

Die hämatologische Standardfärbung der DGHO nach Pappenheim bei Verwendung eines Sysmex Ausstrich- und Färbeautomaten der SP-Reihe

Xtra Schweiz | Frühjahr 2013 | Nr. 04

Die morphologische Hämatologie ist sowohl im Routinelabor als auch in einem hämatologischen Speziallabor eine sehr häufig angeforderte Untersuchung. Die zytologische Untersuchung eines Blutausstrichs erlaubt in vielen Fällen die Unterscheidung zwischen einem reaktiven Geschehen und einer hämatologischen Erkrankung. Der Zeitaufwand für die mikroskopische Untersuchung ist relativ hoch; optimal auswertbare Präparate sind aber relativ leicht herzustellen und erleichtern die Arbeit erheblich.

Drei wesentliche Punkte beeinflussen das Ergebnis der zytologischen Untersuchung:

1. Die Qualität des Ausstriches

Der Ausstrich muss folgende Eigenschaften erfüllen:

- a. korrekte Länge ($\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ des Objektträgers)
- b. dicke und dünne Bereiche mit fleissendem Übergang
- c. Randbereiche (Flanken), die zur Beurteilung mit einbezogen werden können
- d. dünnes Ausstrich-Ende (»Fahne«)

2. Die Qualität der Färbung nach Pappenheim

Nur eine korrekte Färbung zeigt alle morphologischen Details deutlich an:

- a. Chromatin (blastär oder zytisch), Zytoplasma, Granula, Beurteilung von Basophilie, Neutrophilie oder Poychromasie, siehe Punkt b.
- b. DGHO: Pappenheim-Färbung: Beschreibung einer hämatologischen Standardfärbung – Geschichte, Chemie, Durchführung, Artefakte und Problemlösung; Binder *et al.*: Laboratoriumsmedizin, Band 36, Heft 5, Seiten 293–309, ISSN (Online) 1439-0477, ISSN (Print) 0342-3026, DOI: 10.1515/lab-med-2012-0027, September 2012
- c. Beachte: In der WHO-Klassifikation der Tumore des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes wird der Blastenanteil rein zytomorphologisch ermittelt. Basis dafür sind eine korrekte Färbung und für den Verlauf vergleichbare, identisch gefärbte Präparate.

3. Die Expertise des Betrachters

Wie sagte schon Goethe: »Man sieht nur, was man weiss.«

- a. Erfahrung und Routine in der morphologischen Hämatologie schärfen den Blick für die Besonderheiten.
- b. Weiterbildungen durch Mikroskopierkurse oder ähnliche Veranstaltungen machen den Betrachter aufmerksam auf Veränderungen, die er noch nicht kannte.
- c. Eine einheitliche Nomenklatur bei Einsender und Befundersteller ist die Voraussetzung für die korrekte Interpretation der Ergebnisse, siehe Punkt d.
- d. DGHO: Lymphozytenmorphologie im Blutausstrich – Vorstellung einer überarbeiteten Nomenklatur und Systematik, Nebe *et al.*: LaboratoriumsMedizin. Band 35, Heft 5, Seiten 261–270, ISSN (Online) 1439–0477, ISSN (Print) 0342-3026, DOI: 10.1515/JLM.2011.037, September 2011

Mit dem Sysmex Ausstrich- und Färbeautomat der SP-Reihe wird ein standardisierter Ausstrich in Abhängigkeit des Hämatokritwertes erstellt, der im Anschluss einen standardisierten Färbezyklus mit definierten Färbelösungen und Färbezeiten durchläuft. Das Färbeprotokoll wird bei der Installation und Einweisung mit dem Labor an die individuellen Gewohnheiten angepasst.

In der Publikation des Arbeitskreises Laboratorien der DGHO werden für die hämatologische Standardfärbung nach Pappenheim eine Standard-Färbung und damit ein Standard-Ergebnis definiert und beschrieben, von dem nicht abgewichen werden soll.

Für diese Arbeit wurden neben zahlreichen manuell erstellten und gefärbten Blutausstrichen auch Ausstriche begutachtet, die mit den Sysmex Ausstrich-Färbeautomaten SP-10 und SP-1000i erstellt wurden. Das Ergebnis spiegelt genau die Individualität der Labore wider (Anpassung des Protokolls an die individuellen Laborgewohnheiten). Es zeigte aber auch, dass es mit dem SP-10 und SP-1000i möglich ist, mit optimalen Einstellungen des Färbeprotokolls ein Färbeergebnis zu erreichen, das dem Standardprotokoll entspricht.

Folgende »Checkliste« (Zitat aus o.g. Arbeit der DGHO) kann benutzt werden, um ein dem Standard entsprechendes Färbeergebnis festzustellen:

- Makroskopisch kräftig rötlich gefärbter Blutausstrich ohne Blaustich
- Hintergrund zwischen den Zellen nur gering angefärbt ohne Farbniederschläge oder Farbgranulat
- Erythrozyten kräftig angefärbt rein-rot bis rot-gelb ohne Blaustich
- Erythrozyten scharf begrenzt mit deutlicher zentraler Aufhellung (im Bereich des Präparats, in dem die Zellen dichter, weniger ausgebreitet liegen)
- Polychromatische Erythrozyten gut abgrenzbar (in der Fahne des Ausstrichs suchen)
- Kernhaltige Zellen kräftig gefärbt, die Granula »springen ins Auge«
- Kerne intensiv blau-rot gefärbt, nicht nur blau; Nukleolen (wenn sichtbar) blau ohne Rotstich
- Chromatin teils undurchsichtig dunkel (z. B. Chromatinschollen von Granulozytenkernen), bei Blasten und Monozyten durchsichtig netzartig mit Darstellung feiner Fädchen oder Körnchen (bei nicht-hämatopoetischen Zellen)
- Zytoplasma neutrophiler Granulozyten deutlich angefärbt, nicht »leer« , neutrophile Granula auf diesem Hintergrund deutlich dunkler als das Zytoplasma und gut abgrenzbar; neutrophile Granula »unreifer« Granulozyten rötlicher angefärbt; Primärgranula bei toxischer Granulation grösser und blau-rot
- Basophiles Zytoplasma zwischen hellblau und dunkelblau angefärbt ohne Rotstich, nicht nur grau; rötliche Granula bei Monozyten, bei granulierten Lymphozyten und bei myeloischen Blasten kräftig angefärbt und gut abgegrenzt
- Zytoplasma der Thrombozyten hellblau gefärbt, mit deutlich abgegrenzten rötlichen Granula

Tab.1 »Checkliste« aus der Publikation der DGHO: Binder T, Diem H, Fuchs R, Gutensohn K, N T. Pappenheim-Färbung: Beschreibung einer hämatologischen Standardfärbung – Geschichte, Chemie, Durchführung, Artefakte und Problemlösungen. J Lab Med 2012; 36:293–309.

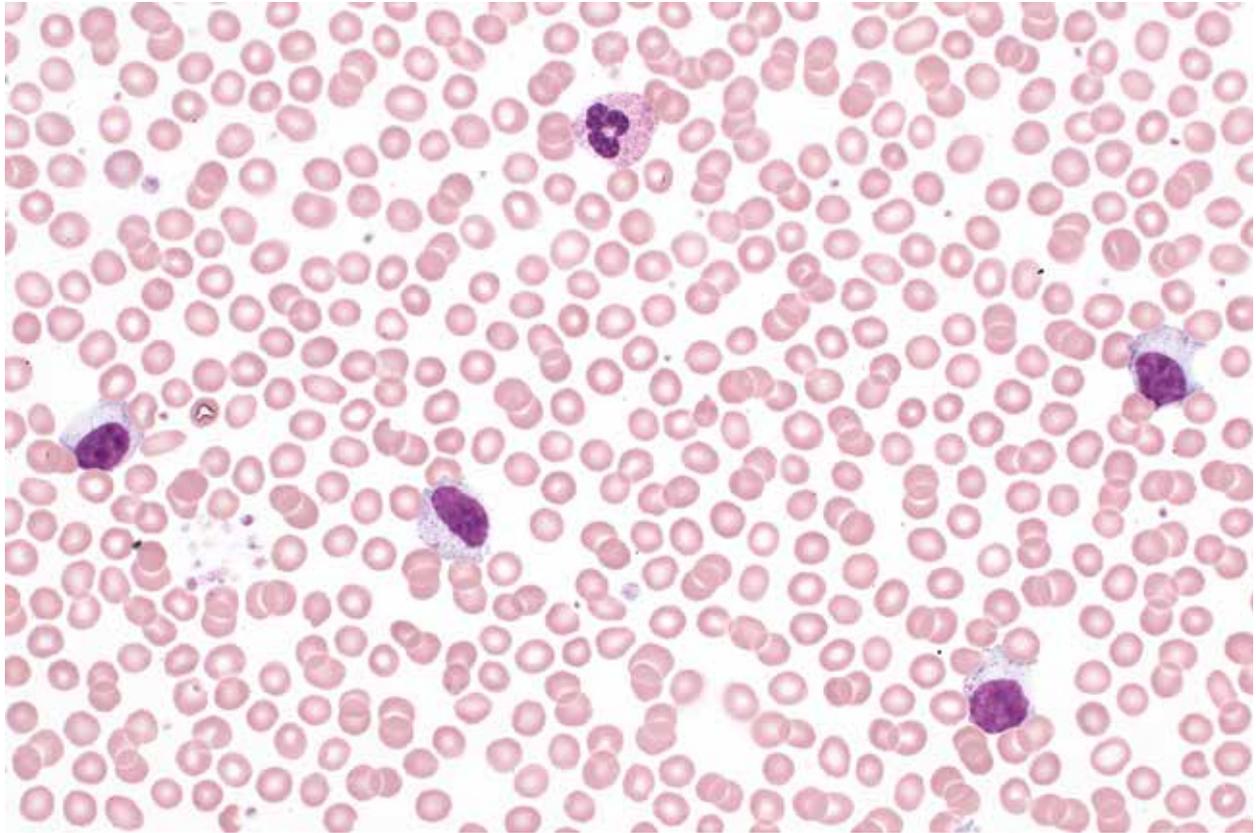


Abb. 1 Nach dem Standard gefärbter Blutausstrich eines Patienten mit LGL-Leukämie als Beispiel einer korrekten Färbung. Beachten Sie die Abfärbung der Thrombozyten; die Granula des Granulozyten sind hier besonders kräftig gefärbt (»toxisch«). Quelle: Binder T, Diem H, Fuchs R, Gutensohn K, N T. Pappenheim-Färbung: Beschreibung einer hämatologischen Standardfärbung – Geschichte, Chemie, Durchführung, Artefakte und Problemlösungen. J Lab Med 2012; 36:293–309.

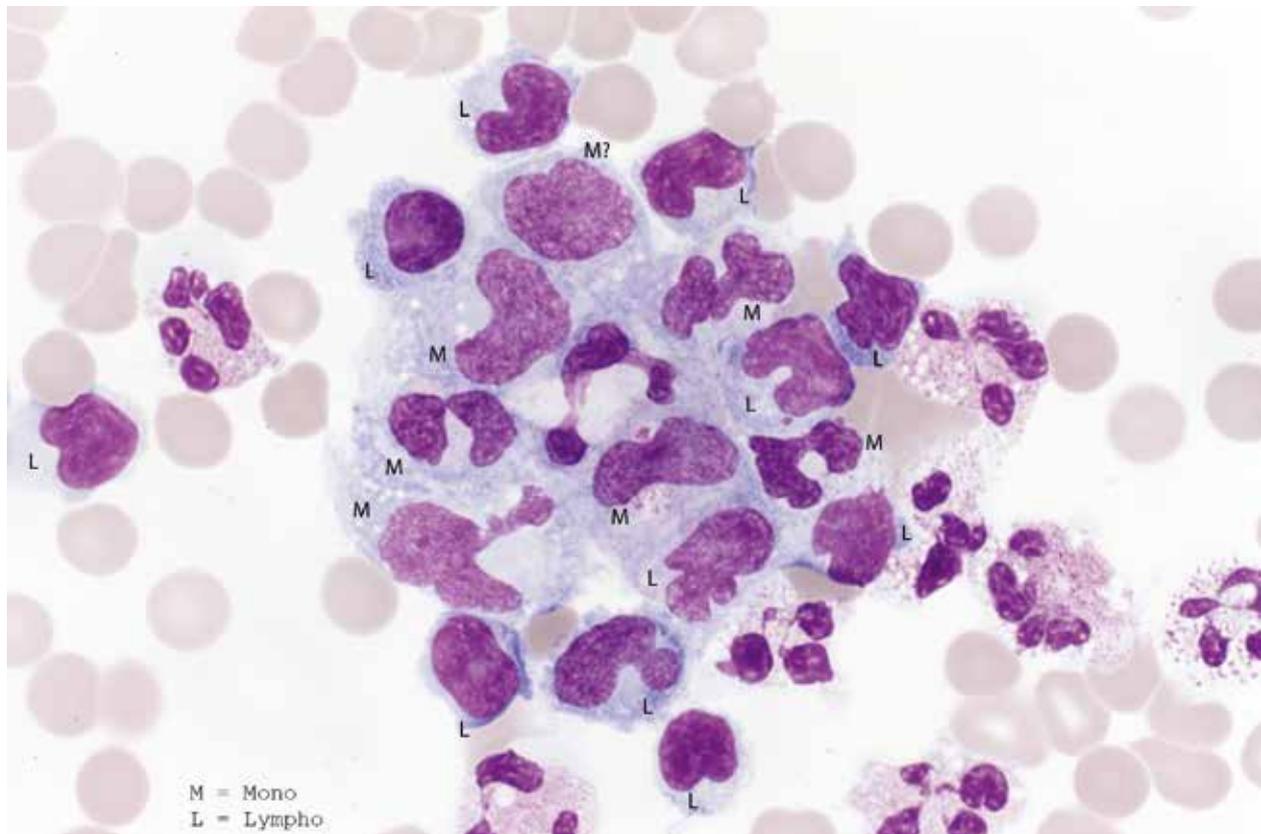


Abb. 2 Liquor eines Patienten mit Pneumokokken-Meningitis; beachte die unterschiedliche Darstellung des Chromatins bei monozytoiden Zellen (»M« – Monozyten oder Ependymzellen) und bei lymphatischen Zellen (»L«).

Das in der Publikation beschriebene Färbeprotokoll für die Standardfärbung nach Pappenheim ist für die Durchführung in Küvetten ausgelegt und nicht 1:1 auf den SP-10 oder SP-1000i übertragbar. Grund dafür ist unter anderem die Betriebstemperatur im SP-Gerät von ca. 40°C, die den Färbeprozess beschleunigt (kürzere Färbezeiten) ohne einen Einfluss auf die Charakteristika der Färbung zu nehmen.

In einem von uns durchgeführten Inhouse-Test haben wir ein Färbeprotokoll ermittelt, das dem Färbergebnis der DGHO Standardvorschrift nach Pappenheim weitgehend entspricht. Wir haben festgestellt, dass dies mit dem Protokoll unserer Ersteinstellung bei Inbetriebnahme des Gerätes so gut wie übereinstimmt.

Wie sieht Ihr Färbeprotokoll aus? Zeigt Ihr Färbergebnis die Resultate, die im DGHO Protokoll beschrieben sind? Alle SP-Geräte bieten die Möglichkeit mehrere Färbeprotokolle anzulegen. Falls Sie ein anderes Färbeprotokoll testen möchten, wenden Sie sich bitte an unsere Produktspezialisten.

Hinweis:

Bei Färbungen von Knochenmark-Präparaten mit Bröckeln am SP-Gerät ist das Färbeergebnis abhängig von der »Dicke« des Präparates. Ggf. müssen die Färbezeiten (Fixation und Färbung) verlängert werden. Knochenmarkblutausstriche oder Zytozentrifugen-Präparate lassen sich mit diesem Färbeprotokoll ebenso wie Blutausstriche färben.

Die Kombination aus Qualität von Ausstrich, Färbung und Betrachter ist für das Ergebnis einer zytomorphologischen Untersuchung in der Hämatologie entscheidend. Nur an optimalen Präparaten kann der Untersucher alle normalen und abnormen Veränderungen sicher erfassen.



Abb.3 RAL Stainer

In unserem Inhouse-Test haben wir ebenfalls unseren neuen Färbevollautomaten getestet. Der RAL Stainer färbt Ihre manuell erstellten Blutausstriche unter Verwendung eines gebrauchsfertigen Reagenz-Kits voll automatisiert. Hier ist zu betonen, dass das Reagenz-Kit auf einer Methanol-freien Basis erstellt wurde.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass die geforderten Färbeergebnisse der DGHO-Empfehlung sich mit der Blood Film Master Serie sehr gut realisieren lassen. Damit können wir auch dem Anwender mit einem kleinen Durchsatz an Ausstrichen und dem Wunsch nach Standardisierung der Färbung nach Pappenheim, eine Lösung zur automatisierten Färbung anbieten.