bei der SLS-Hämoglobin-Methode wird Natrium-Lauryl-Sulfat (SLS) zum Messen der Hämoglobinkonzentration verwendet. Diese Methode ist komplett cyanidfrei. Fette werden emulgiert, so dass es nur sehr selten zu einer Trübung und damit verbunden falsch hohen HGB-Werten kommt. Es finden folgende Reaktionen statt:

1. Hämolytische Reaktion zwischen SLS und der Erythrozytenmembran: SLS bindet sich hauptsächlich durch Ionenbindung und teilweise durch hydrophobe Bindung an die Erythrozytenmembran. Dies führt zur Solubilisierung von Phospholipiden auf der Erythrozytenmembran und bewirkt den Austritt von Hämoglobin aus der roten Blutzelle.
2. Veränderung in der dreidimensionalen Globinstruktur durch SLS.
3. Oxidation des Hämeisens durch Sauerstoff: Zusammen mit der Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Globins wird das zweiwertige Hämeisen einfach durch die Sauerstoffbindung an das Hämeisen oder den gelösten Sauerstoff in dreiwertiges Eisen umgewandelt.
4. Bindung von SLS: Die hydrophilen Gruppen des SLS binden sich an das dreiwertige Hämeisen und es entsteht stabiles SLS-Hämoglobin. Das Analysegerät strahlt Licht bei einer Wellenlänge von 555 nm ab und misst die Absorption.

Reagenz: CELLPACK DCL/DST, SULFOLYSER

Zählung der Leukozytenzahl, Differenzierung der Basophilen und Zählung der kernhaltigen Erythrozyten (NRBC) im WNR Kanal

Im WNR-Kanal werden weiße Blutzellen (WBC, white blood cells) gezählt und eine Differenzialzählung der Basophilen und kernhaltigen Erythrozyten (NRBC) durchgeführt. Lysercell WNR enthält eine oberflächenaktive Substanz zur Hämolyse der roten Blutzellen und durchdringt die Zellmembran der weißen Blutzellen. Dies führt zu Veränderungen der äußeren Form und der inneren Struktur, die von den Zeleigenschaften jeder weißen Blutzelle abhängig sind. Dieser Messkanal differenziert Basophile von anderen weißen Blutzellen und zählt sie, indem die morphologischen Unterschiede basierend auf Veränderungen im Vorwärts-Streulicht (FSC) erfasst werden. Fluorocell WNR markiert die Nukleinsäuren und Zellorganellen der weißen Blutzellen und der kernhaltigen Erythrozyten mit einem Fluoreszenzmarker.

Mit dem Reagenz neigen die „eingefärbten“ Teile dazu, besser erhalten zu bleiben. Die weißen Blutzellen zeigen dabei eine stärkere Fluoreszenz als die kernhaltigen Erythrozyten (NRBC). Der WNR-Kanal nutzt diese Fluoreszenz-Unterschiede, um kernhaltige Erythrozyten von weißen Blutzellen zu differenzieren und erstellt eine separate Zählung für beide Zellarten.

Das erweiterte XN-CBC Messprofil zählt bei jeder Messung kernhaltige Erythrozyten (NRBC) ab einer Konzentration von 0,1/100 WBC. Bei Vorhandensein von NRBC wird eine automatische Leukozytenkorrektur durchgeführt. Für Patienten der Intensivstation kann die automatische Bestimmung von NRBC die frühe Erkennung weiterer kritischer Entwicklungen unterstützen.

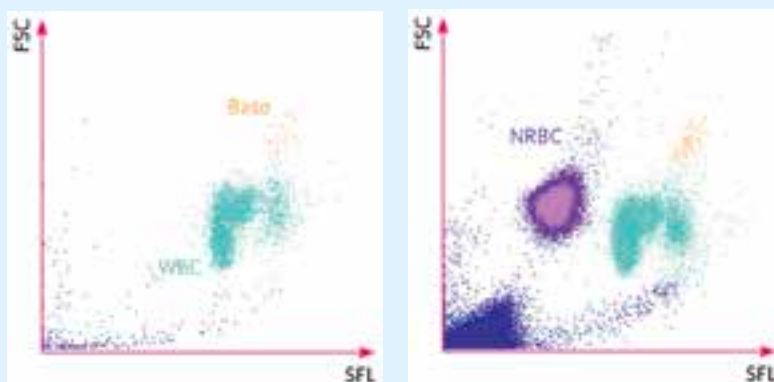


Abb.2 »links: normales WNR Scattergramm; rechts: WNR Scattergramm mit einer hohen Anzahl NRBC

Reagenz: Lysercell WNR, Fluorocell WNR

Differenzierung der Leukozyten und Detektion von unreifen oder atypischen weißen Blutzellen im WDF-Kanal

Der WDF-Kanal differenziert und zählt Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten und Eosinophile und detektiert anomale Zellen sowie unreife weiße Blutzellen und atypische Lymphozyten. Die oberflächenaktiven Substanzen des Lysercell WDF, das speziell für diesen Kanal entwickelt wurde, bewirken die Hämolyse und Auflösung der Erythrozyten und Thrombozyten und durchdringen die Zellmembranen der weißen Blutzellen. Der Grad der Auswirkung und damit die Veränderung der Zellmorphologie hängen von den individuellen Eigenschaften jedes weißen Blutzelltyps ab. Diese Unterschiede werden mit dem Seitwärts-Streulicht hervorgehoben. Der Fluoreszenzmarker Fluorocell WDF dringt in die Zellen ein und färbt die Nukleinsäuren und Zellorganellen. Die Fluoreszenzintensität variiert bei den verschiedenen Typen weißer Blutzellen, abhängig von der Art und der Anzahl der Nukleinsäuren und Zellorganellen. So ist es möglich, verschiedene Zellen zu differenzieren und zu zählen. Anomale Zellen können durch die Cluster-Analyse und durch einen proprietären Algorithmus mit einem Warnhinweis zu versehen werden.

Der DIFF-Modus der XN-Serie schließt die Zählung unreifer Granulozyten (IG) ein und gewährleistet eine äußerst sensitive Erkennung von WBC-Anomalitäten. Proben mit geringer Leukozytenkonzentration können in dem speziellen „Low WBC-Modus“ automatisch wiederholt werden (Reflextest). Durch das 3-fache Zählvolumen erhöht sich die Zuverlässigkeit der Ergebnisse für alle Parameter einschließlich der Leukozytendifferenzierung. Der zusätzliche Modus für vorverdünnte Proben ist für die Analyse von Kapillarblutproben vorgesehen. Im Vorverdünnungsmodus ist ein Blutvolumen von lediglich 20 µL erforderlich.

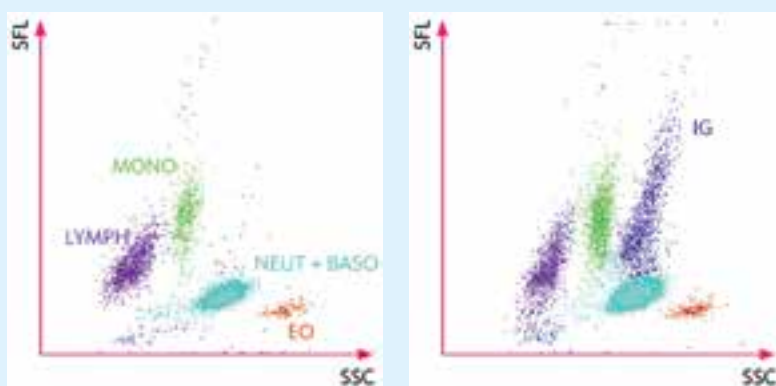


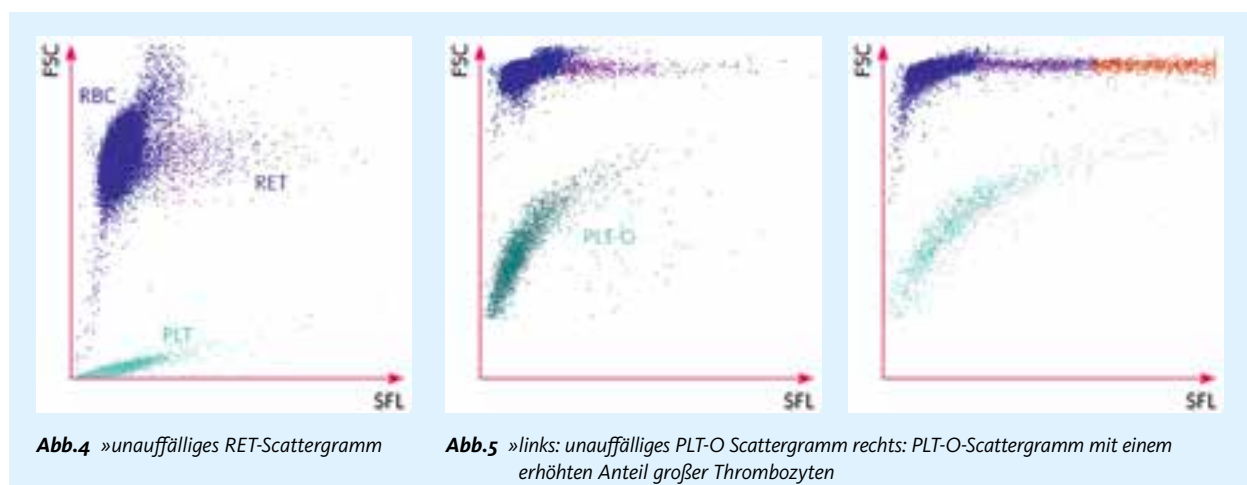
Abb.3 »links: normales WDF Scattergramm, rechts: anomales WDF Scattergramm mit einer erhöhten Anzahl unreifer Granulozyten (IG)

Reagenz: Lysercell WDF, Fluorocell WDF

Zählung der Retikulozyten, Einteilung der Retikulozytenreifungsparameter (LFR, MFR, HF), Bestimmung des „optischen“ Thrombozytenwertes PLT-O, Zusatzparameter zur Anämiediagnostik: RET-H_e und weitere wissenschaftliche Parameter.

Im RET-Kanal werden Nukleinsäuren in Retikulozyten, weißen Blutzellen und Thrombozyten mit Fluorocell RET markiert und mit CELLPACK DFL verdünnt und behandelt. Die Retikulozyten werden von den reifen Erythrozyten durch den Unterschied in der Fluoreszenzintensität differenziert und können somit zusätzlich in 3 Reifestufen unterteilt werden: LFR, MFR, HFR (low-, medium- und high-fluorescence reticulocytes) und IRF (immature reticulocyte fraction = MFR + LFR). Neben dem Fluoreszenzgehalt der Zellen wird das Vorwärtsstreulicht in einem bestimmten Winkel betrachtet. Aus dem mittleren Vorwärtsstreulicht der Retikulozyten ergibt sich das Retikulozyten-Hämoglobin-Äquivalent RET-H_e, aus dem mittleren Vorwärtsstreulicht der Erythrozyten das RBC-H_e. Das DELTA-H_e wird aus diesen beiden Parametern berechnet. Der Parameter %Hypo-H_e bezeichnet den prozentualen Anteil der Erythrozyten mit einem HGB Gehalt < 17pg und wird ebenfalls in diesem Kanal ermittelt. Diese neuen Parameter sind in der Diagnose und dem Therapiemonitoring von Anämien besonders hilfreich.

Große unreife Thrombozyten enthalten ebenfalls Nukleinsäuren, die sich durch das RET-Reagenz markieren lassen. Durch die gleichzeitige Auswertung von Fluoreszenzintensität und Größe (Vorwärtsstreulicht) lassen sich Erythrozyten (kaum Fluoreszenz) und Thrombozyten besonders gut trennen. Dieses Messergebnis (PLT-O) ist daher besonders hilfreich, um bei Interferenzen wie Mikroerythrozyten, Fragmentozyten oder Riesenthrombozyten, die die Impedanzmessung stören können, korrekte PLT-Ergebnisse zu liefern.



Reagenz: CELLPACK DFL, Fluorocell RET

Spezielle Thrombozytendiagnostik: PLT-Wert bei Interferenzen und die Bestimmung des IPF (immature platelet fraction) im PLT-F Kanal

Im PLT-F-Kanal werden Thrombozyten mit Fluorocell PLT markiert und mit CELLPACK DFL verdünnt und behandelt. So können Thrombozyten nahezu ohne Interferenzen gezählt werden. Zusätzlich werden die Messsignale im Bereich mit hoher Fluoreszenzintensität als Anteil unreifer Thrombozyten (IPF – immature platelet fraction) separiert.

Der Parameter IPF ist besonders hilfreich bei der Differenzialdiagnose einer Thrombozytopenie. So hilft dieser Parameter, zwischen einer Knochenmarkinsuffizienz und einem erhöhten Thrombozytenverbrauch zu unterscheiden und möglicherweise unnötige Knochenmarkpunktionen zu vermeiden.

Reagenz: CELLPACK DFL, Fluorocell PLT

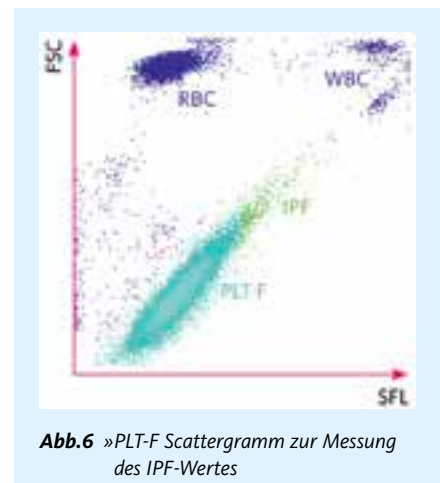


Abb.6 »PLT-F Scattergramm zur Messung des IPF-Wertes

Messung von Körperflüssigkeiten im speziellen Bodyfluid-Modus

Im BF-Modus (Bodyfluid-Modus) können verschiedene Körperflüssigkeiten gemessen werden – das Auszählvolumen ist dabei 3,5-mal so hoch wie das Zählvolumen der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

Mit Hilfe zweier Reagenzien und der Auswertung von Fluoreszenz- und Seitwärtsstreulicht-Intensität wird die Anzahl kernhaltiger Zellen (TC-BF) aus dem WDF-Kanal ermittelt. Eine Differenzierung erfolgt in mononukleäre Zellen (MN) und polymorphnukleäre Zellen (PMN). Zusätzlich werden Warnhinweise für abnormale Zellen generiert.

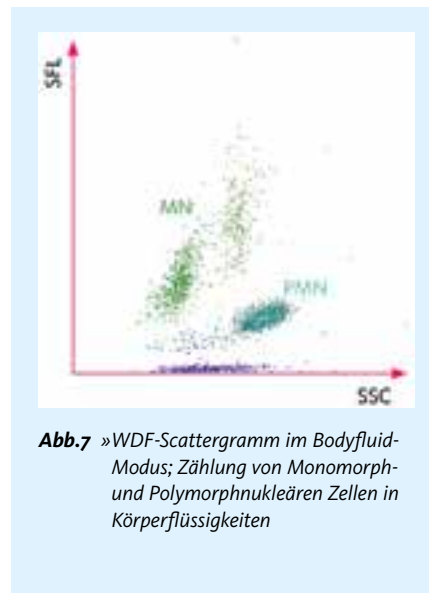


Abb.7 »WDF-Scattergramm im Bodyfluid-Modus; Zählung von Monomorph- und Polymorphnukleären Zellen in Körperflüssigkeiten

Erythrozyten werden im BF-Modus mit der Impedanzmessung im RBC/PLT-Kanal gezählt.

Reagenz: (WDF-Kanal) Lysercell WDF, Fluorocell WDF; CELLPACK DCL (RBC/PLT-Kanal)

Anmerkung: Eine Zusammenfassung der ersten Studienergebnisse finden Sie im Themenblatt der Sysmex Xtra Vol. 17.1 Nr. 03.