

XTRA | 1/2019 | Themenblatt Nr. 5

Digitale Morphologie – Neue Wege in der Zelldifferenzierung

Datum: 1. April 2019

Thema: Digitale Morphologie, Bildanalyzesystem DI-60, CellaVision-Software

Initiator: Marketing Sysmex Deutschland GmbH

Nummer: V1.0

1 Digitale Morphologie

Die Erstellung manueller Differentialblutbilder ist zeitintensiv und erfordert viel Erfahrung, insbesondere, wenn atypische Formen vorliegen. Die Beurteilung von Zellmerkmalen in der klassischen Mikroskopie unterliegt der subjektiven Einschätzung des Laborpersonals, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwert. Darüber hinaus steigen die Anforderungen an Laboratorien hinsichtlich Qualitätssicherung, Standardisierung und Dokumentation.

Hier setzt die Technologie der Digitalen Morphologie an. Sie automatisiert und digitalisiert den Prozess der morphologischen Zellanalyse und bietet damit einen alternativen Ansatz, der es ermöglicht, personelle Ressourcen besser zu nutzen und schnellere sowie standardisiertere Ergebnisse zu generieren. Hochgeschwindigkeitsrobotik und digitale Bilderfassung erlauben es, Zellen automatisch zu lokalisieren und Zellbilder in hoher Qualität aufzunehmen. Unterstützende Softwareanwendungen beurteilen die Zellen anhand einer Vielzahl von Zellmerkmalen und legen dem Anwender einen Klassifizierungsvorschlag vor.

2 Sysmex Digital Imaging System DI-60

Mit dem DI-60 von Sysmex steht dem hämatologischen Labor ein automatisiertes Bildanalyzesystem (Digital Imaging) zur Differenzierung von Zellen aus Blutaussstrichen und Körperflüssigkeitspräparaten zur Verfügung. Der DI-60 schließt eine der letzten verbleibenden Automatisierungslücken im hämatologischen Arbeitsablauf: der Zelldifferenzierung. Das System kann sowohl als Einzelsystem betrieben als auch in einer XN-Konfiguration (XN-1500, XN-3100 oder XN-9100) in die Laborautomation eingebunden werden. Manuelle Arbeitsschritte im Workflow werden minimiert oder entfallen ganz, was zu einer Steigerung von Effizienz, Qualität und Standardisierung beiträgt.



Abb. 1 – Vollautomatisches Digital Imaging System DI-60 von Sysmex

Nach Romanowsky (May-Grünwald-Giemsa oder Wright-Protokoll) gefärbte und barcodierte Ausstriche werden vom System eingelesen und automatisch unter dem integrierten Mikroskop platziert. Anschließend wird der Monolayer identifiziert, einzelne Zellen lokalisiert und digitale Zellbilder in hoher Qualität aufgenommen. Mithilfe eines künstlichen neuronalen Netzwerks (artificial neuronal network = ANN) extrahiert die Software Zellmerkmale aus den Digitalbildern und nimmt eine Vorklassifizierung vor. Der Anwender im Labor begutachtet und prüft die vom System vorgeschlagene Klassifizierung und validiert diese.

In der Benutzeroberfläche des DI-60 lassen sich die Zellklassen nebeneinander oder alle Zellen in Vollbildansicht darstellen, wobei eine Anpassung der Vergrößerung der Zellübersicht sowie einzelner Zellen vorgenommen werden kann (Zoom). Dem Anwender bietet sich die Möglichkeit Zellen untereinander oder mit Referenzzellen aus einer integrierten Referenzzellbibliothek zu vergleichen. Einem Objektträger, Zellklassen oder einzelnen Zellbildern können Markierungen und Kommentare hinzugefügt werden. Sofern der Anwender nicht mit der vom System vorgeschlagenen Klassifizierung übereinstimmt, können die Zellen durch ein einfaches Verschieben in die neue Zellklasse nachklassifiziert werden („drag-and-drop“). Die digitalen Zellbilder können in der Patientenakte archiviert werden.

3 Anwendung für Peripherblut: CellaVision® Peripheral Blood Application

Standardmäßig wird jeder DI-60 von Sysmex mit der CellaVision® Peripheral Blood Application ausgestattet. Diese Anwendung unterstützt die Leukozytendifferenzierung durch Vorklassifizierung in 17 Zellklassen, die Beurteilung der Erythrozyten durch Vorcharakterisierung nach sechs morphologischen Eigenschaften sowie die Thrombozytenbeurteilung. Zusätzlich können mit dem DI-60 Digitalscans von verschiedenen Objektträgerpräparaten erstellt werden (digitale Objektträger).

Einordnung der Zellen in Leukozytenklassen	Einordnung der Zellen in Nicht-Leukozyten-Klassen	Manuelle Zuordnung der Zellen
Segmentkernige neutrophile Granulozyten	Kernhaltige Erythrozytenvorstufen (NRBC)	Unreife Eosinophile
Stabkernige neutrophile Granulozyten	Riesenthrombozyten	Unreife Basophile
Eosinophile Granulozyten	Thrombozytenaggregate	Promonozyten
Basophile Granulozyten	Kernschatten	Prolymphozyten
Lymphozyten	Artefakte	Große granuläre Lymphozyten
Monozyten		Haarzellen
Promyelozyten		Sézary-Zellen
Myelozyten		Sonstige (Leukozyten, die zu keiner der Zellklassen zuordenbar sind)
Metamyelozyten		Megakaryozyten
Blasten		Nicht klassifizierte Zellen (Zellen, die nicht eindeutig zuordenbar sind und nicht berücksichtigt werden sollen)
Varianten von Lymphozyten		
Plasmazellen		

Über die vordefinierten Zellklassen hinaus, sind bis zu 15 benutzerdefinierte Zellklassen erstellbar (z. B. Einteilung der atypischen Lymphozyten in „vermutlich neoplastisch“ und „vermutlich reaktiv“).

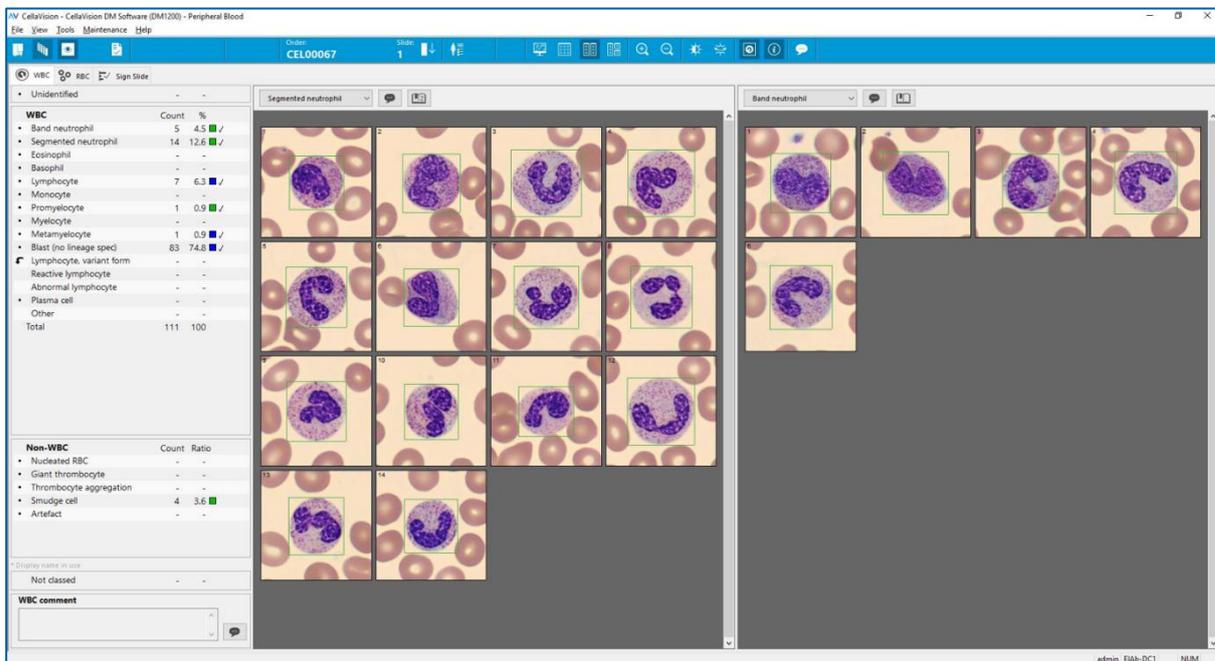


Abb. 2 – Überprüfungsansicht mit zwei Zellbildgalerien

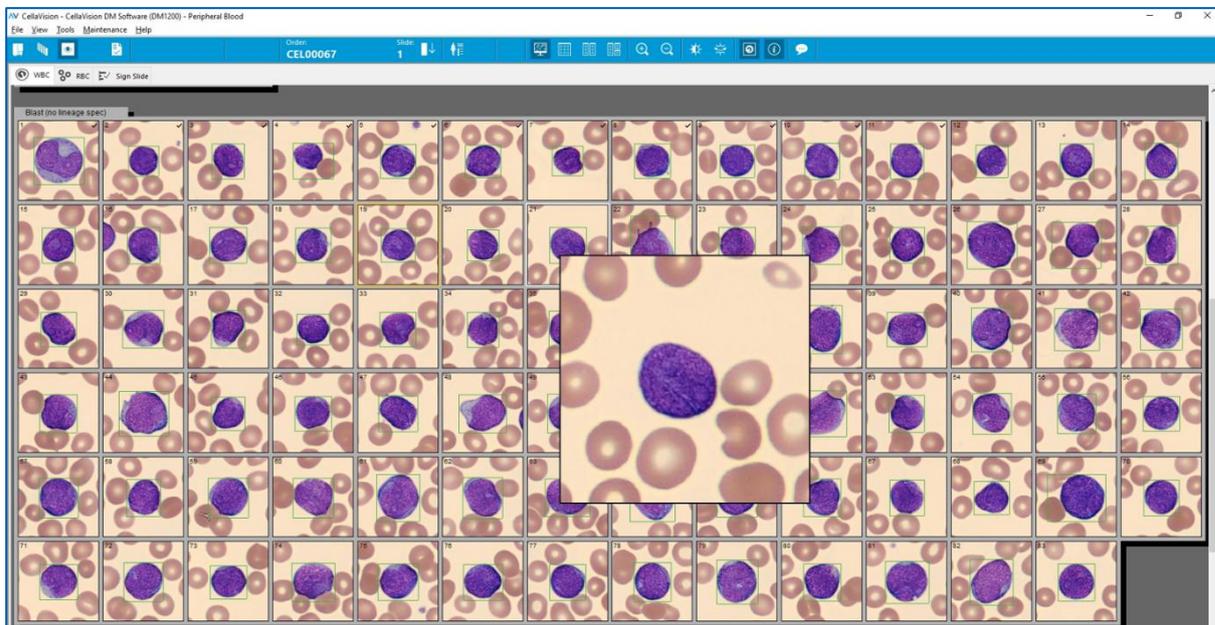


Abb. 3 – Ansicht einer Zellklasse mit hervorgehobener Zelle

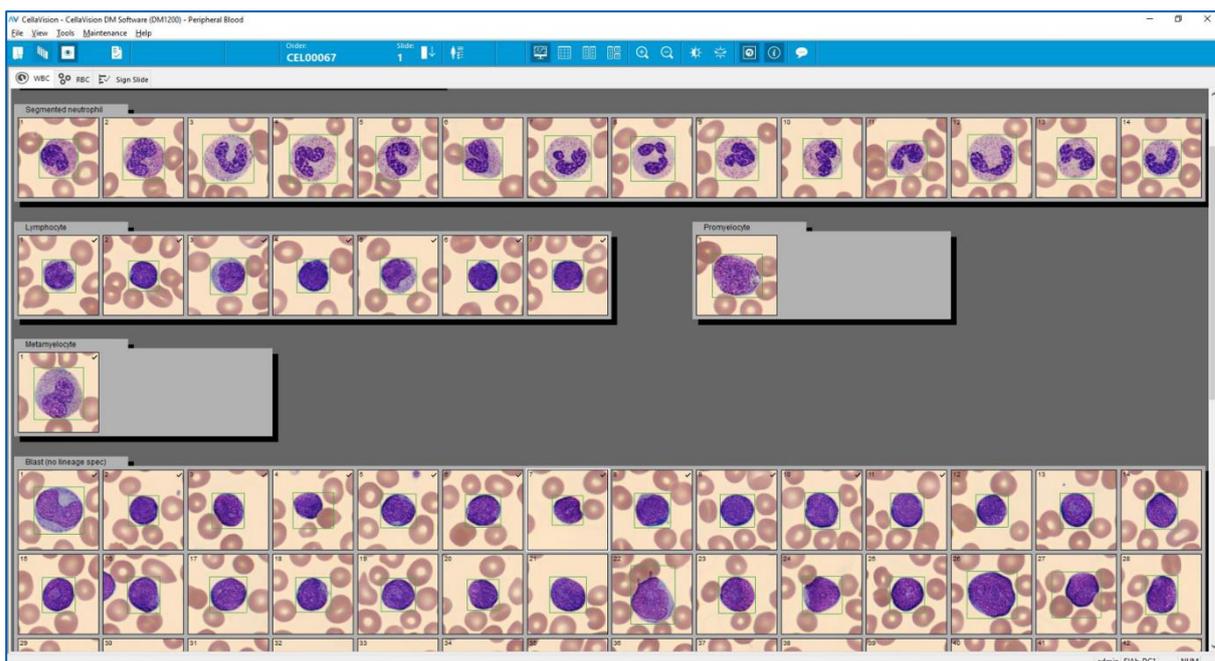


Abb. 4 – Vollbildansicht, Zellklassen untereinander angeordnet

Die morphologische Beurteilung der Erythrozyten anhand sechs morphologischen Eigenschaften ist ebenfalls Bestandteil der CellaVision® Peripheral Blood Application. In einem Überblicksbild entsprechend acht Hochleistungs-Mikroskopfeldern (High Power Fields = HPF) führt das System eine Vorcharakterisierung nach folgenden Morphologien durch. Zusätzlich kann vom Anwender die Charakterisierung nach folgenden Zelltypen und Eigenschaften vorgenommen werden:

Vorcharakterisierung durch das System	Eigene Charakterisierung durch Anwender
Polychromatische Zellen	Target-Zellen
Hypochromatische Zellen	Schistozyten
Anisozytose	Helmzellen
Mikrozytose	Sichelzellen
Makrozytose	Sphärozyten
Poikilozytose	Elliptozyten
	Ovalozyten
	Tränentropfenformzellen
	Stomatozyten
	Akanthozyten
	Echinozyten
	Howell-Jolly-Körperchen
	Pappenheimer-Körperchen
	Basophile Tüpfelung
	Parasiten

Weitere zehn benutzerdefinierte Eigenschaften können zusätzlich angelegt werden (z. B. für Rouleaux).

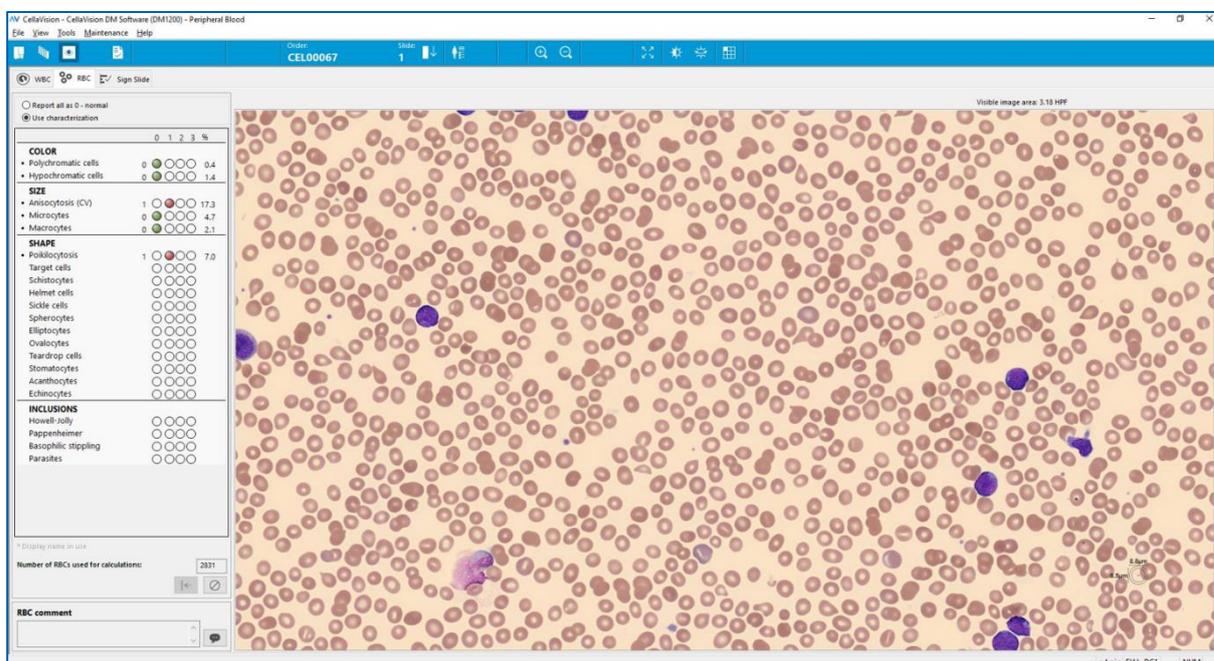


Abb. 5 – Ansicht zur Erythrozytenbeurteilung

Im Rahmen der CellaVision® Peripheral Blood Application besteht weiterhin die Möglichkeit der Thrombozytenbeurteilung. Ein Thrombozyten-Überblicksbild entspricht ebenfalls einer Fläche von acht Hochleistungsmikroskopfeldern und ist je nach gewählter Einstellung in vier, neun oder 16 Gitterquadrate eingeteilt. Mögliche Gittereinteilungen sind somit 2x2, 3x3 und 4x4, wobei 4x4 die stärkste Bildvergrößerung ergibt. Entsprechend der Anzahl der Gitterquadrate sind Eingabefelder vorhanden, in die die Thrombozytenzahl je Gitterquadrat eingetragen wird. Die Thrombozytenkonzentration kann auf zwei Wegen ermittelt werden:

- Durch Eingabe der gezählten (oder geschätzten) Anzahl Thrombozyten je Gitterquadrat in die entsprechenden Felder und anschließende Berechnung der (geschätzten) Thrombozytenzahl über die Software
- oder durch Schätzung der Thrombozytenkonzentration und Auswahl eines Konzentrationsniveaus (deutlich erniedrigt, erniedrigt, normal oder erhöht) im entsprechenden Eingabefeld.

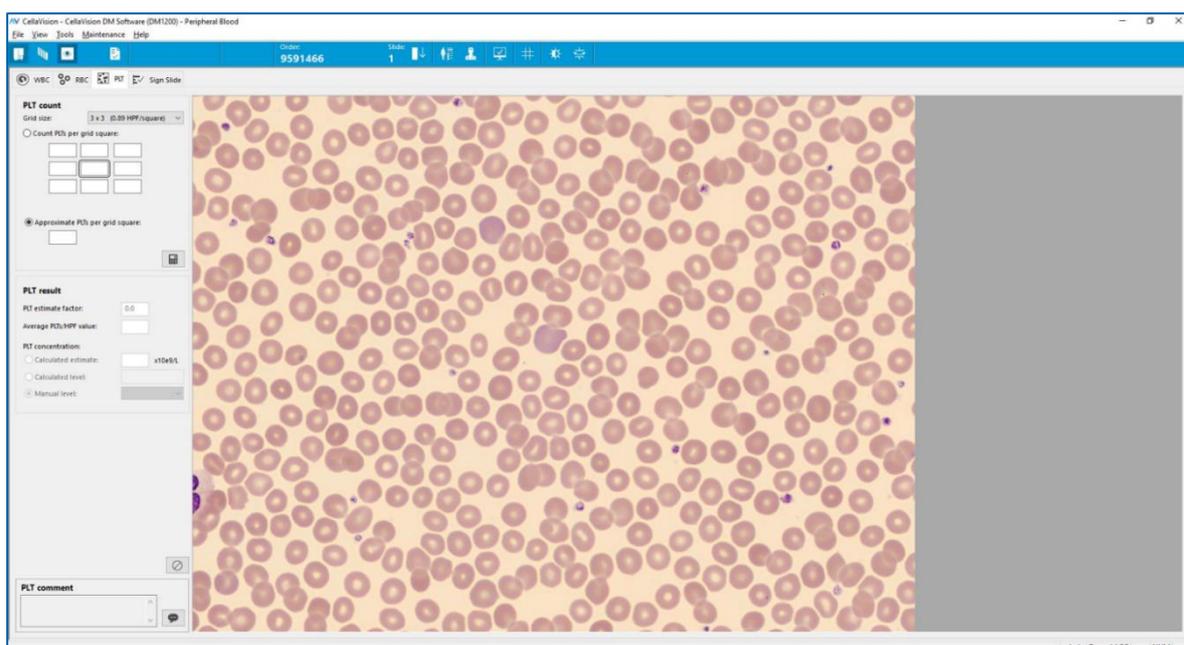


Abb. 6 – Überblick zur Thrombozytenbeurteilung

Über die bereits aufgeführten Anwendungen hinaus können mit dem DI-60 digitale Objektträger angefertigt werden. Über eine separate Scan-Datenbank werden Objektträger in das System eingelesen und gescannt, sodass eine digitale Aufnahme eines zuvor ausgewählten Probenbereiches erstellt wird. In einem Überblicksbild wird der gesamte Probenbereich in einer Miniaturansicht und der jeweils ausgewählte Probenbereich in einer vergrößerten Ansicht (10-fache oder kombinierte 10-fache und 50-fache Vergrößerung) dargestellt. Mithilfe von Navigationsfeldern kann der Scan beurteilt werden, wobei bereits begutachtete Bereiche in der Miniaturansicht farblich markiert werden. Es erfolgt keine Vorklassifizierung durch das System. Dem gesamten Scan können Kommentare hinzugefügt werden. Einzelne Zielbereiche können markiert und kommentiert sowie auf einen externen Datenträger kopiert werden.



Abb. 7 – Digitalscan am Beispiel eines Knochenmarkpräparates

4 Umfassendere Beurteilung der Erythrozytenmorphologie mit der CellaVision® Advanced RBC Application

Die CellaVision® Advanced RBC Application bietet erweiterte Möglichkeiten zur Überprüfung der Erythrozytenmorphologie. Sie ergänzt die CellaVision® Peripheral Blood Application und ermöglicht dem Labor eine umfassendere Beurteilung der Erythrozyten mit einer Vorcharakterisierung nach 21 morphologischen Eigenschaften:

Morphologischen Eigenschaften	
Polychromatische Zellen	Elliptozyten
Hypochromatische Zellen	Ovalozyten
Anisozytose	Tränentropfenformzellen
Mikrozytose	Stomatozyten
Makrozytose	Akanthozyten
Poikilozytose	Echinozyten
Target-Zellen	Howell-Jolly-Körperchen
Schistozyten	Pappenheimer-Körperchen
Helmzellen	Basophile Tüpfelung
Sichelzellen	Parasiten
Sphärozyten	

Mit umschaltbaren Ansichten können die Zellen gefiltert oder gruppiert dargestellt werden. Einzelne Zellbilder lassen sich in der Vergrößerung anpassen und mit Beispielzellen aus der integrierten Referenzzellbibliothek vergleichen. Sofern eine Neucharakterisierung erforderlich ist, kann dies manuell geändert werden. Die Software zeigt den prozentualen Anteil an Erythrozyten im Überblicksbild mit der betreffenden Charakteristik an. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Klassifizierungsgrenzen zu verwenden, die eine Graduierung in die vier Bereiche „normal“, „gering“, „moderat“ und „deutlich“ vornimmt.

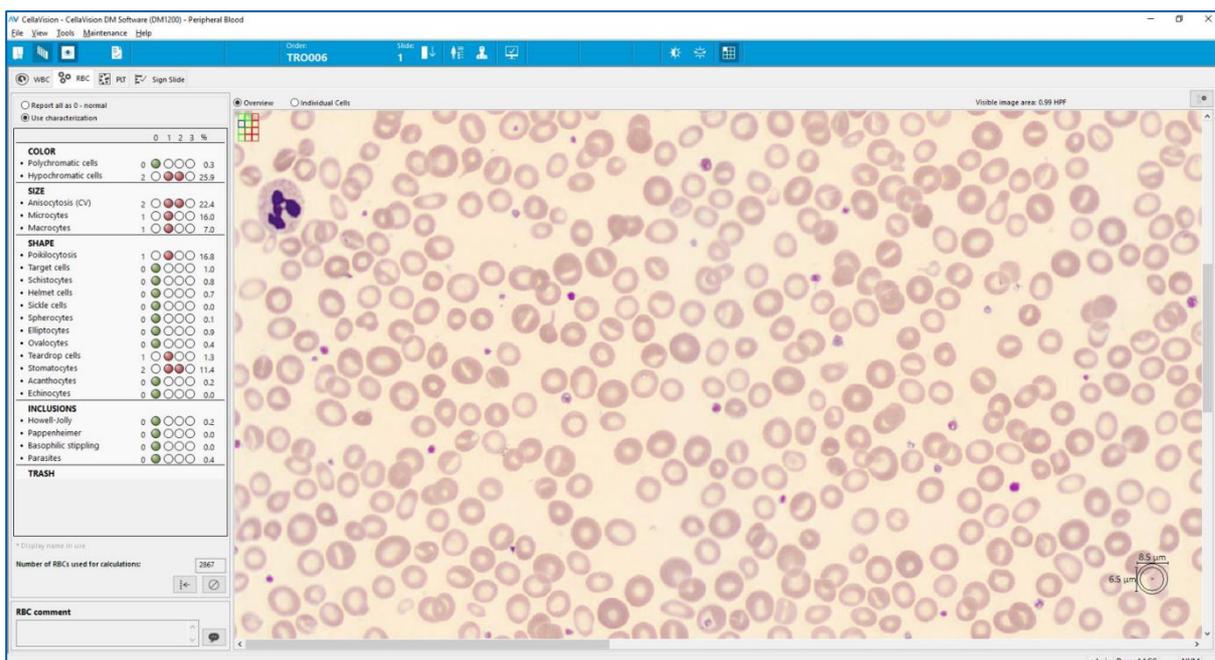


Abb. 8 – Überblick zur Beurteilung der Erythrozytenmorphologie

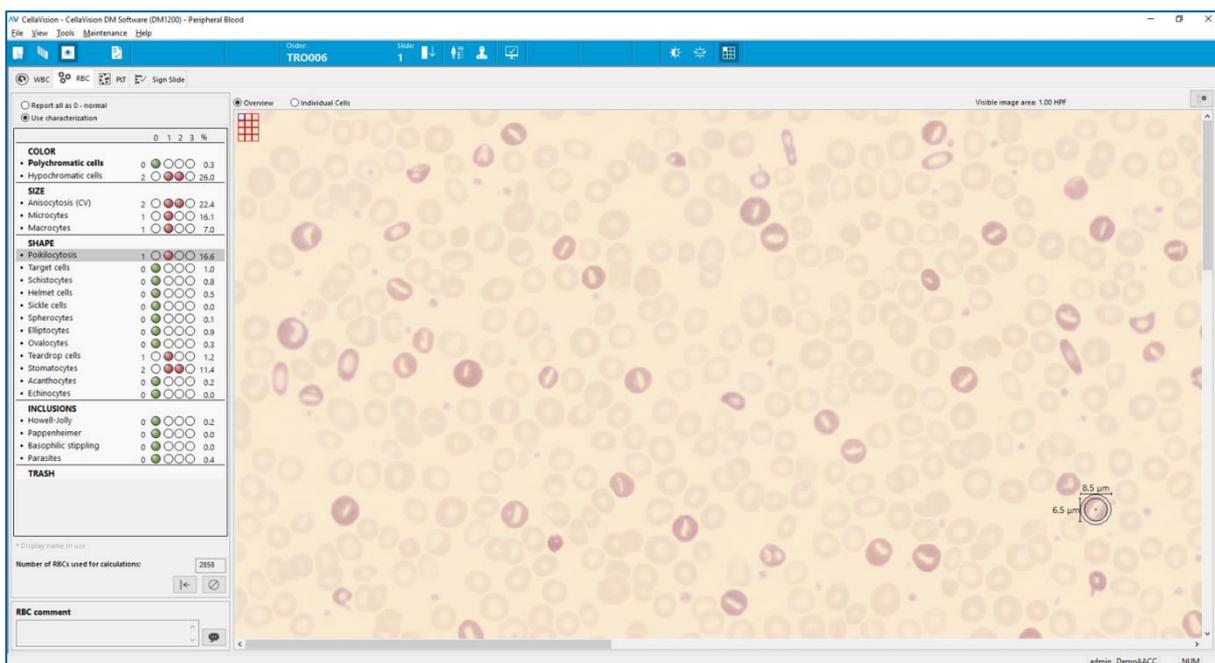


Abb. 9 – Ansicht mit hervorgehobener Morphologiekategorie

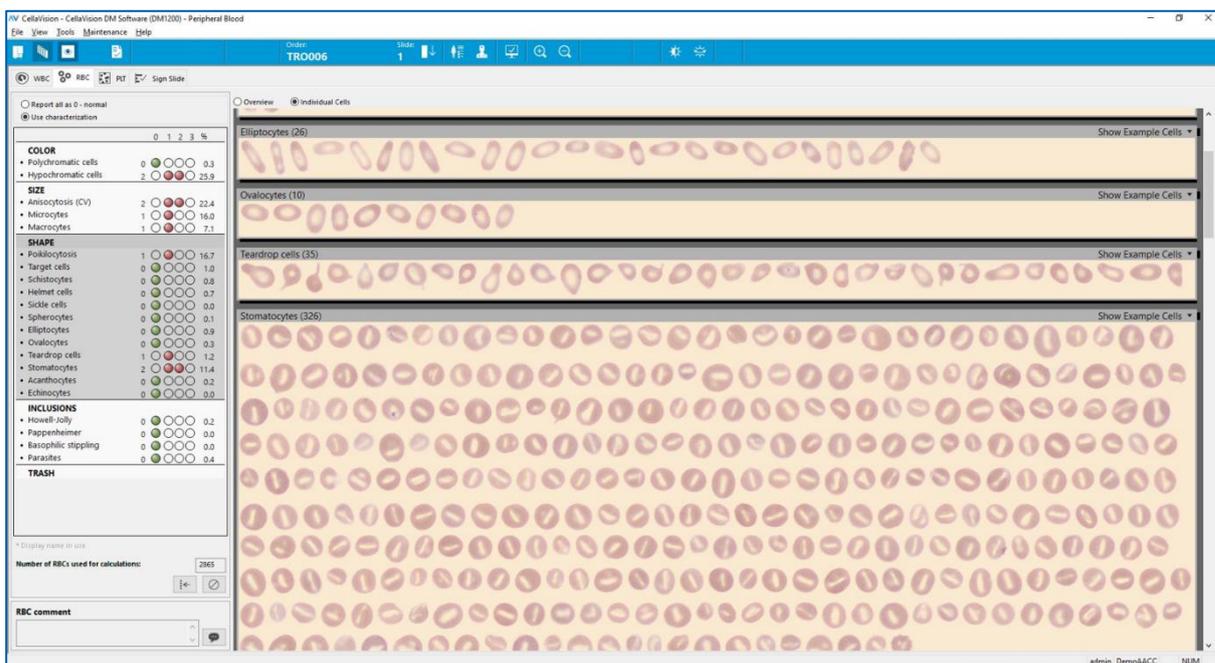


Abb. 10 – Ansicht mit Sortierung nach Form, Größe, Farbe und Einschlüssen

5 Morphologische Untersuchung von Körperflüssigkeitspräparaten mit der CellaVision® Body Fluid Application

Mit der CellaVision® Body Fluid Application kann die morphologische Untersuchung von zytozentrifugierten Körperflüssigkeitspräparaten (Zerebrospinal-, Synovial-, Pleuraflüssigkeit u.a.) automatisiert werden. Bei dieser Anwendung wird eine Leukozytendifferenzierung durch Vorklassifizierung nach fünf Zellarten vorgenommen:

- Neutrophile
- Eosinophile
- Lymphozyten
- Makrophagen (einschließlich Monozyten) und
- Andere (Basophile, Lymphomzellen, atypische Lymphozyten, Blasten und Tumorzellen)

Vorklassifizierte Nicht-Leukozyten sind Kernschatten und Artefakte. Vom System nicht eindeutig vorklassifizierte Zellen werden in die Kategorie „nicht klassifiziert“ verschoben und können vom Anwender nachträglich beurteilt werden. Die Neuklassifizierung von Zellen erfolgt auch in dieser Anwendung durch einfaches Verschieben in die vom Anwender gewählte Zellkategorie.

Neben der Vorklassifizierung der Leukozyten wird das gesamte Cytospin-Präparat digitalisiert (10x oder kombiniert 10x und 50x) und steht so dem Labor zur Begutachtung zur Verfügung. Analog der Digitalscan-Ansicht kann der gesamte Probenbereich in 10x bis 50x Vergrößerung angezeigt werden. Bereiche von besonderem Interesse („regions of interest“ = ROI) können markiert, kommentiert und bei Bedarf exportiert werden.

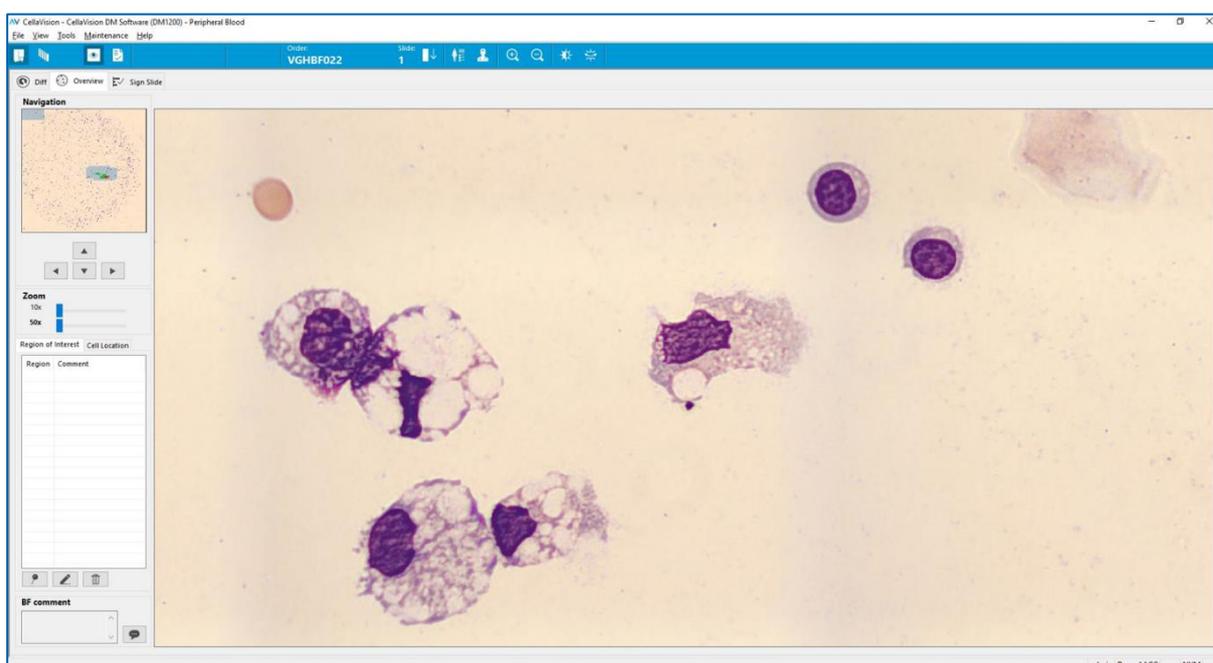


Abb. 11 – Bearbeitungsansicht der CellaVision® Body Fluid Application

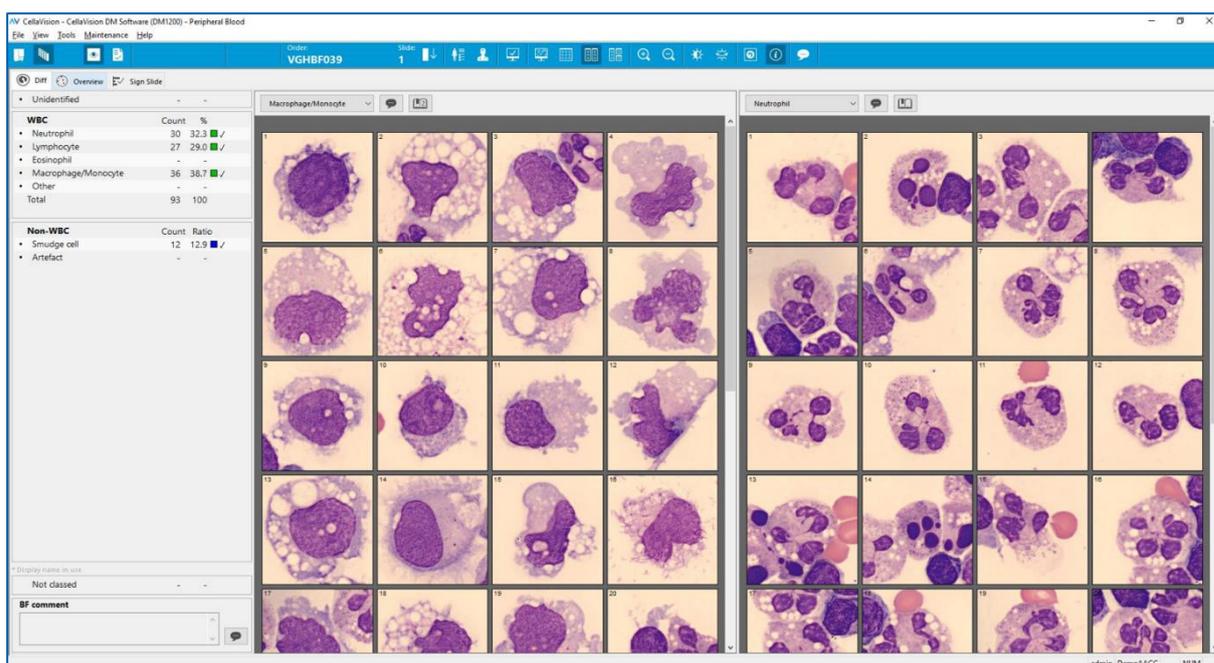


Abb. 12 – Ansicht Vordifferenzierung im Modus für Cytospin-Präparate

6 Probendurchsatz des DI-60

Die Bearbeitungszeiten sind abhängig von Ausstrichqualität, Leukozytenkonzentration und Zahl der Nicht-Leukozyten.

Peripherblut

- Bis zu 30 Objektträger/Stunde bei vollständiger Differenzierung (100 Leukozyten + Erythrozyten + Thrombozyten)

Digitale Objektträger

- Bis zu 20 Objektträger/Stunde bei 10 x 10 mm (mit 10x)
- Bis zu 1,5 Objektträger/Stunde bei 10 x 10 mm (mit 10x und 50x)

Körperflüssigkeiten (basierend auf 6 mm Probenbereich)

- Bis zu 15 Objektträger/Stunde bei Differenzierung (100 Leukozyten mit 10x)
- Bis zu 3 Objektträger/Stunde bei Differenzierung (100 Leukozyten mit 10x und 50x)

CellaVision® Peripheral Blood Application, CellaVision® Advanced RBC Application und CellaVision® Bodyfluid Application sind Produkte von CellaVision AB, Lund, Schweden.