

Die mechanische Leukozytendifferenzierung am Cobas Argos-Hämatologie-Analyzer im Vergleich mit dem Bayer Diagnostic H1 und dem Coulter STKS

Automated leukocyte differential counting by the Cobas Argos-blood cell counter in comparison with the Bayer Diagnostic H1 and the Coulter STKS

C. Sachse¹, Angela Baudach², D. Tille², H. J. Avenarius³, Silke Heller⁴, C. Ruby⁵, E. Henkel¹

Zusammenfassung

Die mechanisierte Differenzierung der Leukozyten in fünf Zellpopulationen am Cobas Argos 5 Diff wurde in einer multizentrischen Studie evaluiert. Das Untersuchungsmaterial umfaßte 245 Proben aus hämatologischen Spezialabteilungen mit einem hohen Anteil neoplastischer und schwerer reaktiver Veränderungen im Blutbild. Präzision und Richtigkeit der Messung am Cobas Argos 5 Diff sowie die Empfindlichkeit gegenüber Probenalterung wurden bestimmt und erwiesen sich als zufriedenstellend. Im Mittelpunkt der Evaluation stand die Eignung des Systems für Screeninguntersuchungen. Dazu wurden die Zuverlässigkeit in der Detektion abnor-

mer Zellen im Blut und die Vergleichbarkeit mit den Resultaten der visuellen Differenzierung als Standardmethode ermittelt. Zu Vergleichszwecken erfolgten entsprechende Untersuchungen für zwei etablierte Geräte zur mechanisierten Erstellung von Differentialblutbildern, Bayer Diagnostik H1 und Coulter STKS. Hinsichtlich der Empfindlichkeit der Warnhinweise, die auf abnorme Zellen im Blut hinweisen, und der Vergleichbarkeit mit der mikroskopischen Differenzierung bestanden keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Cobas Argos 5 Diff und den Vergleichsgeräten. Blutproben, die trotz eines deutlich erhöhten Anteils (mindestens 3%) abnormer Leukozyten von einem System ohne adäquaten Warnhinweis ausgegeben wurden, wurden detailliert analysiert. Auch hinsichtlich der Häufigkeit (am Cobas Argos 5 Diff: 1,0%) und Art solcher fehlerhafter Kennzeichnungen erwies sich das Argos-System gegenüber den etablierten Geräten als gleichwertig oder punktuell überlegen.

Anschriften der Autoren:

- ¹ Dr. Christopher Sachse, Institut für Klinische Chemie II der Medizinischen Hochschule Hannover
² Dr. Angela Baudach, Institut für Laboratoriumsdiagnostik, Klinikum Berlin-Buch
² Dr. Dietmar Tille, Berlin
³ Prof. Dr. H. J. Avenarius, Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover
⁴ Dr. Silke Heller, Zentrallabor St. Gertrauden-Krankenhaus, Berlin
⁵ Dr. Christoph Ruby, Roche Diagnostica, Grenzach-Wyhlen
¹ Prof. Dr. E. Henkel, Institut für Klinische Chemie II der Medizinischen Hochschule Hannover

Korrespondenz-Adresse:

Prof. Dr. E. Henkel, Institut für Klinische Chemie II der Medizinischen Hochschule Hannover, Podbielskistr. 380, D-30659 Hannover

Schlüsselwörter

Blutbild – mechanisierte Leukozytendifferenzierung – Warnhinweis – Hämatologie-Analyzer-Evaluation

Summary

A multicenter study was performed to evaluate the quality of automated five-part leukocyte differential counts at the blood cell counter Argos 5 Diff. For that purpose we used 245 samples of specialized hematological departments; malignant or severe reactive disorders of leukocytes were present in a high proportion of the samples. Precision, accuracy and sample stability of the measurement at the Argos 5

Diff were measured and found to be satisfactory. Our examinations focused on the use of the instrument for screening purposes. We determined the reliability of the detection of abnormal cells and compared the results of the instrument with those of manual differential cell counts.

Corresponding analyses were done with the Bayer Diagnostic H1 and the Coulter STKS blood cell counters, which have been used for automated leukocyte differential counting for some years. Regarding the sensitivity of flags indicating the presence of abnormal cells in the blood there were no major differences between the Argos 5 Diff and the other instruments; the same is true with respect to the comparisons with manual differential cell counting. Special analyses were done regarding the samples, which were measured by an instrument without appropriate flag, although a significant proportion (minimum 3%) of abnormal leukocytes was seen in the manual differential count. As far as frequency (at the Argos 5 Diff: 1.0%) and type of these instrument errors are concerned, the Argos 5 Diff was equal or slightly superior to the other blood cell counters examined.

Key words

blood cell count – leukocyte differential count – flag – blood cell counter evaluation

Einleitung

Für die mechanische Leukozytendifferenzierung stehen nunmehr seit fast 20 Jahren Analysensysteme zur Verfügung. Zur Unterscheidung der Leukozytenpopulationen dienen dabei in verschiedenen Gerätetypen unterschiedliche Methoden. Zum Einsatz kommen insbesondere Widerstandsmessungen mit Gleich- und Wechselstrom, Absorptions- und Streulichtmessungen sowie spezifische Lysen, zum Teil kombiniert mit zelltypspezifischen zytochemischen Reaktionen. Bei den zur Zeit auf dem Markt etablierten Verfahren können lediglich die fünf nor-

malerweise im Blut vorkommenden Leukozytensubpopulationen – Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile und Basophile – quantifiziert und voneinander und von abnormen Zellen abgegrenzt werden. Abnorme Zellen, das heißt Zellen, die beim Gesunden nicht oder nicht im peripheren Blut auftreten, lassen sich mit diesen Verfahren nicht sicher identifizieren und zählen; dies bleibt der visuellen Differenzierung und gegebenenfalls weiterführenden Untersuchungen vorbehalten. Im Rahmen der mechanischen Differenzierung kann lediglich die Anwesenheit einer solchen abnormen Zellpopulation durch Ausgabe eines Warnhinweises (Flag) angezeigt werden.

Die Evaluation eines Analysengerätes soll multizentrisch nach einem definierten Protokoll erfolgen. Ein Protokoll für hämatologische Analysensysteme wurde von dem ICSH (International Committee for Standardization in Haematology) 1984 veröffentlicht [1], ein ähnliches der Arbeitsgruppe Geräteevaluierung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und der Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin wird vorbereitet.

Diese Arbeit diene der Evaluation des Cobas Argos 5 Diff der Firma Hoffmann La-Roche AC in direktem Vergleich mit zwei seit Jahren eingeführten Systemen zur mechanischen Leukozytendifferenzierung, Bayer Diagnostic H1 und Coulter STKS.

Material und Methoden

Die Evaluationsuntersuchungen wurden im Juli und August 1992 vorgenommen. Die Resultate bezüglich der Meßgrößen des kleinen Blutbilds sind an anderer Stelle [2] beschrieben; diese Arbeit beschränkt sich auf die Darstellung der Evaluationsergebnisse für das Differentialblutbild.

245 Blutproben von stationären Patienten der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover (158 Proben) und der III. Medizinischen Klinik des Krankenhaus Berlin-Buch (87 Proben) dienten als Untersuchungsmaterial. Bei der Mehrzahl der Patienten lag eine schwere hämatologische Systemerkrankung oder eine nicht-hämatologische Tumorerkrankung vor (Tabelle 1). Da zahlreiche Patienten vor dem oder im Zeitraum der Evaluation nach aggressiven Therapieschemata zur Tumorbekämpfung behandelt wurden, waren durch die Grunderkrankung bedingte Veränderungen des Differentialblutbilds in vielen Fällen durch Effekte der antineoplastischen Therapie überlagert.

Die venösen Blutentnahmen wurden morgens vorgenommen, die erste Messung erfolgte zwei Stunden später. 2,7 ml-EDTA-Monovetten der Fa. Sarstedt, Nürnberg, dienten als Probengefäße.

Abkürzungen

ALY	= Atypical Lymphocytes
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
LIC	= Large Immature Cells
LMNE	= Lymphocyte Monocyte Neutrophil Eosinophil

Tabelle 1. Diagnosen bei den im Rahmen der Evaluation untersuchten Patienten.

1. **Anämien**
 - Eisenmangelanämie
 - Sphärozytäre hämolytische Anämie
2. **Panzytopenien**
3. **Myelodysplastisches Syndrom**
4. **Myeloproliferatives Syndrom**
 - Polyzythämia vera
 - Chronische myeloische Leukämie
 - Idiopathische Thrombozythämie
5. **Leukämien**
 - Akute myeloische Leukämie (M₁, M₂, M₄ Eo, M₅)
 - Akute lymphoblastische Leukämie
 - Chronische lymphatische Leukämie
 - Prolymphozyten-Leukämie
6. **Lymphogranulomatose Hodgkin**
7. **Non Hodgkin-Lymphome (NHL)**
 - Burkitt-Lymphom
 - Zentroblastisches NHL
 - Zentroblastisch-zentrozytisches NHL
8. **Gammopathien**
 - Plasmozytom
 - Immunozytom
9. **Solide Tumoren**

Aus Hannover stammende Blutproben wurden zunächst am Coulter STKS (Software 1.D.1) sowie – nach Transport in ein anderes Labor – am Cobas Argos 5-DIFF und am Bayer Diagnostic H1-System untersucht. Die Proben wurden dann gekühlt (Einlagerung in Kühlgel) per Taxi und IC-Kurierdienst nach Berlin-Buch befördert und dort etwa acht Stunden nach der Blutentnahme an einem zweiten Cobas Argos 5-DIFF und am Coulter STKS (Software 1.G.1) gemessen. Messungen und Transport der Blutproben aus Berlin erfolgten in umgekehrter Reihenfolge mit dem Unterschied, daß diese Proben in Hannover nicht am Coulter STKS mit der Software 1.D.1 untersucht wurden.

Geräte

Die drei verschiedenen Gerätesysteme, die im Rahmen dieser Evaluation zur mechanisierten Differenzierung der Leukozyten eingesetzt wurden, unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Technologie:

1. H1 (Programmversion 1.3.2; Fa. Bayer Diagnostic, München)
Meßprinzip ist die zytochemische und zytometrische Differenzierung in zwei Kanälen, dem Peroxidasekanal und dem Basophilen-/Kernsegmentierungskanal [3].
2. STKS (Programmversionen 1.D.1 und 1.G.1; Fa. Coulter Electronics GmbH, Krefeld)

Die Differenzierung der Leukozyten erfolgt nach dem VCS-Prinzip [4].

3. Cobas Argos 5 Diff (Programmversion 2.01; Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen)

Die Differenzierung der Leukozyten in fünf Populationen wird am Argos 5 Diff in zwei Kanälen durchgeführt, dem sogenannten LMNE-Kanal und dem Basolyse-Kanal. Dazu werden über ein Blutverteilterventil 25 µl der EDTA-Blutprobe in den LMNE-Kanal geleitet und 15 µl in den Basolyse-Kanal. Im LMNE-Kanal werden unter Hinzufügung des Reagenzes Eosinofix Plus® (Propylenglykol 5%; Formiat-Farbstoff 0,006%; NaCl 0,5%; Natriumlaurylsulfat 0,02%) die Erythrozyten lysiert, die Leukozyten stabilisiert und die Granula der eosinophilen Granulozyten schwarzgefärbt. Anschließend werden in einem Flow-Zytometer mit doppelter hydrodynamischer Fokussierung (Reagenz Difton®: Propylenglykol 5%; Tween 20 0,1%; NaCl 0,27%; Natriumazid 0,1%) zwei Meßsignale pro Leukozyt abgenommen. Die erste Messung ist dabei eine Gleichstrom-Impedanzmessung. Sie liefert das Volumenmeßsignal. Mit der zweiten Messung wird die optische Transmission der Leukozyten bestimmt. Sie gibt Aufschluß über die innere Struktur der Leukozyten. Durch die Schwarzfärbung der eosinophilen Granula haben diese die geringste optische Transmission bzw. die höchste Absorption. Die Impedanzmessung und die Messung der optischen Transmission erfolgen im Abstand von 200 µs. Das Ergebnis dieser Messungen ist die sogenannte LMNE-Matrix. Sie beinhaltet Lymphozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten sowie zwei quantifizierte Populationen mit Warnhinweisen (Flags) auf unreife Zellen myeloischer Herkunft (LIC) und auf abnormale große lymphatische Zellen (ALY). Der Anteil basophiler Granulozyten wird im Basolyse-Kanal mittels Gleichstrom-Impedanzmessung nach Lyse der Erythrozyten und aller nichtbasophilen Leukozyten ermittelt. Die Lysereaktion erfolgt mit dem Reagenz Basolyse® (HCl 0,03%; Phtalsäure 0,09%; Natriumlaurylsulfat 0,02%; pH-Wert: 2,4 ± 0,2) und thermischer Unterstützung.

Neben den bereits erwähnten Warnhinweisen LIC und ALY gibt es weitere, die Störungen der Funktion des Meßsystems signalisieren oder auf lagerungsbedingte Veränderungen oder morphologische Besonderheiten der Probe hindeuten.

Präzision und Richtigkeit

Für die Ermittlung von Präzision und Richtigkeit wurde Kontrollblut in drei Bereichen (MBX 21 normal, abnormal hoch und abnormal niedrig; Fa. ABX Hematologie, Montpellier, Frankreich) eingesetzt.

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurden 20 Wiederholungsmessungen vorgenommen. Die Ermittlung der Präzision zwischen den Serien erfolgte durch 19 Messungen an elf Untersuchungstagen in einem Zeitraum von 28 Tagen. Mit diesen Messungen wurde auch die Richtigkeit anhand der Abweichungen von den Sollwerten des Kontrollbluts erfaßt.

Einflüsse durch Probenalterung

Der Einfluß der Probenalterung auf das Meßergebnis wurde an 20 nichtselektierten Patientenproben untersucht. Die Proben wurden bei Zimmertemperatur gelagert und jeweils 2, 8, 32, 56 und 80 Stunden nach der Blutentnahme gemessen.

Vergleichsmessungen

Im Rahmen der Vergleichsmessungen wurde zum einen an 199 Patientenproben die Übereinstimmung der beiden in dieser Evaluation eingesetzten, unabhängig voneinander eingestellten Argos-Systeme überprüft. Zum anderen wurden die Resultate aller Gerätesysteme mit der mikroskopischen Differenzierung der Leukozyten als Standardmethode verglichen.

Die Präparate für die mikroskopische Differenzierung wurden mittels der Spinner-Ausstrichtechnik hergestellt (Zentrifugalspinner Typ HEG SP 2 der Fa. Omron, Vertrieb Fa. Assista, Wien). In solchen Präparationen liegen die Zellen gleichmäßig verteilt nebeneinander; eine Entmischung in Abhängigkeit von der Zellgröße, wie sie bei manuellen Ausstrichen vorkommen kann, wird nicht beobachtet [5]. Mit einem Färbeautomaten erfolgte die Färbung nach Wright. Bei den aus Hannover stammenden Proben differenzierte eine MTA 400 Leukozyten in einem oder – bei Leukopenie – in zwei Spinnerausstrichen. Bei den Ausstrichen aus Berlin wurden von zwei MTA je 200 Zellen untersucht. In einer kleinen Zahl von Proben mit ausgeprägter Leukopenie konnten insgesamt nur 200 oder 100 Leukozyten differenziert werden.

Zur Beurteilung der eingesetzten Gerätesysteme wurden drei Fragestellungen analysiert:

1. Wie gut stimmt bei Proben, die vom Gerätesystem ohne Warnhinweis gemessen wurden, die Quantifizierung der Leukozytenpopulationen mit der mikroskopischen Differenzierung überein?
2. Wie zuverlässig ist das Gerätesystem hinsichtlich der Ausgabe von Warnhinweisen bei pathologischen Blutproben, die von ihm nicht sicher beurteilt werden können?

3. Bei welchen Veränderungen im mikroskopischen Differentialblutbild kommt es zu Fehlern in der Kennzeichnung durch das Gerätesystem (besonders zu falsch negativen Ergebnissen im Sinne fehlender Warnhinweise)?

Im Rahmen dieser Evaluation wurden alle Blutproben, bei deren mikroskopischer Differenzierung mindestens eine abnorme Zelle im Blut gesehen wurde, als qualitativ pathologisch eingestuft. Wurde eine Blutprobe vom Gerät mit Warnhinweis gemessen, wurde dies bei Anwesenheit mindestens einer abnormen Zelle in der mikroskopischen Differenzierung als richtig positives und anderenfalls als falsch positives Resultat gewertet. Eine Messung ohne Ausgabe eines Warnhinweises wurde bei Anwesenheit einer abnormen Zelle als falsch negativ und sonst als richtig negativ angesehen. Bei der Analyse der falsch negativen Resultate ist zu berücksichtigen, daß seltene Leukozytenpopulationen auch bei mikroskopischer Differenzierung unter Routinebedingungen (Auszählung von 100 Leukozyten) übersehen werden können. Geht man davon aus, daß die Verteilung von Zellen in Blutbildausstrichen der Poisson- oder der Binominalverteilung folgt, muß der Anteil einer Zellpopulation mindestens 3 % betragen, damit mit 95 % Wahrscheinlichkeit eine Zelle dieser Population unter 100 ausgezählten Leukozyten gefunden wird. In dieser Evaluation wurden daher falsch negative Ergebnisse eines Gerätesystems bei Proben, für die in der mikroskopischen Differenzierung mindestens 3 % abnorme Zellen gefunden wurden, als schwerwiegende Fehler betrachtet und besonders ausgewertet.

Zu beachten ist, daß die untersuchten Gerätesysteme unterschiedliche Warnhinweise verwenden. Das Gerätehandbuch des Bayer Diagnostic H1-Systems enthält eine genaue Beschreibung der Warnhinweise und sonstigen Bedingungen, die eine mikroskopische Nachdifferenzierung erforderlich machen. Eine entsprechende Auflistung von Bedingungen am Cobas Argos 5 Diff-System wurde den Evaluatoren von der Herstellerfirma zur Verfügung gestellt. Für den Coulter STKS wurde jedes Auftreten eines Suspect-Alarm mit Bezug auf die Messung der Leukozyten als Aufforderung zur mikroskopischen Nachdifferenzierung gewertet.

Statistische Auswertung

Die Einflüsse durch Probenalterung wurden mittels der Friedman-Tests sowie multipler Vergleiche verbundener Stichproben nach Wilcoxon und Wilcoxon analysiert. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse des Gerätevergleichs wurde das parameterfreie Verfahren nach Passing und Bablok [6] ein-

gesetzt. Diese Auswertung ist unabhängig von der Normalverteilung der Meßwerte, Ausreißer haben praktisch keinen Einfluß auf die Lage der Regressionsgeraden.

Ergebnisse

Präzision in der Serie

Die Angaben zu Präzision und Richtigkeit beschränken sich auf die neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten, da für das eingesetzte Kontrollmaterial nur Angaben zu diesen Zellpopulationen vorliegen.

Tabelle 2 faßt die Daten zur Präzision in der Serie zusammen. Die geringste Präzision ergab sich bei der Bestimmung des Monozytenanteils mit Variationskoeffizienten von 5–11 % im normalen und pathologisch erniedrigten Bereich. Demgegenüber lagen die Variationskoeffizienten für die Ermittlung des Granulozyten- und (außer bei Lymphopenie) des Lymphozytenanteils unter 2 %.

Tabelle 2. Präzision in der Serie: 20fache Bestimmung mit Kontrollblut. x: Mittelwert, s: Standardabweichung, Vk: Variationskoeffizient.

Bereich Nr.	Parameter Einheit	Granulozyten %	Lymphozyten %	Monozyten %
1	x	79,5	19,5	1,03
	s	1,18	1,17	0,11
	Vk (%)	1,48	6,01	10,9
2	x	53,5	42,0	4,53
	s	0,66	0,50	0,43
	Vk (%)	1,24	1,19	9,42
3	x	41,8	54,9	3,27
	s	0,41	0,39	0,18
	Vk (%)	0,98	0,72	5,35

Tabelle 3. Präzision zwischen den Serien: 19fache Bestimmung mit Kontrollblut. x: Mittelwert, s: Standardabweichung, Vk: Variationskoeffizient.

Bereich Nr.	Parameter Einheit	Granulozyten %	Lymphozyten %	Monozyten %
1	x	78,8	19,9	1,30
	s	1,60	1,39	0,50
	Vk (%)	1,98	6,99	37,2
2	x	53,4	42,2	4,38
	s	0,60	0,69	0,46
	Vk (%)	1,13	1,63	10,5
3	x	41,7	55,1	3,18
	s	0,58	0,47	0,28
	Vk (%)	1,39	0,86	8,81

Präzision zwischen den Serien

Die Daten zur Präzision zwischen den Serien sind in Tabelle 3 dargestellt. Die über eine Zeitspanne von 28 Tagen beobachteten Unpräzisionen lagen nur für den Monozytenanteil mehr als geringfügig über den entsprechenden Werten bei Messungen in einer Serie.

Richtigkeit

Die Messungen zur Bestimmung der Präzision zwischen den Serien wurden auch für die Ermittlung der Richtigkeit, ausgedrückt als Abweichung des Mittelwertes vom Sollwert, verwendet (Tabelle 4). Durch diese Untersuchung werden keine größeren Unrichtigkeiten aufgezeigt.

Tabelle 4. Ermittlung der Richtigkeit mit dem Kontrollblut MBX 21. x: Mittelwert der Messungen, SW: Sollwert, m. Abw.: mittlere Abweichung.

Bereich Nr.	Parameter Einheit	Granulozyten %	Lymphozyten %	Monozyten %
1	x	78,8	19,9	1,30
	SW	79	20	1
	m. Abw.	-0,3 %	-0,5 %	+30,0 %
2	x	53,4	42,2	4,38
	SW	53	43	4
	m. Abw.	+0,8 %	-1,9 %	+9,5
3	x	41,7	55,1	3,18
	SW	41	56	3
	m. Abw.	+1,7 %	-1,6 %	+6,0 %

Einflüsse durch Probenalterung

Die systematischen Veränderungen des Differentialblutbilds in Abhängigkeit von der Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Messung sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Im Vergleich mit den Ausgangswerten (Zeitspanne: zwei Stunden) werden acht Stunden nach der Blutentnahme signifikant geringere Monozytenanteile beobachtet (Abweichung etwa 1,5 Prozentpunkte); die übrigen Zellpopulationen sind nicht signifikant verändert. Die acht Stunden nach der Blutentnahme ermittelten Meßwerte lassen sich für weitere 48 Stunden ohne signifikante Abweichungen reproduzieren. Wird eine Lagerungsdauer von 56 Stunden überschritten, kommt es zu größeren Veränderungen (scheinbar Abfall des Neutrophilen-, Wiederanstieg des Monozyten- und Erhöhung des Basophilenanteils).

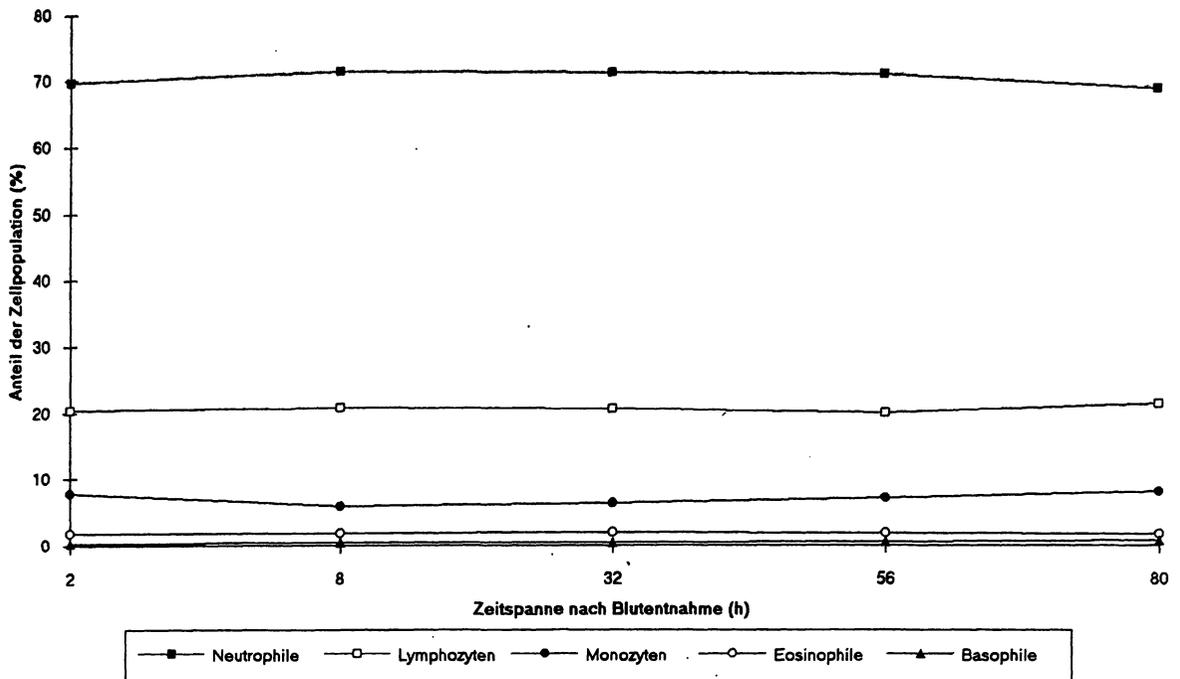


Abb. 1. Veränderung durch Probenalterung: Einfluß auf die Anteile der einzelnen Zellpopulationen (Mittelwerte von 20 Patientenblutproben)

Vergleichsmessungen von zwei Argos-Systemen

Vergleichsmessungen von 199 Patientenproben an zwei in verschiedenen Laboratorien unabhängig voneinander eingestellten Argos-Systemen zeigten keine größeren systematischen Unterschiede auf (Tabelle 5). Die Ausgleichsgeraden nach Passing und Bablok wichen zwar für den Lymphozyten- und den Monozytenanteil signifikant von der Ideallage (vollständige Übereinstimmung) ab; das Ausmaß dieser Abweichungen ist aber im Rahmen der klinischen Diagnostik in der Regel ohne Bedeutung. Die linearen Korrelationskoeffizienten lagen für die Bestimmung des Neutrophilen- und Lymphozytenanteils

über 0,95 und für die Monozyten und Eosinophilen um 0,90. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, daß zwischen den Messungen an den beiden Argos-Systemen 6–8 Stunden (mit Bahntransport) lagen. Eine Probenlagerung über diesen Zeitraum führt zu Veränderungen besonders des Monozytenanteils (siehe oben).

Quantifizierung der physiologischen Leukozytenpopulationen im Vergleich mit der mikroskopischen Differenzierung

Der quantitative Vergleich zwischen mechanisiertem Meßverfahren und Mikroskopie beschränkt sich auf Blutproben, die am jeweiligen Gerät ohne Warnhin-

Tabelle 5. Parallelmessung (199 Patienten) an zwei Argos-Systemen. Angegeben sind Steigung (b) und Achsenabschnitt (a) der Ausgleichsgeraden nach Passing und Bablok sowie der Korrelationskoeffizient (r).*: signifikante Abweichung der Ausgleichsgeraden von der Nullhypothese (b = 1; a = 0) mit p = 0,05.

Parameter Einheit	Neutrophile %	Lymphozyten %	Monozyten %	Eosinophile %	Basophile %
b	0,994	1,071*	0,963	1,055	0,958
a	+0,69	-1,38*	-0,53*	+0,10	+0,00
r	0,952	0,976	0,884	0,907	0,694

weis ausgegeben wurden. Hinsichtlich der Anteile der Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten und Eosinophilen stimmt der Cobas Argos insgesamt ausreichend gut mit der mikroskopischen Differenzierung überein (Tabelle 6 und Abb. 2a–2e). Die Ausgleichsgeraden nach Passing und Bablok, wei-

chen nur geringfügig (allerdings z.T. signifikant) von den Idealwerten ab. Die Korrelationskoeffizienten liegen zwischen 0,84 (Monozyten) und 0,98 (Lymphozyten). Auffällig ist, daß am Cobas Argos in neutropenischen Proben etwas höhere Neutrophilenanteile bestimmt werden als bei mikroskopischer

Tabelle 6. Vergleich der mechanisiert erstellten Differentialblutbilder mit der mikroskopischen Differenzierung als Bezugsmethode. Angegeben sind Steigung (b) und Achsenabschnitt (a) der Ausgleichsgeraden nach Passing und Bablok sowie der Korrelationskoeffizient (r). *: signifikante Abweichung der Ausgleichsgeraden von der Nullhypothese (b = 1; a = 0) mit p = 0,05.

Zellpopulation	Gerät	Cobas Argos	Bayer Diagnostic H1	Coulter STKS Software 1.G.1	Coulter STKS Software 1.D.1
Neutrophile	b	0,819*	1,013	0,905	0,906*
	a	+14,85*	+0,08	+3,28	+7,82*
	r	0,977	0,913	0,913	0,982
Lymphozyten	b	0,770*	0,961	0,933	0,888*
	a	+2,01*	-1,34	+0,20	+3,75*
	r	0,980	0,938	0,973	0,978
Monozyten	b	0,919	0,747*	1,325*	0,687*
	a	+1,40*	+1,73*	+1,15*	+0,67*
	r	0,843	0,806	0,777	0,945
Eosinophile	b	0,853	1,178*	1,200	1,850
	a	+0,00	+0,00	+0,30*	+0,20*
	r	0,909	0,907	0,925	0,926
Basophile	b	1,800	1,200	3,600	1,600
	a	+0,35	+0,40*	+0,30	+0,20
	r	0,007	0,512	0,027	0,905

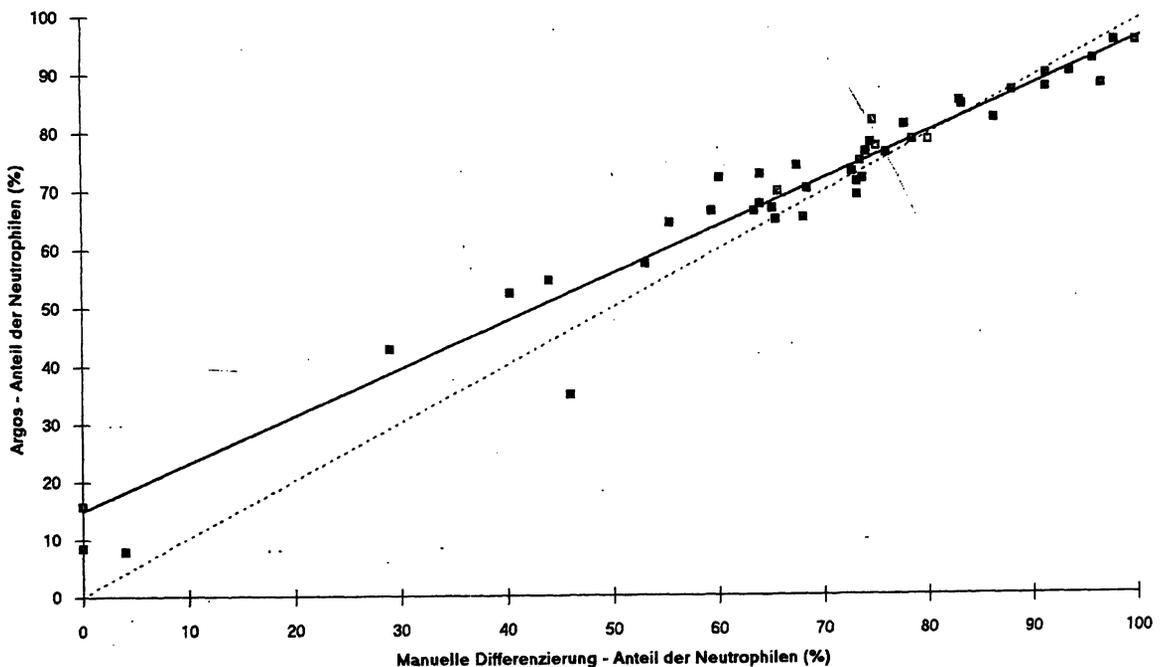


Abb. 2. Vergleich der mit dem Argos-System erstellten Blutbilder mit der mikroskopischen Differenzierung hinsichtlich des Anteils der Neutrophilen (Abb. 2a), Lymphozyten (Abb. 2b), Monozyten (Abb. 2c), Eosinophilen (Abb. 2d) und Basophilen (Abb. 2e)

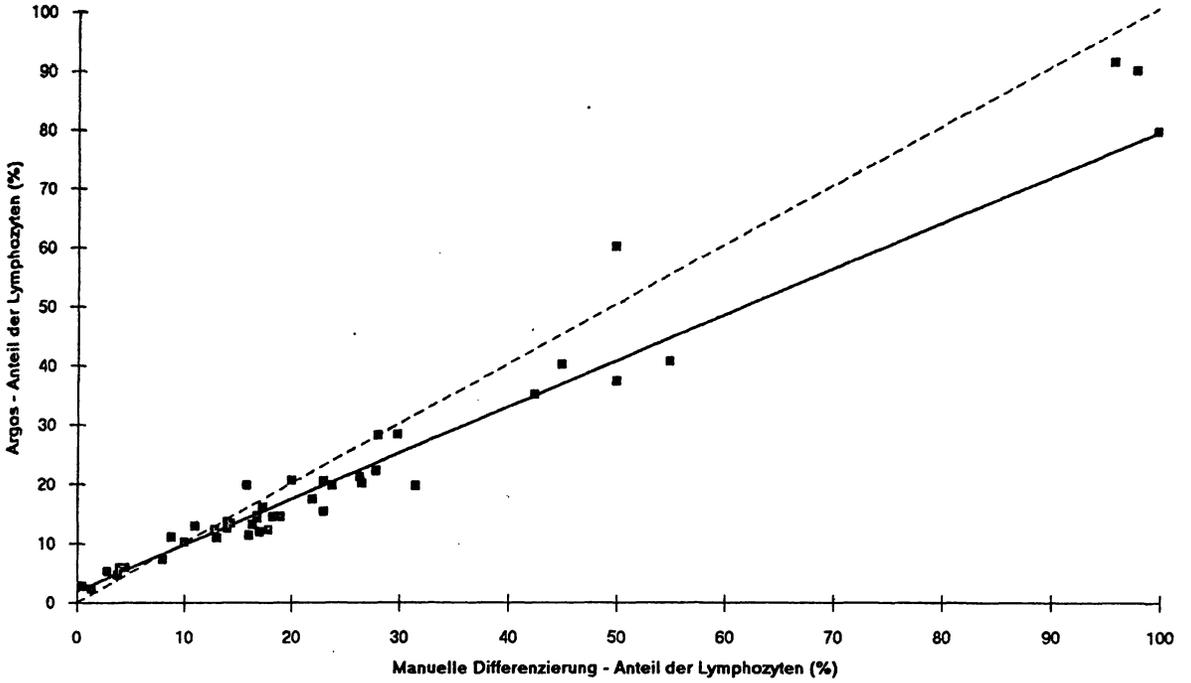


Abb. 2b. Lymphozyten

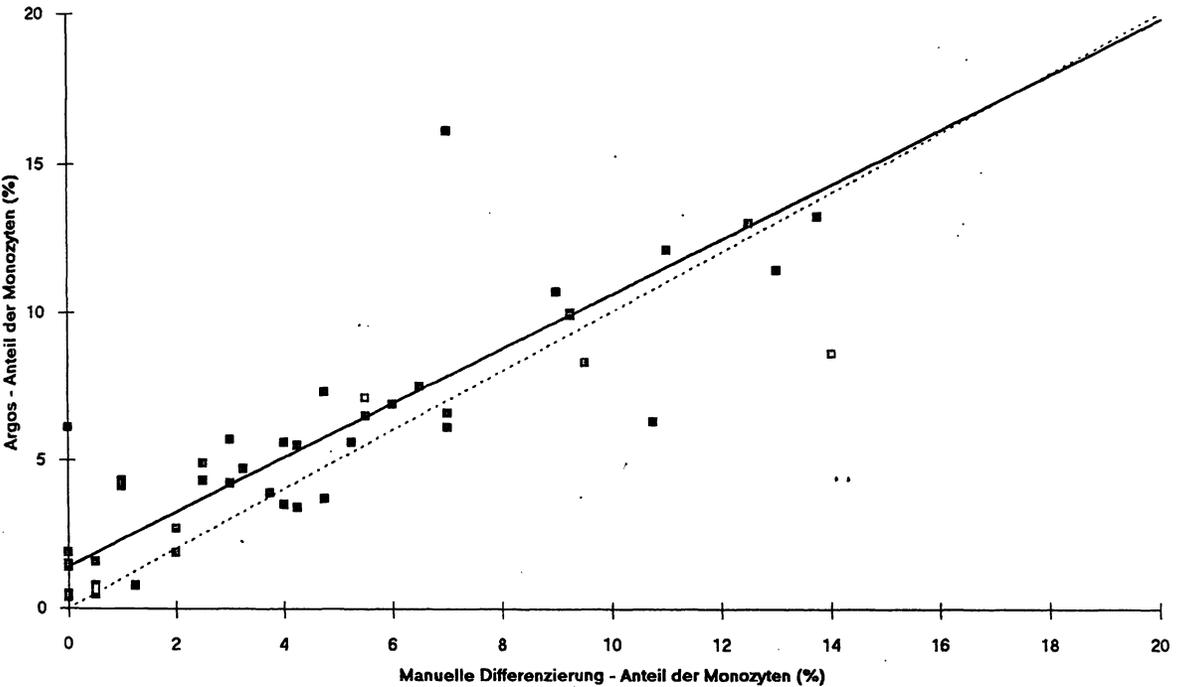


Abb. 2c. Monozyten

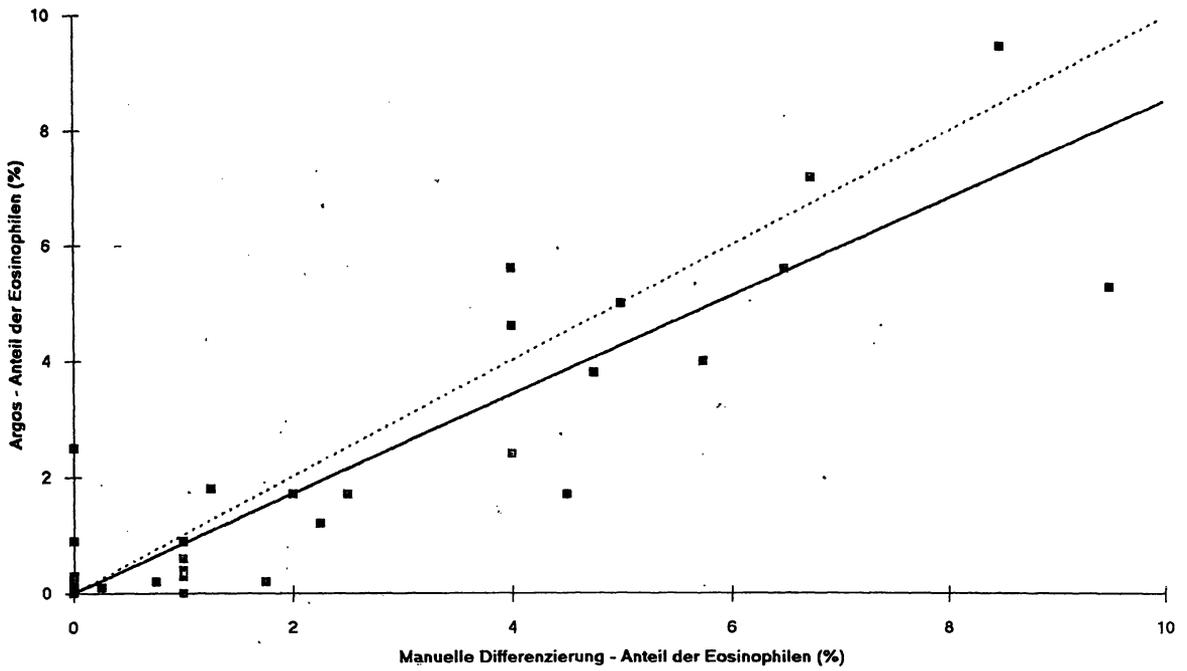


Abb. 2d. Eosinophile

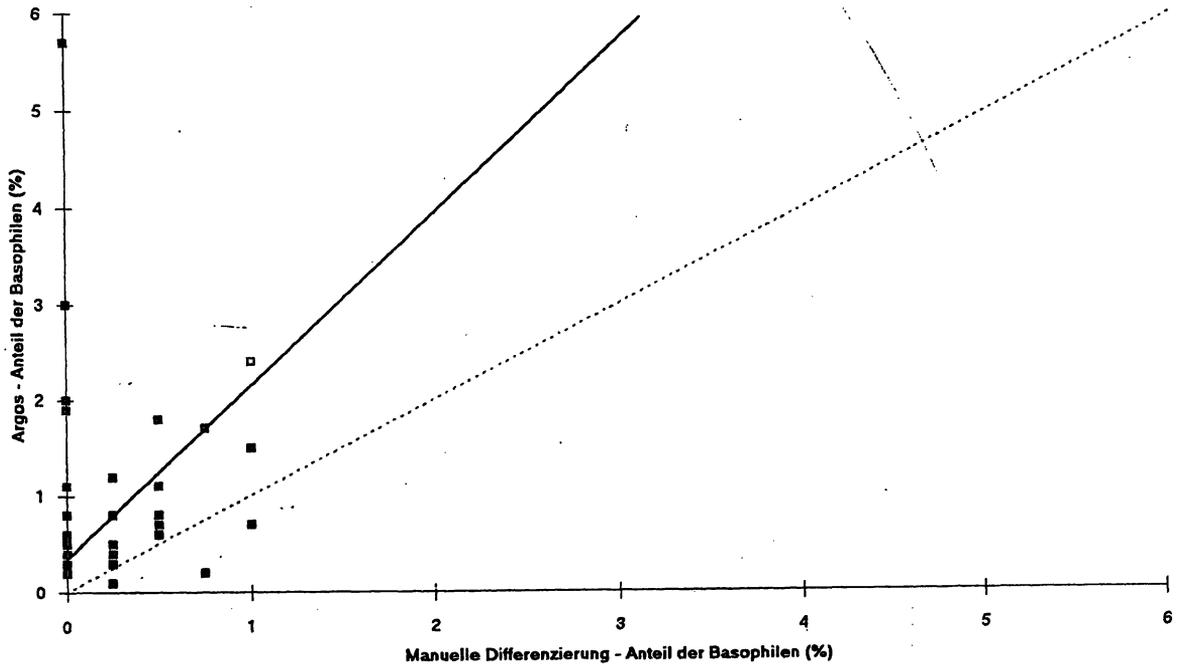


Abb. 2e. Basophile

Differenzierung. Für den Basophilen-Anteil zeigt sich kein Zusammenhang; dies ist aber angesichts des sehr niedrigen Anteils in allen Proben ohne Aussagekraft.

Der Vergleich mit dem mikroskopischen Differentialblutbild ergibt für den Bayer Diagnostic H1 und den Coulter STKS (in zwei Software-Versionen) im wesentlichen ähnliche Resultate wie für das Argos-System.

Kennzeichnung von pathologischen Blutbildern

Von den 245 untersuchten Blutbildern konnten vier wegen zu geringer Leukozytenzahlen in den Spinnerausstrichen nicht mikroskopisch differenziert werden. 197 (82 %) der 241 auswertbaren Blutproben wurden vom Argos-System (Hannover) mit einem Warnhinweis versehen, welcher auf die Anwesenheit abnormer Zellen hindeutet und zur mikroskopischen Nachdifferenzierung auffordert. Im Vergleich mit dem zweiten in dieser Studie eingesetzten Cobas Argos zeigten sich bezüglich der Warnhinweise weitgehend übereinstimmende Resultate.

Am Bayer Diagnostic H1 und am Coulter STKS ergab sich für eine ähnlich hohe Probenzahl die Indikation zur Nachdifferenzierung (Tabelle 7). Von den drei Gerätesystemen wurden aber nicht dieselben Blutproben mit Warnhinweis versehen.

Proben mit pathologischen, vom Gerät nicht gekennzeichneten Zellen

Durch mikroskopische Differenzierung von 400 Zellen wurde in 178 der 241 auswertbaren Blutproben mindestens ein abnormer Leukozyt gefunden.

29 dieser Blutproben wurden am Argos-System gemessen, ohne daß ein Warnhinweis ausgegeben wurde, welcher zur Nachdifferenzierung auffordert. Bei den falsch negativen Ergebnissen am Argos-System war der Anteil abnormaler Leukozyten in der mikroskopischen Differenzierung im allgemeinen sehr gering: In 21 Fällen betrug er maximal 1 %, in sieben weiteren maximal 2 %. Lediglich in einer Probe lag der Anteil mit 3,75 % etwas höher (Tabelle 8).

Am Bayer Diagnostic H1 und am Coulter STKS mit der (neueren) Software-Version 1.G.1 lag der Anteil falsch negativer Blutproben ähnlich hoch wie am Argos-System, am Coulter STKS mit der (älteren) Software-Version 1.D.1 jedoch deutlich höher.

Von besonderer Bedeutung sind die Blutproben, in denen der Anteil abnormer Zellen mindestens 3 % erreicht: Dann wird auch bei mikroskopischer Differenzierung von 100 Leukozyten mit hoher Wahrscheinlichkeit (>95 %) mindestens eine auffällige Zelle beobachtet. Unter diesen Blutproben wurde am Argos-System nur eine ohne adäquaten Warnhinweis gemessen. Demgegenüber differenzierte das H1-System fünf entsprechende Blutbilder ohne Warnhinweis. Bei allen diesen Specimen lag die wesentliche Abweichung im Auftreten lymphatischer Reaktionsformen (maximal 5,5 %). Am Coulter STKS wurden sogar acht (Version 1.G.1) bzw. elf (Version 1.D.1) Proben mit mindestens 3 % auffälligen Leukozyten ohne Warnung gemessen. Auch hier handelt es sich im wesentlichen um Proben mit lymphatischen Reaktionsformen (für die Version 1.G.1 bis maximal 7 %, für die Version 1.D.1 bis 19 %); insbesondere von der Software 1.D.1 wurden daneben auch Blutbilder mit mäßig erhöhten Anteilen unreifer myeloischer Zellen und Normoblasten nicht als auffällig erkannt.

Tabelle 7. Gegenüberstellung der gerätespezifischen Aufforderungen zur Nachdifferenzierung im Vergleich mit der mikroskopischen Differenzierung.

Gerät	Cobas Argos	Bayer Diagnostic H1	Coulter STKS Software 1.G.1	Coulter STKS Software 1.D.1
Anzahl auswertbarer Proben	241	241	241	156
Messung mit Aufforderung zur Nachdifferenzierung	197 (82 %)	193 (80 %)	197 (82 %)	114 (73 %)
davon: richtig positive Messungen	149	145	152	91
davon: falsch positive Messungen	48	48	45	23
Messung ohne Aufforderung zur Nachdifferenzierung	44 (18 %)	48 (20 %)	44 (18 %)	42 (27 %)
davon: richtig negative Messungen	15	15	18	13
davon: falsch negative Messungen	29	33	26	29

Tabelle 8. Übersicht über die falsch negativen Messungen am Argos-System und an den Vergleichsgeräten (Lym. Reaktionsf.: Lymphatische Reaktionsformen).

Gerät	Cobas Argos	Bayer Diagnostic H1	Coulter STKS Software 1.G.1	Coulter STKS Software 1.D.1
Anzahl der Proben mit mindestens einer abnormen Zelle	178	178	178	120
davon: Messung am Gerät ohne Warnsignal	29 (16,3 %)	33 (18,5 %)	26 (14,6 %)	29 (24,2 %)
Anzahl der Proben mit mindestens 3 % abnormen Zellen	98	98	98	79
davon: Messung am Gerät ohne Warnsignal	1 (1,0 %)	5 (5,1 %)	8 (8,2 %)	11 (13,9 %)
Proben mit mindestens 3 % abnormen Zellen, die am Gerät ohne Warnsignal gemessen wurden: Anteile abnormer Zellen in der mikroskopischen Differenzierung im einzelnen	<ul style="list-style-type: none"> - Myelozyten 1 % - Metamyelozyten 0,25 % - Lym. Reaktionsf. 2,5 % 	<ul style="list-style-type: none"> - Metamyelozyten 1 % - Lym. Reaktionsf. 2,5 % - Metamyelozyten 1 % - Lym. Reaktionsf. 2 % - Lym. Reaktionsf. 5,5 % - Myelozyten 1 % - Metamyelozyten 0,25 % - Lym. Reaktionsf. 2,5 % - Lym. Reaktionsf. 4 % - Lym. Reaktionsf. 3 % 	<ul style="list-style-type: none"> - Metamyelozyten 0,5 % - Lym. Reaktionsf. 7 % - Metamyelozyten 1 % - Lym. Reaktionsf. 2 % - Atyp. Monozyten 1 % - Lym. Reaktionsf. 0,5 % - Atyp. Lymphozyten 1,75 % - Metamyelozyten 1 % - Lym. Reaktionsf. 7 % - Lym. Reaktionsf. 4 % - Metamyelozyten 1 % - Lym. Reaktionsf. 2 % - Metamyelozyten 3 % - Plasmazellen 3 % 	<ul style="list-style-type: none"> - Promyelozyten 0,25 % - Myelozyten 0,75 % - Metamyelozyten 0,5 % - Lym. Reaktionsf. 1,5 % - Promyelozyten 1 % - Metamyelozyten 3 % - Normoblasten 3 % - Myelozyten 0,75 % - Metamyelozyten 0,25 % - Lym. Reaktionsf. 14 % - Lym. Reaktionsf. 19 % - Lym. Reaktionsf. 5,5 % - Myelozyten 1 % - Metamyelozyten 0,25 % - Lym. Reaktionsf. 2,5 % - Normoblasten 3 % - Lym. Reaktionsf. 4 % - Metamyelozyten 1 % - Lym. Reaktionsf. 7 % - Lym. Reaktionsf. 4 % - Lym. Reaktionsf. 3 % - Metamyelozyten 3 %

Mikroskopisch unauffällige Proben mit Kennzeichnung

Die Differenzierung mikroskopisch unauffälliger Proben am Argos-System war in 48 Fällen mit einem Warnhinweis und der Aufforderung zur Nachdifferenzierung verbunden. Proben mit deutlicher Leukopenie (Leukozyten $< 2 \text{ G/l}$) sind unter diesen falsch positiven Resultaten vergleichsweise häufig vertreten; ansonsten ließ sich keine einheitliche Ursache ermitteln.

Der Anteil von Differenzierungen mit falsch positivem Warnhinweis war an den Vergleichsgeräten etwa so hoch wie am Argos-System.

Diskussion

Das Cobas Argos-System mit Cobas Argos 5-Diff-Modul eignet sich zur mechanisierten Erstellung des Differentialblutbilds und entspricht in seiner Leistungsfähigkeit langjährig an Markt eingeführten Systemen.

Die von uns erhobenen Daten zur Präzision und Richtigkeit des Argos-Systems sind unter Berücksichtigung der Anforderungen in der Diagnostik als gut zu bewerten, auch im Vergleich mit anderen Systemen [7].

Die Messung am Cobas Argos ist gegenüber Einflüssen durch Probenalterung wenig empfindlich. Grundsätzlich gilt auch für das Argos-System, daß die Verwendung von frischen Blutproben vorzuziehen ist und daß mit den eingesetzten Meßmethoden durch die Probenlagerung bedingte systematische Veränderungen der Meßwerte auftreten. Das Ausmaß dieser Veränderungen ist aber bis 56 Stunden nach der Probennahme für viele diagnostische Fragestellungen nicht relevant.

Vom Gerät erstellte Differentialblutbilder ohne Warnhinweis werden regelmäßig ohne weitere Kontrolle akzeptiert. Für diese Proben stimmen die Meßwerte des Argos-Systems hinsichtlich der Anteile der Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten und Eosinophilen generell gut mit der morphologischen Differenzierung überein. Das gleiche gilt für das Bayer Diagnostic H1 und das Coulter STKS-System. Zu berücksichtigen ist, daß das für den Vergleich mit der mikroskopischen Differenzierung ausgewertete Probenkollektiv dieser Studie relativ klein ist. Trotzdem zeigen die Ergebnisse unserer Arbeit im Vergleich mit der Literatur [7–10] für alle Geräte tendenziell eine etwas bessere Übereinstimmung mit der mikroskopischen Differenzierung. Dies ist wahrscheinlich auf die Probenauswahl (nur Proben ohne Warnhinweise) und auf die hohe Zahl mikroskopisch differenzierter Leukozyten (400 Zellen) zurückzuführen. Eine Bewertung der mechanisch differen-

zierten Basophilen-Anteile ist mit unserem Probenkollektiv nicht möglich.

Unserer Beurteilung der Zuverlässigkeit in der Ausgabe von Warnhinweisen liegt ein Konzept zugrunde, welches von vielen Laboratorien in der Routinediagnostik angewendet wird. Danach werden alle Blutproben, für die die Erstellung eines Differentialblutbilds angefordert ist, zunächst von einem Gerätesystem analysiert (Screening). Gibt das System die mechanisierte Messung mit einem Warnhinweis aus, wird das Ergebnis mikroskopisch überprüft.

Ein Gerätesystem kann dementsprechend nur dann zum Screening eingesetzt werden, wenn es Proben, die es nicht sicher beurteilen kann, mit einem Warnhinweis versieht. Da kein auf dem Markt befindliches System in der Lage ist, nur unter pathologischen Bedingungen im Blut auftretende Leukozytenpopulationen (Blasten, unreife myeloische Zellen, lymphatische Reaktionsformen etc.) zu quantifizieren, müssen insbesondere Proben mit solchen Zellpopulationen gekennzeichnet werden. Der Anwender eines Gerätesystems muß wissen, bei welchen Veränderungen im mikroskopischen Differentialblutbild fehlerhafte Kennzeichnungen durch das Gerät auftreten können. Besonders bedeutsam sind die Fälle, in denen die Anwesenheit von normalerweise nicht im Blut vorkommenden Zellen nicht durch einen Warnhinweis kenntlich gemacht, also übersehen wird (falsch negatives Resultat).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich bewertet, ob das Auftreten abnormaler Zellen in der mikroskopischen Differenzierung bei der Messung der Blutprobe an einem Gerät durch irgendeinen Warnhinweis gekennzeichnet wird. Eine Analyse der Spezifität der Warnhinweise, also der Markierung definierter pathologischer Zustände durch einzelne Warnhinweise, soll zu einem späteren Zeitpunkt folgen.

Unsere Untersuchungen zeigten für das Argos-System bei 241 auswertbaren Blutbildern 29 falsch negative und 48 falsch positive Resultate auf. Ähnliche Zahlen waren für die Vergleichsgeräte festzustellen. Damit liegen für alle untersuchten Systeme die Anteile falsch negativer und falsch positiver Messungen deutlich über den entsprechenden Angaben in der Literatur [9–12].

Die hohen Anteile falsch negativer und falsch positiver Resultate an allen Systemen sind im wesentlichen auf zwei Umstände zurückzuführen: Zum einen wurden mehrheitlich Blutproben mit neoplastischen oder schweren reaktiven Veränderungen des weißen Blutbilds untersucht, welche erfahrungsgemäß mechanisierte Systeme zur Erstellung von Differentialblutbildern vor besondere Probleme stellen und außerhalb hämatologischer Spezialabteilungen selten sind. Zum anderen wurden sehr

strenge Definitionen für „falsch negativ“ bzw. „falsch positiv“ verwendet, so daß z.B. ein einziger abnormer Leukozyt unter 400 Zellen bei Fehlen eines Warnhinweises schon ein falsch negatives Resultat bedingt.

Die genaue Analyse der falsch negativen Resultate zeigt, daß es sich in der Regel um Minimalbefunde handelt, die auch bei routinemäßiger mikroskopischer Differenzierung (100 Zellen) nicht mit Sicherheit aufgefallen wären. Betrachtet man nur Befunde mit mindestens 3 % abnormen Zellen, bleibt für das Argos-System ein einziges – grenzwertig – falsch negatives Resultat. Am H1-System bzw. am Coulter STKS (Software 1.C.1) war die Zahl entsprechender falsch negativer Ergebnisse mit fünf bzw. acht Proben etwas höher; bei den betroffenen Blutproben lag jedoch meist lediglich eine mäßiggradige Erhöhung lymphatischer Reaktionsformen vor. Dazu ist anzumerken, daß die Einordnung von Zellen in diese Kategorie bei der mikroskopischen Differenzierung erheblichen subjektiven Schwankungen unterliegt. Lediglich am Coulter STKS mit der – nach Kenntnis der Autoren inzwischen nicht mehr eingesetzten – Software-Version 1.D.1 wurden auch weitere Veränderungen des weißen Blutbilds bei der mechanischen Differenzierung nicht sicher erkannt.

Ein Screening von Blutproben mittels mechanischer Leukozytendifferenzierung ist sinnvoll, wenn das Probenkollektiv einen geringen Anteil hochpathologischer weißer Blutbilder enthält. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen erwarten, daß der Cobas Argos mit 5-Diff-Modul zuverlässig und effektiv für solche Screening-Aufgaben eingesetzt werden kann. Das Argos-System erreicht die Leistungsfähigkeit von vergleichbaren eingeführten Geräten wie dem Bayer Diagnostic H1 und dem Coulter STKS. Hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber dem Auftreten lymphatischer Reaktionsformen scheint sogar eine gewisse Überlegenheit des Cobas Argos zu bestehen. Für einen exakten Vergleich der verschiedenen Geräte hinsichtlich der Detektion anderer Abnormalitäten, z.B. reaktiver Linksverschiebungen oder des Auftretens von Blasten, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Literatur

1. England JM, Rowan RM, van Assendelft OW, Coulter WH, Croner W, Jones AR, Koepke JA, Lewis SM, Shinton NK, Thom R (1984) Protocol for evaluation of automated blood cell counters. International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). Clin Lab Haematol 6, 69–84
2. Sachse C, Baudach A, Tille D, Avenarius HJ, Heller S, Ruby C, Henkel E: Multicenter-Evaluierung des COBAS ARCOS-Hämatologie-Analyzers. Lab med 18, 441–449
3. Schneider W (1986) Ein flexibler Hämatologie-Analysator mit neuartigen Meßtechniken und diagnostischen Aussagen. mta 1, 1–8
4. Hoehn E (1989) Automatische Differenzierung mit dem neuen Coulter STKS®. Extracta diagnostica 3, 103–106
5. Avenarius HJ, Deinhardt J (1992) Die Erkennung der Monozyten im Differentialblutbild mit unterschiedlicher Technik. Lab med 16, 204–209
6. Passing H, Bablok W (1983) A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. J Clin Chem Clin Biochem 21, 709–720
7. Closson RJ (1990) Evaluation des Technicon H*2-Systems: Vergleichende Untersuchungen mit dem Technicon H*1 und der mikroskopischen Differenzierung. Lab med 14, 445–449
8. Rosier H, Vaupel HA, Körber W, Savic J, Keller R (1993) Erfahrungen mit dem Cell-Dyn 3000, ein Gerät zur mechanisierten Erstellung des roten und weißen Blutbilds. Lab med 17, 47–58
9. Katz N, Grundhöfer C (1993) Möglichkeiten und Grenzen durchflußzytometrischer Differenzierung – Vergleich verschiedener Meßverfahren. Klin Lab 39, 329–334
10. Bas BM, Catsberg MJ, Op de Kump SLK (1993) A Short Evaluation of a New Haematological Analyser: The Cobas Argos 5 Diff Eur J Clin Chem Clin Biochem 31, 603–608
11. Meusers P, Brittinger C, Cottlieb M (1989) Erster Erfahrungsbericht mit dem neuen Coulter STKS in der Routine eines hämatologischen Labors. Extracta diagnostica 3, 294–299
12. Fiehn W, Zorn M (1992) Durchfluß-zytometrische Differenzierung des weißen Blutbilds durch Coulter STKS und Technicon H2. Klin Lab 38, 483–485