

Messtechnologie XN-31

Datum: Februar 2020
Thema: Hämatologie- und Malariadiagnostik XN-31, Technologie
Herausgeber: Marketing
Nummer: V0.1

1 Einleitung

Das automatische Analysesystem XN-31 kann mit ausgezeichneter Empfindlichkeit und Spezifität (Pillay et al*) malarieinfizierte rote Blutkörperchen innerhalb einer Minute (MI-RBC) erkennen und zählen. Eine genaue Zählung und der direkte Nachweis der Parasiten ermöglichen eine zuverlässige Diagnose. Dabei ist die hohe Sensitivität auf Parasitenbefall unabhängig von der Expertise des Anwenders. Die Bestimmungsgrenze (LoQ) liegt bei 20 Parasiten pro μL und erfasst alle Plasmodia-Arten.

Neben der Plasmodienlast liefert das M-Scattergramm des XN-31 auch Informationen über die Lebenszyklus-Stadien der Plasmodien. Ringformen*, Trophozoiten*, Schizonten* und Gametozyten* werden zahlenmäßig erfasst. Anhand dieser und weiterer Informationen aus dem Scattergramm schlägt das System eine Klassifizierung der Malaria-Spezies. (*Forschungsparameter)

Die gleichzeitige Messung des kleinen Blutbilds liefert Ärzten wichtige Informationen für die klinische Korrelation, denn die Ausprägung von Anämie und Thrombozytopenie können einen Hinweis auf den Schweregrad der Malariainfektion geben und die WBC-Zahl kann auf parallel verlaufende Infektionen hinweisen.

Technologisch unterscheidet sich das System von anderen Systemen der XN-Serie durch seinen speziellen Halbleiter-Laser mit einem Anregungsspektrum von 405nm. Bei der Durchflusszytometrie mit einem Halbleiter-Laser werden die Zellen im Durchflusszytometer mit dem Laserstrahl erfasst. Durch die Analyse des Vorwärts-Streulichts (FSC), Seitwärts-Streulichts (SSC) und der Seitwärts-Fluoreszenzlicht-Intensität (SFL) können infizierte Erythrozyten und Leukozyten nach entsprechender Behandlung mit den Reagenzien gezählt werden. Die Intensitäten der Streulichtsignale (FSC, SSC) reflektieren die Oberflächenstruktur, Partikelgröße, Kernform, den Refraktionsindex und die Reflektivität der Zellen. Im Allgemeinen nimmt das FSC-Messsignal zu, je größer die Zellen werden. Das SSC-Messsignal ist intensiver, desto komplexer die intrazellulären Strukturen sind. Die Intensität des Seitwärts-Fluoreszenzlichtsignals reflektiert die Anfärbung von Nukleinsäuren in der Zelle mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Dies ist abhängig von der Permeabilität der Zellmembran, die durch das Lysemittel erzeugt wird, und der Affinität des Farbstoffes. Die simultane Messung dieser drei Signalstärken dient im XN-31 der Zählung von weißen Blutzellen und der Unterscheidung verschiedener Reifezyklen malaria-infizierter roter Blutzellen. Zur Verbesserung der Genauigkeit wird bei jeder Messung die Mantelstrom-Technologie eingesetzt, mit der Zellen mit Hilfe eines Hüllstromes einzeln und mittig durch die Messkapillare gelangen.

Im Folgenden werden die einzelnen Technologien die XN-31 verwendet vorgestellt:

2 RBC/PLT Messkanal – Impedanztechnologie

Reagenz: Cellpack DCL

Im RBC/PLT-Kanal werden Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) mit der Impedanztechnologie (DC = direct current, Gleichstrom) und mittels hydrodynamischer Fokussierung (Mantelstrom) anhand ihres Volumens voneinander unterschieden und gezählt. Hämatokrit (HKT), MCV, RDW-SD, RDW-CV, MicroR% und MacroR% sowie MPV, PCT, PDW, P-LCR entstammen ebenfalls dieser Messung.

Impedanztechnologie

Ein elektrisches Feld zwischen einer positiv und einer negativ geladenen Elektrode wird genutzt, um Anzahl und Volumen der durch dieses Feld fließenden Zellen zu bestimmen. Blutzellen sind schlechte elektrische Leiter. Aus diesem Grund wird eine Elektrolytlösung mit guter Leitfähigkeit als Verdünnungsreagenz verwendet, um die Zellen zu suspendieren. Die 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 zum Volumen der Zelle verhält. Ein Mantelstrom (Hüllstrom), der die Zellen beim Durchtritt durch die Kapillare umhüllt, sorgt dafür, dass die Zellen einzeln und mittig durch die Kapillare fließen. So ist eine besonders genaue Messung möglich.

Die Zählung der Zellen erfolgt nach dem Prinzip der „Absolutzählung“. Dies bedeutet, dass RBC- und PLT-Zahl in einem fest definierten Blutvolumen ausgezählt werden. Vorteil dieser Methode ist, dass keine regelmäßige benutzerseitige Kalibrierung erforderlich ist. Analysesysteme, die das relative Zählprinzip anwenden und die RBC-Zahl anhand der in einem vorgegebenen Zeitraum gezählten Impulse bestimmen, sind fehleranfälliger und erfordern eine regelmäßige Systemkalibrierung.

Hämatokrit

Der Hämatokrit (HKT, eng. HCT) ist ein Parameter, der den Anteil aller zellulären Bestandteile am Volumen des Blutes bezeichnet und damit hauptsächlich von der Erythrozytenkonzentration im Vollblut abhängig ist. Sysmex Hämatologiesysteme messen den Hämatokrit durch die Impedanzmessung und kumulative Impulshöhensummierung. Jede einzelne Zelle, die durch die Messöffnung tritt, erzeugt einen elektrischen Impuls, von dem angenommen wird, dass sich die Impulshöhe proportional zum Zellvolumen verhält. Aus der Kumulation der einzelnen Impulshöhen berechnet sich der Hämatokrit (Abb. 3). Die Konstante [k] bezeichnet einen Faktor, der die osmotische Wirkung des Reagenzes auf das Erythrozytenvolumen ausgleicht.

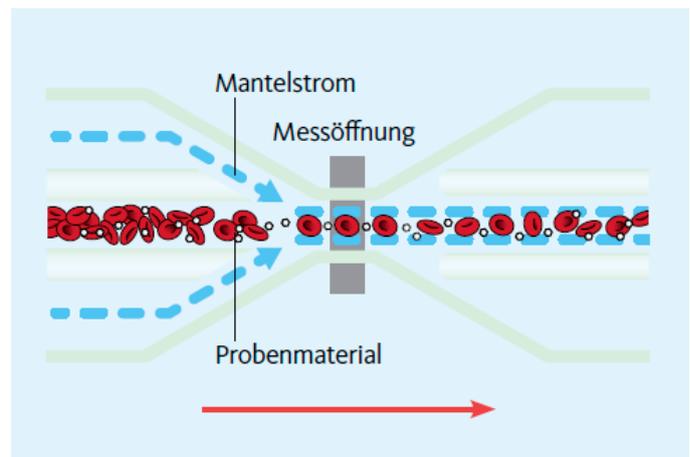


Abb. 1 Impedanztechnologie mit hydrodynamischer Fokussierung

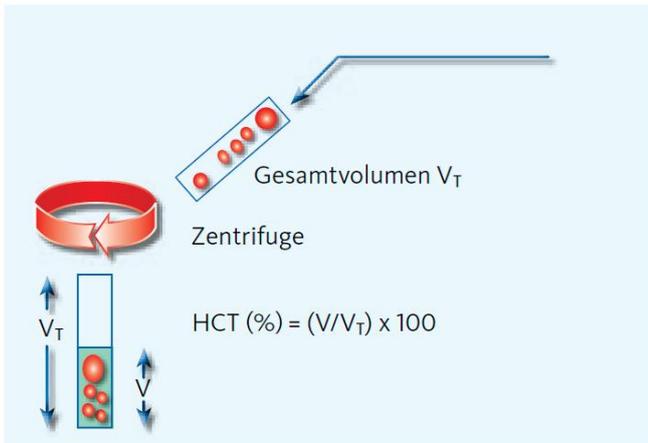


Abb. 2 Schematische Darstellung der HKT-Bestimmung durch Zentrifugieren

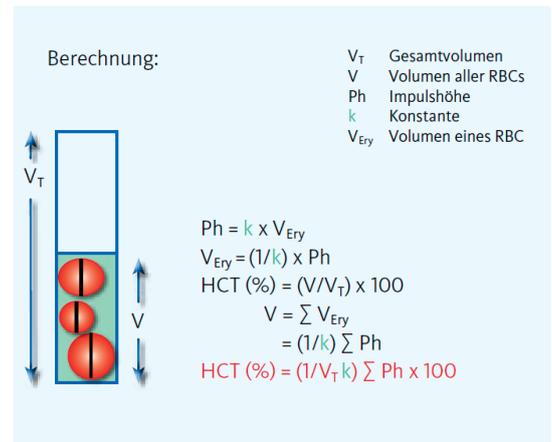


Abb. 3 Formel für die automatische HKT-Bestimmung

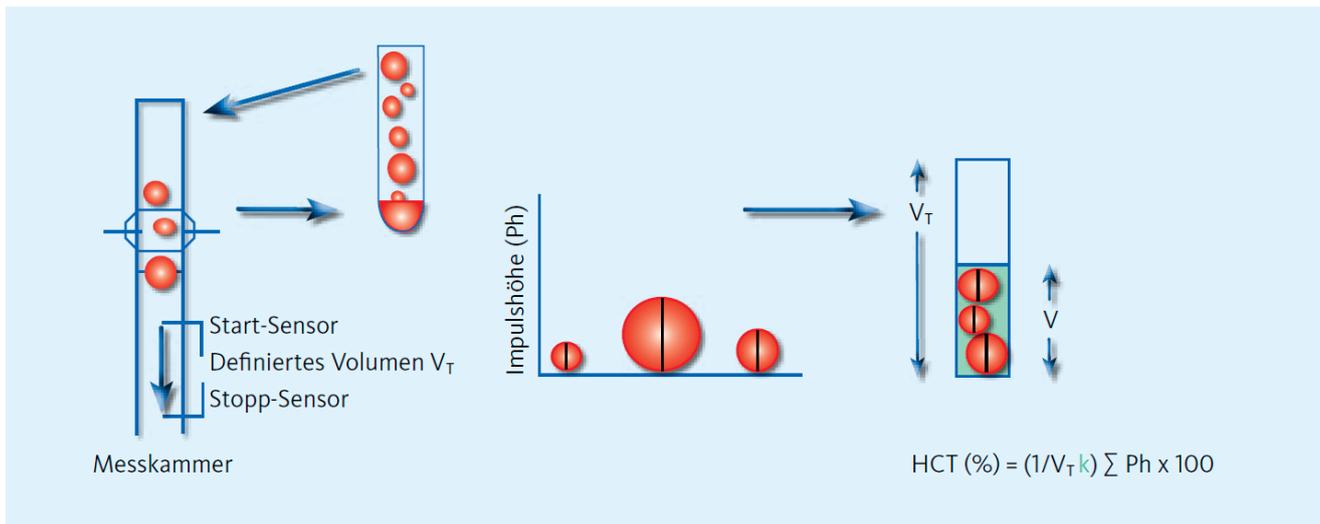


Abb. 4: Schematische Darstellung der automatischen HKT-Bestimmung: Kumulative Impulshöhensummierung (Formel siehe Abb. 3)

Erythrozyten

Die Zählung der Erythrozyten wird im CBC mittels der Impedanztechnologie gemessen. Die Unterscheidung von Thrombozyten erfolgt anhand ihres Volumens mittels Diskriminator wie in der RBC-Verteilungskurve (Histogramm) dargestellt (Abb. 5).

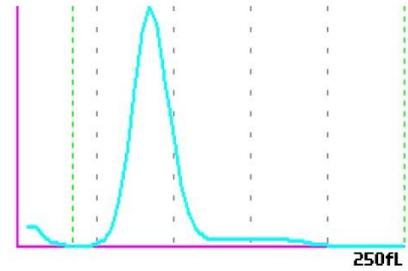


Abb. 5 RBC-Histogramm

Mittleres korpuskuläres Volumen

Das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) wird anhand der nachstehenden Formel aus den Parametern RBC und HKT berechnet:

$$\text{MCV (fL)} = \frac{\text{HKT}}{\text{RBC}}$$

Die Grenzwerte des Referenzbereichs (Normalbereich) für MCV sind altersabhängig. Als normozytär, mikrozytär und makrozytär werden Erythrozytenpopulationen mit normalem, erniedrigtem bzw. erhöhtem MCV bezeichnet.

Erythrozytenverteilungsbreite: RDW-SD und RDW-CV

Die Bestimmung der RDW-SD an Sysmex Hämatologiesystemen ist eine tatsächliche Messung der Breite der Erythrozytenverteilungskurve. Die Messung wird in 20% relativer Höhe der Histogrammkurve über der Basislinie vorgenommen. Je weiter die Kurve durch verschieden große Erythrozyten aufgespreizt ist, desto höher ist der RDW-SD-Wert.

Der RDW-CV wird durch Berechnung ermittelt. Die Formel lautet:

$$\text{RDW-CV} = \frac{1\text{SD}}{\text{MCV}} \times 100$$

RDW-CV und RDW-SD reflektieren die Größenvariation der Erythrozyten um den Mittelwert. Weil der 1SD durch den MCV geteilt wird, ist der RDW-CV abhängig von der durchschnittlichen Größe der Erythrozyten (MCV).

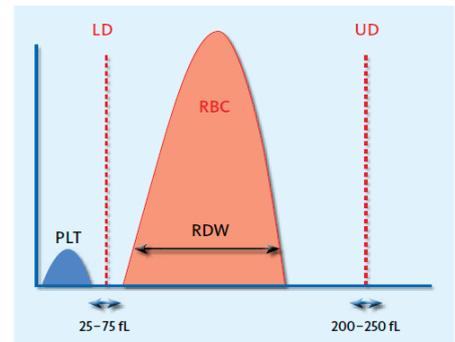


Abb. 6 Darstellung des RDW-Konzepts im Erythrozyten-Histogramm

Anteil Mikrozyten/Makrozyten - MicroR – MacroR

Erythrozyten und Thrombozyten werden im RBC/PLT-Kanal mittels Impedanztechnologie (auch DC-Widerstandsmessprinzips) gezählt. Dabei kommt die hydrodynamische Fokussierung zum Einsatz, sodass nur Einzelzellen den Detektor passieren und die resultierende RBC-Größenverteilung nahezu eine Gaußsche Verteilung aufweist. Die Werte der Parameter MicroR und MacroR werden aus beiden Enden des RBC-Histogramms ermittelt. Die RBC-Histogramme von Proben mit mikrozytischen RBC sind nach links verlagert und zeigen aufgrund der Zunahme kleiner RBC häufig eine Schulter auf der linken Seite. Bei Proben mit makrozytischen RBC zeigen die Histogramme rechts eine längere Flanke. Durch die Anwendung zweier verschiedener beweglicher Diskriminatoren im unteren und oberen Bereich des Histogramms kann eine mikrozytische und eine makrozytische RBC-Population bestimmt werden, und die resultierenden Parameter (MicroR und MacroR) geben diese Populationen als prozentualen Anteil an allen Erythrozyten an.

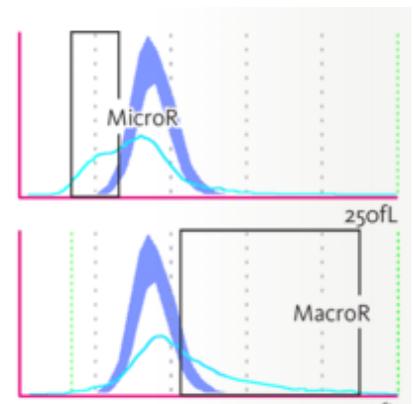


Abb. 7 Mikrozytische RBC (MicroR, oberes Diagramm) und makrozytische RBC (MacroR, unteres Diagramm) im RBC-Histogramm

Thrombozyten

Die Zählung der Thrombozyten erfolgt im CBC mittels der Impedanztechnologie nach dem Absolutmessprinzip. Die Trennung von Erythrozyten erfolgt anhand des Volumens durch einen Diskriminator, dargestellt in der Thrombozytenverteilungskurve (PLT-Histogramm, Diskriminator PU). Neben der Thrombozytenzahl gibt es verschiedene PLT-Zusatzparameter, die weitere Informationen aus dieser Messung liefern können: P-LCR, PDW, MPV und PCT.

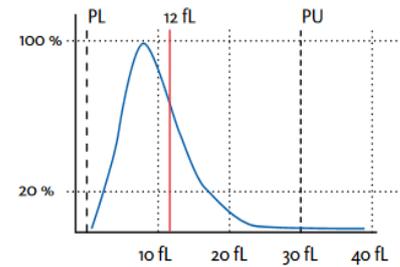


Abb. 8 PLT-Histogramm: Markierung des Diskriminators für P-LCR bei 12 fL (rot)

Mittleres Plättchenvolumen

Der MPV gibt eine Aussage über das mittlere Plättchenvolumen, gemessen zwischen dem unteren Diskriminator PL und dem oberen Diskriminator PU. Referenzbereich liegt bei 8 – 12 fL. Berechnet wird der MPV wie folgt: $MPV = PCT (\%) / PLT (\times 10^3/\mu L)$. Bei anormalen Kurvenverläufen aufgrund von Interferenzen kann dieser Parameter ggf. nicht angezeigt werden.

Anteil großer Thrombozyten

Der P-LCR (Platelet large cell ratio) gibt den Anteil der großen Thrombozyten mit einem Volumen > 12 fL aus dem PLT-Histogramm an. Neben den beiden flexiblen Diskriminatoren, die die Volumensverteilungskurve eingrenzen, gibt es zudem einen festen Diskriminator bei 12 fL (Abb. 8). Der Anteil der Thrombozyten > 12 fL im Verhältnis zur Gesamtzahl der Thrombozyten wird in % dargestellt. Bei anormalen Kurvenverläufen aufgrund von Interferenzen kann dieser Parameter ggf. nicht angezeigt werden.

Plättchenkrit

Der Plättchenkrit (PCT) entspricht der Summe der einzelnen Thrombozytenvolumina und ist somit das Äquivalent zum Hämatokrit der Erythrozyten (Impedanztechnologie und kumulative Impulshöhensummierung).

Thrombozyten-Verteilungsbreite

Der PDW-SD gibt die Verteilungsbreite der Thrombozyten, gemessen bei 20% relativer Höhe der Kurvensumme, an (Abb. 9). Bei anormalen Kurvenverläufen aufgrund von Interferenzen kann dieser Parameter ggf. nicht angezeigt werden.

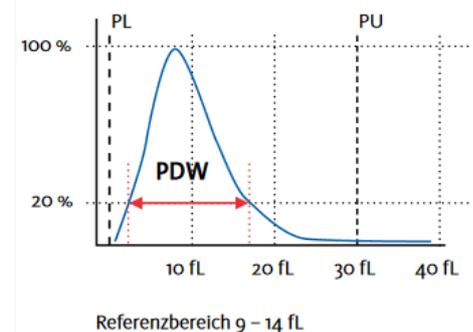


Abb. 9 PLT-Histogramm: Schematische Darstellung des PDW

3 Hämoglobin-Messkanal – SLS-Methode

Reagenz: Cellpack DCL, Sulfolyser

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

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.

1. Veränderung in der Globinstruktur durch SLS.
2. Oxidation des Hämeisens durch Sauerstoff: Zusammen mit der Veränderung der Struktur des Globins wird das zweiwertige Hämeisen einfach durch die Sauerstoffbindung an das Hämeisen oder den gelösten Sauerstoff in dreiwertiges Eisen umgewandelt.
3. Bindung von SLS: Die hydrophilen Gruppen des SLS binden sich an das dreiwertige Hämeisen und es entsteht stabiles SLS-Hämoglobin. Das Analysesystem misst die Absorption bei einer Wellenlänge von 555nm.

Der Vorteil der SLS-Methode gegenüber anderen cyanidfreien Methoden besteht darin, dass sie in der Lage ist, die Hämoglobinderivate Desoxyhämoglobin, Oxyhämoglobin, Carboxyhämoglobin und Methämoglobin zu messen.

4 Die Erythrozytenindizes MCH, MCHC und MCV

Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt

Der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt (MCH) wird anhand der nachstehenden Formel aus den Parametern RBC und HGB berechnet:

$$\text{MCH (pg)} = \frac{\text{HGB}}{\text{RBC}}$$

Die Referenzwerte für MCH sind altersabhängig. Der MCH verhält sich in der Regel proportional zum MCV. Die Zellgröße wird im Wesentlichen durch ihren Hämoglobingehalt bestimmt. Zellen mit einem normalen MCH werden als normochrom bezeichnet, Zellen mit niedrigem MCH als hypochrom.

Mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration

Der MCHC wird anhand der folgenden Formel aus den Parametern HKT und HGB errechnet:

$$\text{MCHC (g/dL)} = \frac{\text{HGB}}{\text{HKT}}$$

MCV – Mittleres korpuskuläres Volumen

Siehe Beschreibung RBC/PLT-Messkanal – Impedanztechnologie

5 Leukozyten und Malariainfizierte Erythrozyten

M-Kanal (Leukozytenzahl, MI-RBC)

Reagenzien M-Kanal: Lycercell M, Fluorocell M

Die Zählung der Leukozyten sowie die Erfassung Malariainfizierter Erythrozyten (MI-RBC) erfolgt im M-Kanal mittels der Fluoreszenzdurchflusszytometrie anhand der Auswertung von Vorwärtsstreuung- und Seitwärts-Fluoreszenzlichtsignalen mit einem Halbleiterlaser (405nm). Das untere Quantifizierungslimit liegt bei 20 Parasiten/ μL .

Lycercell M enthält eine oberflächenaktive Substanz zur Behandlung roter und weißer Blutzellen. Fluorocell M färbt die in den Zellen enthaltenen Nukleinsäuren abhängig von der Permeabilität der Zellmembran und der in der Zelle zugänglichen Nukleinsäure. Neben der Gesamtanzahl von WBC und MI-RBC können so Informationen zum Lebensstadium des Malariaparasiten (Trophozoiten, Schizonten, Gametozyten, Merozoiten) ermittelt werden.

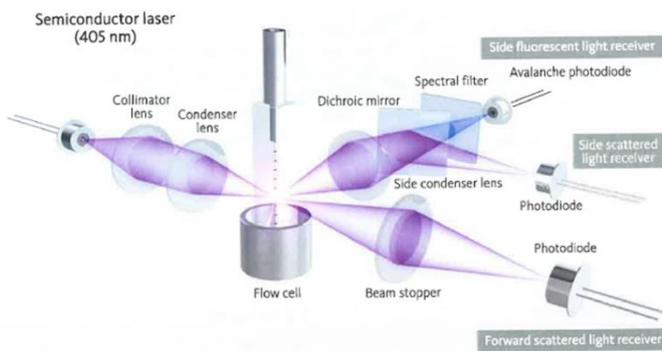


Abb. 10: Schematische Darstellung des Halbleiterlasers

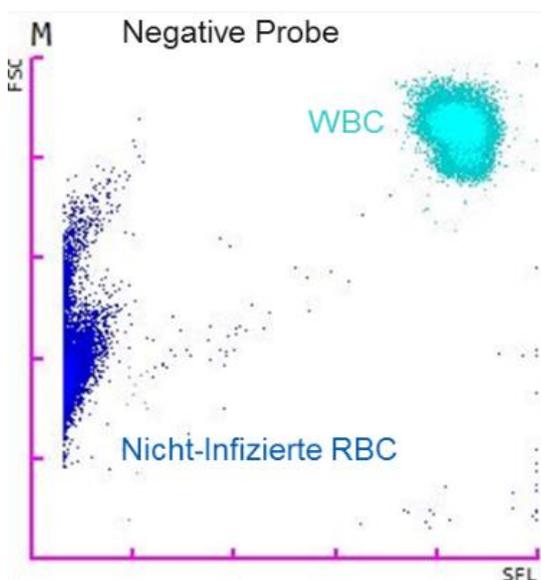


Abb.11: Negative Probe. Nicht-infizierte Erythrozyten (blau) zeigen nur ein sehr geringes SFL-Signal. Leukozyten stellen sich im M-Kanal mit einem hohen Vorwärtsstreuung- und einem hohen Fluoreszenzsignal dar und können numerisch erfasst werden.

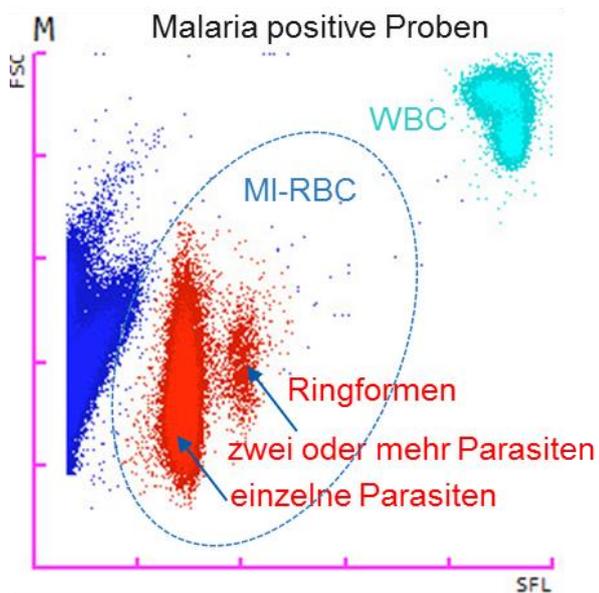


Abb. 12: Malaria positive Probe. Es werden Erythrozyten mit ein oder mehreren Ringformen erkannt. XN-31 triggert den Verdachtshinweis Malaria? (P.f) und weist auf eine mögliche Infektion durch Plasmodium falciparum hin.
MI-RBC# = $68.085 \times 10^3/\mu\text{L}$; MI-RBC% 1.6058 %

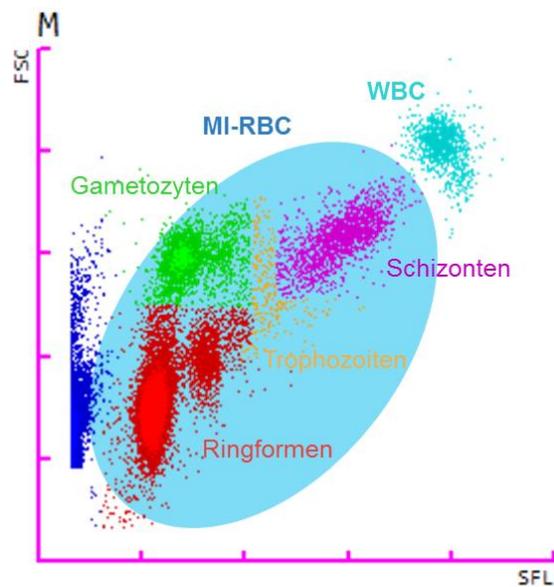


Abb. 13: Malaria positive Probe mit verschiedenen Lebenszyklusstadien. Neben mit Ringformen infizierter Erythrozyten wurden Trophozoiten, Schizonten und Gametozyten detektiert. XN-31 triggert den Verdachtshinweis Malaria? (others). Der Patient zeigte eine Plasmodium Vivax Infektion.

Die Bewertung „MI-RBC positive“ erfolgt ab einer Quantifizierungsgrenze von 20 Parasiten/ μL . Da sich Erythrozyten, die mit *P. falciparum* und *P. vivax* infiziert sind, in ihrer Größe unterscheiden, weisen die mit Ringformen parasitierten roten Blutkörperchen unterschiedliche Streulichtintensitäten auf. Darüber hinaus haben *P. falciparum* und *P. vivax* unterschiedliche Lebenszyklen und Eigenschaften. Durch die Kombination dieser Informationen kann XN-31 die Klassifizierung von Malariaarten vorschlagen. Folgende Verdachtshinweise kann XN-31 bei Malaria-positiven Proben anzeigen:

- Malaria? (P.f.) → Verdachtshinweis auf Befall mit Plasmodium falciparum
- Malaria? (others) → Verdachtshinweis auf Befall mit anderen Plasmodien als *P. falciparum*
- Malaria? (UNC) → Verdachtshinweis auf Malaria – unklassifizierte Malaria Spezies

Anhang:

Diagnostische Parameter im LM-Modus

Messkanal	Messprinzip	Analyse-Parameter	Bedeutung
M-Kanal Verdünnung 1:61	Fluoreszenz- Durchflusszytometrie mit einem Halbleiterlaser (455nm)	WBC	Leukozyten
		MI-RBC#	Anzahl Malaria-Infizierter Erythrozyten ermittelt aus dem M-Kanal
		MI-RBC%	Prozentualer Anteil der Malaria-Infizierten Erythrozyten berechnet an der Erythrozytenzahl
RBC/PLT Verdünnung 1:501	Mantelstrom Detektionsverfahren Impedanztechnologie	RBC	Erythrozyten (rote Blutzellen)
		HCT	Hämatokrit
		MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
		RDW-SD	Erythrozytenverteilungsbreite (Standardabweichung)
		RDW-CV	Erythrozytenverteilungsbreite (Variationskoeffizient)
		PLT	Thrombozyten
		MPV	Thrombozytenverteilungsbreite
		PDW	Mittleres Thrombozytenvolumen
		PCT	Plättchenkrit
		P-LCR	Prozentualer Anteil großer Thrombozyten
		MicroR	Anteil Mikro RBC
MacroR	Anteil Makro RBC		
RBC/ PLT & HGB	Berechnung	MCH	Mittleres korpuskuläres Hämoglobin
		MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
HGB Verdünnung 1:751	SLS-Hämoglobin- Methode	HGB	Hämoglobinkonzentration

Forschungsparameter im LM-Modus

Messkanal	Forschungsparameter	Bedeutung
M-Kanal	WBC-M	Leukozyten
	TNC-M	Gesamtzahl WBC + Malaria-Infizierte Erythrozyten berechnet im M-Kanal
	MEROZ#	Partikelzahl entspricht Merozyten
	RNG-RBC#	Partikelzahl entspricht Malaria-Ringformen
	TRPZ-RBC#	Partikelzahl entspricht Malaria-Trophozoiten
	SCHZ-RBC#	Partikelzahl entspricht Malaria-Schizonten
	GAMT#	Partikelzahl entspricht Gamentozyten
	RNG-RBC%M	Die Ratio der Partikel, die Malaria-Ringformen zu Malaria-infizierten RBC entsprechen, berechnet aus dem M-Kanal
	TRPZ-RBC%M	Die Ratio der Partikel, die Malaria-Trophozoiten zu Malaria-infizierten RBC entsprechen, berechnet aus dem M-Kanal
	SCHZ-RBC%M	Die Ratio der Partikel, die Malaria-Schizonten zu Malaria-infizierten RBC entsprechen, berechnet aus dem M-Kanal
	GAMT%M	Die Ratio der Partikel, die Malaria-Gametozyten zu Malaria-infizierten RBC entsprechen, berechnet aus dem M-Kanal
	WBM-X	Fluoreszenzintensität des WBC-Bereichs im M-Kanal
	WBM-Y	Vorwärtsstreulichtintensität des WBC-Bereichs im M-Kanal
	WBM-Z	Seitwärtsstreulichtintensität des WBC-Bereichs im M-Kanal
	WBM-WX	Verteilungsbreite Fluoreszenzlichtintensität der WBC-Wolke im M-Kanal
	WBM-WY	Verteilungsbreite der Vorwärtsstreulichtintensität der WBC-Wolke im M-Kanal
WBM-WZ	Verteilungsbreite der Seitwärtsstreulichtintensität der WBC-Wolke im M-Kanal	
RBC/ PLT	PLT-I	PLT-Zahl berechnet aus dem RBC/ PLT-Kanal (PLT-Verteilung)
	MicroR	Ratio der Micro-RBC
	MacroR	Ratio der Macro-RBC

Kontakt

- **Sysmex Deutschland GmbH** · Bornbarch 1, 22848 Norderstedt, Germany ·
Telefon +49 40 534102-0 · Fax +49 40 5232302 · xtra@sysmex.de · www.sysmex.de/xtra
- **Sysmex Suisse AG** · Tödistrasse 50 · 8810 Horgen ·
Telefon +41 44 718 38 38 · xtra@sysmex.ch · www.sysmex.ch/xtra ·
- **Sysmex Austria GmbH** · Lienfeldergasse 31-33 · 1160 Wien ·
Telefon + 43 1 486 16 31 · Telefax: + 43 1 486 16 31 25 · xtra@sysmex.at · www.sysmex.at/xtra