

Evaluierung des Hämatologieautomaten Sysmex SF-3000 unter besonderer Berücksichtigung pädiatrischer und onkologischer Aspekte

Evaluation of the Hematology Analyzer Sysmex SF-3000 with Special Regard to Pediatric and Oncologic Aspects

D. Pohland^{1,2} M. Redenbacher³

Zusammenfassung: Der neue Hämatologieautomat Sysmex SF-3000 (TOA Medical Electronics, Kobe, Japan) wurde anhand des Protokolls des International Council for Standardization in Haematology (ICSH) in zwei klinischen Laboratorien mit pädiatrischem bzw. onkologischem Krankengut evaluiert. Für die Meßgrößen des kleinen Blutbildes wurden Präzision, Linearität und Verschleppung sowie die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von etablierten Routinemethoden geprüft. Es ergab sich für alle Meßgrößen eine sehr gute Präzision und ein erweiterter Linearitätsbereich bei leukopenischen Proben. Verschleppung konnte bei Leukozyten, Erythrozyten und Blutplättchen nicht nachgewiesen werden. Die Beurteilung der klinischen Eignung der durchflußzytometrischen Leukozytendifferenzierung erfolgte durch Vergleich mit dem 400-Zellen-Differentialblutbild bei 375 Blutprobenproben, von denen 223 bei der mikroskopischen Untersuchung pathologische Befunde aufwiesen. Insgesamt ergab sich im Vergleich zur manuellen Methode bei der durchflußzytometrischen Leukozytendifferenzierung ein Anteil falsch positiver Ergebnisse von 17,1% bei nur 1,3% falsch negativen Ergebnissen. Für die Leukozytensubpopulationen fanden sich mit Ausnahme der Basophilen ($r = 0,32$) befriedigende (Monozyten: $r = 0,85$) bis gute Korrelationskoeffizienten (Neutrophile: $r = 0,95$; Lymphozyten: $r = 0,96$; Eosinophile: $r = 0,92$).

Schlüsselwörter: Blutzellzählung/Geräte; Blutzellzählung/Methoden; Leukozytendifferenzierung/Methoden; Reproduzierbarkeit der Ergebnisse; Falsch positive Ergebnisse; Falsch negative Ergebnisse; Evaluationsstudien.

Summary: The performance of the new Hematology-Analyzer Sysmex SF-3000 (TOA Medical Electronics, Kobe, Japan) was evaluated according to the ICSH

protocol at two clinical laboratories with pediatric or oncologic blood specimens. For the complete blood cell count, precision, linearity, carry-over and comparability of the results were investigated with established routine methods. An excellent precision and an expanded linearity, especially in the leukopenic range, could be established. Carry-over was not detectable for leukocytes, erythrocytes and platelets. Results of the flow cytometric leukocyte count were compared with the manual 400 cell differential including a high proportion (223/375) of pathological blood specimens. The study of the clinical sensitivity gave a false positive rate of 17.1% with a low false negative rate of only 1.3%. With exception of basophiles ($r = 0.32$), the comparison study with the manual differential yielded good correlation coefficients for neutrophiles ($r = 0.95$), lymphocytes ($r = 0.96$) and eosinophils ($r = 0.92$) and satisfactory correlation coefficients for monocytes ($r = 0.85$).

Keywords: Blood Cell Count/instrumentation; Blood Cell Count/methods; False Positive Reactions; False Negative Reactions; Evaluation Studies; Leukocyte Count/methods; Reproducibility of Results.

Der Sysmex SF-3000 ist ein neuartiger hämatologischer Analyzer für 23 Meßgrößen mit automatischer Probenzuführung und integrierter Barcodelesung [1, 2]. Die Erythrozyten und Thrombozyten werden mittels Widerstandsmeßprinzip unter Einsatz von automatisch gesetzten Diskriminatoren gezählt und als Größenverteilungskurven dargestellt. Die Messung der Hämoglobin-Konzentration erfolgt cyanidfrei in einem separaten Kanal. Für die flowzytometrische Differenzierung der Leukozyten kommt erstmalig eine Halbleitertechnologie zur Erzeugung des Laserstrahls im optischen Meßkanal zum Einsatz. Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile und Eosinophile werden nativ mittels Klein- und Großwinkelstreulicht bestimmt. Eine adaptive Clusteranalyse (ACAS), basierend auf einem lernfähigen Algorithmus, findet zur Bestimmung der Leukozytensubpopulationen Verwendung. Die Bestimmung der Gesamt-Leukozytenzahl erfolgt im opti-

¹Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg

²Korrespondenzadresse: Dr. Dieter Pohland, Altonaer Kinderkrankenhaus, Bleickenallee 38, D-22763 Hamburg. Fax: +49-40-88908595

³Stauferklinik Schwäbisch Gmünd, Zentrallabor und Zentrum für Innere Medizin, Mutlangen
Eingegangen: 21. Juli 1997/ Angenommen: 29. Oktober 1997

schen WBC/BASO Kanal. Die Leukozyten einschließlich der Basophilen werden in einer separaten Verdünnung vorbereitet. Unter Verwendung eines spezifischen Lysereagens werden die Basophilen mittels der ACAS-Technologie von den sonstigen Leukozyten getrennt erfasst.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Leistungsfähigkeit dieses neuartigen hämatologischen Analyzers an klinischen Proben untersucht, wobei nach den Richtlinien des International Council for Standardization in Haematology (ICSH) [3] und dem H20-A Protokoll des National Committee for Clinical and Laboratory Standards (NCCLS) [4] vorgegangen wurde.

Material und Methoden

Präanalytik

Als Probengefäße wurden im Labor Schwäbisch Gmünd K3-EDTA -Monovetten mit 2,7 ml Füllvolumen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) und im Labor Altona 2 ml-Probenröhrchen (Fa. Sarstedt), ebenfalls mit Zusatz von K3-EDTA, verwendet. Alle Blutproben, einschließlich der pädiatrischen, wurden durch Venenpunktion gewonnen und innerhalb von 4 Stunden nach Blutentnahme analysiert.

Analytik

Die Kalibration des SF-3000 und die Durchführung der Messungen erfolgten gemäß Empfehlungen des Herstellers.

Impräzision

Die Untersuchungen zur Impräzision des SF-3000 bei der Blutzellzählung, der Bestimmung des Hämoglobins und des Hämatokrits erfolgte im Altonaer Kinderkrankenhaus. Aufgrund der geringen Probenvolumina in der Pädiatrie wurde die Impräzision im Kapillarblutmodus überprüft. Zur Überprüfung der Präzision in der Serie wurden frische Blutproben 16mal nacheinander im Kapillarblutmodus analysiert.

Die intra- und interserielle Präzision wurde analog dem ICSH-Protokoll anhand von 10 Blutproben jeweils in Triplikaten in zwei Serien im offenen (manuellen) sowie im geschlossenen Modus ermittelt.

Verschleppung

Die Verschleppung wurde für die Parameter WBC, RBC, HKT, HGB und PLT überprüft. Auf eine Probe mit hoher Konzentration (i_1, i_2, i_3) folgte direkt die

Probe mit niedriger Konzentration (j_1, j_2, j_3). Die prozentuale Verschleppung wurde nach der im ICSH-Protokoll beschriebenen Formel berechnet:

$$\text{Verschleppung (\%)} = \frac{(j_1 - j_3)}{(i_1 - i_3)} \times 100$$

Linearität

Die Linearität wurde über einen den physiologischen Bereich weit überschreitenden Meßbereich durch Verdünnungsreihen geprüft. Ein Zellkonzentrat aus normalem Spenderblut wurde mit variablen Mengen zellfreien Plasmas der gleichen Blutprobe verdünnt. Jede Probe der Verdünnungsreihe von 0% Zellkonzentrat bis 100% Zellkonzentrat wurde dreimal analysiert. Die Varianz der Triplikate wurde mit der Varianz der Abweichungen der Verdünnungen von der Regressionsgeraden mit dem F-Test [5] verglichen.

Vergleich zwischen SF-3000 und M-2000

Es wurden 110 randomisierte EDTA-Blutproben von Patienten des Altonaer Kinderkrankenhauses mit dem Hämatologie-Analyzer Sysmex M-2000 [6] und dem Sysmex SF-3000 für das kleine Blutbild untersucht und ausgewertet.

Vergleich zwischen SF-3000, NE-1500 und manuellem 400 Zellen Blutbild

Es wurden 174 Patientenblute der Stauferklinik Schwäbisch Gmünd untersucht, um die Korrelation zwischen 5-Part-Diff (SF-3000) und manuellen Differentialblutbild (NCCLS-H20A-Protokoll) [4, 7] bezüglich der 5 Leukozytensubpopulationen zu ermitteln. Um einen Einfluß von morphologisch nicht exakt zu definierenden Zellen zu vermeiden, wurden Patientenproben mit morphologischen Flags nicht in die Gruppe der positiven Blutbilder einbezogen (Ausnahme: „Left Shift?“ als isolierte Meldung). Die Richtlinien des NCCLS-Standards H20A wurden hierbei realisiert. Modifikation: Zwei Personen beurteilen je 200 Leukozyten.

Gleichzeitig wurden die mit dem SF-3000 erhaltenen Ergebnisse mit dem Routinegerät Sysmex NE-1500 für diese Parameter verglichen.

Warnhinweise

Die Korrektheit der vom SF-3000 angezeigten Warnhinweise („Flags“) wurde in der Stauferklinik Schwäbisch Gmünd anhand von 375 Patientenbluten aus der täglichen Routine überprüft. Hierfür wurden Blutbilder von Patienten aus dem stationären und ambulanten Bereich herangezogen. Die 375 mikroskopisch differenzierten Blutbilder setzen sich aus 223 pathologischen und 152 unauffälligen Proben zusammen (s. Tabelle 1).

Die morphologisch auffälligen Proben stammten von Patienten mit reaktiven Granulozytosen mit oder ohne Linksverschiebung, reaktiven Lymphozytosen

Nicht standardisierte Abkürzungen: ACAS, adaptative Clusteranalyse; FN, falsch negativ; FP, falsch positiv; HCT, hematocrit; HGB, hemoglobin; ICSH, International Council for Standardization in Haematology; MW, Mittelwert; NCCLS, National Committee of Clinical Laboratory Standards; NRBC, nucleated red blood cell; PLT, platelet; RBC, red blood cell; SD, standard deviation; VK, Variationskoeffizient; WBC, white blood cell.

Tabelle 1 Probenkollektive

Pathologischer Befund	Anzahl
Keiner	152
Leukopenie (WBC < 4,0 x 10 ⁹ /l)	95
Reaktive Linksverschiebung (Stabkernige ≥ 0,9 x 10 ⁹ /l)	25
Reaktive Granulozytose (Granulozyten > 80%)	47
Lymphozytosen (Lymphozyten > 50%)	66
Erythroblastosen (NRBC > 1%)	14
Leukämische Erkrankungen (Vorstufen der Granulozyten oder Blasten > 1%)	75

Tabelle 2 Kriterien zur Kennzeichnung „abnormale Morphologie“

Warnhinweis SF-3000	Befund manuelles Differentialblutbild
Left shift?	≥ 0,9 x 10 ⁹ /l Stabkernige ¹
Blasts?	> 1% Blasten
NRBC's?	> 1% NRBC's
Immature Gran's?	> 1% Vorstufen ²
WBC/ABN-Scattergram	> 1% Vorstufen ²

¹ Nach Definition des Herstellers
² Meta- / Myelo- / Promyelozyten

Tabelle 3 Präzision in der Serie für zwei unterschiedliche Proben (n=16); Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (VK)

	WBC	RBC	HGB	HKT	PLT
Probe 1: MW	5,86 x 10 ⁹ /l	2,99 x 10 ¹² /l	9,3 g/dl	27,9%	206 x 10 ⁹ /l
SD	0,09 x 10 ⁹ /l	0,03 x 10 ¹² /l	0,05 g/dl	0,31%	2,96 x 10 ⁹ /l
VK	1,58%	0,88%	0,53%	1,12%	1,44%
Probe 2: MW	8,99 x 10 ⁹ /l	5,19 x 10 ¹² /l	16,2 g/dl	46,4%	256 x 10 ⁹ /l
SD	0,14 x 10 ⁹ /l	0,04 x 10 ¹² /l	0,06 g/dl	0,27%	5,43 x 10 ⁹ /l
VK	1,60%	0,73%	0,38%	0,58%	2,12%

Tabelle 4 Intra- und interserielle Präzision (VK) der Zellzählung und der Hämoglobinbestimmung im offenen und im Automatikbetrieb (n = 60).

	Mittelwert	VK Intraseriell	VK Interseriell
<i>Offener Modus (manuell)</i>			
WBC	11,80 x 10 ⁹ /l	0,39%	0,45%
RBC	3,89 x 10 ¹² /l	0,22%	0,97%
HGB	11,48 g/dl	0,21%	0,76%
HKT	35,20%	0,21%	1,22%
PLT	318 x 10 ⁹ /l	1,03%	1,62%
<i>Geschlossener Modus (Automatikbetrieb)</i>			
WBC	9,44 x 10 ⁹ /l	0,48%	0,51%
RBC	3,95 x 10 ¹² /l	0,26%	1,37%
HGB	11,40 g/dl	0,19%	0,42%
HKT	36,16%	0,26%	1,45%
PLT	264 x 10 ⁹ /l	1,85%	2,60%

und/oder Monozytosen, malignen Non-Hodgkin-Lymphomen mit oder ohne leukämische Ausschwemmung, akuten Leukämien, myeloproliferativen Syndromen und myelodysplastischen Syndromen.

Die statistische Falsch-positiv- (FP) / Falsch-negativ (FN) -Auswertung nach der Methode von Galen und Gambino [3,8] erfolgte bezüglich der Abnormalitäten in zwei Kategorien

1. abnormale Verteilung und abnormale Morphologie,
2. abnormale Morphologie.

und zusätzlich bezüglich der einzelnen morphologischen Warnhinweise. Für die morphologischen Warnhinweise „Blasten“, „Immature Gran“, „Left Shift“ sowie „NRBC“ wurden Einzelauswertungen durchgeführt. Diese Auswertung kam zur Anwendung unter der Voraussetzung, daß ein oder mehr der in der Tabelle 2 genannten Warnhinweise auf dem SF-3000 gemeldet oder die dort genannten Kriterien im manuellen Differentialblutbild erfüllt waren.

Ergebnisse

Impräzision

Die Impräzision des SF-3000 liegt bei allen Parametern weit innerhalb der vom Hersteller angegebenen Grenzwerte. Die Variationskoeffizienten für die Präzision in der Serie für zwei unterschiedliche Proben sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Die intraserielle Präzision zeigte für den offenen und geschlossenen Betrieb jeweils Variationskoeffizienten zum Teil weitaus kleiner als 0,5% für alle Parameter, außer den Thrombozyten mit 1,03% bzw. 1,85%. Etwas höhere VK-Werte der Thrombozyten zeigten sich ebenfalls für die interserielle Präzision: Im geschlossenen Automatikbetrieb wurde für die Thrombozyten der insgesamt höchste VK innerhalb der Präzisionsüberprüfung mit 2,6% ermittelt (s. Tabelle 4).

Verschleppung

Eine Verschleppung konnte für die Meßgrößen WBC, RBC, HKT, HGB und PLT nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5).

Linearität

Für die Meßgrößen Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozyten konnte auch bei

Tabelle 5 Verschleppung in % des Vorwertes.
*i*₃ = dritte Messung, *j*₁ erste darauffolgende und *j*₃ dritte Messung niedriger Konzentration.

	<i>i</i> ₃	<i>j</i> ₁	<i>j</i> ₃	Verschleppung (%)
WBC	57,73 x 10 ⁹ /l	1,18 x 10 ⁹ /l	1,28 x 10 ⁹ /l	0,18%
RBC	9,25 x 10 ¹² /l	1,05 x 10 ¹² /l	1,07 x 10 ¹² /l	0,24%
HGB	18,7 g/dl	2,7 g/dl	2,7 g/dl	0,00%
HKT	60,2%	8,0%	8,2%	0,38%
PLT	871 x 10 ⁹ /l	20 x 10 ⁹ /l	19 x 10 ⁹ /l	0,12%

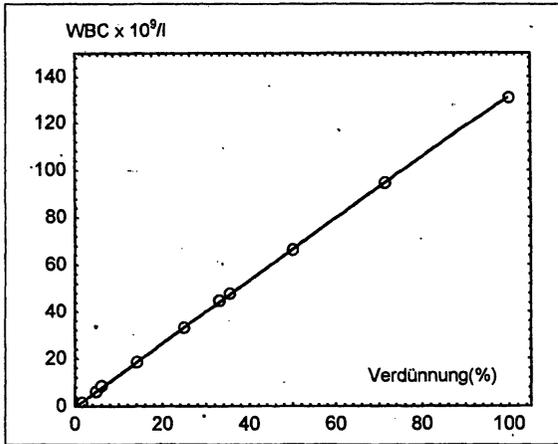


Abbildung 1 Linearität Leukozyten

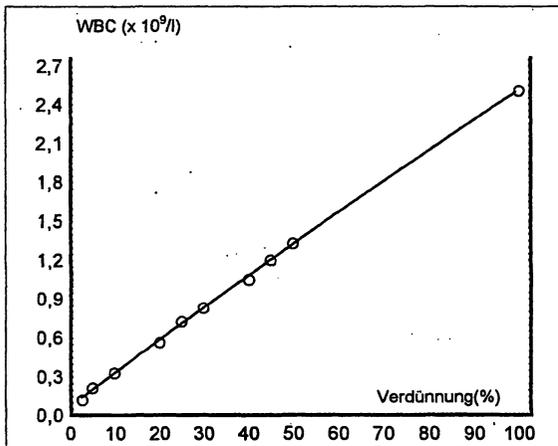


Abbildung 2 Linearität Leukozyten (niedriger Konzentrationsbereich)

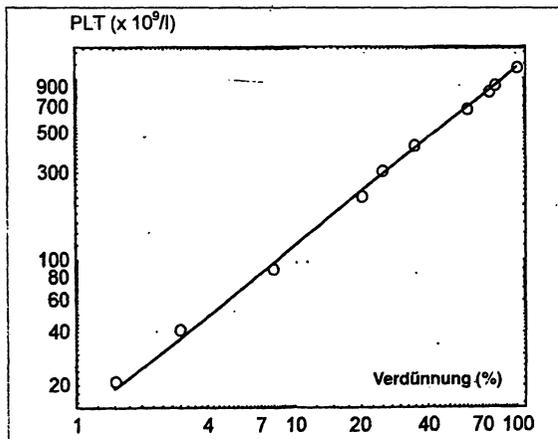


Abbildung 3 Linearität Thrombozyten (logarithmische Darstellung)

Tabelle 6 Lineare Regression und Korrelation ($y = ax + b$, $x =$ theoretische Konzentration, $a =$ Steigung, $b =$ Achsenabschnitt) bei der Linearitätsprüfung

	r	a	b
Leukozyten	0,999	1,006	$0,021 \times 10^9/l$
Leukozyten, niedriger Bereich	0,999	0,969	$0,099 \times 10^9/l$
Erythrozyten	0,999	0,994	$0,081 \times 10^{12}/l$
Hämoglobin	0,999	0,982	-0,086 g/dl
Hämatokrit	0,999	0,986	1,883%
Thrombozyten	0,999	0,992	$2,999 \times 10^9/l$

Tabelle 7 F-Test Werte bei der Linearitätsprüfung

	F	Freiheitsgrade
WBC	5,54	8 und 20
RBC	18,54	8 und 20
HGB	5,18	8 und 20
HKT	18,95	8 und 20
PLT	5,46	8 und 20

Tabelle 8 Lineare Regression und Korrelation ($y = ax + b$, $x =$ Sysmex M-2000) für das kleine Blutbild

	r	a	b
Leukozyten	0,996	0,998	$0,022 \times 10^9/l$
Erythrozyten	0,981	1,020	$-0,045 \times 10^{12}/l$
Hämoglobin	0,996	0,952	0,033 g/dl
Hämatokrit	0,988	0,988	-0,010%
Thrombozyten	0,993	0,955	$9,980 \times 10^9/l$

starker Anreicherung bzw. Verdünnung von Zellsuspensionen (s. „Methoden“) selbst in hochpathologischen Bereichen keine Abweichungen in der Linearität beobachtet werden (s. Tabelle 6). Insbesondere zeigte sich im niedrigen Konzentrationsbereich der Leukozyten (s. Abbildung 2) eine Linearität bis zu 130 Zellen/ μ l.

Die hohen F-Test [5] Werte (s. Tabelle 7) der Verdünnungsreihen zeigen, daß aus den Pipettier-Unge nauigkeiten beim Herstellen der Verdünnungen größere Abweichungen von den Regressionsgeraden resultieren als durch die Messung der Triplikate.

Vergleichsmessung mit Sysmex M-2000

Bei den Vergleichsmessungen pädiatrischer Blutproben mit dem Sysmex M-2000 zeigt sich eine sehr gute Korrelation von Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozyten (s. Tab 8).

Vergleichsmessung mit Sysmex NE-1500

Die Vergleichsmessung zwischen dem Sysmex SF-3000 und dem NE-1500 (s. Tabelle 9) ergibt eine sehr gute Übereinstimmung für Neutrophile, Lymphozyten und Eosinophile. Der Vergleich der Monozyten zeigt

Tabelle 9 Lineare Regression und Korrelation ($y = ax + b$, $x = \text{NE-1500}$) der Leukozytensubpopulationen

	r	a	b
Lymphozyten	0,974	0,981	-0,567 %
Neutrophile	0,916	1,029	-2,876 %
Monozyten	0,848	1,152	-0,465 %
Eosinophile	0,976	1,351	-0,176 %
Basophile	0,407	0,542	0,7305%

erwartungsgemäß eine etwas geringere Übereinstimmung.

Vergleich mit 400-Zellen-Differentialblutbild

Der Vergleich des am Mikroskop ausgewerteten 400 Zellen-Differentialblutbildes mit den Differenzierungsergebnissen [9, 10, 11] des Sysmex SF-3000 ergibt eine ausgezeichnete Übereinstimmung für die Neutrophilen und Lymphozyten. Eine etwas größere Streubreite findet sich bei den Eosinophilen und Monozyten, wobei die Korrelation dennoch als gut bezeichnet werden kann. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 bis 8 und in der zusammenfassenden Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10 Lineare Regression und Korrelation ($y = ax + b$, $x = \text{manuelles 400 Zellen-Differentialblutbild}$) der Differenzierung

	r	a	b
Lymphozyten	0,957	0,874	2,235%
Neutrophile	0,954	0,879	6,771%
Monozyten	0,854	0,958	1,013%
Eosinophile	0,916	0,933	0,514%
Basophile	0,322	0,427	1,114%

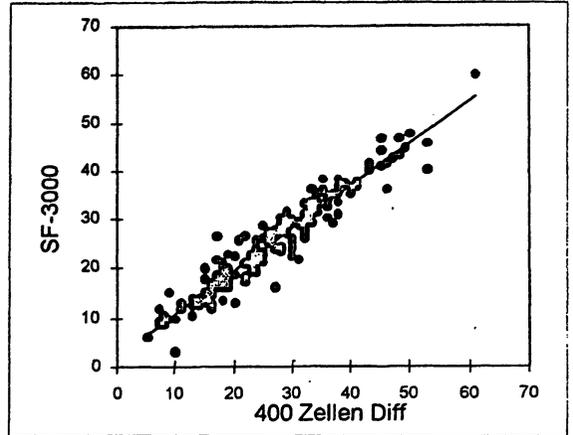


Abbildung 5 Korrelation der Lymphozyten (%) SF-3000 vs. manuelle 400 Zellen-Differenzierung

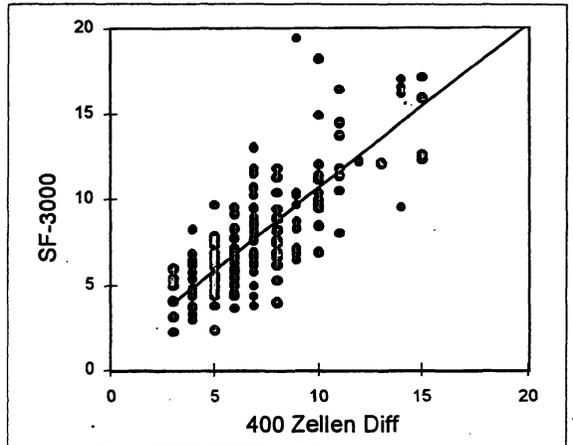


Abbildung 6 Korrelation der Monozyten (%) SF-3000 vs. manuelle 400 Zellen-Differenzierung

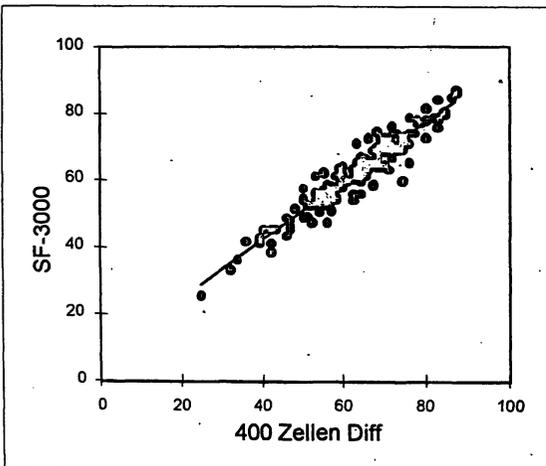


Abbildung 4 Korrelation der neutrophilen Granulozyten (%) SF-3000 vs. manuelle 400 Zellen-Differenzierung

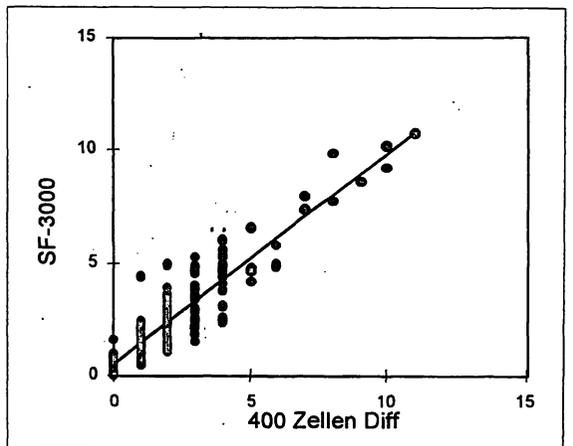


Abbildung 7 Korrelation der eosinophilen Granulozyten (%) SF-3000 vs. manuelle 400 Zellen-Differenzierung

Für die Basophilen läßt sich eine signifikante lineare Korrelation nicht herstellen. In der überwiegenden Mehrzahl der Differenzierungen lagen die mikroskopisch bestimmten Basophilenwerte niedriger als die vom Gerät gezählten Werte.

Erkennung pathologischer Befunde

Hinsichtlich der Erkennung pathologischer Befunde wurde eine Übereinstimmung mit dem mikroskopischen Differentialblutbildbefunden von insgesamt 92,3% ermittelt. Dabei wurde die Sensitivität mit 98,7% und die Spezifität mit 82,9% errechnet. Die in Tabelle 11 dargestellten Ergebnisse zeigen 3 Proben (1,3%) die vom SF-3000 im Gegensatz zur 400 Zellen-Differenzierung als negativ bewertet wurden, während 26 Proben (17,1%) abweichend als positiv angezeigt wurden.

Tabelle 11 Klinische Übereinstimmung von mikroskopischer Differenzierung und Sysmex SF-3000 (TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative)

	SF-3000 Pos	SF-3000 Neg
Mikroskopisch pos.	223	220
Mikroskopisch neg.	152	26
TP =	220	
TN =	126	
FN =	3	1,3%
FP =	26	17,1%
Übereinstimmung		92,3%
Sensitivität		98,7%
Spezifität		82,9%

Die Überprüfung der „falsch Negativen“ (s. Tabelle 12) zeigt für alle drei Proben ausschließlich Auffälligkeiten im Sinne einer Linksverschiebung.

Die Überprüfung der morphologischen Warnmeldungen ergab eine Übereinstimmung von 85,1% (s. Tabelle 13). Die Rate der falsch negativ beurteilten Proben liegt bei 5,6%.

Bei der weitergehenden Analyse der einzelnen spezifischen Warnmeldungen des Gerätes wurde für den Warnhinweis „Blasten“ eine Übereinstimmung von 89,6% mit einer Rate der falsch negativen Proben von 9,5% (s. Tabelle 14) ermittelt. Bei diesen sechs Proben wurden jedoch andere morphologische Flags vom SF-3000 in Übereinstimmung mit der mikroskopischen Differenzierung angezeigt, so daß sie in der Gesamtbewertung als „True Positive“ bewertet wurden.

Tabelle 12 Einzelbefunde der falsch negativen Proben

	Probe 1	Probe 2	Probe 3
<i>SF-3000</i>			
WBC	5,45	5,85	6,65
Neutrophile %	49,7	69,5	68,3
Lymphozyten %	35,4	21,4	20,9
Monozyten %	13,6	6,2	8,6
Eosinophile %	0,6	1,4	1,1
Basophile %	0,7	1,5	1,1
<i>400 Zellen Differentialblutbild</i>			
Myelozyten %	1		
Metamyelozyten %	2	1	1
Stabkernige %	.5	4	3
Segmenkernige %	50	67	66
Lymphozyten %	35	18	22
Monozyten %	6	8	7
Eosinophile %	1	1	1
Basophile %		1	

Für die Hinweise „Unreife Granulozyten“ und „Linksverschiebung“ (s. Tabelle 15 und 16) wurde eine Übereinstimmung von 77,6% bzw. 68,5% gefunden. Für den Warnhinweis „kernhaltige rote Vorstufen“ wurde eine Übereinstimmung von 84,5% (s. Tabelle 17) festgestellt.

Tabelle 13 Morphologische Warnmeldungen

	SF-3000 Pos	SF-3000 Neg
Mikroskopisch pos.	142	182
Mikroskopisch neg.	233	48
TP =	134	193
TN =	185	8
FN =	8	5,6%
FP =	48	20,6%
Übereinstimmung		85,1%
Sensitivität		94,4%
Spezifität		79,4%

Tabelle 14 Blasten

	SF-3000 Pos	SF-3000 Neg
Mikroskopisch pos.	63	90
Mikroskopisch neg.	312	33
TP =	57	285
TN =	279	6
FN =	6	9,5%
FP =	33	10,6%
Übereinstimmung		89,6%
Sensitivität		90,5%
Spezifität		89,4%

Tabelle 15 IG (Unreife Vorstufen)

	SF-3000 Pos	SF-3000 Neg
Mikroskopisch pos.	51	10
Mikroskopisch neg.	324	250
TP=	41	
TN=	250	
FN=	10	19,6%
FP=	74	22,8%
Übereinstimmung		77,6%
Sensitivität		80,4%
Spezifität		77,2%

Tabelle 16 Left Shift

	SF-3000 Pos	SF-3000 Neg
Mikroskopisch pos.	25	0
Mikroskopisch neg.	350	232
TP =	25	
TN =	232	
FN =	0	
FP =	118	33,7%
Übereinstimmung		68,5%
Sensitivität		100,0%
Spezifität		66,3%

Tabelle 17 NRBC (kernhaltige Erythrozyten)

	SF-3000 Pos	SF-3000 Neg
Mikroskopisch pos.	14	4
Mikroskopisch neg.	361	307
TP =	10	
TN =	307	
FN =	4	28,6%
FP =	54	15,0%
Übereinstimmung		84,5%
Sensitivität		71,4%
Spezifität		85,0%

Diskussion

Die Differenzierung der Leukozyten mittels unterschiedlicher Meßtechniken [12, 13] ist bereits mehrfach in Hämatologieautomaten realisiert worden. Neben der klassischen Zellzählung nach der Widerstandsmeßmethode hat sich die Flowzytometrie als weiteres verlässliches Meßprinzip in der Hämatologie etabliert. Die Messung der Streulichtintensität gibt Auskunft über spezifische Merkmale einer Zelle: Gra-

nularität, Oberflächenbeschaffenheit und Volumen [14]. Anhand dieser Vorgaben wird die Flowzytometrie bevorzugt zur Charakterisierung der Leukozyten eingesetzt, die somit anhand ihrer Merkmale in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterschieden werden können.

Potentielle Störfaktoren der optischen Leukozytenzählung sind zum größten Teil bedingt durch lyseresistente Erythrozyten und Thrombozytenaggregate. Die Auftrennung der Granulozyten in Neutrophile, Eosinophile und Basophile bedarf eines zusätzlichen meßtechnischen Aufwandes. Der SF-3000 setzt zur Vermeidung der Störfaktoren und der Bestimmung der Eosinophilen und Basophilen erstmals zwei getrennte Kanäle zur flowzytometrischen Bestimmung der Leukozyten ein. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgt im nativen Zustand nach ausreichender „Dehämiglobinisierung“ der Erythrozyten im DIFF-Kanal. Parallel dazu werden in einer zweiten Meßsuspension, dem WBC/Baso-Kanal, die kernhaltigen Zellen mit Ausnahme der Basophilen vollständig lysiert. Dieses Vorgehen hat den Vorteil der Verfügbarkeit einer korrekten optischen Leukozytenzählung selbst bei extrem lyseresistenten Erythrozyten, die insbesondere in der Pädiatrie [15] das Zählergebnis der Leukozyten verfälschen können. Wir konnten diese Erfahrung während der Evaluationsphase bestätigen. Eine optische Zählung der Leukozyten ist somit ohne Einschränkungen möglich.

Bei der Überprüfung der Impräzision und der Linearität konnten sehr überzeugende statistische Kennwerte ermittelt werden. Legt man die Bewertungsgrenzen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie bzw. des Instituts für Standardisierung (INSTAND) bei Ringversuchen zugrunde, so beträgt die Impräzision des SF-3000 nur ca. ein Zehntel dieser extern vorgegebenen, maximal zulässigen relativen Meßabweichungen. Die Linearität bei der Messung von Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozyten ist beim SF-3000 über einen breiten Meßbereich hervorragend; die Meßbereiche überdecken nach den von uns durchgeführten Verdünnungsversuchen (s. Abbildung 1-3) einen großen Teil der klinisch vorkommenden pathologischen Bereiche. Die optische Zählung der Leukozyten zeigt einen deutlich erweiterten Linearitätsbereich insbesondere in dem für die Diagnostik wichtigen leukopenischen Bereich.

Die Verschleppung beim SF-3000 ist für alle gemessenen Parameter praktisch zu vernachlässigen. In der Extremsituation mit Messung einer Thrombozytose ($871 \times 10^9/l$) und nachfolgender Thrombozytopenie ($20 \times 10^9/l$) zeigte das Gerät eine Verschleppung von 0,12%. Somit kann auch in einem solchen Fall auf eine Wiederholmessung verzichtet werden.

Als weitere Neuerung hat der Hersteller eine „lernfähige“ Clusteranalyse zur Bestimmung der Leukozytenpopulationen entwickelt, die fest eingestellte Diskriminatoren ersetzt. Der von uns durchgeführte Vergleich der SF-3000 Differenzierung mit dem am Mi-

kroskop ausgewerteten 400 Zellen-Differentialblutbild zeigt eine gute bis sehr gute Übereinstimmung. Lediglich für die Basophilen konnte eine lineare Korrelation nicht nachgewiesen werden. Besonders hohe Abweichungen von 2,0 bis 3,7% wurden bei leukopenischen Blutproben beobachtet, was zumindest teilweise auf die geringe Gesamtleukozytenzahl und die sich daraus ergebenden Schwierigkeiten für die mikroskopische Differenzierung zurückzuführen sein dürfte. Die Stellungnahme des Herstellers besagt, daß mit einer bereits in der Entwicklung stehenden Softwareänderung auf diese Problematik eingegangen wurde und eine weitere Optimierung der Clusteranalyse angestrebt wird.

Die Erkennung von abnormalen und morphologisch auffälligen Patientenbluten gehört zu den wesentlichen Aufgaben heutiger Hämatologieautomaten. Die Sicherheit eines Systems zur eindeutigen Filterung von „Negativen“ und „Positiven“ Befunden ist daher von großer Bedeutung. Es war somit ein besonderes Anliegen, die Eignung des SF-3000 für klinische Blutproben mit einem hohen Anteil pathologischer Befunde zu überprüfen.

Mit einer Übereinstimmung von 92,3%, einer Sensitivität mit 98,7% und einer Spezifität mit 82,9% sind dementsprechend die vom Gerät ausgegebenen Signale „Positiv“ bzw. „Negativ“ für den überwiegenden Anteil der untersuchten Proben zutreffend. Besonders hervorzuheben ist der niedrige Anteil falsch negativer Warnhinweise (3 entsprechend 1,3%) woraus für das Gerät eine hohe Sicherheit der Erkennung pathologischer Proben abgeleitet werden kann.

Über die summarische Beurteilung „Positiv“ bzw. „Negativ“ hinaus gibt das Gerät morphologische Warmmeldungen und abnormale Meldungen aus. Bei diesen Warnhinweisen besteht eine sehr gute bis gute Übereinstimmung von 92,3% für die Abnormal-Meldungen bzw. 85,1% für die Morphologischen Warmmeldungen. Dementsprechend sind Sensitivität und Spezifität ebenfalls hoch. Die Rate der falsch negativ beurteilten Proben liegt für die Abnormal-Meldungen bei 3,0% und für die morphologischen Warmmeldungen bei 5,6%.

Je spezifischer die Warmmeldungen des Gerätes ausfallen, desto mehr nehmen Übereinstimmung, Sensitivität und Spezifität ab. Während für den Warnhinweis „Blasten“ noch eine Übereinstimmung von 89,6% mit einer Rate der falsch negativen Proben von 9,5% erreicht wird stellen sich die Ergebnisse für die Warnhinweise „Unreife Granulozyten“ und „Linksverschiebung“ schlechter dar.

Bei den als falsch positiv eingestuften Proben beobachtet man eine deutliche Zunahme für die einzelnen Warnhinweise beginnend bei „Blasten“ sowie bei „Unreife Granulozyten“ und weiter bei „Linksverschiebung“. Das zusätzliche, falsch positive Auftreten von morphologischen Warmmeldungen resultiert aus der hohen Empfindlichkeit des Meßsystems insbesondere bei Einschluß morphologisch ähnlicher Zellen.

Die hohe Sensitivität (94,4%) des SF-3000 in Bezug auf morphologische Veränderungen läßt sich

aus dem WBC/Baso-Kanal ableiten, der Blasten und unreife Granulozyten wegen ihrer weitaus resistenteren Membran weniger zu beeinflussen scheint. Diese Zellen können somit ohne Überlagerung der lysierten „normalen Leukozyten“ selbst bei geringsten Konzentrationen sichtbar gemacht werden.

Trotz der kleinen Zahl ergibt sich für den Warnhinweis „kernhaltige rote Vorstufen“ eine bemerkenswert gute Übereinstimmung von 84,5%. In der Pädiatrie ist die Erkennung des Einflusses von oft hohen Erythroblastenzahlen bei Neugeborenen auf das Leukozytenergebnis von besonderer Bedeutung. Mit der Erkennung von klinisch relevanten Erythroblastenzahlen können die damit verbundenen falsch erhöhten Leukozytenzahlen sicher korrigiert werden.

Der Einfluß von Erythroblasten auf die Leukozytenzählung automatisierter Systeme ist mehrfach dokumentiert [16]. Lassen sich kleinere Erythroblasten mit Diskriminatoren noch trennen, werden Erythroblasten mit der annähernden Größe von Lymphozyten in die Leukozytenzählung mit einbezogen. Dies kann unter Umständen dazu führen, daß Erythroblasten nicht erkannt werden und eine hohe Rate falsch negativer Befunde erzeugen [17].

Die automatische Blutbilddifferenzierung führt erfahrungsgemäß zu einem deutlichen Rückgang der Zahl der mikroskopisch auszuwertenden Differentialabblutbilder, ohne jedoch diese zeitlich recht aufwendige Methode ganz ersetzen zu können. Die hämatologische Diagnostik wird daher auf eine erfahrene medizinisch-technische Assistentin nicht verzichten können.

Die von uns durchgeführte Evaluation des neuen Sysmex SF-3000 bestätigt die mit dem Sysmex NE-1500 und dem M-2000 gemachten Erfahrungen in nochmals verbesserter Form. Die Rate falsch negativ beurteilter Proben ist bemerkenswert niedrig, die Sicherheit der Erkennung pathologischer Blutbildveränderungen sehr hoch. Besonders zuverlässig erscheint die Differenzierung bei leukopenischen Proben. Verlaufskontrollen bei bekannten hämatologischen Diagnosen können mit Hilfe des SF-3000 mit hoher Zuverlässigkeit durchgeführt werden, ohne daß jedes Mal erneut ein mikroskopisches Differentialblutbild erstellt werden muß.

Danksagung

Wir möchten es an dieser Stelle nicht versäumen, unseren Mitarbeitern, insbesondere Frau Ripka (Stauferklinik Schwäbisch Gmünd) und Frau Harmsen (Altonaer Kinderkrankenhaus) für ihre zeitaufwendige Unterstützung zu danken.

Literatur

1. Green J. Performance Evaluation of the Sysmex SF-3000TM an Automated 23-Parameter Hematology Analyzer. *Sysmex J Internat* 1996; 6:129-35.
2. Bartels PCM, Schöorl M. Evaluation of the Sysmex SF-3000TM Automated Haematology Analyzer. *Sysmex J Internat* 1996;6:136-42.

3. International Council for Standardization in Haematology. Guidelines for the evaluation of blood cell analyzers including those for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. *Clin Lab Haematol* 1994;16:157-74.
4. NCCLS H20-A. Reference leucocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods. Approved Standard, Villanova (PA): National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1996.
5. Sachs L. *Angewandte Statistik*, 6th Edit., Berlin (DE): Springer Verlag, 1984.
6. Pohland D. Evaluation of the Automated Haematology Analyzer Sysmex M-2000. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27: 41-7.
7. International Council for Standardization in Haematology. Recommendation of the International Council for Standardization in Haematology on Reporting Differential Leukocyte Counts. *Clin Lab Haematol* 1995;17:113.
8. Galen RS, Gambino SP. *Beyond normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnosis*. New York (USA): Wiley, 1975, pp10-40.
9. Carter JL, Chavda N, Grant D, Patterson R, Poppek M, Carter A, Machin SJ. Comparison of monocyte counts obtained by flow cytometric analysis of surface markers, manual morphology, esterase staining and two automated differential counters. *Lab Hematol* 1995;1:37-42.
10. Bucher U. Die Zellen des Blutes. In: Bucher U, editor. *Labormethoden in der Hämatologie*. Bern (CH): Verlag Hans Huber, 1988, 66-8.
11. Koeppen KM, Heller S. Zelldifferenzierung. In: Boll, I, Heller, S, editors. *Praktische Blutzell Diagnostik*. Berlin(DE) Springer 1991, 162-87
12. Theodorsen I, Holter R, Akselberg K, Lande K. Comparison of five automated haematology analyzers. *Sysmex J Intern* 1994;4:73-80.
13. Seeger HT, Poppy U. Zellzähl- und Differenziergeräte. In: Boll I, Heller S, editors. *Praktische Blutzell Diagnostik*. Berlin (DE): Springer-Verlag, 1991, 115-61.
14. Raffael A, Nebe CT, Valet G. Grundlagen der Durchflußzytometrie. In : Schmitz G, Rothe G. editors. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart (DE): Schattauer, 1994.
15. Serrani RE, Alonso D, Chorochs JI. States of stability/lysis in human fetal and adults red blood cells. *Arch Intern Physiol Biochem* 1989;97: 307-16.
16. Paterakis GS. Reticulocyte counting in thalassaemia. *Clin Lab Haematol* 1996;18:17-28.
17. Vives-Corrons JL, Besson I, Jou JM, Gutierrez G. Evaluation of the Abbott Cell-DYN 3500 Hematology Analyzer in a University Hospital. *Am J Clin Pathol* 1996;105:553-9.

Immunologische Schnelltests zur sinnvollen Ergänzung für die Diagnostik von Streptokokken-Infektionen

Die Familie der Streptococci umfaßt verschiedene humanpathogene, gram-positive und Katalase-negative Bakterien mit β -hämolytischer Aktivität (komplette Hämolyse). Unter den infektiösen, β -hämolytischen Streptokokken sind die Gruppen A, B C und D die bekanntesten.

Die Streptokokken der Gruppe B besiedeln den unteren weiblichen Genitaltrakt und können bei der Passage durch den Geburtskanal auf den Säugling übertragen werden. Sie sind als Auslöser von Neugeboreneninfektionen von Bedeutung. Dabei werden zwei Arten unterschieden. Zum einen perinatal erworbene Infektionen, die innerhalb von 10 Tagen nach der Entbindung auftreten (early onset disease) und zum anderen Allgemeininfektionen, die in den meisten Fällen 10 Tage nach der Entbindung auftreten (late onset disease). Letztere zeigen häufig einen letalen Verlauf. Die Häufigkeit von Gruppe B-Streptococcus Infektionen liegt bei 1 % bis 5 %, mit einer Sterblichkeitsrate von 22 % bis 80 %.

Streptokokken der Gruppe A besiedeln den oberen respiratorischen Trakt und stehen als häufigste Auslöser von Rachenkatarrh und anderen eitrigen Infekten. - insbesondere bei Kindern unter 4 Jahren - im Mittelpunkt des Interesses. Eine nicht behandelte, durch Gruppe A-Streptokokken ausgelöste Infektion kann zu dauerhaften Folgeerkrankungen, wie rheumatisches Fieber und Glomerulonephritis führen.

Die Abklärung einer Streptokokkeninfektion erfolgt bisher konventionell durch Anlegen von Bakterienkulturen. Zu diesem Zweck werden Abstrichproben auf Selektionsnährböden kultiviert und anschließend die lebenden Bakterien u. a. anhand ihrer Stoffwechselaktivität identifiziert. Insbesondere bei Streptokokkeninfektionen können derartige Bestimmungen aufgrund der Artenvielfalt dieser Bakterienfamilie mehrere Tage dauern. Bei akuten Entzündungen wird daher wegen der langen Wartezeiten auf den Befund oftmals eine Verabreichungstherapie veranlaßt, ohne zuvor den ethiologischen Verursacher identifiziert zu haben. Der beste Therapieerfolg wird aber erst durch einen schnellen und eindeutigen Nachweis des Erregers gewährleistet, da nur in diesem Fall ein zielgerichteter Einsatz von Antibiotika möglich wird.

Zu diesem Zweck bietet die Firma NOBIS Labordiagnostica mit NobiView Strep-A-Ag (DR) und NobiView Strep-B-Ag (DR) zwei immunochromatographische Schnelltests in Einschnitt-Kassettentechnologie an. Die Tests sind zur direkten qualitativen Bestimmung von Gruppe A- oder Gruppe B-Streptococcus- β -haemolyticus Antigenen in humanem Rachen- oder Vaginalabstrich geeignet. Die Tests verwenden hochspezifische Kombinationen aus monoklonalen und polyklonalen Antikörpern, die durch kolloidale Goldmarkierung mit großer Empfindlichkeit Streptococcus-A- oder Streptococcus-B-Antigenen nachweisen. Das entsprechende Bakterienantigen wird zunächst aus der Patientenprobe (Rachen-/Vaginalabstrich) mit Hilfe der im Test mitgelieferten Reagenzien innerhalb von 2 Minuten extrahiert. Anschließend werden 5 Tropfen (ca. 250 μ l) der so behandelten Probe auf das Probenfenster der Kassette aufgetragen. Das Ergebnis kann schon nach 10 Minuten im Ergebnisfenster abgelesen werden.

Sollten Sie an weiterer Information zu NobiView Strep-A-Ag und NobiView Strep-B-Ag interessiert sein, fragen Sie bitte nach bei: NOBIS Labordiagnostika GmbH, Elsässer Str. 18, D-79346 Endingen, Tel.: 07642-9055-0 oder Fax: 07642-2662.

Streptokokken Infektionen



einfach und schnell diagnostiziert



NobiView

- ▶ Strep-A-Ag (DR)
- ▶ Strep-B-Ag (DR)



- Ergebnis in 15 Minuten
- Einschnitt-Kassettentest
- hohe Spezifität/Sensitivität
- kosteneffektives Testsystem

weitere Informationen durch:

NOBIS
Labordiagnostica GmbH
D-79343 Endingen, Elsässerstr. 18