

Interpretation der Resultate des automatisierten Hämatogramms

Das Blutbild

Die Bestimmung der Blutbildparameter bildet die Grundlage bei der Diagnosestellung von hämatologischen und nicht hämatologischen Krankheiten sowohl im Spital- als auch im Praxisalltag. Das Differentialblutbild ist eine der am häufigsten angeforderten medizinischen Laboruntersuchungen. Die erhobenen Parameter liefern wegweisende Informationen, welche den behandelnden Arzt bei der Untersuchung des Patienten unterstützen. Mit den Ausführungen in diesem Artikel soll ein besseres Verständnis für die diagnostischen Applikationen und Messprinzipien der Hämatologie-Automaten erreicht werden, damit eine korrekte Interpretation der Resultate möglich wird.

In den vergangenen Jahrzehnten haben sich die Messtechnologien rasant weiterentwickelt. Die Messungen der hämatologischen Parameter werden heute automatisch mittels direkter Ankoppelung an Hämatologiestrassen vorgenommen. Vor Beurteilung der Ergebnisse ist es wichtig zu wissen, was die Geräte bezüglich gewünschter Diagnostik messen können und wo die Grenzen hinsichtlich Qualität und Machbarkeit liegen.

Messprinzipien der Hämatologie-Automaten

Eine der wichtigsten Messmethoden, welche die fehleranfällige, zeitaufwendige und Personal bindende Kammerzählung abge-

löst hat, ist die Impedanzmessung, auch Widerstandsmessprinzip genannt. Ein für das Gerät definiertes Probevolumen wird durch eine Kapillaröffnung geleitet. Passiert eine Zelle diese Messöffnung, wird eine elektrische Widerstandsänderung erzeugt, welche als elektrischer Impuls gemessen und erfasst wird. Dabei werden sowohl die Grösse, welche proportional zum analysierten Impuls ist, als auch die Anzahl der Impulsänderungen in einer bestimmten Zeit erfasst. Die erfassten Informationen werden bearbeitet, Erythrozyten-, Thrombozyten- oder Leukozytenzahl sowie das mittlere Zellvolumen (MCV) werden ermittelt und die Grössenverteilungskurven (Histogramme) angezeigt. Diese Methode wurde von Coul-



Dr. med. Adriana Méndez
Aarau

Dr. sc. nat. Saskia Brunner-Agten
Aarau

Prof. Dr. med. Andreas Huber
Aarau

TAB. 1 Zusammenstellung erhältlicher Geräte und entsprechende Messprinzipien		
Hersteller	Name	Messprinzipien
Sysmex	Grosse Geräte: XN-, XN-L- und XT-Serie	<ul style="list-style-type: none"> • Impedanzmessung: Erythrozyten und Thrombozyten • Fluoreszenz-Durchflusszytometrie: die verschiedenen Leukozytenpopulationen bzw. 5-part-Diff, Normoblasten, Retikulozyten, Thrombozyten) • SLS-Methode: Hämoglobinkonzentration
	Kleine Geräte: XP-300 und pocH-100i	<ul style="list-style-type: none"> • Impedanzmessung: Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten bzw. 3-part-Diff • SLS-Methode: Hämoglobinkonzentration
Siemens	Grosse Geräte: ADVIA-2120i, -560, -560L	<ul style="list-style-type: none"> • Impedanzmessung: Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten • Photometrische Lichtabsorptionsmethode: Hämoglobinkonzentration • Optische Lichtstreuung und -brechung: Leukozytendifferenzierung bzw. 5-part-Diff.
	Kleine Geräte: ADVIA 360	<ul style="list-style-type: none"> • Impedanzmessung: Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten bzw. 3-part-Diff • Photometrische Lichtabsorptionsmethode: Hämoglobinkonzentration
Beckmann Coulter	Grosse Geräte: UniCel DxH-801 und -2401	<ul style="list-style-type: none"> • Impedanzmessung oder Coulter-Prinzip: Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten • VCA (Volumen, Conductivity, Axial light loss): Normoblasten und Leukozytendifferenzierung • Oxyhämoglobin: Hämoglobinkonzentration
	Kleine Geräte: DxH 500 und UniCel DxH 600	<ul style="list-style-type: none"> • Impedanzmessung oder Coulter-Prinzip: Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten • Oxyhämoglobin: Hämoglobinkonzentration • Direktes optisches Verfahren: Leukozytenpopulationen bzw. 5-part-Diff • Interne Berechnung: Hämatokrit, MCH (mittleres korpuskuläres Hämoglobin) und MCHC (mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration)
Axonlab	Grosse Geräte: ABX Pentra-ES 60, -60, -60 C+, -DX und -DF Nexus	<ul style="list-style-type: none"> • Impedanzmessung: Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten • Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (DHSS Horiba Patent): die verschiedenen Leukozytenpopulationen bzw. 5-part-Diff • Thiazole Orange (Farbstoff für die Anfärbung der Nukleinsäuren) und Fluoreszenz-Durchflusszytometrie: Retikulozyten • Cyanmethämoglobin-Methode: Hämoglobinkonzentration
	Kleine Geräte: ABX Micros, Microsemi CRP	<ul style="list-style-type: none"> • Impedanzmessung: Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten bzw. 3-part-Diff • Cyanmethämoglobin-Methode: Hämoglobinkonzentration

ter 1953 patentiert und angewendet. In den letzten Jahren wurde der Fokus vor allem auf die Behebung der Fehleranfälligkeit, welche durch Störsignale, Rezirkulation von Partikeln und Koinzidenz entstehen, gelegt.

In einer nächsten Entwicklungsstufe wurde das elektrische Verfahren der Impedanzmessung mittels zusätzlichem Einsatz einer hydrodynamischen Fokussierung (Mantelstrom) verfeinert. Damit kann jedes einzeln durchlaufende Partikel in einem Dunkelfeld photoelektrisch erfasst werden, was die Zählgenauigkeit enorm steigert. Hier ist auch die Grösse der Ausschläge proportional zur Zellgrösse entscheidend. Die Leistungsfähigkeit dieser Methode wurde später durch den Einsatz von Laserstrahlen weiter gesteigert, welche die Messung des Streulichts in verschiedenen Winkeln erlaubt und hauptsächlich die verschiedenen Leukozytenpopulationen unterscheiden kann (siehe auch Erläuterungen zu 5-part-Diff). Später kam die Fluoreszenz-Flowzytometrie als weiteres Messprinzip zur Charakterisierung der einzelnen Blutzellklassen dazu. Mit Hilfe dieser Methode werden sowohl die intrazellulären Bestandteile als auch der RNA/DNA -Gehalt einer Zelle erfasst. Das Vorwärtsstreulicht (FSC: *forward-scattered light*) liefert Informationen über die Zellgrösse, das Seitwärtsstreulicht (SSC: *side-scattered light*) über die Granularität und die Seitwärtsfluoreszenz (SFL: *side fluorescence light*) über den Gehalt an RNA/DNA der Zelle. Hierbei werden die verschiedenen Leukozytenpopulationen, Retikulozyten und Thrombozyten sehr spezifisch und mit hoher Geschwindigkeit erfasst, differenziert und quantifiziert. Die Ergebnisse werden auf Scattergrammen und Histogrammen dargestellt. Einige moderne Hämatologie-Automaten sind in der Lage, anhand eines internen Regelwerks automatisch die Blutproben eines Patienten zu aliquotieren, mit Fluoreszenzfarbstoffen zu inkubieren und weiter zu analysieren. Dabei werden für den Patienten in kürzester Zeit zusätzliche wichtige Informationen erhoben.

Für die Messung des Hämoglobins wird das Molekül an Cyanmethämoglobin gebunden. Das Eisen wird in die dreiwertige Form oxidiert und anschliessend an das Cyanid-Anion gebunden. Dadurch wird das Hämoglobin stabil und kann photometrisch gemessen werden. Da sich diese Methode als nicht umweltfreundlich erwiesen hat, wurden andere Messmethoden entwickelt, wie z.B. die Natrium-Lauryl-Sulfat- (SLS-) Methode der Firma Sysmex GmbH. Hier wird das nach Erythrozytenlyse freigesetzte Hämoglobin oxidiert an SLS gebunden und photometrisch gemessen.

Die Kombination all dieser Methoden erlaubt die Messung von insgesamt über 80 Parametern, die eine exakte, weiterführende Analyse der Blutprobe erlaubt.

Wird eine Blutprobe von einem hämatologischen Gerät mittels eines Flagging-Systems als pathologisch markiert, ist die Herstellung eines Blutausriches für die erweiterte Diagnose notwendig. Einige moderne Hämatologie-Automaten verfügen bereits über einen Ausstrichautomaten und ein Digital-Mikroskop, welche in der Lage sind, anhand eines internen Regelwerks automatisch Blutausriche herzustellen, zu färben und mikroskopisch zu analysieren. Diese Systeme lassen sich heutzutage an eine Analytik-Strasse koppeln. Dadurch wird die Turn-Around-Time (TAT) bis zur vollständigen Probemessung verringert.

Allerdings stossen diese Messtechnologien an die Grenzen der technischen Möglichkeiten, insbesondere bei speziellen Fragestellungen (z. B. nach blastären Zellen), weshalb die Untersuchung der Blutprobe unter einem optischen Mikroskop durch eine erfahrene

ABB. 1 Graphische Darstellung in Form eines Histogramms

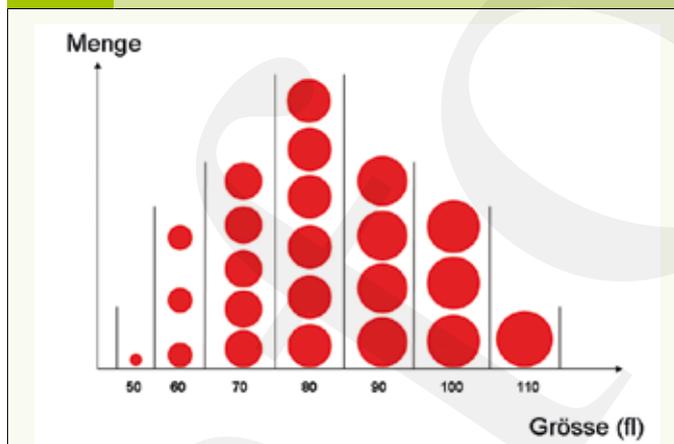
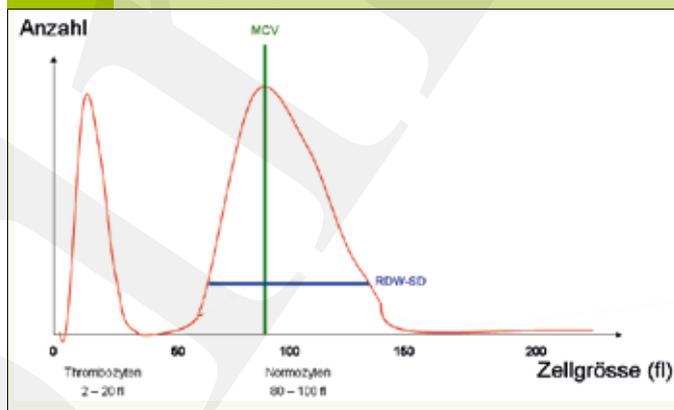


ABB. 2 Darstellung einer Verteilkurve für Thrombozyten (links) sowie Erythrozyten (rechts)



biomedizinische Analytikerin in ca. 10% aller Fälle trotzdem notwendig ist.

Die diagnostische Industrie bietet verschiedene «grosse und kleine» Hämatologie-Automaten an. Tabelle 1 liefert eine Übersicht über die verschiedenen Hersteller, Geräte und Messprinzipien.

Diagnostische Applikationen und Interpretationen der Resultate

In der Folge werden die diagnostischen Applikationen detailliert beschrieben und anhand einiger Beispiele erläutert. Wie oben erwähnt, verfügen die kleinen Hämatologie-Automaten, welche mehrheitlich in Arztpraxen eingesetzt werden, über das Messprinzip der Impedanzmessung zur Erfassung der Zellzählung und Zellvolumen der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Insgesamt messen diese Geräte bis zu 18 verschiedene Parameter. Dabei wird die Blutprobe mit einer isotonen Lösung verdünnt und durch eine Kapillaröffnung gezogen. Abhängig von der Grösse wird ein Impuls ausgelöst und erfasst, d.h. kleine Zelle – kleiner Impuls, grosse Zelle – grosser Impuls. Aus den verschiedenen Impulsen wird ein Histogramm (Abb.1) erstellt. Dadurch entstehen so genannte Verteilkurven (Abb.2), welche Auskunft über Menge und Grösse der Zelle geben.

Wie Abbildung 2 zeigt, liefert die Verteilungskurve Informationen über die Grösse der Erythrozyten anhand des mittleren korpusku-

lären Volumens (MCV) oder durchschnittlichen Zellvolumens aller gemessenen Erythrozyten und der Verteilung der Erythrozytenpopulation oder Erythrozytenanisozytose (RDW-SD). Diese Parameter sind einerseits für die Klassierung einer Anämie massgebend, d.h. beim Vorliegen einer Anämie erlauben diese Parameter die Unterteilung zwischen mikrozytär (< 80 fl), normozytär (80–100 fl) oder makrozytär (> 100 fl). Andererseits ist die Kurvenbreite bei einer Erythrozytenanisozytose, z. B. bei einer Hämolyse, beim Vorliegen von Sphärozyten und/oder Fragmentozyten sowie Retikulozyten entsprechend breiter (> 15%).

Abbildung 3 zeigt die Erythrozyten-Verteilkurven eines Eisenmangelanämie-Patienten, eines Patienten mit einer megaloblastären Anämie sowie eines Patienten mit einer autoimmunhämolytischen Anämie.

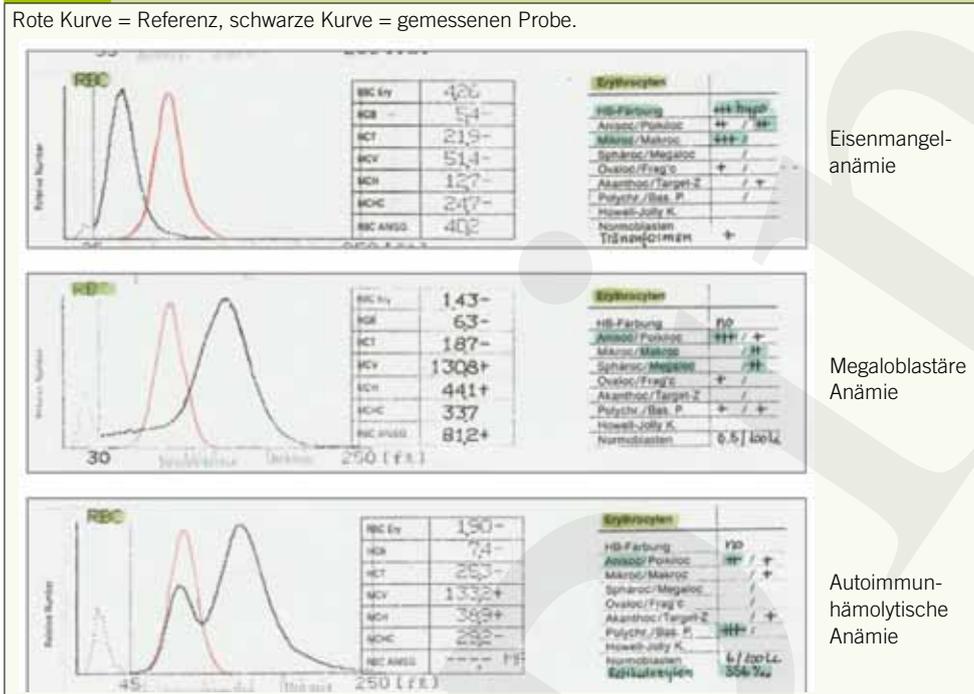
Geräte wie beispielsweise der ADVIA von Siemens liefern zusätzlich zu den Verteilkurven auch noch Scatterbilder (Abbildung 3b). Weiter lassen sich die Erythrozytenindizes (Mittleres zelluläres Volumen (MCV), mittlerer zellulärer Hämoglobingehalt (MCH), mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration (MCHC)) aus den Resultaten der Messungen ableiten. Diese werden in Abbildung 4 dargestellt.

Die Leukozyten werden ebenfalls mittels Impedanz erfasst und differenziert, wobei die Zellen vorgängig mit Lyseagenzien behandelt werden. Dies führt zur Lyse von Erythrozyten, zur Schrumpfung der Thrombozyten und zum Verlust von Zytoplasmahalt der Leukozyten. Je nach Hersteller werden andere Lysemittel verwendet, weshalb die Leukozyten an unterschiedlichen Positionen im Histogramm dargestellt werden. Deshalb ist es für die korrekte Histogramm-Beurteilung eminent wichtig zu wissen, welche Methode verwendet wurde.

Am Beispiel der Geräte Sysmex KX-Serie / Poch-i und ABX Micros kann die unterschiedliche Einteilung der Leukozytenpopulationen besser verstanden werden (Abbildungen 5, 6). Im Fall von Sysmex KX-21 N/Poch-100i liegen Monozyten, basophile und eosinophile Granulozyten im gleichen Histogrammbereich (3-part-Diff). 3-part-Diff steht für 3-Part-Differentialblutbild und umfasst die Vordifferenzierung der Leukozyten in drei Populationen: Lymphozyten, die Mischpopulation (mit Eosinophilen, Basophilen und Monozyten), sowie die Neutrophilen. Dies ist der Grund warum bei Monozytosen, Basophilie oder Eosinophilie ähnliche Kurven ermittelt werden. Bei Bedarf ist hier eine mikroskopische Differenzierung und/oder weiterführende Untersuchung der Probe in einem grossen Hämatologie-Automaten notwendig (5-part-Diff).

Abschliessend dürfen wir sagen, dass die automatischen Blutbildgeräte den Alltag im Hämatologielabor revolutioniert haben. Bereits mit kleinen Mengen Blut kann in kurzer Zeit eine grosse Anzahl Zellen analysiert werden. Je Gerät können über

ABB. 3 Beispiele für Verteilkurven der Erythrozyten bei Eisenmangelanämie, Megaloblastärer Anämie sowie einer autoimmunhämolytischen Anämie



Geräte wie beispielsweise der ADVIA von Siemens liefern zusätzlich zu den Verteilkurven auch noch Scatterbilder (Abbildung 3b).

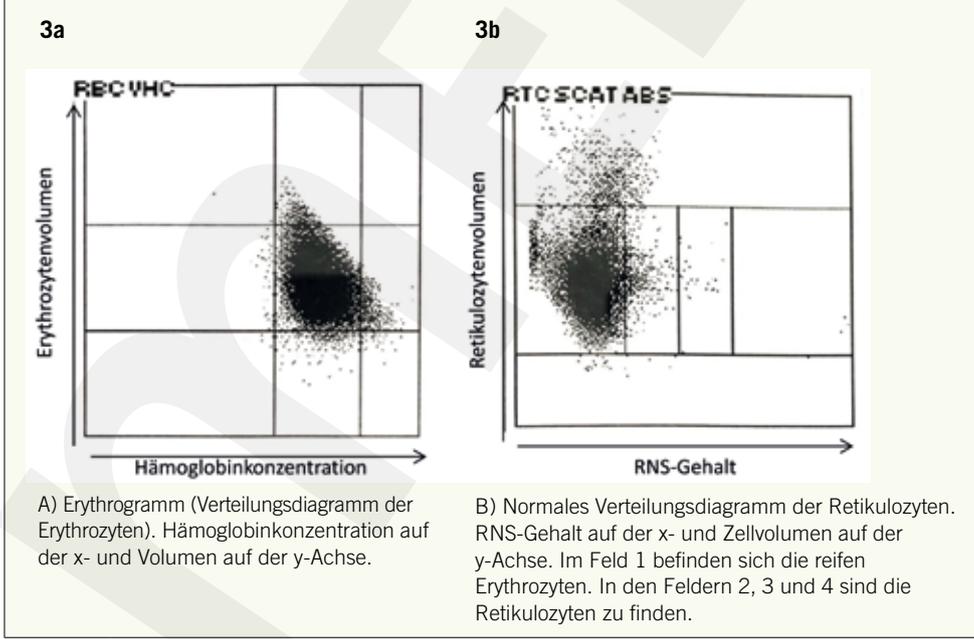


ABB. 4 Definition/Errechnung der Erythrozytenindizes

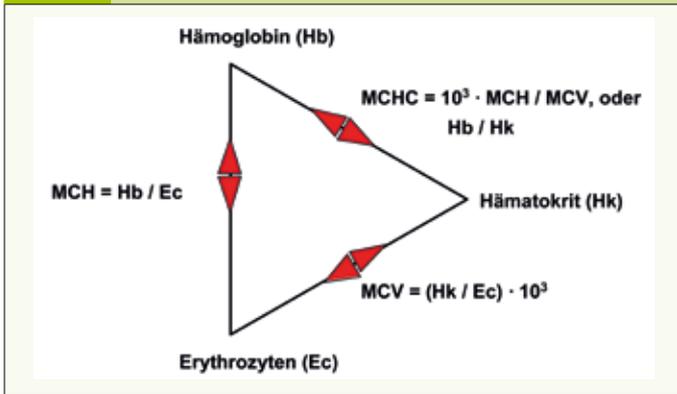
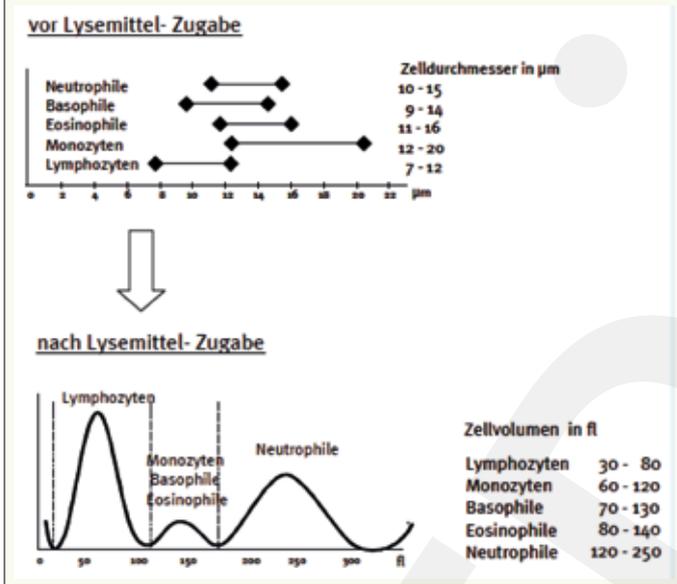


ABB. 5 Einfluss des Lysemittels auf die Verteilung der Leukozyten

hier am Beispiel eines kleinen Blutbildgerätes der Firma Sysmex (3-part-Diff)



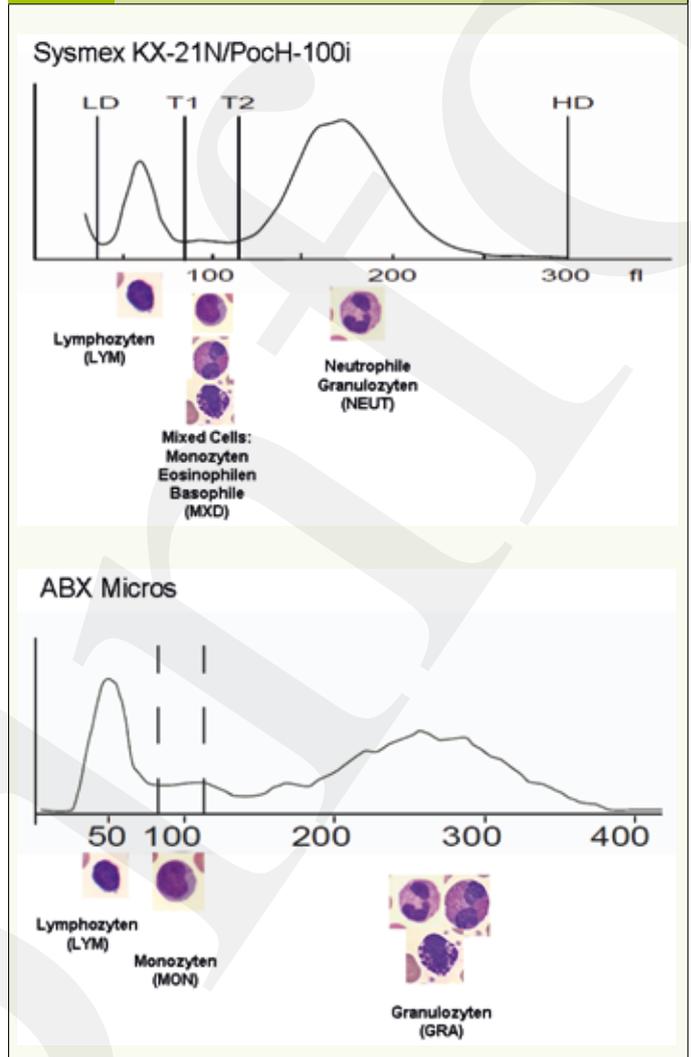
80 Parameter bestimmt werden. Da nicht bloss individuelle Zellen beschrieben, sondern die ganze Population betrachtet wird, können die Resultate auch in Form von Histogrammen und Scattergrammen dargestellt werden. Auch wenn jedes Gerät eine eigene Art hat, die Resultate in Form von Diagrammen darzustellen, so bleibt das Prinzip dahinter dennoch das gleiche. Diese Bilder – wenn auch oftmals vernachlässigt – liefern dem Arzt hilfreiche Informationen, welche teilweise zu «einfacher» Blickdiagnostik führen können.

Dr. med. Adriana Méndez
 Dr. sc. nat. Saskia Brunner-Agten
 Prof. Dr. med. Andreas Huber

Institut für Labormedizin
 Kantonsspital Aarau AG
 adriana.mendez@ksa.ch

+ **Interessenskonflikt:** Prof. Andreas Huber ist Consultant bei Sysmex und Siemens Healthcare.

ABB. 6 Vergleich Leukozytenpopulationen Sysmex KX-21N/ Poch-100i und ABX Micros



Take-Home Message

- ◆ Die automatischen Blutbildgeräte haben in den letzten ca. 70 Jahren den Alltag im Hämatologielabor revolutioniert. Die modernen Hämatologiegeräte sind heutzutage an eine Hämatologie-Strasse angebunden, was die Arbeit im Labor vereinfacht und effizienter macht
- ◆ Nichts desto trotz ist der menschliche Verstand notwendig um die Resultate im klinischen Kontext adäquat zu interpretieren
- ◆ Bereits mit kleinen Mengen Blut kann in kurzer Zeit eine grosse Anzahl Zellen analysiert und je nach Gerät über 80 Parametern bestimmt werden. Da nicht bloss individuelle Zellen beschrieben, sondern die ganze Population betrachtet wird, können die Resultate auch in Form von Kurven, Histogrammen und Scattergrammen dargestellt werden. Diese Bilder können dem Arzt auf einen Blick häufig hilfreiche Informationen liefern.

Literatur:

1. Broschüre der Firmen: Sysmex AG, Siemens AG (Advia), Beckmann Coulter und AxonLab AG.
2. Bucher U. Labormethoden in der Hämatologie. Verlag Hans Huber.
3. Steiger A., Fried R. Blickpunkt Hämatologie. Die automatisierte Analyse des roten Blutbildes. MQZH 2010-04
4. Steiger A., Fried R. Blickpunkt Hämatologie. Die automatisierte Differenzierung der Leukozytensubtypen. MQZH 2013-03