

Das Nukleogramm des Technicon H1: Factum und Artefactum

The Technicon H1 Nucleogram: Facts and Artifacts

Nicole Etavard

II. Medizinische Klinik, Abt. Klinische Chemie, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf

Zusammenfassung:

Der H1 vermag basophile Granulozyten in den meisten Blutproben zuverlässig zu erkennen und zu quantifizieren. Es gibt jedoch einige Situationen, in denen die Basophilenzählung versagt. Dies ist der Fall bei hohen Gesamtleukozytenzahlen, viralen Erkrankungen und einigen Lymphomen, sowie beim Blut von Säuglingen. Diese Störungen sind meist durch einen typischen Aspekt des Befund-Diagramms zu erkennen. Bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie kann eine Besonderheit im Nukleogramm zu einem Befundbild führen, welches dem kompletten Myeloperoxidase-Mangel ähnelt. Die vornehmlich aus dem Basophilen-Kanal abgeleiteten Signale für eine Linksverschiebung oder das Vorliegen von Blasten in einer Blutprobe sind weniger zuverlässig als eine mikroskopische Untersuchung.

Schlüsselwörter:

Automatische Leukozytendifferenzierung – Technicon H1 – Nukleogramm – diagnostische Wertigkeit – Artefakte

Summary:

In most blood samples, the H1 hematology analyser is capable of reliably recognizing and quantifying basophil granulocytes. However, in some situations the analyzer gives an incorrect basophil count. We observed this phenomenon in cases of high white blood cell count, viral infections, lymphoma and in the blood of newborns. Most of these artifacts can be identified by a typical pattern of the H1 differential diagram. A peculiarity in the nucleogram is observed in the blood of patients with chronic lymphatic leukemia, where a picture similar to complete myeloperoxidase deficiency may arise. The H1 signals for left shift or leukemic blasts are less reliable than microscopic examination of a blood smear.

Keywords:

Automated white blood cell differentiation – Technicon H1 – Nucleogram – Diagnostic significance – Artifacts

Einleitung

Der Blutzell-Analysator H1 der Fa. Technicon leitet die Leukozyten-Differenzierung aus zwei Meßvorgängen mit jeweils zwei Meßgrößen ab (1, 9):

1. Einer Peroxidase-/Streulichtmessung der Leukozyten im sogenannten Peroxidase-Kanal.

Aus dieser kombinierten Messung erfolgt eine Auftrennung der Leukozyten in zwei Dimensionen, nach einem zytochemischen und einem physikalischen Kriterium. Neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und atypische Zellen können hierdurch getrennt quantifiziert werden; Lymphozyten und basophile Granulozyten erscheinen als gemeinsame Zellpopulation. Die Population der Neutrophilen umfaßt hierbei sowohl die reifen segmentkernigen Granulozyten als auch Vorstufen der Granulopoese vom Stabkernigen bis zum Promyelozyten. Eine Unterscheidung von reif und unreif ist mit diesem Meßprinzip allein in keiner Weise möglich.

2. Einer Laser-Streulichtmessung der Leukozytenkerne (Ausnahme: basophile Granulozyten s.u.) in zwei Winkelbereichen im sogenannten Basophilen- oder Baso-Kanal.

Vor der Messung werden hier, in stark saurem detergenzienhaltigem Milieu, alle Zellen mit Ausnahme der Basophilen, von ihrem Zytoplasma befreit (Zell-Stripping). Die verbleibenden Zellkerne werden dann im Laserstreulicht als rund oder segmentiert erfaßt.

Zu den rundkernigen, „mononukleär“ genannten Zellen (MN) zählen die Lymphozyten und Monozyten, aber auch die rundkernigen Vorstufen der Granulopoese (vom Metamyelozyten bis zum Blasten). Die mit „polymorphkernig“ bezeichneten Zellen (PMN) umfassen die segmentkernigen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Stabkernige Granulozyten sollen sich im Übergangsbereich zwischen mononukleären und polymorphkernigen Zellen ansiedeln.

Einzig die basophilen Granulozyten sollen im Milieu des Basophilen-Kanals intakt bleiben (1, 6, 9). Durch ihre Streulichteigenschaften unter diesen Bedingungen setzen sich die Basophilen deutlich von den übrigen Populationen ab und werden an dieser Stelle des Analysengangs quantifiziert.

Die kombinierte Information aus beiden Meßkanälen, dem Peroxidase- und dem Basophilen-Kanal, ergibt eine Unterscheidung der 5 Leukozytenpopulationen (neutrophile, eosinophile Granulozyten und Monozyten allein aus dem Peroxidase-Kanal, Lymphozyten und basophile Granulozyten aus Peroxidase- und Baso-Kanal) mit einer zusätzlichen gemeinsamen Rubrik LUC für eine Reihe von Zellen, welche bei pathologischen Situationen auftreten (s. Abb. 1, LUC = large unstained cells aus dem Peroxidase-Kanal).

Unter die Rubrik LUC fallen im wesentlichen große, bzw. reaktiv veränderte Lymphozyten, Blasten und Plasmazellen.

Durch einen Zählvergleich beider Meßkanäle, Peroxidase- und Basophilen-Kanal, schließt das Gerät auf die Plausibilität der ermittelten Gesamtleukozytenzahl. Darüber hinaus werden aus einer Gegenüberstellung bestimmter Zellpopulationen aus beiden Kanälen einige Hinweise auf Blutbildveränderungen abgeleitet:

- Eine vermehrte Zellzahl im Übergangsbereich zwischen „mononukleären“ und „polymorphkernigen“ Zellen im Baso-Kanal deutet das Gerät als reaktive Linksverschiebung der Granulopoese, d.h. eine Erhöhung der Stabkernigen, deren Kerne nicht mehr rund und noch nicht segmentiert sind.

- Überwiegen die (neutrophilen + eosinophilen) Granulozyten, gezählt im Peroxidase-Kanal, gegenüber den polymorphkernigen Zellen aus dem Baso-Kanal [$\text{PMN(Baso)} + \text{Eos(Pox)} - \text{PMN(Baso)} > 10\%$], wird der Verdacht auf das Vorliegen unreifer Vorstufen der Granulopoese signalisiert. Dahinter steht der Gedanke, daß derartige Vorstufen (ab Metamyelozyten) im Baso-Kanal als „rundkernige“ Zellen klassifiziert werden und damit unter die „mononukleären“ Zellen fallen. Die verbleibende Population der PMN (Baso-Kanal) wird damit kleiner als die der Granulozyten (Peroxidase-Kanal).

- Treten im Baso-Kanal Zellkerne auf, welche ein geringes Großwinkelstreulicht erzeugen (im Diagramm: linker Bereich im Feld der „mononukleären“ Zellen), erscheint ein Hinweis auf Blasten.

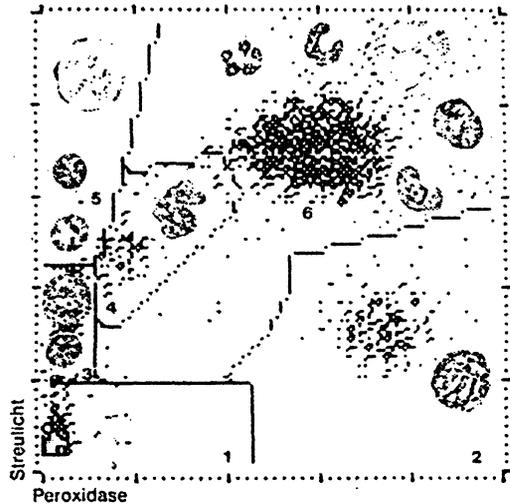
Bei der bisherigen Evaluation des Technicon H1 ist viel Wert auf die Daten des Peroxidase-Kanals gelegt worden. Die Informationen aus dem Basophilen-Kanal wurden demgegenüber relativ wenig diskutiert.

Aus unserer Erfahrung soll hier die Zuverlässigkeit der Angaben dargestellt werden, welche sich aus den Messungen des Basophilen-Kanals ableiten. Insbesondere sollen aber auch typische Störungen und Artefakte beschrieben werden, die im Zusammenhang mit dem Basophilen-Kanal des H1 auftreten.

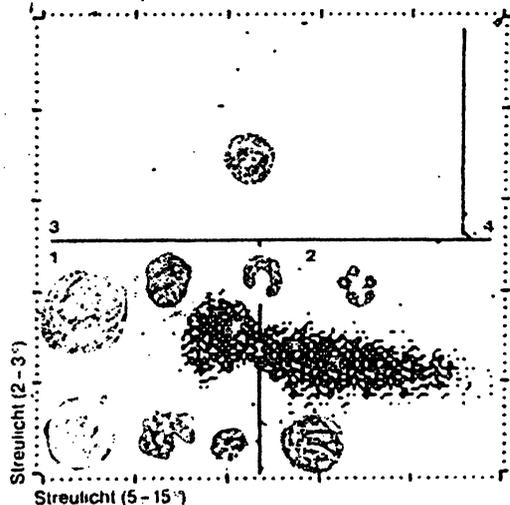
Methodik

Die Analytik am Technicon H1 erfolgte grundsätzlich aus EDTA-Vollblut, spätestens 6 Std. nach der Blutentnahme. Zur Verdünnung von zellreichem Material wurde autologes oder heterologes Blutplasma eingesetzt. Bei einer Latenzzeit von maximal 10 min zwischen Verdünnung und

H1-Analyse ist selbst bei prinzipiell inkompatiblem Blut eine nennenswerte immunologische Reaktion nicht zu erwarten, zumal sich das Interesse hier auf die Granulozyten konzentrierte, welche als Substrat für Agglutinationsreaktionen kaum Bedeutung haben. Dennoch wurde bei Verdünnungsreihen mit heterologem Plasma zum Vergleich eine Verdünnungsstufe mit autologem Plasma durchgeführt. In keinem Fall haben wir einen Unterschied zwischen der Verdünnung mit autologem und heterologem Blut feststellen können.



Leukogramm



Nukleogramm

Abb. 1: Leukozytendifferenzierung mittels Technicon H1: Befunddiagramme des Peroxidase-Kanals (Leukogramm) und des Baso-Kanals (Nukleogramm). Die mikroskopischen Zellbilder sind in die entsprechenden Befundfelder projiziert (mit freundlicher Genehmigung der Fa. Technicon Instr. Corp.) Leukogramm: 1 Rauschsignale, 2 eosinophile Granulozyten, 3 Lymphozyten und basophile Granulozyten, 4 Monozyten, 5 LUC; Nucleogramm: 1 MN, 2 PMN, 3 basophile Granulozyten, 4 Rauschsignale (nähere Erläuterungen im Text)

Eine mikroskopische Basophilenzählung beinhaltet die Auswertung von jeweils 200 – 300 Zellen aus vier separaten Blutaussstrichen. Dieses Verfahren erlaubt eine quantitative Aussage auch bei anteilig kleinen Zellpopulationen (8) und diente hier als Referenz.

Zur Beurteilung der Warnsignale „Linksverschiebung“ bzw. „unreife Granulozyten“ wurden an 10 Routine-Arbeitstagen alle entsprechend markierten H1-Befunde mikroskopisch kontrolliert. Andererseits wurden Proben, bei denen der Befund einer Linksverschiebung primär aus dem Blutaussstrich gestellt worden war (ohne vorherige H1-Analyse), im Nachhinein mittels H1 analysiert. Als Referenz galt der mikroskopische Befund (200-Zellen-Differenzierung). Die Grenze für eine Linksverschiebung wurde bei 5 Stabkernigen oder anderen Vorstufen der Granulopoese pro 100 Zellen angesetzt. Im untersuchten Zeitraum von 10 Arbeitstagen erstellte der H1 insgesamt ca. 2300 Analysen, die Zahl der primär angefertigten Blutaussstriche lag bei ca. 400.

Zur externen Inkubation von CLL-Blutproben in Baso-Dil® (Fa. Technicon), dem Lyse-Reagenz des Baso-Kanals, wurde das Blut, entsprechend den Vorgaben im H1-Analysator, 1:41 verdünnt, nach 40 sec ein Ausstrich angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Inkubationen bis zu 10 min ergaben keine Unterschiede im mikroskopischen Befund.

Ergebnisse

Basophilen-Quantifizierung

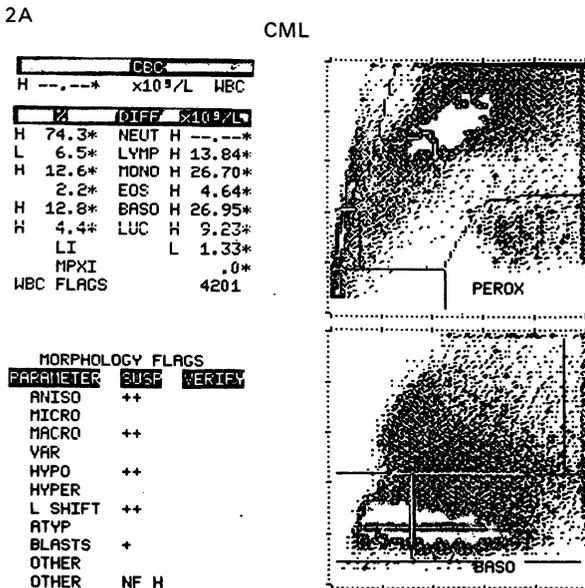
Die Güte einer automatisierten Quantifizierung von basophilen Granulozyten im peripheren Blut ist nicht einfach zu überprüfen, da diese Zellen in relativ kleiner Zahl vor-

handen sind und eine entsprechende Referenzmethode fehlt. Da die Basophilen jedoch bei myeloproliferativen Erkrankungen einen wichtigen prognostischen Faktor darstellen (2, 3, 10), ist zu einer sinnvollen Verlaufskontrolle eine zuverlässige Basophilenzählung zu fordern. Mit einiger Genauigkeit läßt sich der Basophilen-Anteil aus einer mikroskopischen Auszählung von 800 Zellen erfassen (je 200 aus 4 verschiedenen Ausstrichen, vgl. 8). Die sequentielle Verdünnung einer relativ konzentrierten Probe läßt sich ebenfalls heranziehen, um die Zuverlässigkeit einer Automatenzählung abzuschätzen. Ist eine Zählmethode zuverlässig, so sollte bei einfacher Verdünnung von Blutzellen in Plasma die absolute Zellzahl entsprechend der Verdünnung abnehmen, der relative Anteil jeder Population jedoch konstant bleiben.

Deutlich erhöhte Basophilen-Konzentrationen treten am häufigsten im Verlauf einer chronisch myeloischen Leukämie auf. Abb. 2A zeigt den H1-Befund der unverdünnten Blutprobe eines Patienten mit CML. Derartige Blutproben wurden herangezogen, um die Reproduzierbarkeit und Richtigkeit der Basophilenbestimmung bei unterschiedlichen Zellkonzentrationen zu prüfen. Als Referenzzählung galt dabei ein mikroskopisches Differentialbild, bei dem 800 Zellen ausgewertet wurden.

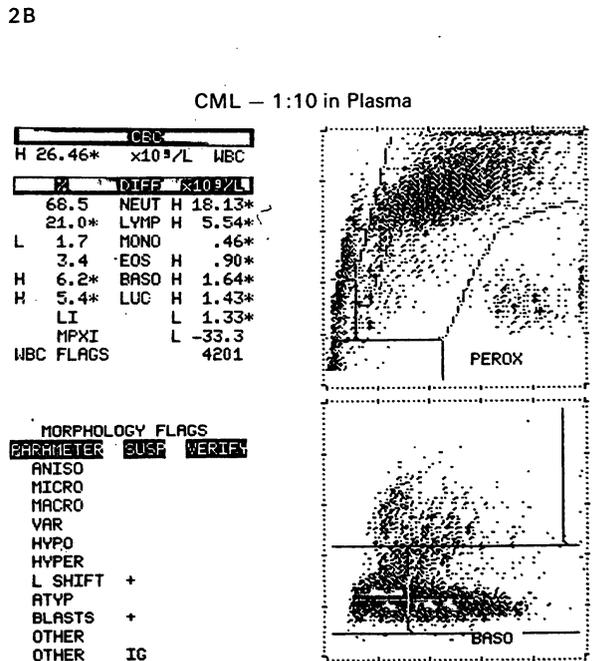
Abb. 3 zeigt die vom H1 gemessenen Basophilenanteile bei sequentieller Verdünnung des Blutes eines CML-Patienten. Der bei hoher Zellzahl (ca. 300000 Leukozyten/ μ l Blut) gemessene hohe Basophilenanteil von ca. 13% verringert sich mit Verdünnung der Probe und bleibt ab einer Konzentration um 50000 Leukozyten/ μ l abwärts nahezu konstant. Bei wiederholten Verdünnungsreihen aus dem peripheren Blut von 7 verschiedenen Patienten mit CML erhielten wir jeweils gleichartige Ergebnisse.

Im Bereich unterhalb von 50000 Leukozyten/ μ l Blut bestand eine gute Übereinstimmung der mittels H1 gemessenen Basophilen-Anteile mit den mikroskopisch be-



Basophile im Differentialblutbild: 7,4%

Abb. 2: H1-Befund bei einer chronisch myeloischen Leukämie. Analyse der Blutprobe nativ (Abb. 2A) und nach 1:10-Verdünnung im Plasma (Abb. 2B)

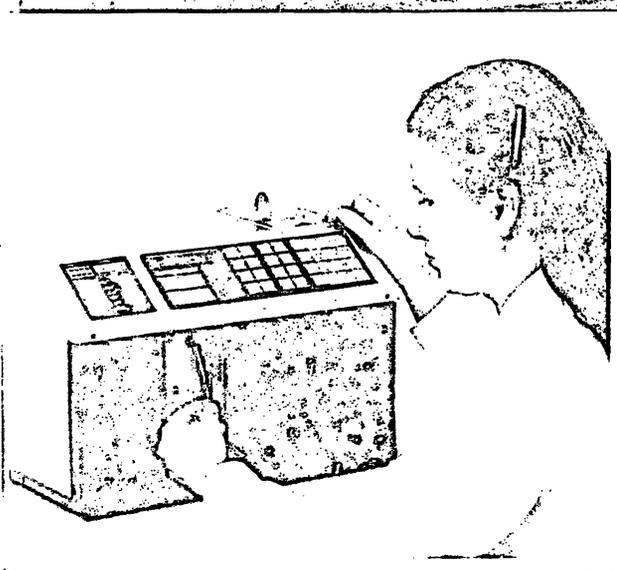


Basophile im Differentialblutbild: 7,4%

... eine zeitgemäße Elektrolytbestimmung

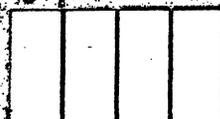
MICROLYTE 6 – ein ionenselektives Meßgerät,
das simultan Na^+ , K^+ , Cl^- , Li^+ , Ca^{++} und pH
mißt, dafür 150 μl Probe benötigt und pro Stunde
über 400 Ergebnisse ermittelt.

Ein System, das durch modernste Technologie im
Routine- und Notfallbetrieb zuverlässige Meßwerte
sicherstellt und ergänzend dazu enorm
wirtschaftlich arbeitet.



Übrigens: KONE hat nahezu 10 Jahre Erfahrung
mit ionenselektiven Elektroden.

Warum sollten Sie sich mit weniger
zufriedengeben?



Ein führender Hersteller klin.-chem. Analysensysteme

KONE DY MEDZINTECHNIK
Niederlassung Deutschland Feldbornstr. 1A
D-2085 Duldorn
Tel. 0 41 06-40 81, Telex 2 180 668 kone d
Telefax 0 41 06-606 90

JURAMED®

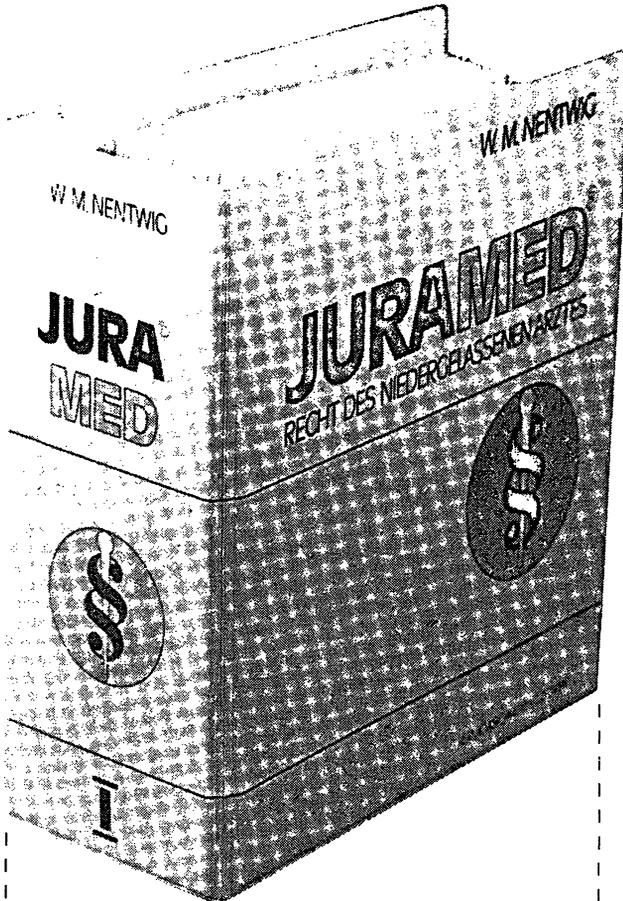
RECHT DES NIEDERGELASSENEN ARZTES

Was ist JURAMED?

JURAMED ist ein praxisnahes Werk über das Recht des niedergelassenen Arztes, zusammengestellt von anerkannten Fachleuten, die wissen, wo den niedergelassenen Arzt (juristisch) der Schuh drückt.

Die übersichtliche Gestaltung des Werkes und ein hervorragend gegliedertes Register ermöglichen dem Ratsuchenden, in kürzester Zeit fündig zu werden. Die hier jeweils angebotene prägnante Problemlösung, auch auf arbeitsrechtlichem Gebiet, erlaubt es dem Benutzer, zu agieren und nicht zu reagieren.

Nentwig, W. M.: JURAMED – Recht des niedergelassenen Arztes. Loseblattwerk im Sammelordner, 2. Auflage, 98,- DM, einmal jährlich erscheinende Nachtragslieferung (Seitenpreis 0,29 DM), ISBN 3-87409-003-5.



Hiermit bestelle ich das Grundwerk **JURAMED**, 518 Seiten, zum Preis von 98,- DM sowie die einmal jährlich erscheinende Nachtragslieferung (Seitenpreis 0,29 DM).

Name: _____

Straße: _____

PLZ/Ort: _____

Datum: _____ Unterschrift: _____

Diese Bestellung kann ich binnen einer Frist von einer Woche schriftlich widerrufen. Der Widerruf ist an den Verlag Kirchheim, Postfach 2524, 6500 Mainz, zu richten. Zur Wahrung der Frist genügt die rechtzeitige Absendung des Widerrufs. Diesen Hinweis habe ich zur Kenntnis genommen und bestätige dies durch meine 2. Unterschrift.

Datum: _____ Unterschrift: _____



Warum ist JURAMED immer aktuell?

Da es sich um eine Loseblattsammlung handelt, sind die häufig auftretenden Änderungen in Gesetz und Rechtsprechung in kürzester Zeit Bestandteile des Werkes und stehen aktuell zur Verfügung.

Die Beschränkung auf die wesentlichen Kernprobleme der jeweiligen Fallgestaltung und deren griffige Darstellung erlaubt es auch dem unter chronischer Zeitnot leidenden Leser, schnell umfassend informiert zu sein.

In einer Zeit, in der sich der niedergelassene Arzt mehr und mehr mit rechtlichen Problemen konfrontiert sieht, ist JURAMED ein unentbehrlicher Begleiter.

**VERLAG
KIRCHHEIM
MAINZ**

Postfach 2524, 6500 Mainz

Tab. 1: Basophilenzählung. Vergleich von H1 und mikroskopischer Differenzierung bei Patienten mit CML (Angaben in %)

H1	0,7	1,0	3,0	4,0	4,2	4,5	4,6	6,0	8,7
Mikroskop (800 Z.)	0	0,4	3,2	3,1	5,7	6,8	6,4	7,4	9,6

stimmten Zahlen (Tab.1), wobei der H1 eine Tendenz zu niedrigeren Werten zeigte. Angesichts der geringen Probenzahl zeigte sich hierfür jedoch keine Signifikanz.

Die falsch-hohen Basophilenzahlen in den zellreichen Blutproben weisen auf ein generelles Problem des Basophilenkanals und sollen daher im folgenden Abschnitt besprochen werden.

Pseudo-Basophilen

Wie eingangs erwähnt, bedient sich der H1 zur getrennten Quantifizierung der Basophilen des sogenannten Zell-Stripping, in dessen Folge die Basophilen durch ihre Streulicht-Eigenschaften identifizierbar sind. Bei dieser Technik sind prinzipiell zwei Arten von Störungen denkbar:

Zum einen kann das Stripping unvollständig verlaufen, zum anderen können beispielsweise atypische Zellen unter diesen Bedingungen den Basophilen ähnliche Streulichteigenschaften zeigen.

Welcher der beiden Effekte im Einzelfall vorliegt, ist zu meist schwer zu eruieren, jedoch gibt es typische und reproduzierbare Störungen der Basophilenzählung, welche hier kurz dargestellt werden sollen.

Bei jeder Leukozytose, gleich welcher Ursache, ist mit einer falschen Basophilie zu rechnen. Stellvertretend seien hier die CML (Abb. 2A) und die CLL (Abb. 5) gezeigt, jedoch ist dieser Effekt ebenso bei reaktiven Granulozytosen, akuten Leukämien sowie bei leukämischer Ausschwemmung solider Lymphome anzutreffen. Die kritische Schwelle liegt bei etwa 50000 Leukozyten pro μ l Blut.

Wird die betreffende Blutprobe mit Plasma verdünnt, so verschwindet diese falsche Basophilie (Abb. 2B/5). Die Abhängigkeit dieser Störung von der Zellkonzentration deutet auf technische Grenzen des Analysators bei hohen Leukozytenzahlen, in dem Sinn, daß die Lyse-Kapazität des Reagenz in der gegebenen Zeit in diesen Fällen nicht ausreicht; es resultiert ein inkomplettes „Stripping“. Durch diese unvollständige Vorbehandlung werden einige Leukozyten in der folgenden Streulichtanalyse vom Gerät fälschlich als Basophile interpretiert.

Ein anderes typisches Phänomen wurde bei Proben aus der Pädiatrie beobachtet. In bis zu 20% der Blutproben Neugeborener bietet das Nukleogramm aus dem Baso-Kanal einen ganz eigenen Aspekt (Abb. 4A): Die Population der „mononukleären“ Zellen ist gewissermaßen nach oben abgeknickt und ragt als Ganze in das Basophilenfeld hinein. Als Ursache für diese Art der Pseudo-Basophilie, vom H1-Befund aus gesehen, kommen sowohl die gegenüber Erwachsenen andere Größenverteilung der Lymphozyten wie auch eine erhöhte Resistenz gegenüber dem hier eingesetzten Lyse-Reagenz in Frage. Dieses spezielle Bild fanden wir, mit einer einzigen Ausnahme (einem 8jährigen Kind mit einem Herzfehler), ausschließlich im Blut von Neugeborenen und jungen Säuglingen.

Im Zuge von Erkrankungen, welche das lymphatische System betreffen, lassen sich auch bei mäßig erhöhten Lym-

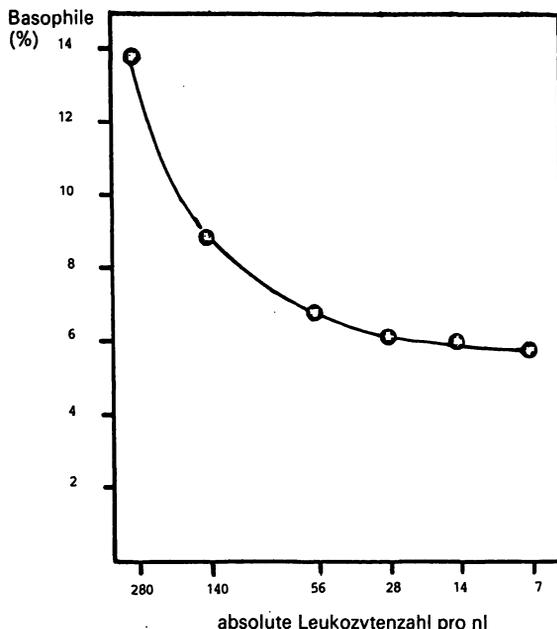


Abb. 3: Basophilenzählung des H1 bei sequentieller Probenverdünnung. Blut eines Patienten mit CML, in Plasma verdünnt und im H1 analysiert. Abszisse: absolute Leukozytenzahl (Nativprobe: 280/nl) vor und nach Verdünnung bis 1:40, Ordinate: Basophilenanteil (%) im H1-Befund

phozytenzahlen, z. B. 20000/ μ l, mit atypischen Zellen im H1-Befund falsche Basophilen-Populationen beobachten. Dies betrifft Virus-Infektionen wie die infektiöse Mononukleose (Abb. 4B) und lymphatische Leukämien.

Ausgeprägte Fälle falscher Basophilen-Populationen ließen sich bei leukämischer Ausschwemmung solider Lymphome beobachten. Vertreten waren dabei vornehmlich Lymphome vom T-Zelltyp. Wie Abb. 4C zeigt, bilden die falschen Basophilen im Falle eines Lymphoms ein kompaktes Zell-Cluster, wohingegen bei hohen Zellzahlen das Basophilenfeld großflächiger ausgefüllt wird (vgl. Abb. 2A).

Pseudo-Basophilien bei viralen Erkrankungen und Lymphomen sind nicht abhängig von der Zellkonzentration. Als Ursache kommt daher bei viralen Erkrankungen eine erhöhte Lyse-Resistenz in Betracht, oder, was im Falle atypischer Zellen wahrscheinlich erscheint, Streulichteigenschaften der Zellkerne, die zu einer falschen Klassifizierung als Basophile führen.

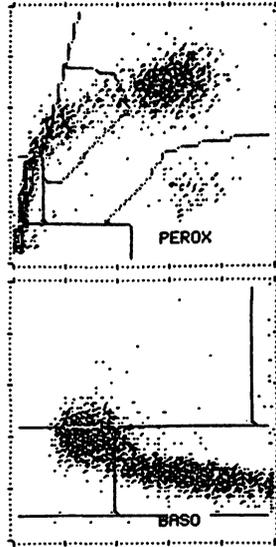
Auffällig war in den meisten uns bekannten Fällen von Lymphomen mit leukämischer Ausschwemmung eine zahlenmäßige Übereinstimmung der „falschen Basophilen“ mit den LUC aus dem Peroxidase-Kanal (s. Abb. 4C), bei einem Anteil von bis zu 50% atypischen Zellen. Es ist in keiner Weise bewiesen, daß jeweils die gleiche pathologische Zellpopulation in beiden Kanälen erfaßt wurde, jedoch ist die häufig exakte Übereinstimmung der Werte bei völlig unterschiedlicher Meßtechnik bemerkenswert.

An dieser Stelle sollte kurz erwähnt werden, daß EDTA-Blutproben nach 12–24 Std. Lagerungszeit bei einer H1-Analyse einige typische Veränderungen zeigen, zu denen auch eine falsche Basophilie gehört.

Ist eine Pseudo-Basophilie als solche erkannt und ihre Ursache bekannt, beeinträchtigt sie die Aussagekraft des

4A

CBC		
6.38	x10 ⁹ /µl WBC	
%	DIFF	x10 ³ /µl
41.7	NEUT	2.66
40.1*	LYMP	2.56*
H 10.3	MONO	.66
4.0	EOS	.26
H 10.6*	BASO H	.68*
3.9*	LUC	.25*
LI		2.54
MPXI		3.3
WBC FLAGS = 0000		

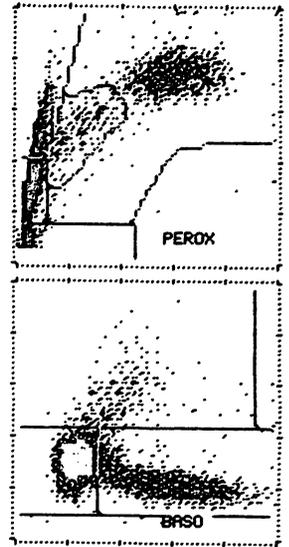


MORPHOLOGY FLAGS		
PARAMETER	SUSP	VERIFY
ANISO	+	
MICRO		
MACRO	++	
VAR	+	
HYPO	++	
HYPER		
L SHIFT		
ATYP		
BLASTS		
OTHER	N	
OTHER		

Basophile im Differentialblutbild: 0,3%

4B

CBC		
H 19.86	x10 ⁹ /L WBC	
%	DIFF	x10 ³ /µl
L 17.2	NEUT	3.42
H 70.2*	LYMP H	13.94*
3.5	MONO	.70
.1	EOS	.01
H 3.4*	BASO H	.67*
H 9.0*	LUC H	1.79*
LI		2.54
MPXI		-4.4

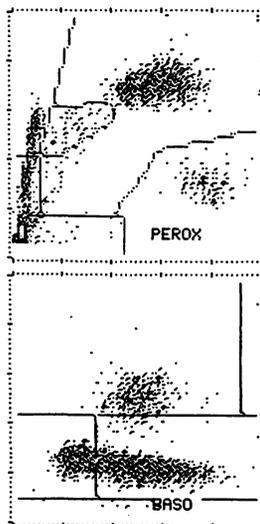


MORPHOLOGY FLAGS		
PARAMETER	SUSP	VERIFY
ANISO		
MICRO		
MACRO	+	
VAR		
HYPO		
HYPER		
L SHIFT		
ATYP		
BLASTS		
OTHER		
OTHER		

Basophile im Differentialblutbild: 0,3%

4C

CBC		
5.92	x10 ⁹ /L WBC	
%	DIFF	x10 ³ /L
58.8	NEUT	3.48
L 15.4*	LYMP	.91*
3.6	MONO	.21
H 6.7	EOS	.40
H 16.3*	BASO H	.96*
H 15.5*	LUC H	.92*
LI		2.08
MPXI		-3.5
WBC FLAGS 0001		



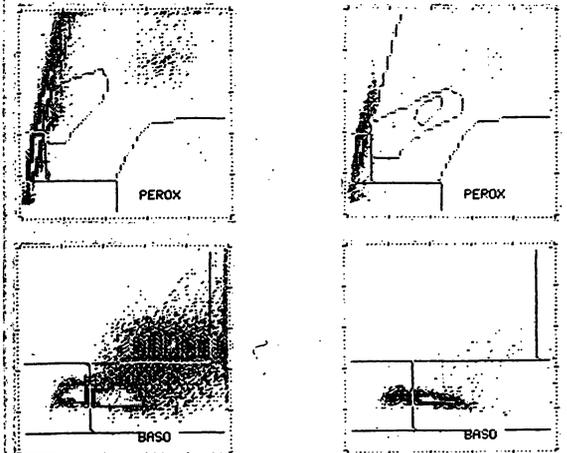
MORPHOLOGY FLAGS		
PARAMETER	SUSP	VERIFY
ANISO		
MICRO		
MACRO		
VAR		
HYPO		
HYPER		
L SHIFT		
ATYP	+	
BLASTS		
OTHER		
OTHER		

Basophile im Differentialblutbild: 0,3%

Abb. 4: Pseudo-Basophilien im H1-Befund bei Neugeborenenblut (4A), infektiöser Mononukleose (4B) und einem T-Lymphom in leukämischer Phase (4C, nähere Erläuterungen im Text)

CLL

1:20 (Plasma)



ca 400,000 Leuko/µl

CBC		
L 20.79	x10 ⁹ /L WBC	
%	DIFF	x10 ³ /L
L .6*	NEUT	2.52*
H 72.2*	LYMP H	28.9*
L .5*	MONO H	1.79*
.0*	EOS	.05*
H 9.7*	BASO H	37.74*
H 26.7*	LUC H	10.8*
BASO		
MPXI		74.4
MPXI		13.8

CBC		
H 20.79	x10 ⁹ /L WBC	
%	DIFF	x10 ³ /L
L .8	NEUT L	.16
H 90.0	LYMP H	18.71
L .2	MONO L	.04
.0	EOS	.00
.6	BASO	.12
H 8.4	LUC H	1.75
BASO		
MPXI		78.4
MPXI		21.0

Abb. 5: Leukozytendifferenzierung mittels H1 bei einer chronisch lymphatischen Leukämie (Daten aus Peroxidase- und Baso-Kanal). Analyse der Blutprobe nativ und nach Verdünnung 1:20 in Plasma

H1-Befundes kaum, sofern die Zahl der echten Basophilen nicht unbedingt gebraucht wird. Dies liegt in der Software-Verarbeitung der Differenzierungsdaten begründet: Überschreiten die Basophilen-Impulse einen Anteil von 2,5%, werden sie bei der prozentualen Auswertung der H1-Differenzierung zunächst ausgespart und dann getrennt, quasi als überzählige Zellen, aufgeführt. Die Zählung aller Leukozytenpopulationen, welche sich aus dem Peroxidasekanal ableiten, einschließlich der Lymphozyten, wird daher bei falscher Basophilie nicht gestört. Hingegen muß, als Konsequenz des genannten Auswertungsverfahrens, im Fall echter Basophilie bedacht werden, daß die Summe der Prozentangaben dann nicht 100, sondern (100 + Basophile) beträgt. Bei echter Basophilie muß der angezeigte Lymphozytenanteil um den Basophilenanteil bereinigt werden, ein Vorgang, der bei Basophilenzahlen unterhalb der Schwelle von 2,5% vom Gerät automatisch geleistet wird. Diese Form der Verrechnung von Basophilen-Impulsen folgt sicherlich der Erfahrung, daß falsche Basophilien, wenn auch relativ selten, so doch häufiger sind als echte Basophilien.

Auswertung der Kernanalyse

Die Laserstreulicht-Analyse der Leukozytenkerne im Baso-Kanal ergibt eine Einteilung in zwei Klassen, eine rundkernige und eine polymorphkernige Population. Wie eingangs erläutert, leitet der H1 aus einer Gegenüberstellung dieser Kern-Populationen und der Zell-Kategorien des Peroxidase-Kanals einige Hinweise auf pathologische Blutbildveränderungen ab:

- die Linksverschiebung, d.h. eine Vermehrung der Stabkernigen (LV, abgestuft + bis +++)
- das Auftreten unreifer Granulozyten-Vorstufen jenseits der Stabkernigen (UG)
- das Auftreten von Blasten.

a) Linksverschiebung/unreife Granulozyten

Diese Signale beruhen auf unterschiedlichen Rechenvorgängen (s. Einleitung), sollen hier jedoch gemeinsam abgehandelt werden, da sie in ihrer diagnostischen Aussage verwandt sind.

Generell war zu bemerken, daß die Ausprägung einer Linksverschiebung, wie sie sich unter dem Mikroskop präsentierte, häufig nicht mit der Abstufung des Gerätesignals (LV + bis +++ bzw. UG) im Einklang stand. Aus diesem Grund wurden zur Auswertung der Signalgebung des H1 alle Signale im Sinne einer Positiv-Negativ-Ausgabe zusammengefaßt.

Die hier gezeigten Ergebnisse fassen die Befunde von 10 repräsentativen Routine-Arbeitstagen zusammen (s. Methodik).

Eine Auswertung der mittels H1 oder bei mikroskopischer Differenzierung signalisierten Linksverschiebungen zeigt Tab. 2. Als Referenz galt hierbei die mikroskopische 200-Zellenzählung, die Grenze für eine Linksverschiebung wurde bei 5 Stabkernigen oder anderen Vorstufen der Granulopoese pro 100 Zellen angesetzt.

Bei primärer H1-Analyse ergab die mikroskopische Nachuntersuchung im Beobachtungszeitraum eine Rate von ca. 50% falsch-positiven Signalen. Das umgekehrte Vorgehen, d.h. eine H1-Analyse nach mikroskopisch befundeter Linksverschiebung, erlaubt die Abschätzung falsch-negativer H1-Signale, welche sich im Bereich von 30% bewegen.

Tab. 2: Linksverschiebung. H1-Signale im Vergleich zur mikroskopischen Differenzierung (Vorgehen s. Methodik)

	richtig-positiv	falsch-positiv	Gesamtzahl
H1 primär	25	22	47
		falsch-negativ	
H1 sekundär (nach Mikroskop)	11	7	18

Die Alterung jeder EDTA-Blutprobe führt im Laufe von 12–24 Std. zu degenerativen Zellveränderungen, welche in der H1-Analyse typischerweise das Signal einer Linksverschiebung hervorrufen. Derartiges Material, wie auch jede Blutprobe, welche mikroskopisch eine längere Lagerung vermuten ließ, wurde ausgesondert und ging nicht in die Betrachtungen zur Linksverschiebung ein.

Blasten

Dem Blastensignal wurde in einigen Arbeiten eine besondere Sensitivität und Spezifität zugesprochen (5, 7). Nach eigener Erfahrung bestehen jedoch Interferenzen insbesondere mit reaktiv veränderten Lymphozyten. Bei Niereninsuffizienz, toxisch bedingten Leukopenien sowie nach Chemotherapie solider Tumoren wurde das Blastensignal gehäuft beobachtet, ohne daß sich dieser Hinweis mikroskopisch bestätigen ließ. Auch zeigte sich in solchen Fällen eine Instabilität des Blastensignals bei Mehrfach-Analysen derselben Blutprobe. Bei über 90% der leukämischen Proben, der myeloischen wie der lymphatischen Reihe, wurde das Vorliegen von Blasten jedoch vom H1 richtig signalisiert. Bei der morphologischen Vielgestaltigkeit von Blasten ist nicht verwunderlich, daß eine Streulichtanalyse von Leukozytenkernen, aus der das Blastensignal abgeleitet wird, nicht alle denkbaren Formen zu erfassen vermag. Bei einem Anteil von über 5% Blasten oder hohen Gesamtleukozytenzahlen deuten erhöhte LUC-Werte in Verbindung mit dem Bild des LeukoGRAMMS auch bei fehlendem Blastensignal auf Abnormalitäten in der Blutprobe. Nach unserer Erfahrung läßt sich jedoch die Sensitivität der Blastenerkennung durch das Blastensignal des H1 im Vergleich zur alleinigen Zählung der LUC nicht steigern. Ein Blastenanteil von 4% bei einer Gesamtzellzahl um 20000 kann bei einer H1-Analyse unerkant bleiben.

Zuordnung der Leukozyten zu den Populationen MN und PMN

Wie bereits ausgeführt, werden im Baso-Kanal des H1, basierend auf einer Streulichtanalyse in zwei Winkelbereichen, die Kerne der Leukozyten, mit Ausnahme der Basophilen, in eine rundkernige (MN) und segmentkernige (PMN) Population unterteilt. Diese Einteilung gilt dann als Grundlage für die oben genannten morphologischen Signale (Linksverschiebung, unreife Granulozyten, Blasten). Die Ursache für falsch-positive morphologische Signale liegt somit maßgeblich bei der Kernstrukturanalyse.

Hauptsächlich soll hier ein typisches Artefakt dargestellt werden, welches bereits bei grober Betrachtung der Differenzierungsdiagramme aus Peroxidase- und Baso-Kanal auffällt. Es handelt sich um ein Phänomen, das in

unserem Labor bisher ausschließlich bei chronisch lymphatischen Leukämien beobachtet wurde. Abb. 5 zeigt einen solchen Fall. Um Artefakte durch die hohe Zellzahl auszuschließen, wurde die Probe auch nach Verdünnung in autologem Plasma analysiert (Abb. 4). Bei einem mikroskopisch bestimmten Anteil von nahezu 100% rundkernigen lymphatischen Zellen werden im Baso-Kanal über 70% der Impulse der polymorphkernigen Population, also den segmentkernigen Zellen zugeordnet. Dieser Befund blieb über eine Verdünnungsreihe bis 1:40 konstant. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz zeichnet sich ab, als die betreffende CLL-Blutprobe extern im Lyse-Reagenz des Baso-Kanals (Baso-Dil®) inkubiert wurde: das darauffolgende Ausstrichpräparat zeigte polymorph geknäuelte Zellkerne. Es scheint daher wahrscheinlich, daß diese Zuordnung lymphatischer Zellen zur PMN-Population durch die Einwirkung des Lyse-Reagenz auf atypische Zellen bedingt ist. Dieser Effekt wurde in unserem Labor, in unterschiedlicher Ausprägung, bei ca. 30% der CLL-Patienten beobachtet. Sind die Leukozytenzahlen in einem solchen Fall von CLL nicht extrem erhöht, können sich die Differenzierungsdiagramme von Peroxidase- und Baso-Kanal ähnlich darstellen wie bei kompletten Myeloperoxidase-Mangel und daher Anlaß zu Fehleinschätzungen geben. Ist mikroskopisch eine CLL gesichert, kann die Verlaufskontrolle der Erkrankung trotz der beschriebenen falschen Zuordnung der Kernpopulationen mittels H1 erfolgen, da die Kernanalyse keinen Einfluß auf die Zählung der Leukozytenfraktionen nimmt. Bei komplettem Myeloperoxidase-Mangel, der häufig angeboren ist, ist der H1 zur Leukozytendifferenzierung selbstverständlich nicht einsetzbar.

Schlußfolgerungen

Die Daten aus dem Baso-Kanal des H1 dienen einerseits der Quantifizierung der basophilen Granulozyten im peripherem Blut. Andererseits bilden sie, unter Berücksichtigung der Daten aus dem Peroxidase-Kanal, die Grundlage für das Signalisieren einiger Blutbildveränderungen.

Nach den hier beschriebenen Erfahrungen liefert der H1 praktisch keine falsch-negativen Befunde in bezug auf die Basophilenzählung. Uns ist kein Fall bekannt, in dem der H1 eine Basophilie übersehen hätte. Wohl aber gibt es eine Reihe von Situationen, in denen der H1 andere Leukozyten fälschlich den Basophilen zuordnet. Derartige Phänomene bei hohen Zellzahlen, bei Neugeborenenblut, viralen Erkrankungen und einigen Lymphomen zeigen zumeist charakteristische Bilder. Dennoch empfiehlt sich eine großzügige mikroskopische Kontrolle. So gab es in unserem Labor kürzlich den Fall eines Lymphomes mit Pseudo-Basophilie, bei dem sich im Verlauf der Erkrankung eine echte Basophilie entwickelte, was aus dem Basophilen-Diagramm keineswegs zu ersehen war.

Die morphologischen Signale zur Linksverschiebung (LV + bis + + +, UG), wie auch das Blastensignal, sind nach unseren Erfahrungen mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, da in beiden Fällen mit falsch negativen H1-Befunden zu rechnen ist. Beim Blastensignal ist dies zwar relativ selten, jedoch ist bei der klinischen Tragweite der Aussage bei entsprechender Fragestellung in unseren Augen eine mikroskopische Untersuchung vorzuziehen. Was die Linksverschiebung betrifft, so hat sie in unserem Labor insofern an Bedeutung eingebüßt, als in vielen Fällen die Bestimmung von Akut-Phase-Proteinen wie des CRP oder auch der Leukozyten-Elastase eine höhere

Sensitivität für akut entzündliche Vorgänge bietet. Auch hier gilt jedoch, daß das Aufspüren von Vorstufen der Granulopoese bei entsprechender Indikation die Domäne des Mikroskops geblieben ist (vgl. 4, 11). Das Signalisieren von Blasten oder einer Linksverschiebung durch den H1 führt in unserem Labor nur dann zu einer mikroskopischen Kontrolle, wenn andere Kriterien wie hohe Zellzahl, erhöhte LUC-Werte oder Abnormalitäten der Differenzierungsdiagramme sich dazugesellen.

Die gezeigten Störungen, welche vom Basophilen-Kanal des H1 ausgehen, betreffen in unserem Krankengut insgesamt nur etwa 1–2% der Blutproben, so daß die Belastung durch zusätzliche mikroskopische Untersuchungen gering ist. Unsere Nachdifferenzierungsrate liegt, nach vergleichenden Doppelanalysen (H1/Ausstrich) über mehrere Monate, derzeit insgesamt bei ca. 5%, wobei, mit Ausnahme von Säuglingsblut, alle zur Leukozytendifferenzierung eingehenden Blutproben primär mittels H1 analysiert werden.

Dennoch zeigen die analytischen Grenzen eines jeden Automaten, so auch des H1, daß auf die mikroskopische Zell-Differenzierung nicht verzichtet werden kann. Es ist daher zu fordern, daß jedes Labor, welches Differenzierungsautomaten zur Blutbildanalytik einsetzt, sowohl technisch wie personell in der Lage sein muß, mikroskopische Differentialblutbilder zu erstellen und zu beurteilen, um die maschinell erstellten Befunde kontrollieren und ergänzen zu können.

Schrifttum:

1. DE CRESCE, R.: The Technicon H¹: A discrete fully automated complete blood cell analyzer. *Lab. Med.* 17, 17–21 (1986).
2. JACQUILLAT, C., CHASTANG, C., TANZER, J., BRIERE, J., WEIL, M., PEREIRANETO, M., GEMON-AUCLERC, F., SCHAISON, G., DOMINGO, A., BOIRON, M., BERNARD, J.: Facteurs de pronostic de la leucémie myéloïde chronique. A propos de 798 observations. *Nouv. Rev. Fr. Hemat.* 15, 229–240 (1975).
3. KAMADA, N., UCHINO, H.: Chronologic sequence in appearance of clinical and laboratory findings characteristic of chronic myelocytic leukemia. *Blood* 51, 843–850 (1978).
4. KATZ, N., LENZ, T.: Vergleich der Volumen-Verteilungs-Analyse von Leukozyten am Coulter Stacker mit der cytochemisch-cytometrischen Klassifizierung am Technicon H 6000 und der mikroskopischen Differenzierung. *Lab. med.* 12, 354–362 (1988).
5. KAWARABAYASHI, K., TSUDA, I., TATSUMI, N., OKUDA, K.: Leukemic blasts detected by the Technicon H¹ blood cell counter. *Am. J. Clin. Pathol.* 88, 624–627 (1987).
6. MALIN, M., BEN-DAVID, D., GRONER, W.: Factors regulating basophil lobularity measurement on Technicon H¹ Hematology System. XXI Congress of the International Society of Hematology, p. 637 (1986) (Abstr.).
7. D'ONOFRIO, G., MANCINI, S., LEONE, G., BIZZI, B., MANGO, G.: Identification of blast cells in peripheral blood through automatic assessment of nuclear density: a new tool for monitoring patients with acute leukemia. *Brit. J. Haemat.* 66, 473–477 (1987).
8. RÜMKE, C. L., BEZEMER, P. D., KUIK, D. J.: Normal values and least significant differences for differential leukocyte counts. *J. Chron. Dis.* 28, 661–668 (1975).
9. SCHNEIDER, W.: Ein flexibler Hämatologie-Analysator mit neuartigen Meßtechniken und diagnostischen Aussagen. *MTA* 5/86, 1–8 (1986).
10. THEOLOGIDES, A.: Unfavorable signs in patients with chronic myeloid leukemia. *Ann. Int. Med.* 76, 95–99 (1972).
11. WENZ, B., RAMIREZ, M. A., BURNS, E. R.: The H¹ hematology analyzer. Its performance characteristics and value in the diagnosis of infectious disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 111, 521–524 (1987).

Anschrift des Verfassers:

Dr. Nicole Etavard
Abt. Klin. Chemie
Universitäts-Krankenhaus Eppendorf
Martinistraße 52
2000 Hamburg 20

Das neue LP700 von Dr. Lange: Methodenvielfalt und Einsatzvielfalt. Und jede Menge weiterer Pluspunkte: einfache Bedienung, hohe Präzision und Richtigkeit, höchste Wirtschaftlichkeit in Anschaffung und täglichem Betrieb. Die Zukunft schon eingebaut: leichte Aufnahme neuer Methoden, für bichromatische Messungen vorbereitet usw. Mit Bedienerführung und grafikfähigem Drucker.

Dr. Lange LP 700. Das Universal-Photometer à la carte:

Einsatzvielfalt à la carte: z.B. Meßplatz für die Routine (150 Kinetiken/Stunde bzw. noch mehr Substrate). Z.B. für den Notfall (24-Stunden-Bereitschaft), z.B. im Nachtdienst und im Speziallabor. Zum Beispiel aber auch als Backup- Laborsystem, falls Ihr Automat plötzlich ausfällt.

Sollte hier die Anforderungskarte fehlen, schreiben Sie bitte wegen weiterer Unterlagen zur Produktfamilie LP 700 an Dr. Bruno Lange GmbH, Königsweg 10, 1000 Berlin 37.

Dr. Bruno Lange GmbH
Königsweg 10
D-1000 Berlin 37
Telefon (030) 316 02-0

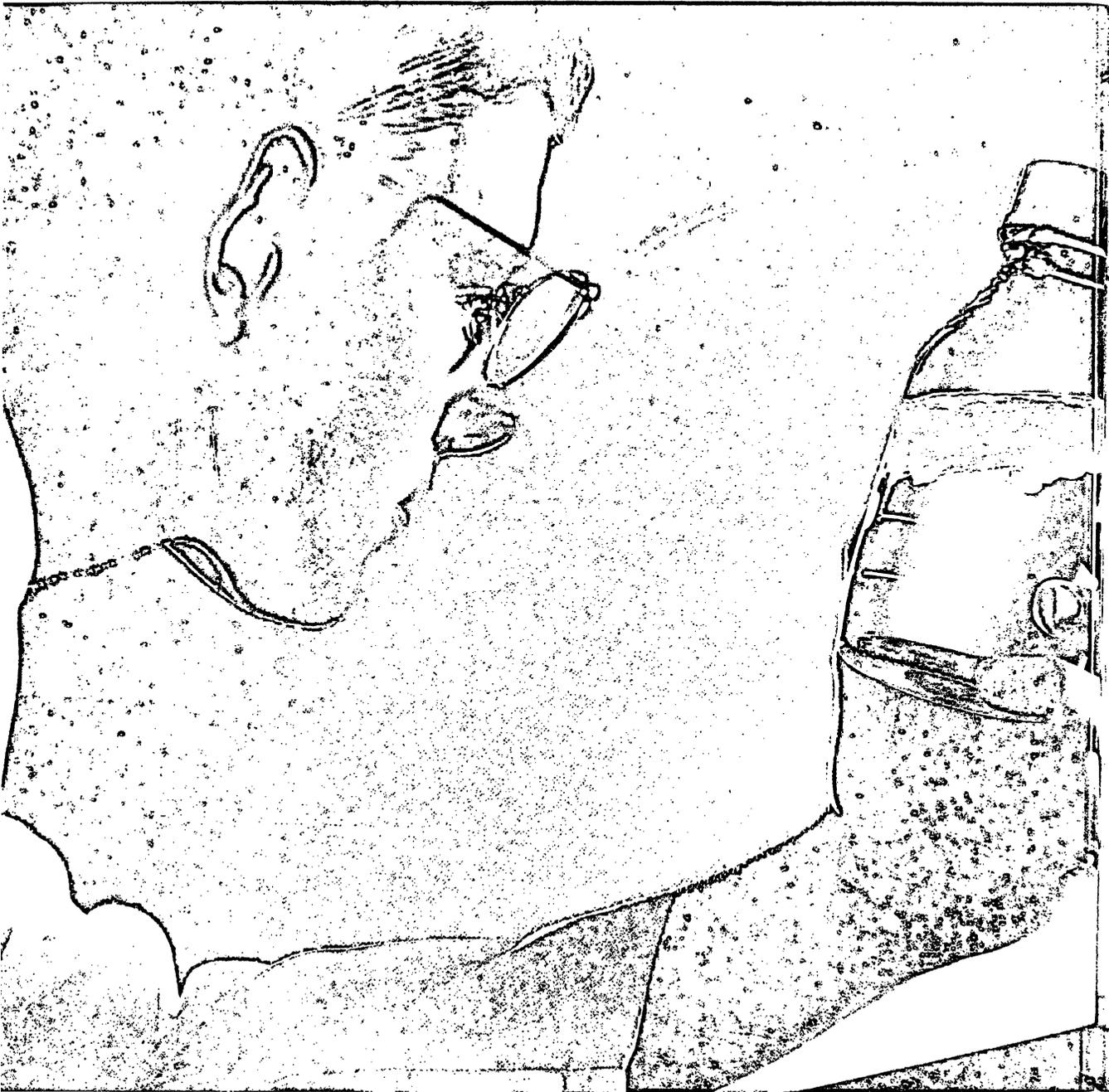


DR LANGE

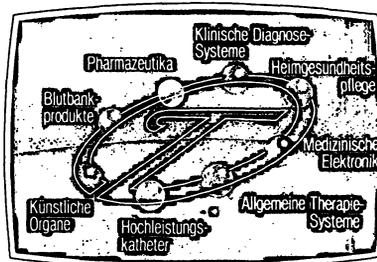
Methodenvielfalt à la carte:
Enzyme, Substrate, Lipide,
Gerinnung, Hormone,
Tumormarker, HbA_{1c} ...
mehr als 100 mögliche
Methoden.

Verfahrensvielfalt à la carte:
Endpunktbestimmung,
Endpunkte mit unlinearen
Bezugskurven, Kinetiken,
Enzymimmunoassays,
Fixed-Absorbance.

*Ihr Anspruch:
Qualität.*



**Terumo:
Qualität
liegt uns
am Herzen.**



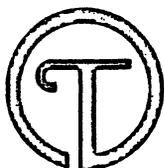
Wenn es um das Wohl Ihrer Patienten geht, dann gibt es keinen Ersatz für Qualität. Sie kümmern sich um Ihre Patienten – Terumo

kümmert sich um Sie. Terumo stellt weltweit eine breite Palette – weit über 1500 – verschiedenster medizinischer Qualitätspro-

dukte her. Dazu gehören

- Spritzen und Kanülen,
- IV-Katheter,
- Blutentnahmesysteme,
- Angiographie-Katheter,
- elektronische Ausrüstungen wie klinische Test- und Diagnose-Anlagen,
- High-Tech-Produkte wie z.B. künstliche Organe.

Vom Rohmaterial zum Endprodukt – Qualität ist selbstverständlich für Terumo. Schliesslich ist es auch für Sie selbstverständlich, nur das Beste zu wollen.



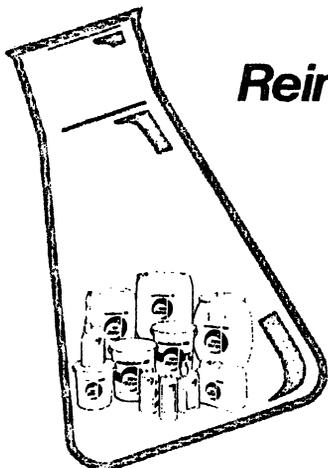
Immer das Neueste auf dem Gebiet der Medizin.

TERUMO®

Niederlassung Deutschland: Terumo (Deutschland) GmbH, Lyoner Str. 11a / Postfach 71.08.63, 6000 Frankfurt (M) 71, Tel.: (069) 66.66.727.
Europäisches Hauptwerk und Produktion: Haasrode (Belgien).
Weitere Zweigstellen: Brüssel, London, Paris, Rom, Madrid.



• Terumo Europe N.V.



Reinigung und Desinfektion von Laborglas



mit neodisher® Spezialprodukten
für höchste Ansprüche

- im Forschungslabor ● im Lebensmittellabor
- im Industrielabor ● im Kontrolllabor



DR. WEIGERT

CHEMISCHE FABRIK DR. WEIGERT (GMBH & CO.)
MÜHLENHAGEN 85 POSTFACH 28 01 40 D-2000 HAMBURG 28
TELEFON 040/78 96 0-0 TELEFAX 040/78 96 0-20 TELEY 2 162 114

Stellenangebot

Für verschiedene Auftraggeber im Diagnostik-Bereich suchen wir Mitarbeiter in leitenden Funktionen.
Hier eine Auswahl:

Produktmanager/in Gerinnung

Hessen

Naturwissenschaftler, veterinär- und humanmedizinisch vorgebildet mit Vertriebserfahrung

Kennziffer 021

Arzt/Ärztin für Nuklearmedizin

Nordrhein-Westfalen

als Partner(in) für Assoziation in Medizinischem Labor

Kennziffer 022

Arzt/Ärztin für Mikrobiologie

Nordrhein-Westfalen

als Partner(in) mit Gebietsbezeichnung für Assoziation in Medizinischem Labor

Kennziffer 023

Gebietsverkaufsleiter Diagnostika

Köln bis Frankfurt

RIA's, EIA's und Mikrobiologische Produkte

Kennziffer 025

Biochemiker für Medizinisches Labor

Rhein-Main-Neckar

einschlägige Erfahrung in HPLC, AAS, DNA-Hybridisierung

Kennziffer 027

Verkaufsleiter/in Deutschland

Rhein-Main

pharmakologisch, biologisch oder humanmedizinisch vorgebildet, Englischkenntnisse

Kennziffer 028

Produktionsleiter/In Allergologie

Deutschland

Erfahrung in der Herstellung von Allergenscheiben für das RAST-System und dazu gehörenden Produkten

Kennziffer 030

Bewerbungen mit Lebenslauf und Lichtbild
senden Sie bitte an

DELAB Personalberatung GmbH

Schusterstraße 13, Postfach 21 08, 6500 Mainz 1



DELAB