

Verfahren der hämatologischen Meß- und Zähltechnik: Lichtoptisches Prinzip nach Technicon

R. Weber
Technicon GmbH, Bad Vilbel

Einleitung

Bei den optisch messenden Zellzählern können alle Probleme auf folgende zwei Grundfragen zurückgeführt werden:

1. Wie genau ist die Bestimmung der Zellzahl?
2. Wie genau ist die Bestimmung des MCV-Wertes?

Diskutiert werden soll dies an Hand einer abstrakten Skizze, aus der hervorgeht, wie ein Zellzähler im Prinzip aufgebaut ist (Abb. 1). Das Blut fließt durch den analytischen Teil, in dem es verdünnt wird, zum Detektor. Dies kann entweder ein Leitfähigkeitsdetektor oder ein optischer Detektor sein. Die von den durchfließenden Zellen verursachten Impulse werden in der nachfolgenden Elektronik der Größe nach diskriminiert und zu den ausgegebenen Werten umgerechnet.

Größenbestimmung der Zellen

Im Technicon H 6000, der nach dem lichtoptischen Prinzip arbeitet, wird die im Querschnitt (Abb. 2) dargestellte Küvette benutzt und der Probenstrom durch den Mantelstrom auf 50 µm Durchmesser verjüngt. In Abb. 3 ist der Strahlengang dargestellt. Das Licht einer Halogenlampe wird senkrecht zur Fließrichtung des Probenstroms auf den Probenstrom unter einem Winkel γ fokussiert. Das gestreute Licht wird im Winkelbereich $\beta-\alpha$ gemessen.

Was passiert bei der Lichtstreuung? Das auf die Zelle auftreffende Licht wird an einem Oberflächenelement mit der Intensität $J(n, \theta)$ in die Richtung θ reflektiert und mit einer Intensität $J(n, E, \theta)$ beim Durchgang durch die Zelle mit der Extinktion E geschwächt und in die Richtung θ gebrochen. Beide Effekte sind vom Brechungsindexunterschied zwischen Zellinnerem und Zelläußerem abhängig. Beide Anteile zeigen über alle beleuchteten Oberflächenelemente integriert eine Winkelabhängigkeit, wie sie in Abb. 4 als $J(n, \theta) + J(n, E, \theta)$ dargestellt ist.

Bei den uns interessierenden Zellen überwiegt der Beitrag eines dritten Effektes – die Beugung $J(\theta, d, \lambda)$.

Alle drei genannten Effekte werden zusammen als Streuung bezeichnet.

Die an den Strukturelementen der Membran und des Zellinhaltes wie z.B. den Granula entstehende Beugung lässt sich auf die gleichen physikalischen Gesetzmäßigkeiten zurückführen wie die allseits bekannte Beugung am Spalt oder die Beugung am Gitter.

Es gibt recht detaillierte theoretische Berechnungen – basierend auf den Maxwell-Gleichungen –, die die Beugung des Lichtes an kleinen homogenen Kugeln beschreiben. Eine Erweiterung dieser Theorie auf inhomogene nicht kugelförmige Teilchen mit einer Größe von mehreren Mikrometer Durchmesser wurde in unter-

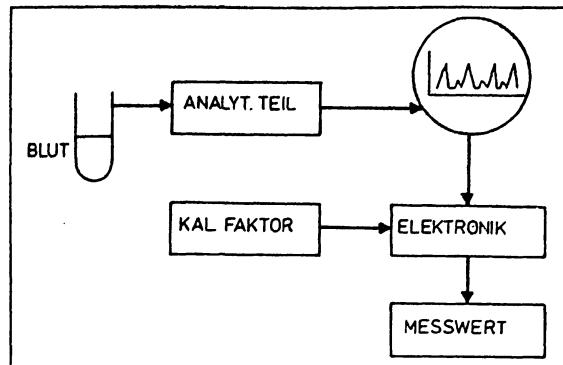


Abb. 1: Prinzip des Aufbaues eines Zellzählers

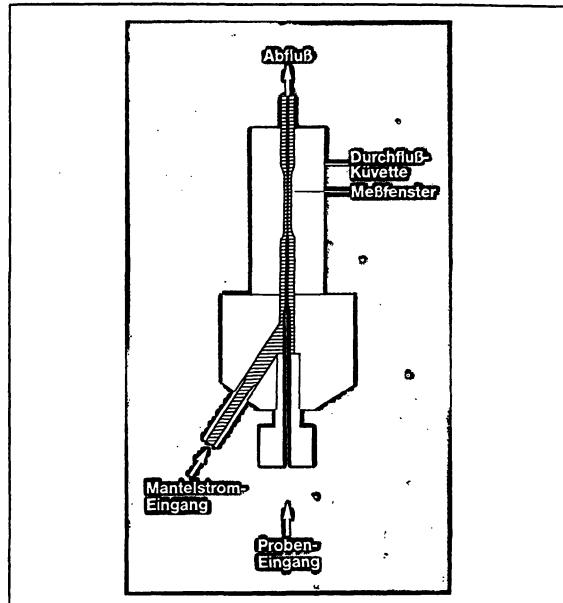


Abb. 2: Küvette am Technicon H 6000

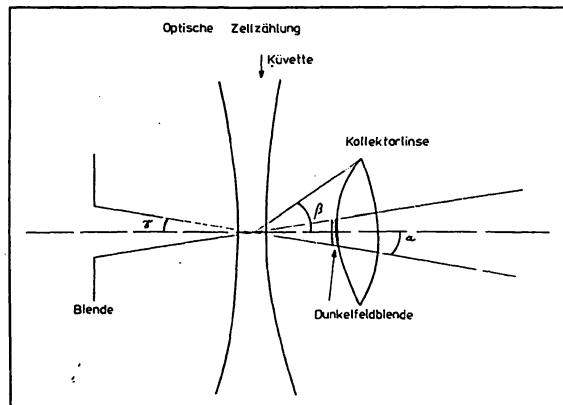


Abb. 3: Darstellung des Strahlenganges beim lichtoptischen Prinzip der Zellzählung am Technicon H 6000®

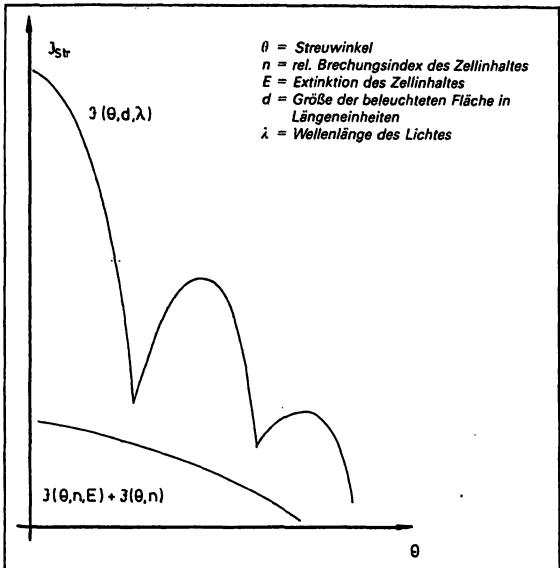


Abb. 4: Lichtstreuung an einem Oberflächenelement

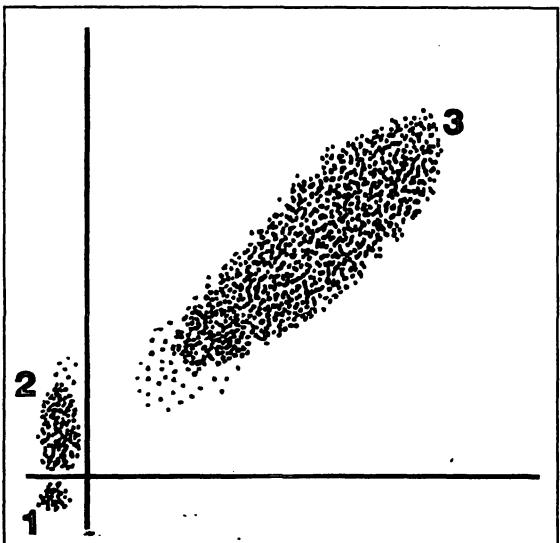


Abb. 5: Darstellung der Meßsignale in einem x-y-Diagramm.
Punktfolge 1 = Rauschen, Punktfolge 2 = Thrombozyten,
Punktfolge 3 = Erythrozyten

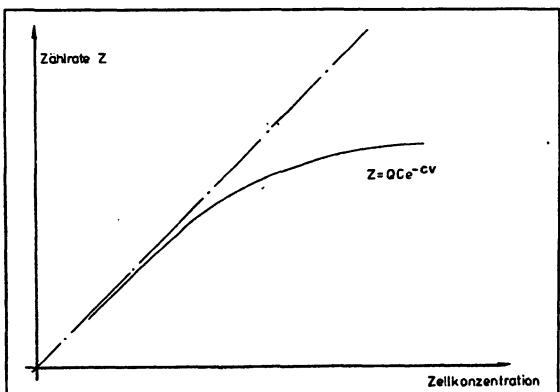


Abb. 6: Zusammenhang zwischen Zählrate und Zellkonzentration

schiedlichen Modellen, z.B. zwei konzentrisch ineinanderliegende Kugeln mit und ohne Zellkern durchgeführt. Die rechnerische Berücksichtigung interner Strukturen beliebiger Lage an jedem beliebigen Ort in der Zelle, zeigt starke Veränderungen des Streulichtes besonders in Rückwärtsrichtung.

In der Anwendung beschränkt man sich meistens darauf, Streudiagramme, wie in Abb. 4, experimentell zu ermitteln und an ihnen den optimalen Winkelbereich $\beta-\alpha$, z.B. zwischen 5° und 10° bei Erythrozyten zu bestimmen.

Der Einfluß von Brechungsindex, Wellenlänge und Größe der Zelle auf das Streudiagramm läßt sich daraus nur unvollständig ablesen. Beispiele aus der Literatur zeigen, daß die bestrahlte Zelloberfläche das Streulicht in Vorwärtsrichtung am stärksten beeinflußt. Will man über die Messung der Streulichtintensität das Volumen einer Zelle und damit das mittlere Zellvolumen aller Zellen und den Hämatokritwert bestimmen, so muß man einen quantitativen Zusammenhang zwischen bestrahlter Oberfläche und dem Volumen der Zelle benutzen. Es gibt die Möglichkeit, daß man eine Mittelwertbildung über alle Zellorientierungen der Erythrozyten vornimmt, oder man verformt wie im H 6000 die Erythrozyten zu gleichvolumigen aber kugelförmigen Zellen. Damit ist für jede einzelne Zelle das flächenproportionale Streulicht auch volumenproportional, denn eine Kugel bietet der Lichtquelle, unabhängig von der Orientierung, die gleiche Fläche.

Aus dem daraus ermittelten MCV-Wert wird der Hämatokrit durch eine einfache Multiplikation bestimmt. Im Detail gesehen, steckt hier jedoch ein Bedienungsproblem, da der richtige Hämatokritwert sowohl von der Kalibration als auch von der Lichtintensität und damit der Justierung der Küvette abhängig ist. Diese zweite Abhängigkeit ist in ihrer Bedeutung und Konsequenz mit der Nullpunktinstellung beim Photometer vergleichbar.

Bestimmung der Zellzahl

Eine andere wesentliche Fragestellung ist, daß bei der Zählung die jeweilige Zellsorte richtig gezählt wird.

Da im H 6000 die Zellen volumenproportional erfaßt werden, kann das Zählen der richtigen Zellsorte elegant mit der Benutzung zweier Diskriminatoren gesichert werden. Das Streulicht wird durch einen Strahlungsteiler zwei Detektoren unterschiedlicher Empfindlichkeit und unterschiedlichen Winkelbereiches zugeführt. Die Meßsignale werden graphisch im sogenannten x-y-Diagramm zweidimensional dargestellt (Abb. 5).

Jeder Punkt auf dem Diagramm repräsentiert eine Zelle. Die Punktfolge 1 ist das Rauschen, die Punktfolge 2 stellt die Thrombozyten und die Punktfolge 3 die Erythrozyten dar. Man sieht, daß zwei Diskriminatorlinien, eine senkrecht und eine waagerecht, nötig sind, um die 3 Zellsorten sicher voneinander zu trennen.

Da die Zellen statistisch verteilt im Detektor ankommen, ergibt sich ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen Zählrate und Zellkonzentration (Abb. 6). Die Unlinearität wird durch eine räumliche und eine zeitliche Koinzidenz verursacht. Die zeitliche Koinzidenz kann durch die Verwendung schneller elektronischer Bausteine weitgehend unterdrückt werden. Die räumliche Koinzidenz hängt vom Detektorvolumen und von der Verdünnung der Probe im analytischen Teil ab.

Obwohl auch diese Koinzidenz durch kleine Detektorvolumina und große Verdünnungen reduziert werden kann,

$$\text{Zellkonzentration} = (\text{KAL.FAKTOR}) \times (\text{Zählrate}) \times \left(\frac{1}{1 - \frac{\text{Totzeit}}{\text{Messzeit}}} \right)$$

Abb. 7: Korrekturformel für Koinzidenzverluste optischer Detektoren

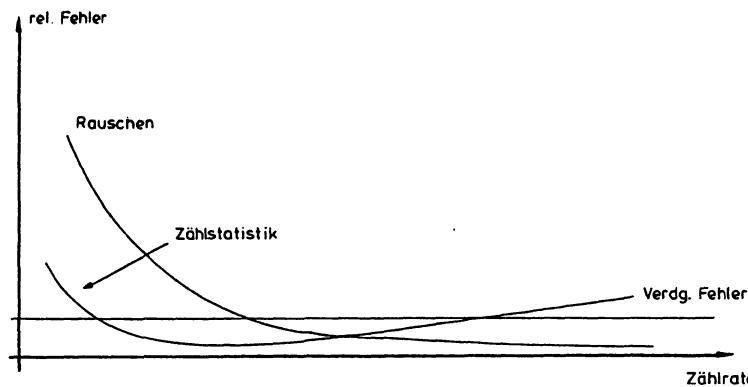


Abb. 8: Relativer Fehler der Zählrate in Abhängigkeit von der Zählrate

sind Koinzidenzverluste von bis zu einigen Prozenten an der Obergrenze des Meßbereiches möglich. Deswegen ist eine Korrektur notwendig. Eine richtige Korrektur ist für Leitfähigkeitsdetektoren problematisch, kann aber für optische Detektoren theoretisch klar begründet werden und führt zu einfachen aus der Kernmeßtechnik bekannten und bewährten Formeln (Abb. 7).

Bewertung verschiedener Fehlerbeiträge

Es gibt 3 verschiedene Arten von Fehlern, die die Zellzahl beeinflussen ohne Berücksichtigung der Richtigkeit der Schwelleneinstellung (Abb. 8):

1. Verdünnungsfehler,
2. Zählstatistik,
3. Rauschen.

Der Zählstatistikfehler durchläuft ein Minimum bei mittleren Zählraten und ist natürlich bei kleinen Zählraten hoch. Der Anstieg zu größeren Zählraten hin hängt von der Höhe des Koinzidenzverlustes und der Art seiner Korrektur ab. Das Rauschen hat eine elektronische und optische Komponente. Je größer die Rauschimpulse sind, desto seltener treten sie auf. Beim H 6000 gibt es etwa 10 Rauschimpulse pro Sekunde, die die Impulshöhe eines Thrombozyten erreichen.

Bezogen auf die Zählrate nimmt dieser probenunabhängige Rauschanteil mit steigender Zählrate ab. Dadurch erklärt sich die Tatsache, daß sowohl die Reduzierung dieses Rauschanteiles als auch die Wahl der Zählrate durch geeignete Verdünnungen den Zählfehler verkleinern.

Anchrift der Verfasser:

R. Weber
Technikon GmbH
6368 Bad Vilbel

Diskussion

Zeile: Wie scharf können Sie in der Impulshöhendarstellung die Thrombozyten von den Erythrozyten trennen oder kommt es gelegentlich zu Überschneidungen der beiden Zellpopulationen?

Weber: Das ist von der Einstellung an dem Gerät abhängig. Sie können in der Impulshöhendarstellung zwischen der Thrombozyten- und der Erythrozytenverteilung ein bis auf die Abzisse hinuntergehendes Tal bekommen. Die Qualität der Trennung kann am Gerät auf einem externen Drucker ausgedruckt und kontrolliert werden.

Spaethe: Dies ist, so glaube ich, ein wichtiger Punkt. Wir haben auch inzwischen etwas Erfahrung in der Sollwertermittlung mit dem H 6000 und mit zwei verschiedenen Verdünnungslösungen, die Sie in dem Erythrozyten/Thrombozytenkanal verwenden. Wir haben dabei gefunden, daß wir mit der früher von Ihnen vertriebenen Lösung hervorragende Diskriminierungen bekamen, also auch zwischen den Vogelerythrozyten und zwischen den Thrombozyten bzw. den Erythrozyten. Die einstandardisierten Werte der entsprechenden Sollwertlabors waren sehr konstant und wurden auch immer sehr schön wiedergefunden. Und dann haben Sie Ihre Lösung in dem Kanal verändert, in dem von Ihnen beschriebenen Sinn, daß die Zellen sich jetzt etwas kugelförmiger aufblähen. Damit haben Sie, wie ich jetzt verstanden habe, zwar meßtechnisch ein besseres Ergebnis. Aber bestimmte Erythrozyten und vor allem Kontrollblutzellen, die nicht fixiert sind, und die nicht nur einen Tag, sondern unter Umständen 4 Wochen alt sind, blähen sich jetzt auf. Diese platzen zum Teil und Fragmente der Membrane dieser Erythrozyten werden bei den Thrombozyten mitgezählt. Dadurch haben wir plötzlich bei diesem Meßprinzip mit dieser Verdünnungslösung keine guten Ergebnisse mehr mit unseren Kontrollmaterialien erzielt. Es sei denn, wir gehen wieder zurück zu den Materialien, die sehr stark fixiert

sind, die also dieses nicht mitmachen. Da fragt man sich dann, ob dies ein Fortschritt oder ein Nachteil ist. Sie haben meßtechnisch eine Verbesserung erreicht, aber zur Kontrolle, und ich weiß nicht, ob vielleicht auch für manche Krankheitsbilder bei den Erythrozyten, einen Nachteil eingekauft. Ist das nicht eine Diskrepanz, in der wir uns überhaupt befinden mit der Zellzählung und seiner Technik? Wir haben inzwischen einen Stand der Technik erreicht, der, glaube ich, recht gut ist. Auf der anderen Seite arbeiten wir mit biologischen Materialien, die sich eben doch wieder sehr unterschiedlich verhalten.

Schneider: Da kann ich vielleicht Stellung nehmen. Es ist ein über den beschriebenen Rahmen hinaus meßtechnischer Vorteil darin, daß zum Beispiel die Linearität des MCV-Wertes und auch die Meßergebnisse der Erythrozyten verbessert sind, nicht nur die Thrombozytenergebnisse. Dies ließe sich im Detail darstellen, das würde jetzt hier zu weit führen. Im übrigen ist es so, daß dem Anwender der H 6000 Systeme es freigestellt wird, welche Suspensionslösungen er verwendet, ob er also die beiden Lösungen, die neue Lösung, mit denen die Messung nicht mehr möglich ist, verwendet, oder die alten Lösungen. Und die Mehrzahl der Anwender hat sich aus meßtechnischen Vorteilen heraus für die Verwendung der neuen Suspensionslösungen entschieden, aber im Grunde genommen könnten Sie, wenn Sie kontrollieren wollen mit diesen Materialien, auf die andere Lösung umsteigen.

Spaethe: War es denn ein großer Nachteil mit den alten Lösungen zu arbeiten, ist es ein großer Fortschritt, mit den neuen zu arbeiten? Warum wird es gemacht, denn das hat ganz großen Einfluß auch auf das, was auch Herr Prof. Thom zeigt. Er hat die verschiedenen Schultern der Kurven gezeigt, und daß ganz verschiedene Diskriminatoreinstellungen erhalten werden. Auch hier werden mit dem gleichen Meßprinzip unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Das ist natürlich besonders, so glaube ich, für die Frage der Ringversuche ganz wesentlich.

Thom: Reagenzien, die eine Schwellung der Erythrozyten durch Wassereinstrom bewirken, z.B. durch Erniedrigung von pH-Wert oder Tonizität können meßtechnische Vorteile bieten. Voraussetzung ist jedoch frisches, vor allem gesundes Blut. Die hämatologische Diagnostik erfordert aber schwerpunktmäßig Meßsicherheit in pathologischen Proben. Am Beispiel der häreditären Sphärozytose (H. S.) läßt sich zeigen, daß eine geringe Verminderung des Verhältnisses Zellmembranfläche/Zellvolumen zur Hämolyse der Erythrozyten führt, die keinen Membranüberschuß mehr besitzen. Statt der für eine H. S. typische Mikrozytose wird dann eine Makrozytose gemessen, begleitet von einer „Thrombozytose“ hervorgerufen durch sogenannte Ghost's, d.h. leere Erythrozyten-Membranen, wie dies ja auch von Herrn Spaethe in älterem Kontrollblut beobachtet worden ist.

Weber: Bei Erythrozyten liegt der Winkel etwa zwischen 5 und 10°.

Jakschik: Haben wir es in Ihrer Erklärung richtig verstanden, daß das Beugungsmaximum der ersten Ordnung jetzt dadurch zustande kommt, daß Sie auf der Oberfläche Mikrobereiche haben, die beugen? Wenn Sie jetzt einen Erythrozyten mit einem Durchmesser von 7 oder 8 μm ansetzen, sind diese Bereiche etwa 1 bis 2 μm und würden dann nachher in Summe zusammen das Beugungsmaximum an dieser Stelle ergeben?

Weber: Das Problem ist, daß ich den Durchmesser der Strukturelemente nicht kenne. Das ist nur eine Überlagerung aller Beugungsbilder, die insgesamt existieren.

Jakschik: Aber das Dominierende müßte eigentlich das Beugungsbild vom Partikel selbst sein?

Weber: Da gibt es unterschiedliche Angaben. Es gibt keine einheitlichen Schlußfolgerungen, die man aus der Literatur ziehen kann bezüglich der Beugung durch Zellen.

Eßer: Sie haben doch keine Einrichtungen, um reflektierte Strahlen aufzufangen?

Weber: Nein. In der Literatur ist man sich darüber einig, daß, falls innere Strukturen der Zelle vorhanden sind, das Licht in der Rückwärtsrichtung, also in der Richtung auf die Lichtquelle, am meisten beeinflußt wird, aber in Vorwärtsrichtung, in der alle Zellzähler arbeiten, kaum Einflüsse existieren.

Schneider: Die Forschungsergebnisse, die zur Entwicklung dieses Suspensionsmediums in Amerika geführt haben, kennen wir nicht. Wenn es zu ernsthaften Problemen der von Ihnen beschriebenen Art geführt hätte, hätte man sich sicher dazu nicht entschieden. Also wie gesagt, im Detail kann ich dazu wenig sagen, ob pathologische Proben dadurch unmeßbar geworden sind. Tatsache ist, daß der Anwender es letztlich frei entscheiden kann, zu welchen Lösungen er sich entscheidet und wir ihn nicht dazu zwingen, zu diesen neuen Lösungen überzugehen.

Thom: Wie kommt es, daß man bei allen kontrastgebenden optischen Verfahren beim Erythrozyten den Umfang sieht und kaum die Oberfläche? Ich denke dabei an Dunkelfeld-, Interferenz- oder Phasenkontrast-Mikroskopie.

Weber: Man sieht, auch wenn man kleine runde Teilchen betrachtet, die Beugungsfiguren um diese Kugel herum. Ich bin jetzt nicht genau informiert und kenne nicht sehr genau aus im Phasen-Kontrastverfahren. Aber ich bin der Meinung, daß dieser Beugungseffekt um die Kugel herum auch da dominierend ist, wo die Beugungsmuster so eng beieinander liegen, daß man sie vielleicht gar nicht sauber sehen kann.