

Monozytenzählung: Manuelle und automatische Zählmethoden im Vergleich

Beim Vergleich zwischen manueller und automatisierter Zelldifferenzierung treten im Hinblick auf die Monozytenzahl folgende Fragen immer wieder auf:

- Warum sind die Monozytenwerte der manuellen Differenzierung niedriger als die der automatischen?
- Warum gibt es unterschiedliche Referenzwerte für manuell und automatisch ermittelte Monozytenwerte?

Die Ursachen für die unterschiedlichen Monozytenergebnisse sind sowohl in der Methodik, in der Statistik als auch in der Adhärenz der Monozyten zu finden.

Methoden

Manuelle Differenzierung

Die Ausstrichqualität nach Pappenheim oder Wright unterliegt vielen bekannten Einflussgrößen, wie z.B. fettfreier Objektträger, Qualität des Ausstrichgläschens, Ausstrichwinkel und Färbung. Des Weiteren ist insbesondere der Monozyt eine adhärente Zelle. Somit bieten die Glasoberflächen der Objektträger und die geschliffene Glaskante des Ausstrichgläschens hervorragende Haftflächen für diese Leukozytensubpopulation. Dadurch lagern sich die Monozyten vermehrt in den Randzonen des Ausstrichs an.^[1]

Da die Differenzierung normalerweise im mittleren Bereich des Ausstrichs erfolgt, in dem sich überwiegend kleinere Zellen (z. B. Lymphozyten) befinden, werden die sich in der Randlage befindenden Monozyten nicht mit in die Differenzierung einbezogen, sodass sich allein aus dieser Differenzierungsmethode der oft niedrigere Monozytenwert erklärt.^[10]

X-CLASS Technologie: Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

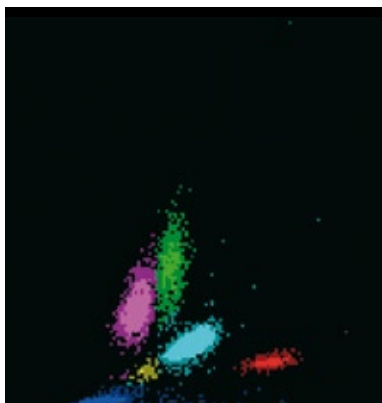


Abb. 1 DIFF-Scattergramm xs-Serie



Abb. 2 DIFF-Scattergramm xT- und xE-Serie

Im DIFF-Kanal der x-CLASS Systeme werden bei der xE- und xT-Serie vier Populationen (Neutrophile, Eosinophile, Lymphozyten und Monozyten) und in der xs-Geräteserie fünf Zellpopulationen bestimmt (vier Populationen + Basophile). Für die Messung wird ein Reagenziensystem, bestehend aus einer Kombination von Lysereagenz

und Fluoreszenzfarbstoff, verwendet und mit dem Blut verdünnt. Die erstgenannte Reagenzkomponente, das Lysereagenz (STROMATOLYSER-4DL), lysiert während dieses Vorgangs alle Erythrozyten und perforiert die Zellmembranen der Leukozyten. Der Fluoreszenzfarbstoff (STROMATOLYSER-4DS) kann anschließend in die Zelle eindringen und an die im Kern und Zytoplasma vorhandenen Nukleinsäuren binden. Dadurch sind Rückschlüsse auf die Zellaktivität und den Reifegrad der Leukozyten möglich. Bei diesem Prozess bleiben die Zellen weitestgehend intakt. Nach der Inkubationszeit wird die Probe unter Verwendung des Halbleiterlasers durchflusszytometrisch analysiert.

Beim Passieren der Durchflusszelle werden die Fluoreszenzintensität und das Seitwärtsstreulicht der Zellen gemessen. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zum RNA/DNA-Gehalt der Zelle und gibt Informationen über die Zellreife und die Zellaktivität. Die Seitwärtsstreulichtintensität ist abhängig von der Granulation der Zelle und der Größe oder Lobularität (Segmentkernigkeit) des Kerns, reflektiert also die interne Zellstruktur. Zur weiteren Zellanalyse werden die beschriebenen Messsignale individuell von jeder Zelle simultan erfasst und in so genannten »Scattergrammen« (Punktwolkendiagrammen) dargestellt. Einzelne Punkte in den Scattergrammen repräsentieren die Messdaten der dazugehörigen Zelle. Diese Punkte können dann zu Populationen zusammengefasst bzw. zugeordnet werden und die Zahl der Zellen in jeder Population wird schließlich ermittelt. [2]

Die Adhärenz der Monozyten spielt für die automatische Zählung keine Rolle, da durch die Verdünnung und die anschließende durchflusszytometrische Analyse die Zellen einzeln erfasst werden.

Aufgrund dieser methodischen Unterschiede ergeben sich in der Literatur folgende an die jeweilige Methode »angepasste« Referenzbereiche:

Monozyten-Referenzwerte für die manuelle Differenzierung

Quelle	Weiblich Monozyten Zellzahl/ μ L	Männlich Monozyten Zellzahl/ μ L	Weiblich Monozyten %	Männlich Monozyten %	Gesamt- WBC- Zahl/ μ L
Heckner F. [3]	80 - 600	80 - 600	2 - 8	2 - 8	4.000 - 9.000
Rolf Mahlberg, Anette Gilles, Anita Läsch [4]	80 - 540	80 - 540	2 - 6	2 - 6	4.000 - 9.000

Tab. 1 Zusammenfassung der Referenzstudienresultate der manuellen Differenzierung

Monozyten-Referenzwerte für die automatisierte Zählung der X-CLASS Systeme

Quelle	Weiblich Monozyten Zellzahl/ μ L	Männlich Monozyten Zellzahl/ μ L	Weiblich Monozyten %	Männlich Monozyten %	Gesamt- WBC- Zahl/ μ L
Judith Pfaeffli [5]	0 - 1.000	0 - 1.000	3 - 14	3 - 14	2.600 - 7.800
Ramona Häusler [6]	240 - 360	300 - 820	4,7 - 12,5	5,3 - 12,2	4.000 - 9.000

Tab. 2 Zusammenfassung der Referenzstudienresultate der X-CLASS Differenzierung

Statistik

Auch die Anzahl der differenzierten Zellen spielt im Zusammenhang mit der Genauigkeit der unterschiedlichen Methoden eine große Rolle. Im Folgenden ist die Auswirkung der Anzahl der gezählten Zellen auf die Zuverlässigkeit der Ergebnisse an einem Beispiel erklärt.

Manuelle Differenzierung:

Bei der manuellen Differenzierung im Routinelabor werden gewöhnlich 100 Leukozyten bewertet (n = 100 Zellen).

Automatisierte Differenzierung:

Die Zellzahl der am Gerät differenzierten Zellen errechnet sich am Beispiel des xE-2100 nach folgender Formel:

$$\frac{\text{WBC}}{51 \text{ (Verdünnung)}} \times 40 \mu\text{L (Auszahlvolumen)}$$

Somit werden beispielsweise 9.421 Zellen tatsächlich durchflusszytometrisch analysiert, wenn ein Leukozytenwert von 12.000/ μL angezeigt wird ($n = 9.421$).

Die *Rümke-Tabelle*^[11] erlaubt eine statistische Aussage über die Genauigkeit von Zählparametern:

A	n=100	n=200	n=500	n=1.000	n=10.000
0	0-3,6	0-1,8	0-0,7	0-0,4	0-0,1
1	0,0-5,4	0,1-3,6	0,3-2,3	0,5-1,8	0,8-1,3
5	1,6-11,3	2,4-9,0	3,3-7,3	3,7-6,5	4,5-5,5
10	4,9-17,6	6,2-15,0	7,5-13,0	8,2-12,0	9,4-10,7
15	8,6-23,5	10,4-20,7	12,0-18,4	12,8-17,4	14,3-15,8
20	12,7-29,2	14,7-26,2	16,6-23,8	17,6-22,6	19,2-20,8
30	21,2-40,0	23,7-36,9	26,0-34,2	27,2-32,9	29,1-31,0
40	30,3-50,3	33,2-47,1	35,7-44,4	36,9-43,1	39,0-41,0
50	39,8-60,2	42,9-57,1	45,5-54,5	46,9-53,1	49,0-51,0
70	60,0-78,8	63,1-76,3	65,8-74,0	67,1-72,8	69,0-70,9
80	70,8-87,3	73,8-85,3	76,2-83,4	77,4-82,4	79,2-80,8
90	82,4-95,1	85,0-93,8	87,0-92,5	88,0-91,8	89,3-90,6
100	96,4-100	98,2-100	99,3-100	99,6-100	99,9-100

Tab. 3 95%-Vertrauensgrenzen für den tatsächlichen Prozentsatz der Leukozyten. A = % Leukozyten einer Zellpopulation.

Bei einem angenommenen Wert von 5% Monozyten in einer Blutprobe und einer Differenzierung von $n = 100$ Zellen im Ausstrich bedeutet dies, dass das Zählergebnis zwischen 1,6 und 11,3 Zellen variieren kann. Es liegt also ein sehr weiter Vertrauensbereich zugrunde, weil die Zahl der differenzierten Zellen sehr gering ist. Im Vergleich dazu differenziert der xE-2100 in der gleichen Probe fast 10.000 Zellen (siehe Beispielrechnung oben). Bei dieser Anzahl von differenzierten Zellen würde das Ergebnis maximal zwischen 4,5 und 5,5 Zellen schwanken. Statistisch gesehen bringt also eine höhere Anzahl an Zellen ein zuverlässigeres Ergebnis.

Studien

Studien, die die unterschiedlichen Methoden miteinander vergleichen (manuelle Differenzierung, Durchflusszytometrie und /oder automatische Differenzierung der x-CLASS), zeigen folgende Ergebnisse:

- Evaluation of the 5-Part Differential Leukocyte Count obtained with the SYSMEX XE-2100 Automated Hematologic Cell Analyzer as compared to Flow Cytometry and Microscopy; L.I. Sanches Abarca, M.D. et al, Service of Cytometry Laboratory, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; ISLH XIVth International Symposium [7]

In dieser Studie wurden 50 normale Blutbilder in K₃EDTA-Abnahmeröhrchen innerhalb von 4 Stunden nach der Abnahme mit Hilfe von 3 unterschiedlichen Methoden analysiert.

- 1: 100µL der jeweiligen Probe wurde mit monoklonalen Antikörpern versetzt (HLADR-FITC/CD33PE/CD45PC/CD14APC) und am FACSCalibur analysiert.
- 2: Messung der Probe am XE-2100
- 3: Ausstricherstellung und May-Grünwald-Giemsa-Färbung, Mikroskopieren eines 400-Zellen-Diffs

Ergebnis für die Monozyten im Vergleich zwischen FACSCalibur und XE-2100:

r = 0,89; slope = 1,06; y-Intercept = 1,30

Ergebnis für die Monozyten im Vergleich zwischen 400-Zellen-Diff und XE-2100:

r = 0,60; slope = 0,55; y-Intercept = 5,1

- Precision and Accuracy of the Leukocyte Differential on the SYSMEX XE-2100; R. Herklotz et al; Zentrum für Labormedizin, Kantonsspital Aarau, Switzerland; SYSMEX J Int 11: 8-21, 2001 [8]

Hier wurden von jeder Probe innerhalb von 2 Stunden nach Blutentnahme zwei Spinnerpräparate angefertigt (Horizontor, Hettich) und nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Diese Spinnerpräparate wurden mit Hilfe eines 500-Zellen-Diffs ausgezählt und mit dem Ergebnis des XE-2100 verglichen.

Ergebnis für die Monozyten absolut:

r = 0,8360; slope = 1,121; y-Intercept = 0,009

Ergebnis für die Monozyten prozentual:

r = 0,8629; slope = 1,044; y-Intercept = 0,610

- Performance of the xE-2100 leucocyte differential; G. Stamminger et al, Klinikum Chemnitz gGmbH, Institut für Laboratoriumsmedizin, Chemnitz, Germany; Clin. Lab. Haem., 2002, 24, 271-280 [9]

In dieser Studie wurden die gemessenen 194 Patientenproben in 2 Gruppen eingeteilt und anhand der Gesamtleukozytenzahl unterschieden:

- »NCCLS-Gruppe«: n = 131; Leukozyten $> 4,0 \times 10^9/L$ ohne morphologische Flags
- »leukopenische Gruppe«: n = 63; Leukozyten $> 0,1$ und $< 4,0 \times 10^9/L$, ebenfalls ohne morphologische Flags

Es wurden die Absolutwerte des xE-2100 mit den Mittelwerten von jeweils vier mikroskopischen Ausstrichen pro Patientenprobe (200 Zellen pro Ausstrich), die in Absolutwerte konvertiert wurden, verglichen.

Analyt	Mikroskop ($\times 10^9/L$) Mittelwert (Bereich)	xE-2100 ($\times 10^9/L$) Mittelwert (Bereich)	r
»NCCLS-Group« (Gruppe 1)			
Neutrophile	5.30 (4.11-24.42)	3.49 (0.99-22.37)	0.9961
Lymphozyten	1.50 (0.1-3.94)	1.36 (0.07-3.45)	0.9374
Monozyten	0.50 (0.01-1.67)	0.40 (0-1.41)	0.9119
Eosinophile	0.175 (0-7.31)	0.17 (0-6.62)	0.9984
Basophile	0.03 (0-0.16)	0.03 (0-0.18)	0.6721
»Leukopenic Group« (Gruppe 2)			
Neutrophile	1.37 (0-3.32)	1.49 (0.01-3.45)	0.9931
Lymphozyten	0.59 (0-1.51)	0.56 (0.02-1.56)	0.9745
Monozyten	0.34 (0-0.93)	0.27 (0-0.85)	0.9370
Eosinophile	0.05 (0-0.58)	0.05 (0-0.54)	0.9570
Basophile	0.03 (0-0.24)	0.02 (0-0.15)	0.5439

Tab. 4 Ergebnisse der Studie: Performance of the xE-2100 leucocyte differential; G.Stamminger et al, Klinikum Chemnitz gGmbH, Institut für Laboratoriumsmedizin, Chemnitz, Germany; Clin. Lab. Haem., 2002, 24, 271-280 [9]

Zusammenfassend kann man erkennen, dass die Ergebnisse aller genannten Studien präzise Ergebnisse der automatischen Differenzierung sowohl im Vergleich zur Durchflusszytometrie als auch zur manuellen Methode zeigen, wenn wenigstens 400 Zellen differenziert wurden.

Dieser Methodenvergleich wie auch die Rümke-Tabelle erlauben die Schlussfolgerung, dass automatische Differenzierungen im Hinblick auf Zellzahlbestimmungen das Mittel der Wahl sein sollten. Allerdings sollte im Fall einer pathologischen automatischen Differenzierung mit Warnhinweisen wie z. B. »Blasten?« die Beurteilung der *Zellmorphologie* anhand eines manuellen Ausstrichs erfolgen.



Übrigens... In der heutigen Zeit kann man diese mikroskopische Tätigkeit mit Hilfe von automatisierten Bildanalysensystemen wie z.B. CELLAVISION® DM8 oder DM96 erheblich erleichtern.

Abb. 3 Digitale Morphologie-Analysensysteme CELLAVISION® DM8 und DM96

Automatisierte Differenzierung

Der CELLAVISION® DM8 (Durchsatz ca. 25 Ausstriche/h) und der DM96 (Durchsatz ca. 40 Ausstriche/h) sind automatisierte Bildanalysensysteme, die die Blutzellen mittels einer hochauflösenden Kamera, verbunden mit einem hochwertigen Mikroskop und fortschrittlicher Bildverarbeitungstechnologie (künstliche neuronale Netzwerktechnologie basierend auf einer umfangreichen Zelldatenbank), vorklassifizieren. Beide Systeme lokalisieren automatisch kernhaltige Zellen in einem gefärbten Blutausstrich. Bilder von Zellen werden aufgenommen, analysiert, vorklassifiziert und in verschiedene Zelltypen kategorisiert (mit einer Genauigkeit von bis zu 95 %). [12]

- Vorklassifizierung für reife Leukozyten: Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile, Basophile
- Vorklassifizierung für unreife Leukozyten: Stäbe, Metamyelozyten, Myelozyten, Promyelozyten, Blasten
- Vorklassifizierung für Nicht-Leukozyten: NRBC, Riesenthrombozyten und weitere nicht klassifizierbare Zellen

Die Ergebnisse und die Zellbilder dieser automatisierten Analyse des Ausstrichs werden auf dem Bildschirm angezeigt und vom Betrachter überprüft. Im Bedarfsfall kann eine Neuklassifizierung vorgenommen werden, und nach der Überprüfung der Erythrozyten-Morphologie (ebenfalls von den Systemen automatisch »vor«-beurteilt) erfolgt die Validierung des kompletten Differenzialblutbildes mit anschließender Übertragung zum LIS (inklusive aller Kommentare).

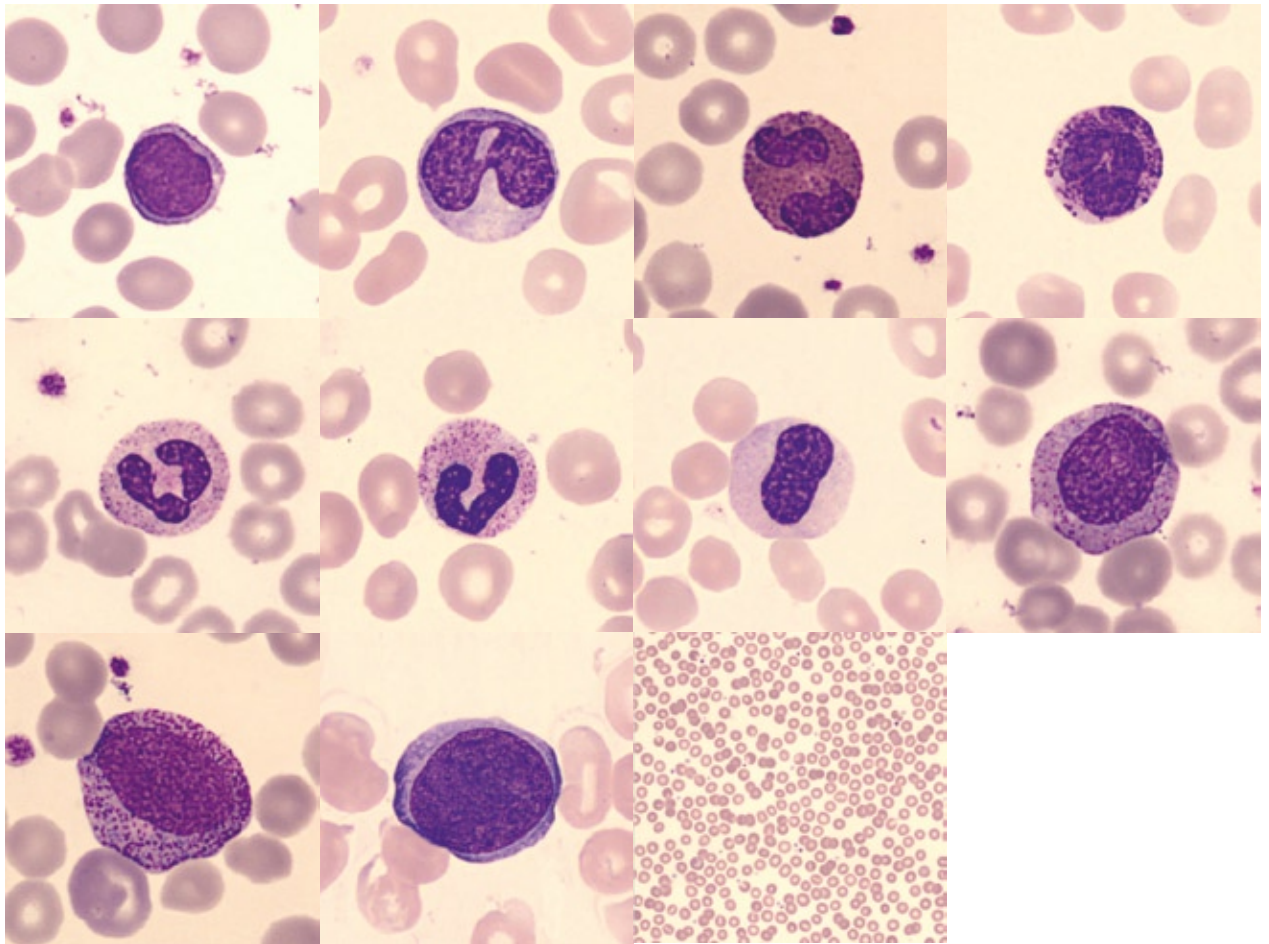


Abb. 4 Auswahl von Zellbildern eines CELLAVISION® DM8 und eines DM96

CELLAVISION® DM8 und DM96 sind Produkte der Firma CellaVision AB, Lund, Schweden.

Quellen

- (1) *Das Differentialblutbild, manuelle und automatische Differenzierung (Teil1)*; Dr. Christoph Ruby; Oldenburg, MTA-Dialog 9 (2007) Jahrgang 8
- (2) *Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie*; Silke Over; *SYSMEX XTRA* Vol. 6 Nr. 2, 2002
- (3) *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie*; F.Heckner; Urban & Schwarzenberg, München, 1986
- (4) *Hämatologie*; Rolf Mahlberg, Anette Gilles, Anita Läsch; 2. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage 2005, Wiley-VCH
- (5) *Reference Limits for the Automated Haematology Analyser SYSMEX XE-2100*; Judith Pfaeffli; *SYSMEX J Int* 12: 18-23, 2002
- (6) *Referenzbereiche für die Hämatologie: SYSMEX x-Family*; Ramona Häusler; *SYSMEX Lab Info*, März 2006
- (7) *Evaluation of the 5-Part Differential Leukocyte Count Obtained with the SYSMEX XE-2100 Automated Hematologic Cell Analyzer as Compared to Flow Cytometry and Microscopy*; L.I. Sanches Abarca, M.D. Tabernero, E. Arroyo, M.A. Garcia-Marcos, J.L. Salvador, J.L. Arroyo, J. San Miguel, A. Orfao; Service of Cytometry Laboratory, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; ISLH XIVth International Symposium
- (8) *Precision and Accuracy of the Leukocyte Differential on the SYSMEX XE-2100*; R. Herklotz and A.R. Huber; Zentrum für Labormedizin, Kantonsspital Aarau, 5001 Aarau, Switzerland; *SYSMEX J Int* 11: 8-21, 2001
- (9) *Performance of the XE-2100 leucocyte differential*; Klinikum Chemnitz gGmbH, Institut für Laboratoriumsmedizin, G. Stamminger, Chemnitz, Germany; Uni-Klinikum Gießen, Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie, D. Auch, Gießen, Germany; Universität München, Institut für klinische Chemie, H. Diem, München, Germany; Medical Fakultät der HUB (Charité), Institut für Pathobiochemie und Klinische Chemie, P. Sinha, Berlin, Germany; *Clin. Lab. Haem.*, 2002, 24, 271-280
- (10) *Fehler bei der Herstellung von Blutausstrichen (Wedge Methode) und deren Bewertung*; Jo Linssen; *SYSMEX XTRA* Vol. 2 Nr. 2, 1998
- (11) *Statistische Betrachtungen über die Genauigkeit der Differenzierung und der Zählung von Leukozyten*; C.L. Rümke; *Z. Klin. Med.* 1987, 42:173
- (12) *Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of DIFFMASTER OCTAVIA and CELLAVISION DM96*; H. Ceelie, R.B. Dinkelaar and W. van Gelder, 2006-2007 Department of Clinical Chemistry, Albert Schweitzer Ziekenhuis, Dordrecht, The Netherlands; *Journal of Clinical Pathology* 2007;60:72-79