

## **Histogramm-Interpretation WBC für die 3-part-Diff-Systeme XP-300 und pochH-100i**

Xtra Schweiz / Herbst 2014 / Nr. 03

Sysmex XP-300 und pochH-100i sind automatische Hämatologie-Analysesysteme mit einer 3-part-Differenzierung. Dies umfasst die Vordifferenzierung der Leukozyten in 3 Populationen: 1. Lymphozyten, 2. Mischpopulation (Eosinophile, Basophile und Monozyten), 3. Neutrophile.

Die Systeme sind von kompakter Grösse, robust und leicht zu bedienen, sie können sowohl in der klassischen Laborumgebung als auch direkt am Point-of-Care eingesetzt werden. Der pochH-100i kommt daher häufig in modernen Arztpraxen, Gesundheitszentren oder auf der Krankenhausstation zum Einsatz, wenn diagnostisch qualitativ hochwertige Ergebnisse zeitnah vorliegen müssen.

Auf Grund der hohen Zählmenge der Zellen sind selbst kleine Hämatologiesysteme äusserst genau. Was ist jedoch, wenn Interferenzen im Blut keine eindeutige Trennung der einzelnen Zellpopulationen zulassen und Messwerte produzieren, die als unzuverlässig angezeigt werden? Dieses Themenblatt wird Ihnen eine Übersicht darüber geben, wie WBC-Histogrammkurven richtig interpretiert werden können und welche Schlussfolgerungen daraus gezogen werden müssen.



**Abb. 1** XP-300



**Abb. 2** pochH-100i

## Teil 1: Technologie

### Impedanzmessung

An allen 3-part-Diff-Systemen wird für die WBC- als auch für die RBC- und PLT-Messung die Impedanzmessung (Widerstandsmessung) zur Zählung der Zellen durchgeführt. Durch den zusätzlichen Einsatz einer hydrodynamischen Fokussierung (Mantelstrom) wird die Zählgenauigkeit enorm gesteigert.

Für die WBC-Messung werden alle Erythrozyten mit einem Lyse-reagenz vollständig lysiert, um eine Trennung von RBC und WBC nach ihrer Zellgrösse zu ermöglichen. Darüber hinaus hat das spezielle Lyse-reagenz Einfluss auf die Grösse der verschiedenen Leukozytenpopulationen. Es bewirkt eine Schrumpfung der Leukozyten in unterschiedlichem Ausmass und ermöglicht somit eine Einteilung in 3 Subpopulationen (siehe Abb. 3). Um neutrophile Granulozyten als separate Zellgruppe zählen zu können, setzt Sysmex ein spezielles Reagenz ein. Damit ist auch in kleinen Praxen ein Monitoring dieser Zellgruppe ohne zeitaufwendige mikroskopische Differenzierung möglich.

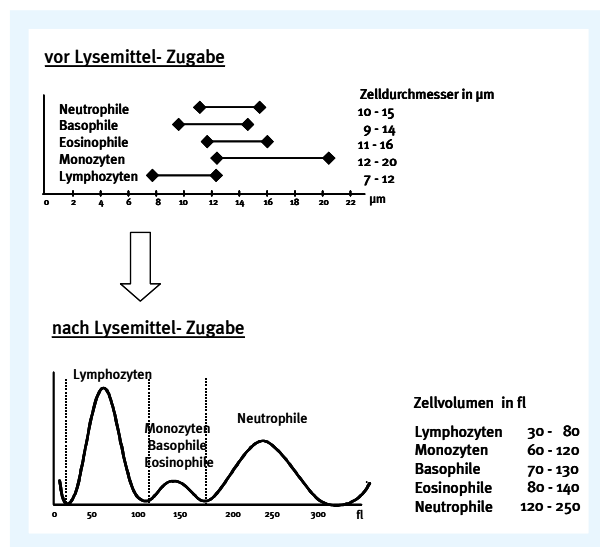


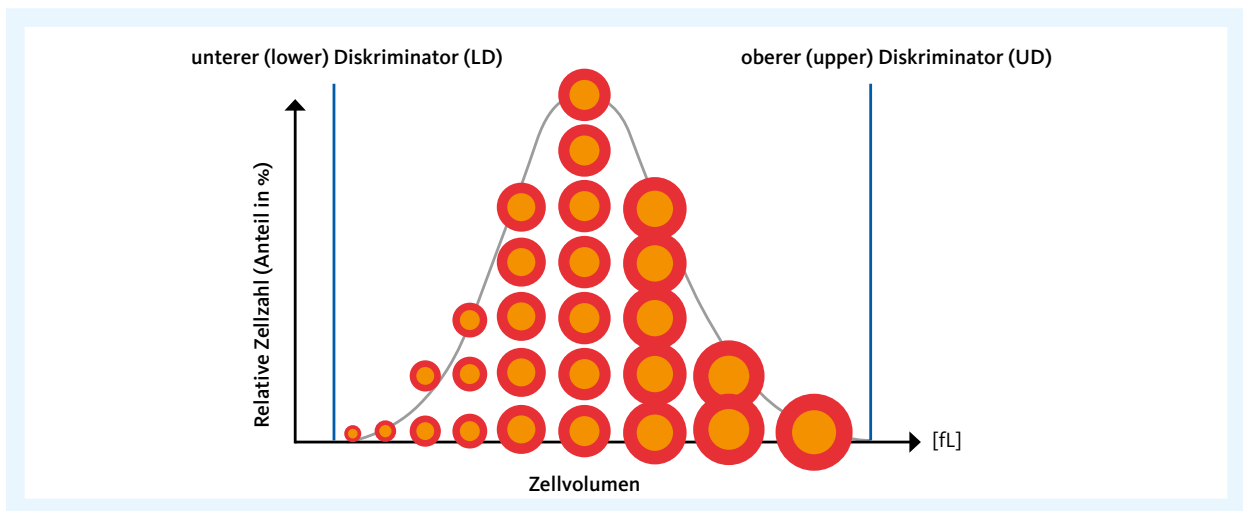
Abb. 3 Einfluss des Lyse-reagenz auf Leukozyten

Für die Messung wird eine genau definierte Verdünnung in den Detektor eingespritzt. Ein Mantelstrom verbessert die Messgenauigkeit der Resultate, weil die Zellen einzeln und mittig durch die Messkapillare geleitet werden.

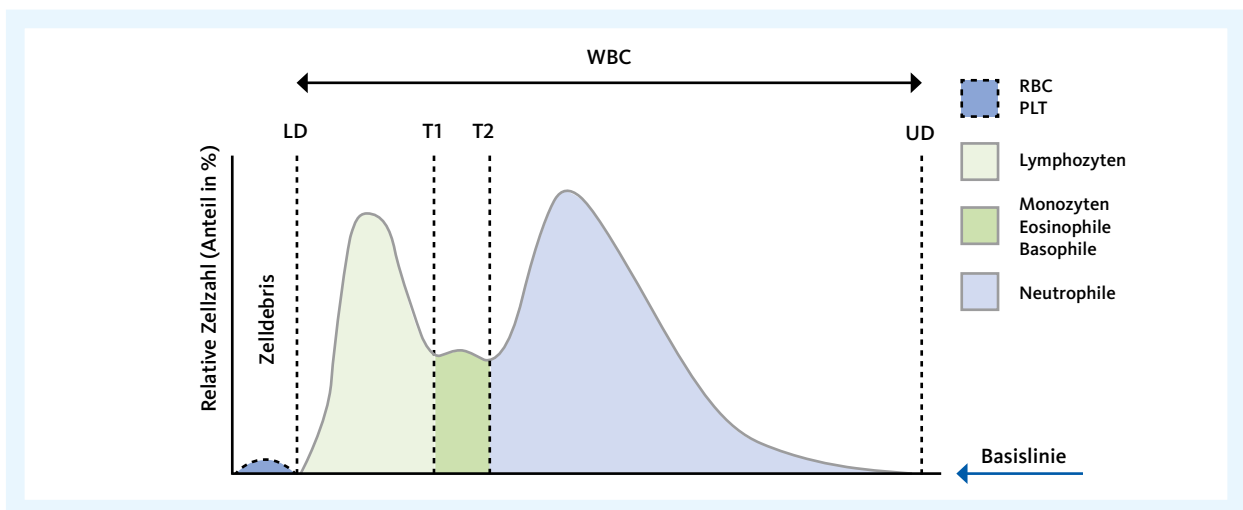
Während die Zellen die Kapillare passieren, verursachen sie einen elektrischen Widerstand, der als elektrischer Impuls aufgezeichnet wird. Das Volumen der Zelle ist direkt proportional zum gemessenen Impuls. Alle Impulse werden registriert, elektronisch verarbeitet und auf Basis ihrer Grösse sortiert. Graphisch dargestellt ergeben sich dadurch sogenannte Verteilungskurven (Histogramme). Die Impuls- bzw. Zellzählung beginnt am unteren (lower) Diskriminator und endet mit dem oberen (upper) Diskriminator.

**Das Histogramm:**

Ein Histogramm ist eine grafische Darstellung der Zellvolumenverteilung der unterschiedlichen Blutzellen. Auf der Y-Achse wird die relative Zellzahl dargestellt, der Peak der Verteilungskurve wird gleich 100% gesetzt. Die X-Achse repräsentiert das Zellvolumen in Femtoliter (fL).



**Abb. 4** Graphisches Beispiel einer RBC-Histogramm-Kurve



**Abb. 5** Die WBC-Histogrammkurve LD = unterer (lower) Diskriminator (flexibel); UD = oberer (upper) Diskriminator (fest).

Alle Impulse zwischen LD und UD werden als Leukozyten gezählt. T1 und T2 sind flexible Diskriminatoren, die die Leukozyten in 3 Subpopulationen trennen. Fraktion 1: Lymphozyten; Fraktion 2: Mischpopulation von Monozyten, Eosinophilen und Basophilen; Fraktion 3: Neutrophile.

## Teil 2: Warnhinweise der WBC-Ergebnisdarstellung

### Warnhinweise (Fehlermeldungen) der Leukozytenzählung:

WL = Fehler am unteren (lower) Diskriminator WBC

WU = Fehler am oberen (upper) Diskriminator WBC

AG = Hinweis auf Aggregate

### Warnhinweise (Fehlermeldungen) der Leukozytendifferenzierung:

T1 oder T2 = keine Trennung einzelner Populationen möglich –  
3-part-Differenzierung gesperrt

F1, F2 oder F3 = 3-part-Differenzierung aufgrund Überlappung einzelner Zellbereiche nur  
unzureichend möglich. Die Differenzierung sollte überprüft werden.

### Merke

Im Idealfall beginnt und endet eine Verteilungskurve immer an der Basislinie (X-Achse). Die erhaltenen Ergebnisse sind dabei als verlässlich anzusehen. Beginnt eine Histogrammkurve höher als 20% der Gesamtkurve oder endet höher als normal, zeigt dies Messinterferenzen an. Das System markiert das Analyseergebnis entsprechend mit einem Hinweis. [Interferenzen sind Faktoren (z.B. Zellen oder Artefakte), die die korrekte Messung einer Zellklasse stören können.]

### Warnhinweis »WL«

Der Warnhinweis »WL« wird vor dem WBC-Ergebnis angezeigt. Es zeigt an, dass das WBC-Ergebnis durch Interferenzen beeinflusst ist und einer Überprüfung bedarf. »WL« steht dabei für Fehler am unteren (lower) Diskriminator.

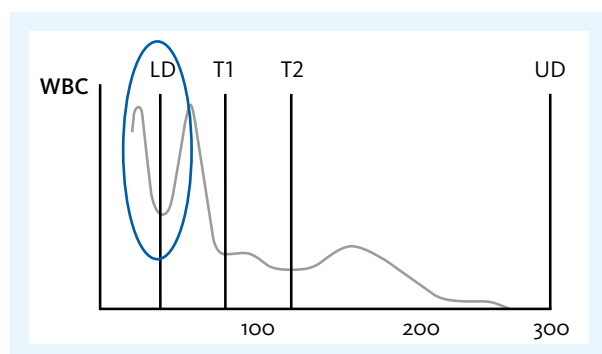


Abb. 6 WBC-Histogrammkurve mit einem abnormalen Kurvenverlauf am unteren Diskriminator (LD)

### Mögliche Interferenzen:

- Lyseresistente Erythrozyten
- Thrombozytenaggregate: z. B. EDTA-Unverträglichkeit oder Gerinnsel in der Probe
- Erythroblasten (NRBC, nucleated red blood cells)
- Kälteagglutination (selten)

**Merke**

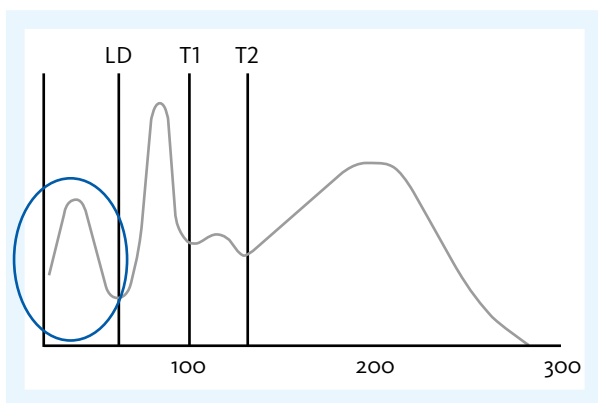
Das WBC-Ergebnis und alle Parameter, die mit »WL« markiert sind, müssen kontrolliert werden. Das WBC-Ergebnis kann falsch hohe Werte zeigen. Proben mit Lyseresistenten Erythrozyten können verdünnt gemessen werden, um korrekte Ergebnisse zu erzielen. Proben mit Thrombozytenaggregaten bedürfen einer erneuten Blutabnahme (siehe Teil 3). Neben dem Hinweis »WL« kann zusätzlich auch das PLT-Ergebnis mit »PU« markiert sein und verstärkt auf eine Thrombozytenaggregation hinweisen.

**Warnhinweis »AG«**

Der Warnhinweis »AG« weist auf eine abnormale Höhe/Peak der Histogrammkurve vor dem unteren Diskriminator der WBC-Kurve hin. Das WBC-Ergebnis wird dabei jedoch nicht bzw. nur geringfügig beeinflusst.

**Merke**

Da zumeist PLT-Aggregate die Ursache sind, sollte unbedingt das Thrombozytenergebnis überprüft werden.

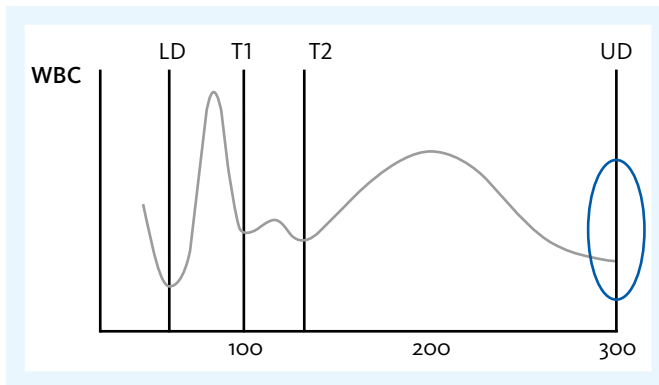
**Mögliche Ursachen:**

- Thrombozytenaggregate  
(z. B. EDTA-Unverträglichkeit, Gerinnsel)
- Erythroblasten  
(NRBC, nucleated red blood cells)
- Lyse-resistente Erythrozyten

**Abb. 7** WBC-Histogrammkurve mit einem Peak vor dem unteren Diskriminator. Der Warnhinweis »AG« wird generiert

**Warnhinweis: »WU«**

Der Warnhinweis: »WU« deutet auf einen Fehler am oberen Diskriminator der WBC-Histogrammkurve hin.



**Abb. 3** WU-Warnhinweis am oberen Diskriminator

**Mögliche Ursachen:**

- extreme Leukozytose
- selten: WBC-Agglutination oder Satellitenphänomen

Alle WBC-Parameter sollten kontrolliert werden. Das WBC-Ergebnis kann falsch niedrig sein.

**Erläuterung:**

Die Histogrammkurve kommt am oberen Diskriminator nicht mehr auf die Basislinie zurück. Die Ursache hierfür kann eine hohe Anzahl extrem grosser Partikel sein. Häufig sind dies WBC-Agglutinate, beispielsweise eine Leukozytenagglutination durch PLT-Satellitose. Im seltenen Fall einer Thrombozyten-Satellitose sollte Citrat als Antikoagulant verwendet werden, um eine Verklumpung zu vermeiden.

Ein »WU« Fehler kann jedoch auch erscheinen, wenn die Linearität der WBC überschritten ist und die Zellen auf Grund der hohen Zellzahl die Kapillare nicht mehr einzeln passieren können. Eine Verdünnung der Probe (z. B. 1:2 oder 1:5 – je nach Schwere der Leukose) kann helfen, den richtigen WBC-Wert zu ermitteln. Eine Verdünnung sollte immer mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%ige NaCl-Lösung) oder mit Cellpack erfolgen. Die verdünnte Probe sollte möglichst zeitnah gemessen werden, da die Verdünnungslösung einen Effekt auf die Zellen ausüben kann (z. B. MCV). Die Ergebnisse der verdünnten Probe, die im Vollblutmodus gemessen wurden, müssen entsprechend der Verdünnung multipliziert werden.

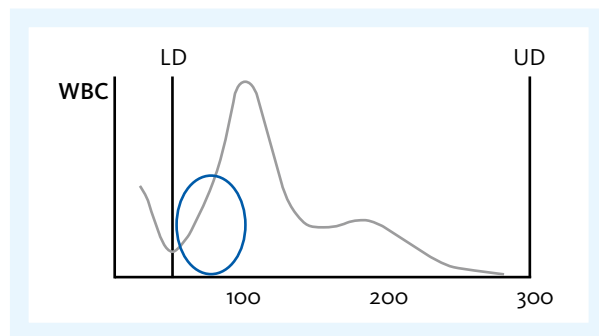
Eine extreme Leukose kann sowohl bei akuten als auch chronischen Leukämien (z. B. CML) beobachtet werden. Eine Differenzierung der pathologischen Zellen ist mit der 3-part-Differenzierung nicht möglich. Daher wird eine mikroskopische Befundung empfohlen.

### Wichtig

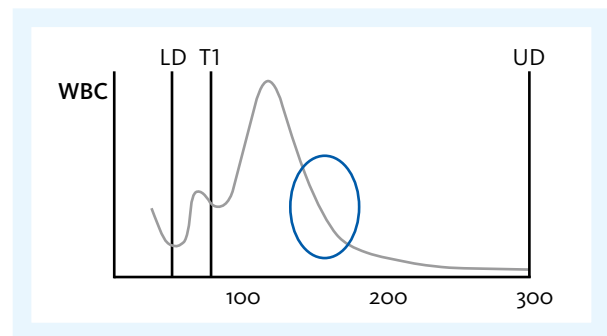
Im Falle von Aggregaten (Ausstrichkontrolle), sollte eine erneute Abnahme stattfinden (siehe Teil 3). Bei einer extremen Leukose (WBC-Ergebnisse oberhalb des Linearitätsbereiches) sollte die Probe verdünnt und erneut gemessen werden.

### Warnhinweise »T1«, »T2« sowie »F1«, »F2« und »F3« (Vordifferenzierung)

T1 und T2 sind die »Tal-Diskriminatoren« der WBC-Histogrammkurve. Sie werden gesetzt, um die WBC in drei Populationen einteilen zu können. Diese Diskriminatoren sind flexibel. T1 trennt Lymphozyten von der Mischpopulation, T2 separiert Zellen der Mischpopulation und Neutrophilen. Erscheinen diese Warnhinweise neben Ergebnissen der Vordifferenzierung, kann kein »Tal« in der Histogrammkurve gefunden und die Trennung der Zellpopulation nicht vorgenommen werden. Folglich werden die Ergebnisse der Vordifferenzierung gesperrt.

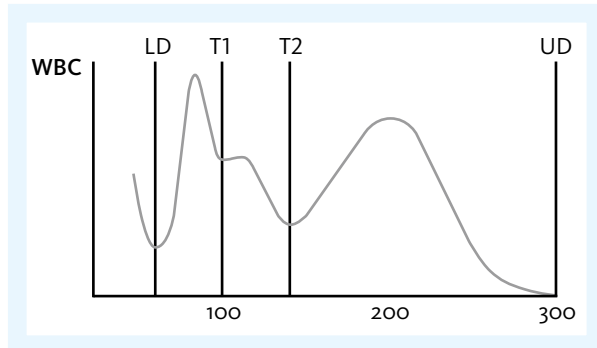


**Abb. 9a** Markierung »T1« - Keine Trennung zwischen Lymphozyten und der MXD-Population.  
Mögliche Ursache: Abnormale WBC



**Abb. 9b** Markierung »T2« - Keine Trennung zwischen MXD und Neutrophilen.  
Mögliche Ursache: Abnormale WBC

Die Meldungen »F1«, »F2« und »F3« beziehen sich ebenfalls auf die Vordifferenzierung. Diese Meldungen weisen darauf hin, dass die Ergebnisse aufgrund überlappender Zellpopulationen nicht korrekt ermittelt werden können und einer Überprüfung bedürfen.



**Abb. 10** Die Meldungen »T1«, »T2« und »T3« beziehen sich ebenfalls auf die Vordifferenzierung

Die Diskriminatoren T1 und/oder T2 können gesetzt werden, die einzelnen WBC-Populationen überlappen sich jedoch und können nicht adäquat voneinander getrennt werden. Die Ergebnisse werden markiert und mit einem Stern versehen. Die Differenzierung sollte überprüft werden.

### Mögliche Ursachen:

Die Meldungen »T1«, »T2«, »F1«, »F2« und »F3« deuten auf eine abnormale Verteilung der Leukozytenpopulationen bzw. auf pathologische oder unreife weisse Blutzellen hin.

### Merke

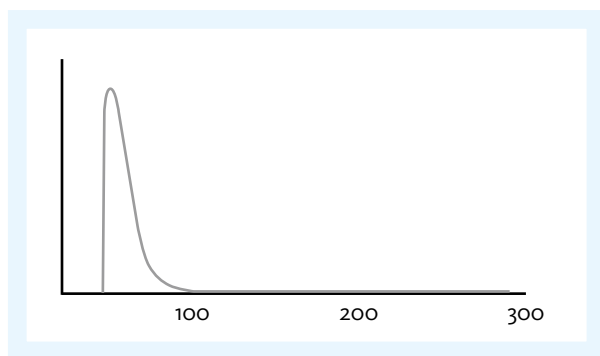
Eine auffällige Vordifferenzierung sollte bei unbekanntem Patienten zeitnah durch eine moderne 5-part-Differenzierung und/oder durch eine mikroskopische Beurteilung abgeklärt werden. Die Gesamtleukozytenzahl ist korrekt, insofern keine weiteren Hinweise für ein unplausibles WBC-Ergebnis vorliegen (z. B. »WL« oder »WU«).



## Teil 3: Interferenzen die die Impedanzmessung von Leukozyten stören können:

### Lyseresistente Erythrozyten:

Nicht vollständig lysierte RBC können z. B. auf eine erhöhte Osmotische Resistenz zurückzuführen sein. Sie produzieren zumeist ein falsch hohes Leukozytenergebnis. Sogenannte Lyseresistente Erythrozyten kommen unter anderem bei Patienten mit schweren Leberfunktionsstörungen (z. B. bei Alkoholismus und HIV-Erkrankung) sowie bei Thalassämien und anderen Hämoglobinopathien vor. Physiologisch sind Lyseresistente Erythrozyten jedoch auch bei Neugeborenen zu beobachten. Um dennoch ein korrektes Ergebnis messen zu können, kann die Probe mit Cellpack oder mit physiologischer NaCl-Lösung (0,9% NaCl-Lösung) verdünnt und erneut gemessen werden. In den meisten Fällen reicht eine Verdünnung 1:2 aus (In dem Fall müssen die Ergebnisse mit dem Faktor 2 multipliziert werden). Beachte: Für eine korrekte Trennung der einzelnen Zellpopulationen sollte die Histogrammkurve zwischen zwei Populationen die Basislinie erreichen.



**Abb. 11** Beispiel eines typischen WBC-Histogramms mit einer extrem hohen Anzahl Lyseresistenter Erythrozyten (Rutschbahnkurve)

Beispiel (Abb. 11): Der WBC-Wert wurde mit »WL« markiert und mit  $98 \times 10^3$  Leukozyten pro Mikroliter angezeigt. Um ein korrektes WBC-Ergebnis zu erzielen, muss die Probe soweit verdünnt werden, bis alle Erythrozyten lysiert werden können. Eine korrekte Messung kann daran erkannt werden, dass die WBC-Histogrammkurve an der Basislinie beginnt. Das WBC-Ergebnis das durch eine verdünnte Probe ermittelt werden konnte, war  $9,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ .

## Thrombozytenaggregate

### a) Thromboaggregate durch inkorrekte Blutabnahme:

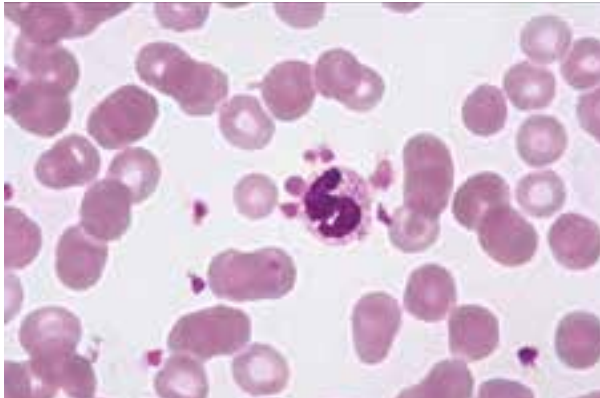
Proben, in denen sich Thrombozytenaggregate befinden, müssen erneut abgenommen werden, um korrekte Ergebnisse zu erzielen. Thrombozytenaggregate können durch eine inkorrekte Abnahme und/oder fehlende Mischung der frischen Blutprobe entstehen und eine ausgeprägte Thrombozytopenie vortäuschen. Grosse Aggregate (Gerinnsel) können ggf. im Röhrchen makroskopisch erkannt werden, zumeist sind sie jedoch mikroskopisch klein (Mikrogerinnsel) und nur im gefärbten mikroskopischen Blutaussstrich sichtbar. Merkmal: eine Probe mit PLT-Aggregaten weist zumeist in Wiederholungsmessungen sehr stark schwankende Werte auf (Aggregate sind nicht gleichmässig verteilt.)

### b) Thrombozytenaggregate durch EDTA-Unverträglichkeit:

Thrombozytenaggregate können jedoch auch in vitro durch eine Unverträglichkeit des Blutes mit dem Antikoagulant EDTA entstehen. Eine erneute Abnahme sollte dann mit einem alternativen Antikoagulant durchgeführt werden. Die meisten Labore verwenden bei dem Verdacht einer EDTA-Unverträglichkeit für die Bestimmung der Thrombozyten ein Citrat-Röhrchen. In sehr seltenen Fällen wurden bereits Citrat-Unverträglichkeiten beobachtet, so dass die Messung entweder sofort nach der Abnahme oder mit einem weiteren Antikoagulant durchgeführt werden sollte.

### c) Thrombozytenaggregate durch Thrombozytensatellitose:

Die Thrombozyten-Satellitose ist eine besondere Form der Pseudothrombozytopenie. Ähnlich wie bei einer EDTA-Unverträglichkeit führt dieses Phänomen in vitro durch den Einfluss von EDTA und anderen bisher nur unzureichend bekannten Einflüssen zu einer Pseudothrombozytopenie. Bei der PLT-Satellitose heften sich Thrombozyten an die Oberfläche der Leukozyten – wobei vornehmlich nur neutrophile Leukozyten betroffen sind, so dass sich Mikrogerinnsel aus Thrombozyten und Neutrophilen bilden können. Messtechnisch kann dies durch ein unzuverlässiges Leukozytenergebnis (»WU«-Warnhinweis) und einer Thrombozytopenie bemerkbar machen. Dieses Phänomen kann im mikroskopischen Blutaussstrich bestätigt werden und macht eine erneute Blutabnahme mit einem alternativen Antikoagulant unverzichtbar.



**Abb. 12** PLT-Satellitose – Thrombozyten heften sich rund um einen Neutrophilen.

### Merke

Erkennung von Thrombozytenaggregaten: Warnhinweise »WL« oder »AG« und unbekannte Thrombopenien sollten auf Aggregate überprüft werden.

### Erythroblasten (NRBC, nucleated red blood cells)

Des Weiteren können Proben, die sehr viele Erythroblasten (unreife und kernhaltige Erythrozytenvorstufen) enthalten, den WBC-Wert interferieren. Die Kerne der Erythroblasten lassen sich nicht lysieren und können je nach Reifegrad ähnlich gross sein wie Lymphozyten. In diesem Fall kann das WBC-Ergebnis mittels mikroskopischer Zählung der NRBCs auf 100 Leukozyten korrigiert werden.

$$\text{WBC-Wert (Analysesystem)} \times 100 \div \text{NRBC-Zahl (morphologische Zählung)} + 100$$

Der Begriff »NRBC (nucleated red blood cells)« – bezeichnet kernhaltige Vorstufen der roten Blutzellen, bekannt als Erythroblasten oder – veraltet – Normoblasten. NRBC finden sich beim gesunden Erwachsenen und älteren Kind nur im blutbildenden Knochenmark, wo sie heranreifen. Ihr Auftreten im peripheren Blut deutet auf eine extramedulläre Erythropoese (Blutbildung ausserhalb des Knochenmarks) oder eine Störung der Blut-Knochenmark-Schranke hin. Beides kommt nur im Rahmen ernsthafter Erkrankungen vor. Lediglich bei Früh- und Neugeborenen treten NRBC physiologisch im zirkulierenden Blut auf.

### Merke

Das Vorkommen von NRBC ist in den allermeisten Fällen pathologisch und sollte dokumentiert werden. Häufig sind sie Begleiter von hämolytischen Anämien, Thalassämien, hämatologischen Systemerkrankungen wie MDS oder Leukämien und schweren Blutungen. Sie kommen jedoch auch bei einem allgemein kritischen Gesundheitszustand vor (z. B. bei Traumpatienten auf der Intensivstation). Zudem können hohe NRBC-Werte (z. B. bei Frühgeborenen) den WBC-Wert stark verfälschen, so dass eine manuelle Korrektur oder die Messung an einem Sysmex 5-part-Analysesystem inkl. NRBC-Zählung (z. B. XN-1000) notwendig ist.

Weiterführende Informationen hierzu finden Sie auch in unserem Themenblatt: Xtra Schweiz / März 2012 / Nr. 10 Die klinische Relevanz der Bestimmung von NRBC im kleinen Blutbild durch die XN-Serie [www.sysmex.ch/xtra](http://www.sysmex.ch/xtra)

Weitere Befundbeispiele für die Hämatologiesysteme XP-300 finden Sie in unserem Fallbeispiel-Booklet XP-Serie, welches Sie über Ihren zuständigen Sysmex Aussendienstmitarbeiter bestellen können.

Viele weitere themensortierte Informationen aus der Hämatologie finden Sie auf unserer Webseite im Bereich Akademie: [www.sysmex.ch/akademie](http://www.sysmex.ch/akademie)