

## Einfluß auf die Präzision der Messung

Die beschriebenen Störgrößen wirken sich nicht nur auf die Richtigkeit, sondern auch auf die Präzision der Messung aus. Liegen (ausgewählt ist ein Beispiel) Thrombozytenaggregate vor, so ist der Thrombozytenwert falsch niedrig (Mittelwert 59 G/l anstatt 219 G/l) und der Leukozytenwert ist falsch hoch bestimmt (Mittelwert 7.6 anstatt 6.6 G/l). Der Variationskoeffizient als Maß für die Präzision steigt von 1.1 % für die Leukozytenzählung und 0.8 % für die Thrombozytenzählung ohne Thrombozytenaggregate auf 4.5 % für die Leukozytenzählung und 32 % für die Thrombozytenzählung bei der Probe mit Thrombozytenaggregaten. Das bedeutet, daß beim Vorliegen von Störgrößen Korrekturberechnungen über Hilfsformeln nicht angewendet werden dürfen.

## Analytische Beurteilung

Jeder Anwender von hämatologischen Analysensystemen muß die Meßprinzipien und Arbeitsweise „seines“ Geräts kennen, um Störgrößen sicher erfassen zu können. Liegen Störgrößen vor, dann kann als einfaches Routineverfahren die Zählung der Blutzellen in der Zählkammer empfohlen werden. Diese Vorgehensweise sollte konsequent angewendet werden, um bei der Analyse jeder individuellen Probe den medizinisch begründeten Qualitätsanforderungen zu genügen.

## Literatur

1. Stobbe H (1991) Plättchen-Partikelkonzentration. In: Boll I, Heller S (Hrsg.) *Praktische Blutzell Diagnostik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 84–90
2. Koeppen KM, Heller S (1991) Differentialblutbild. In: Boll I, Heller S (Hrsg.) *Praktische Blutzell Diagnostik*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 162–166
3. Späth-Schwalbe E, Heimpel H (1993) Pseudothrombozytopenie – Pseudothrombozytose. *Lab med* 17, 152

## Bestimmung der Blutplättchenkonzentration mit Hilfe monoklonaler Antikörper (CD41a/CD42b/CD61)

A. von Ruecker<sup>1</sup>, R. Dickerhoff<sup>2</sup>,  
F. Bidlingmaier<sup>1</sup>

### Zweck der Methode, Anwendungsbereich

Trotz diverser Fortschritte in der Zellzähltechnik kann die Bestimmung der Blutplättchenkonzentration noch immer als Problemfall der Zellzählmethoden bezeichnet werden. Insbesondere bei niedrigen Thrombozytenkonzentrationen ( $< 50 \times 10^9/l$ ) gibt es unterschiedliche Störfaktoren (vgl. Tabelle 1), die von Hämatologieautomaten nicht erkannt oder berücksichtigt werden. Einziger Ausweg ist oft die Bestimmung der Blutplättchenkonzentration in der Zählkammer, mit allen Vor- und Nachteilen (z. B. optische Zuordnung jeder einzelnen Zellkomponente, schlechte Präzision, Thrombozytenaggregate bleiben beim Füllen der Kammer am Deckglas hängen, hoher personeller Aufwand). Die im folgenden beschriebene Methode zeigt, wie mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die spezifische Epitope auf Thrombozyten erkennen, die Blutplättchenkonzentration auch bei sehr niedrigen Thrombozytenzahlen mit guter Präzision und Richtigkeit durch einen Durchflußzytometer bestimmt werden kann.

## Materialien

### Reagenzien und selbsthergestellte Puffer

Monoklonale FITC-konjugierte Antikörper gegen CD41a und CD42b waren von Dianova (Hamburg), anti-CD61 lieferte Becton Dickinson (Heidelberg). PBS (phosphate buffered saline) bestand aus: 0,147 M NaCl; 4,1 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2,3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 15 mM  $\text{NaN}_3$ ; 10 mM Dextrose. Alle Chemikalien wurden von E. Merck, Darmstadt (Reinheitsstufe p.a.) bezogen.

Calibrite™-FITC-konjugierte Fluoreszenzpartikel lieferte Becton Dickinson, Heidelberg. Weitere FITC-Fluoreszenzpartikel zur Quantifizierung der Throm-

Anschrift der Autoren:

<sup>1</sup> Institut für Klin. Biochemie  
Universität Bonn, 53105 Bonn

<sup>2</sup> Johanniter Kinderklinik, 53757 St. Augustin

bozyten kamen von Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). Hierbei ist zu beachten, daß sich die Fluoreszenzpartikel im forward oder/und side light scatter von den Blutplättchen deutlich unterscheiden sollen.

### Geräte

Durchflußzytometrische Untersuchungen wurden mit einem FACScan (Becton Dickinson; Heidelberg) durchgeführt. Zur Auswertung wurde das von der Firma gelieferte Programm Lysis 2 für PC verwendet. Ferner wurde zur Bestimmung der Erythrozytenkonzentrationen und FITC-Partikelkonzentrationen ein Coulter-ZM-Partikelzählgerät eingesetzt (Coulter Electronics GmbH, Krefeld).

### Sonstiges Zubehör/Hinweise

Falcon-Teströhrchen für den FACScan wurden von Becton Dickinson (Heidelberg), 1,5 – 2 ml Testgefäße von Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Unterschiedliche Chargen der Fluoreszenzpartikel oder Calibrite-beads wurden mit Hilfe eines ZM Partikelzählers (Coulter Electronics, Krefeld) quantifiziert. Volumetrische Meßpipetten (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) wurden mit Hilfe gravimetrischer Messungen geeicht, Pipetten mit einem VK über 3 % wurden nicht verwendet (n = 10).

### Patientenvorbereitung und Probengewinnung

Bei der Gewinnung von Blutproben zur Bestimmung der Blutplättchenkonzentration können unterschiedliche Probleme auftreten, die in Tabelle 1 zusammengefaßt dargestellt sind. Standardmäßig soll bei der Messung der Blutplättchenkonzentration venöses Blut

**Tabelle 1.** Störfaktoren bei der Quantifizierung von Blutplättchen im Vollblut

Plättchen:	↓ Plättchenagglutinate ↓ Riesenthrombozyten ↓ Mikrogerinnsel
Leukozyten:	↑ fragile Leukozyten (CLL, Chemotherapie, Intensiv-Patient etc.)
Erythrozyten:	↑ Mikrozyten/Fragmentozyten/Stechäpfel ↑ Erythrozyteneinschlüsse (z. B. Parasiten, Howell-Jolly-Körperchen)
Sonstiges:	↑ elektron. Rauschen, Bakteriämie, cell dust ↑ Paraproteine

Anm.: Pfeile zeigen Veränderung an: ↑ zu hoch; ↓ zu tief

in  $K_2$ EDTA-haltige Röhrchen abgenommen werden. Blutplättchen halten sich am besten bei Raumtemperatur, Blutproben sollten nicht älter als 4 h (maximal 24 h) sein.

### Methodologie, Prinzip der Messung/Methode

Durchflußzytometer für die Immunophänotypisierung von Zellen messen im allgemeinen nicht die Partikelzahl in einem bestimmten Volumen (Ausnahme: Cytoron-Absolute der Fa. Ortho-Diagnostic Systems), sondern bestimmen den prozentualen Anteil einer bestimmten Partikel- oder Zellpopulation an der Gesamtheit aller Partikeln bzw. Zellen. Durch Zufügen einer definierten Menge von Latexpartikeln zu einem definierten Blutprobenvolumen, kann indirekt in jedem Durchflußzytometer eine Volumenmessung vorgenommen werden.

### Beschreibung des Analysengangs

#### Eichung der Latexpartikelkonzentration:

Die Stammlösung einer Latexpartikelsuspension kann auf unterschiedliche Art kalibriert werden. Hierzu eignet sich eine gewöhnliche Zellozählkammer (*cave*: niedrige Präzision, der VK sollte bei 10 Messungen 4 % nicht überschreiten) oder ein Partikelzählgerät (z. B. der hier verwendete Coulter-ZM). Ferner kann man über die sorgfältige Bestimmung der Erythrozytenkonzentration und dem im Durchflußzytometer bestimmbaren Verhältnis aus Erythrozyten und Latexpartikel indirekt auf die Latexpartikelkonzentration schließen. Vor der Anwendung der zuletzt genannten Methode muß abgeklärt werden, ob die Latexpartikel unspezifisch an Oberflächen anhaften oder beim Meßvorgang, z. B. in Abhängigkeit der Plasmaproteinkonzentration, aggregieren können. Empfehlenswert ist, bei der ersten Eichung der Partikelkonzentration mehrere Messungen bei unterschiedlichen Partikelverdünnungen durchzuführen, wobei der VK nicht größer als 5 % sein sollte.

#### Messung einer Blutprobe:

Bestehende Grundeinstellungen (Kompensation, elektronische Verstärkung) am Durchflußzytometer sollten regelmäßig kontrolliert werden. Gegebenenfalls sollte eine Kalibrierung mit Eichpartikeln (z. B. Calibrite™) durchgeführt werden, um die Trennung und Verstärkung der einzelnen Fluoreszenzen zu optimieren.

Patientenblutprobe ( $K_2$ EDTA-Vollblut) gut mischen (ca.  $20 \times 180^\circ$  „überkopf“).

10 µl Vollblut werden mit einer Pipette entnommen und in ein 1,5 – 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Eine definierte Menge an FITC-Latexpartikeln in PBS (etwa der zu erwartenden Blutplättchenzahl entsprechend!) und 10  $\mu$ l monoklonaler, FITC-gekoppelter Antikörper (anti-CD41a, anti-CD42b oder anti-CD61) werden hinzugefügt (Probe P1). Eine zweite Probe (P2) enthält nur Vollblut (10  $\mu$ l) und den monoklonalen FITC-Antikörper (10  $\mu$ l). Das Gesamtvolumen sollte jeweils bei ca. 50  $\mu$ l liegen und kann mit PBS oder einem ähnlichen Puffer ergänzt werden. Nach guter Durchmischung mit einem Probenschüttler (ca. 5 s) wird die Probe im Dunkeln ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird mit 1 ml PBS verdünnt. Wenn die Proben nicht innerhalb 60 min gemessen werden, sollten die Zellen mit 1 ml 1 %-iger Paraformaldehyd-PBS-Lösung verdünnt und fixiert werden. Die Proben werden bis zur Messung im Dunkeln aufbewahrt und sollten innerhalb 4 – 6 h gemessen werden.

Die Probe P2 wird zuerst am Durchflußzytometer gemessen (side light scatter/fluorescence-1 mode). Dies geschieht, um die optimale Verdünnung bzw. Flußrate für die Probe zu ermitteln. Ist die Flußrate zu hoch, tritt Koinkidenz von Erythrozyten und FITC-markierten Thrombozyten auf, d. h. Thrombozyten und Erythrozyten werden als Einheit registriert und es entstehen pseudo-FITC-fluoreszierende Erythrozyten/Leukozyten (vgl. Abb. 1a). Ist die Flußrate richtig, tritt nur eine geringe Koinkidenz auf, die vernachlässigt werden kann (Abb. 1b). Gewöhnlich ist die Probe richtig verdünnt, wenn die Flußrate  $2\text{--}4 \times 10^3$  Partikel bzw. Zellen pro sec beträgt. Mit der selben Geräteeinstellung und Probenverdünnung wird nun die Probe P1 gemessen

(10–50 000 Zellen). Anschließend sollten mit einem ausreichenden FITC-Fluoreszenz-threshold nur die FITC-Latexpartikel und die FITC-markierten Blutplättchen gemessen werden (2000–10 000 FITC-positive Teilchen) (vgl. Abb. 2). Die Thrombozytenkonzentration kann aus dem Verhältnis FITC-Latexpartikel/FITC-markierte Plättchen und der bekannten Latexpartikelkonzentration berechnet werden.

Für Routinezwecke genügen meist 1 – 2 Messungen des gleichen Ansatzes und es kann auf die Verwendung von FITC-Latexpartikel (Probe P2) verzichtet werden, wenn ausreichend gezeigt wurde, daß die Berechnung der Blutplättchenkonzentration auch mit Hilfe der Erythrozytenkonzentration und des Verhältnisses aus FITC-markierten Blutplättchen und Erythrozyten zuverlässig erfolgt. Zur Bestimmung eines Referenzmethodenwertes sollten Messungen bei fünf Probenverdünnungen und jeweils 7 Ansätzen durchgeführt werden.

### Interferenzen

Die dargestellte Methode kann durch Störungen beeinträchtigt werden, die z. B. durch Aggregation der FITC-Latexpartikel mit Plasmaproteinen oder durch Anhaften von Latexpartikeln an Oberflächen von Glas und manchen Kunststoffen verursacht werden. Diese Störungen werden gut erkannt, wenn die Erythrozytenkonzentration mit Hilfe der FITC-Latexpartikelkonzentration und des Verhältnisses aus FITC-Latexpartikel und Erythrozyten berechnet wird (vgl.

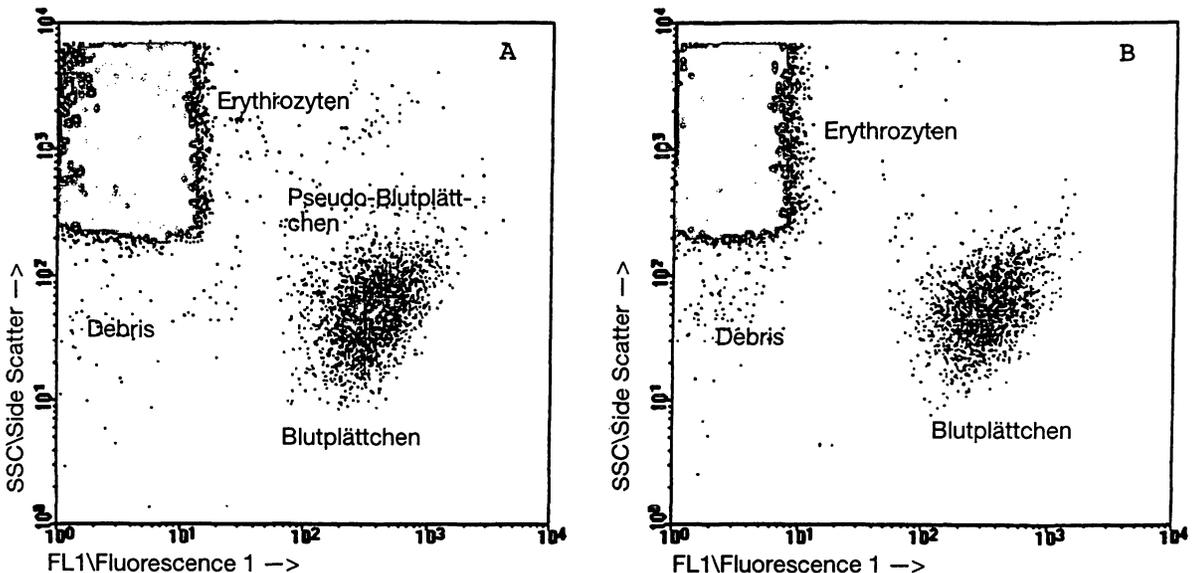


Abb. 1a, b. a) Pseudo FITC-fluoreszierende Erythrozyten/Leukozyten durch Koinkidenz mit FITC-markierten Blutplättchen (anti-CD41a-FITC) bei zu hoher Zellkonzentration und Durchflußrate im Durchflußzytometer (Flußrate ca. 14 000/s). b) Dieselbe Probe wie a) nach Verdünnung der Probe und Erniedrigung der Flußrate (ca. 3400/s)

Abb. 2a) und keine Übereinstimmung mit der im Hämatologiegerät bestimmten Erythrozytenkonzentration vorhanden ist (Toleranzgrenze  $\pm 5\%$ ). Zur Beseitigung dieser Störung genügt oft die Verwendung anderer Glaswaren oder Kunststoffgefäße.

Störungen bei der Markierung von Blutplättchen mit monoklonalen Antikörpern können gelegentlich bei pathologischen Proben beobachtet werden, z. B. eine niedrige FITC-Fluoreszenz der Blutplättchen oder zwei Plättchen-Populationen mit unterschiedlicher FITC-Fluoreszenz. Dies kann die Einstellung des FITC-*threshold* erschweren. Oft können diese Störungen beseitigt werden, wenn zwei FITC-Antikörper gegen unterschiedliche Epitope gleichzeitig eingesetzt werden (z. B. CD41a/CD42b oder CD61/CD42b).

## Ergebnisdarstellung, Auswertung

### Graphische Darstellung

Abbildung 2 zeigt ein typisches Ergebnis, vier Fraktionen werden unterschieden: Erythrozyten/Leukozyten, FITC-Latexpartikel, Blutplättchen und Debris. Beträgt die Blutplättchenkonzentration über  $20 \times 10^9/l$  und werden 50 000 Zellen/Partikel registriert, kann versucht werden, die Blutplättchenkonzentration sofort mittels Dreisatz (z. B. Anzahl CD41a<sup>+</sup>-Blutplättchen/Anzahl FITC-Partikel  $\times$  FITC-Latexpartikelkonzentration in Probe) zu berechnen. Zur Kontrolle sollte immer nachgesehen werden, ob aus dem Verhältnis von FITC-Latexpartikel und Erythrozyten

auch die vom Hämatologiegerät bestimmte Erythrozytenkonzentration annähernd erzielt wird (Toleranzgrenze  $\pm 5\%$ ).

Sind nur ungenügend Blutplättchen vorhanden ( $< 20 \times 10^9/l$ ), sollte die Zählung nach Einstellung des FITC-Fluoreszenz-*threshold* zum Ausschluß von Erythrozyten/-Leukozyten und Zelldebris wiederholt werden, wobei mindestens 2000 Teilchen gezählt werden sollen (vgl. Abb. 2b). Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß der Anteil von Mikrothrombozyten besser beurteilt werden kann.

### Statistische Auswertung, Software

Korrelationen wurden mit Hilfe des Spearman-Korrelationskoeffizienten berechnet. Zur graphischen Darstellung wurde die lineare Regression benutzt.

In den aufgezeigten Untersuchungen wurde die Lysis 2 Software für PC von Becton Dickinson verwendet. Jede andere Software, die in der Lage ist, *list mode* Dateien zu bearbeiten, kann alternativ eingesetzt werden.

### Analytische Beurteilung

#### Zuverlässigkeit der Meßmethode, Richtigkeit

Die Präzision in der Serie ( $n = 10$ ) bei Blutproben mit einer mittleren Blutplättchenkonzentration von ca.  $14 \times 10^9/l$  war zufriedenstellend, der Variations-

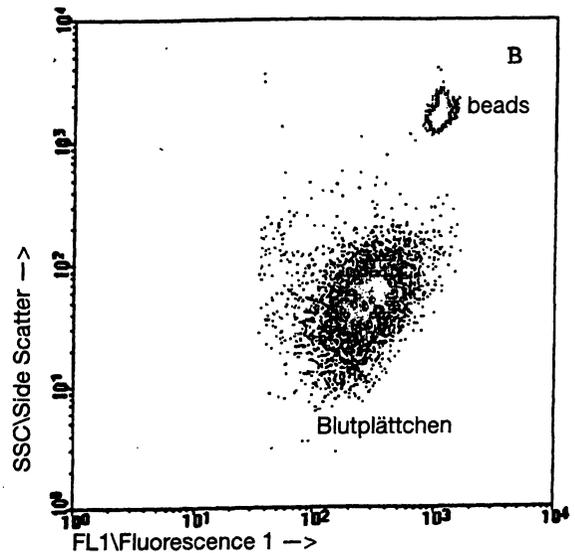
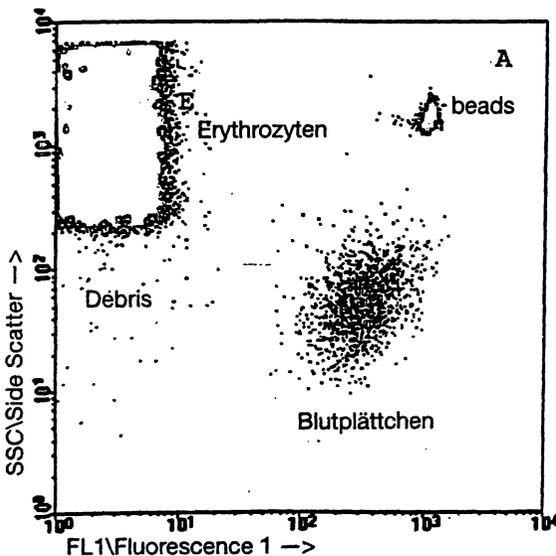
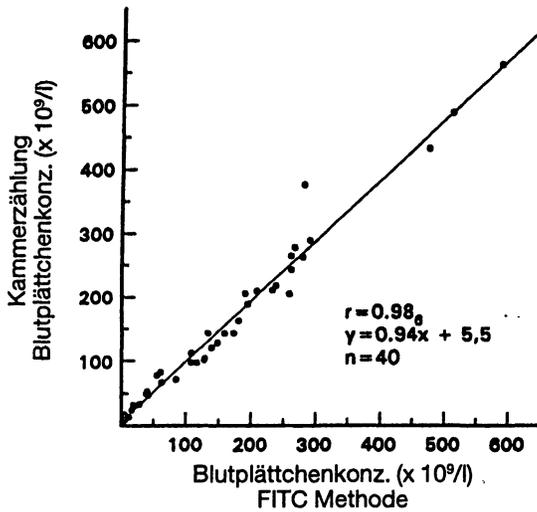


Abb. 2a, b. a) FITC-markierte Blutplättchen (*anti-CD41a-FITC*) in Vollblut in Gegenwart von FITC-markierten Latexpartikeln. b) Mit FITC-markierte Blutplättchen wie in a) nach Einstellung des FITC-Fluoreszenz-*thresholds*

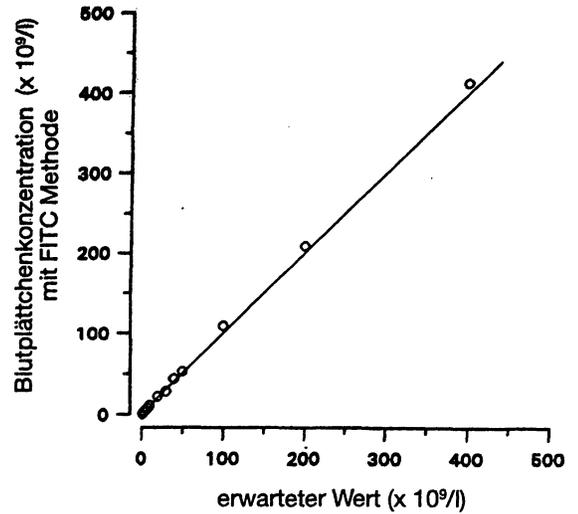


**Abb. 3.** Vergleich der Methoden: Plättchenkonzentrationsbestimmung mittels Kammerzählung und FITC-konjugierte Antikörper gegen CD41a und CD42b

koefizient betrug 4,1 %. Die Präzision von Tag zu Tag wurde bei drei Proben mit mittleren Blutplättchenkonzentrationen von 5,4, 12,2 und  $34,7 \times 10^9/l$  (jeweils  $n = 10$ ) gemessen. Die Variationskoeffizienten betragen 9,5 %, 4,7 % und 2,9 %. Gegenüber Messungen in der Zählkammer (bisherige „Referenzmethode“) zeigte sich eine gute Übereinstimmung (Abb. 3).

#### Linearitätsbereich und Nachweisgrenze

Die Linearität wurde bestimmt durch Zugabe einer konstanten Blutplättchenzahl zu Plättchen-depletiertem Vollblut (identischer Spender) und war in dem Meßbereich von 1000 bis  $400\,000/\mu l$  sehr zufriedenstellend (vgl. Abb. 4). Die Nachweisgrenze im Vollblut liegt bei ca. 10 Blutplättchen/ $\mu l$ .



**Abb. 4.** Linearitätsprüfung der Blutplättchenkonzentrationsbestimmung mittels Verdünnungsreihe bei konstantem Hämatokrit (0,45 l/l)

#### Zusammenfassung

Ein als Routine- und Referenzmethode geeignetes Verfahren die Blutplättchenkonzentration mit hoher Sensitivität und Spezifität im Vollblut zu bestimmen, wird beschrieben.

#### Literatur

1. Rowan RM (1991) Platelet counting and the Assessment of platelet function. In: Koepke JA (ed.) Practical Laboratory Hematology. Churchill Livingstone, New York, 157-170
2. England JM (1990) Recommended methods for the assignment of assay values to stabilized cell suspensions. Clin lab Haemat 12 Suppl. 1, 13-21