

Vergleichende Leukozytendifferenzierung in pädiatrischen Blutproben an drei mechanisierten Analysesystemen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Gisela Barbara Grundhöfer  
aus Speyer am Rhein

Gießen 2000

Aus dem Zentrum für Klinische Chemie, Klinische Immunologie und Humangenetik  
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Leiter: Prof. Dr. Dr. N. Katz  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. N. Katz

Gutachter: Prof. Dr. H. Pralle

Tag der Disputation: 5. März 2001

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
2.1	Mikroskopische Differenzierung . . . . .	9
2.2	Analyse am Coulter VCS . . . . .	11
2.3	Analyse am Technicon H*1 . . . . .	15
2.4	Analyse am Sysmex NE-8000 . . . . .	21
2.5	Zusätzliche Anmerkungen . . . . .	27
2.6	Statistische Auswertung . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Quantifizierung von Leukozytenpopulationen . . . . .	29
3.1.1	Neutrophile Granulozyten . . . . .	29
3.1.2	Lymphozyten . . . . .	33
3.1.3	Monozyten . . . . .	36
3.1.4	Eosinophile Granulozyten . . . . .	40
3.1.5	Basophile Granulozyten . . . . .	43
3.2	Signalisierung von Abnormalitäten . . . . .	43
3.2.1	Erkennung von abnormen beziehungsweise pathologischen Blutbil- dern in der Altersgruppe „Neugeborene, 0. – 4. Woche“ . . . . .	44
3.2.2	Erkennung von abnormen beziehungsweise pathologischen Blut- proben in der Altersgruppe „Säuglinge, 5. Woche – 1 Jahr“ . . . . .	46
3.2.3	Erkennung von abnormen beziehungsweise pathologischen Blut- proben in der Altersgruppe „Kinder 1. – 5. Jahr“ . . . . .	48
3.2.4	Erkennung von abnormen beziehungsweise pathologischen Blut- proben in der Altersgruppe „Kinder ab 5 Jahren“ . . . . .	49
3.3	Signalisierungsübereinstimmung . . . . .	50
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
4.1	Quantitative Leukozytendifferenzierung . . . . .	53
4.1.1	Neutrophile Granulozyten . . . . .	53
4.1.2	Lymphozyten . . . . .	53
4.1.3	Monozyten . . . . .	56
4.1.4	Eosinophile Granulozyten . . . . .	59
4.1.5	Basophile Granulozyten . . . . .	61
4.2	Qualitative Erkennung . . . . .	63
4.2.1	Signalisierung von Abnormalitäten bei Neugeborenenblutproben . . . . .	63
4.2.2	Signalisierung der Blutproben „Säuglinge 5. Woche–1. Jahr“, „Kin- der 1.–5. Jahr“ und „Kinder ab 5 Jahren“ . . . . .	65
4.3	Treffsicherheit von Warnsignalen . . . . .	69

4.3.1	Erkennung von reaktiven Linksverschiebungen . . . . .	69
4.3.2	Erkennung von Toxischen Granulationen und DÖHLE-Körperchen	73
4.3.3	Erkennung von atypischen Lymphozyten . . . . .	74
4.3.4	Blasten . . . . .	75
4.4	Probleme und Fehlerquellen bei der Probenpräparation . . . . .	78
4.4.1	Generelle Probleme und Fehlerquellen bei der Blutentnahme . . .	78
4.4.2	Fehlerquellen in der Blutausstrich-Präparation . . . . .	79
4.4.3	Einfluß der Lagerungszeit der Blutproben auf die Leukozytendifferenzierung . . . . .	80
4.5	Fehlermöglichkeiten der Leukozytenbestimmung . . . . .	82
4.6	Vorteile der automatisierten Differenzierungsanalytoren . . . . .	85
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Schlußfolgerung</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Tabellen</b>	<b>94</b>

## 1 Einleitung

Blutbilder stellen auch heute einen wichtigen Pfeiler in der medizinischen Diagnostik dar. Verfahren, die Leukozyten nicht nur quantitativ erfassen, sondern auch zwischen verschiedenen Typen von Leukozyten zu differenzieren vermögen, geben Aufschluß über infektiöse Prozesse und allergische Reaktionen sowie Erkrankungen des blutbildenden Systems. Bei Differentialblutbildern von Kindern, die den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bilden, kommt der Erkennung schwerer entzündlicher Reaktionen wie z.B. der Neugeborenensepsis besondere Bedeutung zu.

Die Erstellung eines mikroskopischen Differentialblutbildes ist jedoch eine zeitraubende und arbeitsintensive Maßnahme im hämatologischen Labor. Bei einer großen Probenanzahl und somit erheblich personellem Einsatz und Kostenaufwand, ist die Durchführung eines mikroskopischen Differentialblutbildes bei jedem Patienten kaum mehr möglich.<sup>1-3</sup> Während die Quantifizierung von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten mittels hochtechnisierter Geräte inzwischen in der Regel unproblematisch und Standardmethode ist, hat die Differenzierung des gefärbten Blutaussstriches den Automatisationsbemühungen am längsten widerstanden. Inzwischen sind mehrere Differenzierungsgeräte von verschiedenen Firmen (Coulter Counter, Coulter STKS, Technicon H\*1, Technicon H\*2, Sysmex NE8000 und Sysmex E 4000\*\*, Cell Dyn) entwickelt und verfeinert worden, haben aber die mikroskopische Technik bislang nicht vollständig ersetzen können.

Zur Differenzierung von Blutbildern erwachsener Patienten sind mittlerweile verschiedene mechanisierte Analyseverfahren im Einsatz, welche sich im Routinebetrieb als zuverlässig und leistungsfähig erweisen.<sup>3-8</sup>

Ein ganz „spezielles“ Problem für die mechanisierte Differenzierung bringt Kinderblut mit sich, da das weiße Blutbild während der ersten Lebensjahre Veränderungen erfährt. So sind im Säuglings- und Kinderblut bis zu einem Jahr Erythroblasten (kernhaltige Vorstufen der Erythropoese) physiologischerweise nachweisbar, die ähnlich wie Erythrozyten von Neugeborenen eine erhöhte Resistenz gegenüber den eingesetzten Lyseragenzien besitzen und somit als kernhaltige Zellen fälschlicherweise den Leukozyten zugerechnet werden.<sup>9,10</sup>

Die Domäne der mechanisierten Analysesysteme besteht darin, daß Leukozytenpopulationen mit relativ homogenen Merkmalen mit einem extrem hohen Maß an Genauigkeit erfaßt werden. Dabei bleiben graduelle Unterschiede verschiedener Zellen innerhalb einer Population allerdings häufig unerkannt.<sup>11</sup> Neben einer exakten Differenzierung der fünf verschiedenen Leukozytenpopulationen in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten sowie Lymphozyten und Monozyten ist zu fordern, daß die Analysesysteme mit einer befriedigenden Sensitivität und Spezifität das Vorhandensein von pathologischen Blutzellen beziehungsweise nicht eindeutig zuzuordnenden Zellen zuverlässig signalisieren.<sup>3,12,13</sup> Proben, bei denen ein oder mehrere solcher Signale angezeigt werden, müssen einer mikroskopischen Nachdifferenzierung unterworfen werden.<sup>14-16</sup>

Unter Verwendung der verschiedenen Differenzierungsverfahren wurden unterschied-

liche Analysensysteme entwickelt. Um einen möglichst ökonomischen Arbeitsablauf bei einem Höchstmaß an Sicherheit und Präzision der erhobenen Befunde zu gewährleisten, ist es notwendig, die von den einzelnen Geräte angewandten Methoden, deren Grenzen und Fehlermöglichkeiten genau zu kennen.

Ziel dieser Arbeit war es, festzustellen, ob Blutbildanalysatoren auch zur mechanisierten Differenzierung von Blutproben von Kindern geeignet und einsetzbar sind. Verglichen wurden drei verschiedene Analysegeräte von unterschiedlichen Firmen, welche auf unterschiedliche Weise Differentialblutbilder erstellen. Es erfolgten vergleichende Messungen von Kinderblutproben durch die Streulicht-konduktometrische Methode am Coulter VCS (Coulter Electronics Hialeah, FL) sowie mittels Streulicht-zytochemischen Verfahrens am Technicon H\*1 (Technicon Instrument Corp., Kobe, Japan) und der Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyseselektiven Methode am Sysmex NE8000 (TOA Medical Corp. Tarrytown, NY). Die Ergebnisse der maschinellen Differenzierung aller drei Differenzierungsautomaten wurden der mikroskopischen Differenzierung, die die Referenzmethode darstellte, gegenübergestellt.

## 2 Material und Methoden

Für die Untersuchung standen 1989 folgende drei verschiedene Blutzellendifferenzierungsgeräte zur Verfügung:

- Coulter VCS (Coulter Electronics Hialeah, FL)
- Technicon H\*1 (Technicon Instrument Corp., Tarrytown, NY)
- Sysmex NE8000 (TOA Medical Corp., Kobe, Japan)

Es ist zu erwähnen, daß nicht alle drei Differenzierungsautomaten gleichzeitig aufgestellt waren. Der Coulter VCS stand uns während der gesamten sechswöchigen Phase der Messungen zur Verfügung, so daß hier die größte Zahl von Blutbild-Differenzierungen vorliegt. Der Differenzierungsautomat Technicon H\*1 war drei Wochen gleichzeitig zum Coulter VCS installiert; während das Differenzierungsgerät Sysmex NE8000 zwei Wochen parallel zu Coulter VCS genutzt werden konnte.

Als Probenmaterial dienten unselektionierte Blutproben aus der Kinderklinik des Uniklinikum Giessen aus dem täglichen Routineaufkommen. Untersucht wurden insgesamt 646 Blutbilder. Die zu messenden Kinderblutproben wurden in vier Kollektive unterteilt:

- Proben von Neugeborenen: 0. – 4. Woche
- Proben von Säuglingen: 5. Woche – 1 Jahr
- Proben von Kindern: 1. Jahr – 5 Jahre
- Proben von Kindern: ab 5 Jahre

Als Probenmaterial wurde bei Neugeborenen Kapillarblut verwendet; bei den weiteren Blutproben wurde wie bei Erwachsenen Venenblut untersucht, beide Proben wurden durch Zusatz von K2-EDTA (Kabe, Nümbrecht) ungerinnbar gemacht.

Die Differentialblutbestimmungen durch die Geräte erfolgte in der Regel zwischen drei und sechs Stunden nach der Blutentnahme. Die Proben wurden bis zur Bestimmung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Von jeder Blutprobe wurde ein Blutaussstrich angefertigt. Die Erstellung des mikroskopischen Differentialblutbildes erfolgte durch hämatologisch geschulte medizinisch-technische Assistentinnen der Kinderklinik. Den jeweils Untersuchenden war das Ergebnis der mechanisierten Analyse an den verschiedenen Differenzierungsgeräten nicht bekannt.

Wegen der relativ geringen Menge an Probenmaterial konnten nicht immer von allen Kinderblutproben an zwei verschiedenen Geräten Messungen durchgeführt werden.

## 2.1 Mikroskopische Differenzierung

Jeder Blutausstrich wurde manuell auf einem Objektträger 76 x 26 x 0.8 mm mit geschliffenem Deckglas angefertigt. Ein kleiner Blutstropfen wurde hierzu am Ende des Objektträgers aufgesetzt, sofort hinter der angewinkelten Kante des aufgesetzten Deckgläschens zum seitlichen Verlauf gebracht und dann hinter dem Deckgläschen her über den Objektträger geführt. Der doppelseitige randfreie Ausstrich sollte dabei dünner werdend mit Fransenbildung auslaufen. Hierbei wurde eine Ausstrichqualität erreicht, bei der die Erythrozyten dicht nebeneinander zu liegen kamen. Nach Lufttrocknen der Ausstrichpräparate erfolgt die Färbung. Mittels konzentrierter MAY-GRÜNWARD-Stammlösung (Merck, Darmstadt) wurde zunächst für drei Minuten überschichtet und damit der Ausstrich fixiert. Danach wurde *aqua bidest.* zugegeben und behutsam vermischt und schließlich die Lösung abgekippt. Sofort wurde anschließend mit GIEMSA-Gebrauchslösung (Merck, Darmstadt) überschichtet und nach 15-30 Minuten Einwirkung mit reichlich Wasser der Blutbildausstrich abgespült und wieder luftgetrocknet. Die gefärbten Ausstriche wurden dann bei einer 100-fachen Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl mäanderförmig durchgemustert. Mittels einer mechanisierten Zählhilfe wurden 100 kernhaltige Zellen ausgezählt; in wenigen Blutausstrichen mit ausgesprochen wenigen kernhaltigen Zellen, z.B. bei akuten Leukämien oder nach Chemotherapie, wurden nur 50 Blutzellen differenziert.

Da es bei Blutausstrichen mittels Deckglas auf den Objektträger dazu kommen kann, daß die kleineren Zellen schließlich überwiegend in der Mitte des Feldes, die größeren dagegen am Rande liegen, ist die Auszählung des Blutbildes in Mäanderform notwendig, was Inhomogenitäten des Ausstrichs ausgleichen soll.<sup>17</sup>

### Richtlinien der mikroskopischen Auswertung

Als mikroskopisch „nicht gesichert pathologisch“ nach BEGEMANN<sup>18</sup> wurden Blutbilder eingestuft, wenn folgende Grenzen überschritten wurden:

Stabkernige Granulozyten	$\geq 7\%$
Pro-, Meta-, Myelozyten	$\geq 1\%$
Blasten	$\geq 1\%$
Plasmazellen	$> 1\%$
Atypische Zellen	$\geq 2\%$

Als mikroskopisch pathologisch nach RÜMKE<sup>19, 20</sup> wurden Blutbilder eingestuft, wenn sich differenzieren ließen:

## 2. Material und Methoden

---

Stabkernige Granulozyten	$\geq 10\%$
Pro-, Meta-, Myelozyten	$\geq 2\%$
Blasten	$> 1\%$
Plasmazellen	$\geq 2\%$
Atypische Zellen	$\geq 3\%$

Das Auftreten von Normoblasten sollte generell erkannt werden.

### 2.2 Analyse am Coulter VCS

Das Coulter VCS-System ist ein Durchflußzytometer zur automatischen Erstellung von Differentialblutbildern.<sup>21</sup> Nach Verdünnen und Hämolyse der Erythrozyten (Erythrolyse, Coulter VCS-PAK) und Zugabe eines Reagens zur Unterbrechung des lytischen Prozesses (Quenching, Coulter VCS-PAK) wird das Reagenz Leukostat (Coulter VCS-PAK) in die Leukozytensuspension zugegeben. Dieses bewirkt eine Stabilisierung der Leukozyten, erhält diese nach Herstellerangabe nahezu in ihrer „nativen Morphologie“ und hebt so deren Dreidimensionalität hervor. Die ursprüngliche Größe der Leukozyten, die internen physikalischen und chemischen Eigenschaften sowie die charakteristische Oberflächenstruktur jeder Zelle bleiben somit erhalten.<sup>21</sup>

Der Differenzierungsanalysator ist ein mit drei Meßprinzipien ausgestattetes Gerät, das in dieser Form ausschließlich zur Klassifizierung der normalerweise im peripheren Blut vorkommenden weißen Blutzellen herangezogen werden kann. Die Leukozytenzählung selbst muß an einem anderen Gerät durchgeführt werden.<sup>22</sup>

Die Zelltypisierung einzelner Leukozyten beruht auf einer synchronen Erfassung des Zellvolumens, der inneren Zellstruktur und der Zelloberfläche. Zur Klassifizierung in fünf typische Leukozytenpopulationen werden in der Regel über 8000 Zellen herangezogen; pro Differentialblutbild wird ein Volumen von 100 $\mu$ l benötigt. Werden bei einer leukozytopenischen Probe innerhalb von 90 Sekunden nicht mindestens 8000 Zellen differenziert, so wird die Analyse beendet. Die Anzahl der erkannten Zellen wird grundsätzlich im Ausdruck angegeben.<sup>14,23</sup>

Zur Messung wird ein hydrodynamisch fokussierter Leukozytenstrom durch eine Flowzelle geleitet.

Die Meßprinzipien des Coulter VCS sind:

**Messung der Zellvolumina nach dem Impedanzprinzip:** Das Coulter-System benutzt einen niederfrequenten Strom durch eine Meßkapillare. Beim Durchtritt einer Zelle erhöht sich kurzfristig der Widerstand, was zu einer dem Zellvolumen proportionalen Widerstandsänderung führt.

**Messung der Leitfähigkeit mittels Hochfrequenz:** Die Messung der intrazellulären Leitfähigkeit erfolgt durch hochfrequenten Wechselstrom im Radiofrequenzbereich. Hochfrequente elektromagnetische Wellen „tasten“ damit das Innere der Zelle wie Kernstruktur, Plasma, Granula ab, und geben zusätzliche Informationen über die physikalische und chemische Zusammensetzung der Zelle.

**Messung der Streuung von Laserlicht an der Zelloberfläche:** Die Beurteilung der Oberflächenstruktur jeder Zelle erfolgt durch Laserlichtstreuung. Verwendet wird ein Neon-Helium-Laser. Die Intensität des Streulichtes jeder Zelle, die durch einen monochromatischen Laserstrahl fließt, liefert Informationen über Zellgröße und Zelloberflächenstruktur.<sup>12,23,24</sup>

## 2. Material und Methoden

---

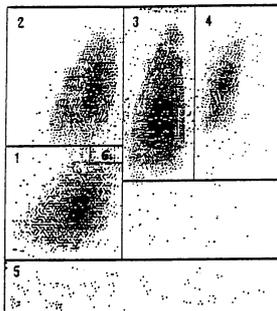
Das Coulter–Differenzierungsgerät mißt die Verteilungswerte für Normalzelltypen und nimmt eine Einteilung in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten sowie Lymphozyten und Monozyten vor. Stabkernige Granulozyten werden nicht gesondert erfaßt, sondern der Gruppe der Neutrophilen zugeordnet. Die klassifizierten Zellen werden in Punktwolken in einem Scattergramm dargestellt und numerisch als %-Werte ausgedruckt. Als Option können nach Eingabe der Leukozytengesamtzahl auch die Absolutwerte von dem Gerät bestimmt werden.

Durch die unterschiedliche Beschaffenheit der Zellen werden typischerweise fünf Punktwolken sichtbar. Die optische Analyse des Scattergramms wird durch mehrere Bildschirmfunktionen und Darstellungen der Punktwolken aus verschiedenen Blickrichtungen unterstützt.<sup>14,22,25</sup>

Der Scatterplot (DF1) zeigt die graphische Darstellung der Lymphozyten, Monozyten sowie der neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. Beispielhaft ist ein solcher Plot in Abb. 1 dargestellt.

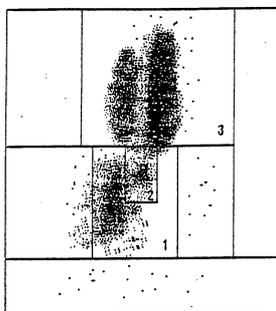
Der Scatterplot (DF2) zeigt die separate Darstellung der Konduktivitätsanalyse, welche von besonderem Interesse zur Differenzierung der Gruppe der Basophilen und der atypischen Zellen ist.<sup>21,23,24</sup> Einen solchen Plot zeigt Abb. 2.

Mit einer dreidimensionalen Graphik können alle Zellpopulationen – einschließlich abnormaler Zellen – dreidimensional links- oder rechtsdrehend dargestellt werden.



- |  |                |
|--|----------------|
| 1. Lymphozyten                                 | 2. Monozyten   |
| 3. Neutrophile                                 | 4. Eosinophile |
| 5. Debris der Erythrozyten<br>und Thrombozyten | 6. Basophile   |

Abbildung 1: VCS Scatterplot DF1



- |   |
|---|
| 1. Lymphozyten                            |
| 2. Basophile                              |
| 3. Neutrophile, Monozyten und Eosinophile |

Abbildung 2: VCS Scatterplot DF2

Diese Scatterplots können sowohl in schwarz–weiß als auch farbig ausgedruckt werden. Bei schwarz–weißer Dokumentation der Ergebnisse bedeutet die dunkelste Stelle der Abbildung, daß sich hier die größte Zelldichte befindet. Bei farbiger Dokumentation der Ergebnisse gibt gelb die größte, rot die zweitgrößte und grün die drittgrößte Zellpopulation an; werden die Punkte blau gezeichnet, handelt es sich um die kleinste Zellzahl.

Bei Zellpopulationen, die keine homogene Punktwolke im Scattergramm ergeben oder welche zwischen den Punktwolken der normalen Blutzellen zu liegen kommen, wird ein Signal gesetzt.<sup>14,23,25,26</sup>

Der Coulter VCS kennt folgende Signale:

**POSITIVE:** Das Signal „POSITIVE“ wird dann gegeben, wenn sich Proben mit morphologisch abnormen Zelltypen finden, welche von dem Gerät nicht identifiziert werden können.

**NEGATIVE:** Das Signal „NEGATIVE“ wird dann ausgedruckt, wenn das Gerät keine auffälligen pathologischen Zellen finden konnte.

**INCOMPLETE:** Das Signal „INCOMPLETE“ zeigt das Gerät bei Proben, die nicht korrekt angesaugt wurden oder bei Proben mit niedriger Leukozytenzahl. Dieses Signal sagt generell aus, daß zu wenige Daten für eine zuverlässige Analyse des Differentialblutbildes vorliegen.<sup>21,23</sup>

Außerdem setzt das Gerät zusätzliche Flags, die eine genauere Angabe über das pathologische Differentialblutbild geben:<sup>23,24</sup>

- X1:** betrifft die Leukozytenbasislinie (trennt Normoblasten und Thrombozytenaggregate ab)
- X2:** betrifft den beweglichen Diskriminator zwischen der Lymphozyten- und Monozytenpopulation (atypische Lymphozyten, Pfeifferzellen)
- X3:** betrifft den beweglichen Diskriminator zwischen der Monozyten- und Neutrophilenpopulation (atypische Monozyten, toxische Granulation)
- X4:** betrifft den beweglichen Diskriminator zwischen der Lymphozyten- und Neutrophilenpopulation (atypische Lymphozyten, altes Blut)
- X5:** in einen höheren Bereich verschobene Neutrophilenpopulation (Linksverschiebung, Vorstufen der myeloischen Reihe)
- X6:** dieser Alarm weist auf möglicherweise vorhandene Blasten hin; er kann in drei Bereichen auftreten, siehe Abb. 3
- X7:** in einen unteren Bereich verschobene Lymphozytenpopulation z.B. Plasmazellen

2. Material und Methoden

**XT:** Temperatur im Gerät über 29.5°C

Abb. 3 gibt eine Übersicht über die Lokalisierung der verschiedenen Signale im Scatterplot.

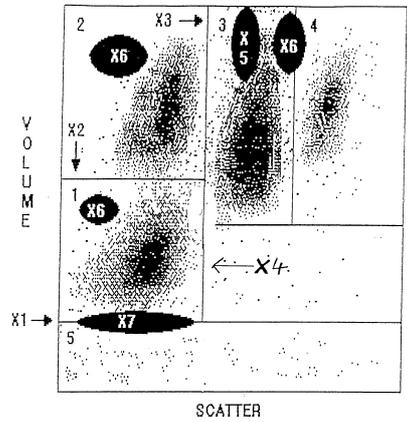
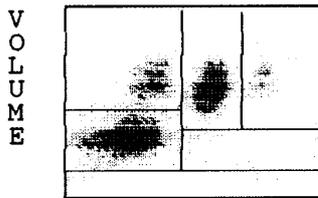


Abbildung 3: VCS Flags

Diese Markierungen sind lediglich richtungsweisend. Jede markierte Blutprobe muß einer mikroskopischen Nachdifferenzierung unterzogen werden.

Die Abb. 4 zeigt ein normales und ein pathologisches Differentialblutbild aus dieser Arbeit.

ID  
CYCLE 0003  
26/07/89  
10:41  
NEGATIVE



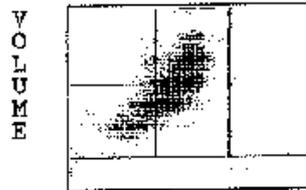
DF 1

WBC

52.40 LY%  
6.36 MO%  
37.78 NE%  
3.10 EO%  
0.36 BA%

Cells 7980/8192 Secs. 16

CYCLE 0005  
06/07/89  
13:28  
P. X2X3X4X5X6



DF 1

WBC

LY#	10.85	LY%	LY#
MO#	1.95	MO%	MO#
NE#	75.30	NE%	NE#
EO#	1.30	EO%	EO#
BA#	10.60	BA%	BA#

Cells 7843/8192 Secs. 05

Abbildung 4: Normales und pathologisches Differentialblut am VCS

### 2.3 Analyse am Technicon H\*1

Der Technicon H\*1 ist ein mechanisiertes vollautomatisches Hämatologie–Analyse–System, das aus 100  $\mu$ l Vollblut wahlweise das kleine oder das große Blutbild durchführt. Von einer Probennehmernadel wird das Blut angesaugt und auf die drei Kanäle verteilt. Im Normalfall werden 10.000 Zellen ausgezählt; bei Proben mit weniger als 4.000 Leukozyten/ $\mu$ l werden 1.000 Zellen pro Kanal ausgezählt.<sup>27,28</sup> Das Gerät arbeitet nach dem Prinzip der optischen Zytometrie gekoppelt mit zytochemischer Differenzierung der Leukozyten. Hierbei wird die Peroxidaseanfärbbarkeit der Zelle (zytochemisch) mit der Streulichtmessung an Leukozyten (Größe der Zelle) und der zytometrischen Streulichtmessung an Leukozytenkernen kombiniert.<sup>15,29</sup>

#### Peroxidase– und Streulichtmessung der Leukozyten im Peroxidasekanal

Die Peroxidasereaktion dient vor allem zur Differenzierung der bei akuten Leukosen auftretenden Zellarten. Myeloblasten, Lymphoblasten, Lymphozyten und der größere Teil der Monozyten (über 75%) sind peroxidase–negativ. Promyelozyten, Myelozyten und reife Granulozyten (mit Ausnahme der Basophilen) sowie ein kleiner Teil der Monozyten (unter 25%) reagieren peroxidase–positiv. Bei einem Teil der akuten Leukosen zeigen jedoch auch Blasten Peroxidaseaktivität. Dieser Befund weist darauf hin, daß es sich um Myeloblasten handelt, die sich in einem bestimmten Reifungsstadium zum Promyelozyten hin befinden. In diesen Zellen sind bereits enzymhaltige Organellen vorhanden, die sich jedoch mit der Färbung nach PAPPENHEIM nicht als Granula darstellen. Ein negativer Befund schließt eine akute Myelose nicht aus und erlaubt keine Abgrenzung gegenüber einer chronischen oder akuten Lymphadenose.<sup>30</sup>

Zur Messung der Peroxidaseaktivität werden zunächst die Leukozyten fixiert und die Erythrozyten zerstört, dann erfolgt die Anfärbung der Leukozyten entsprechend ihrer Peroxidaseaktivität. Die so behandelte Zellsuspension wird dann von einem Mantelstrom umhüllt in einer Flußküvette analysiert.

In dieser Küvette wird gleichzeitig die Streuung des Lichtes eines Lasers an den zu differenzierenden Zellen gemessen.

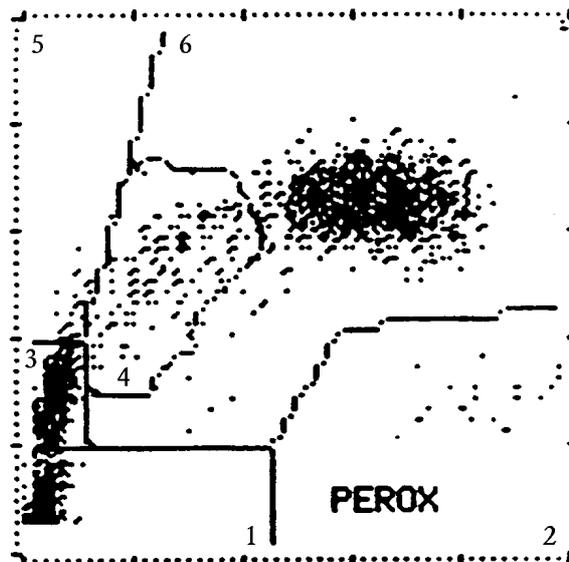
Von jeder einzelnen Zelle erhält man also zwei Signale: ein Streulichtsignal (proportional zur Größe der Zelle) und ein Absorptionssignal (proportional zur Enzymaktivität). Das Leukogramm wird erstellt, indem beide Signale für alle Zellen einer Probe (ca. 10.000 differenzierte Zellen) in einem x–y–Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen werden.<sup>15,27</sup>

Das Leukogramm (siehe Abb. 5) einer jeden Probe kann in sechs verschiedene Felder eingeteilt werden, in denen sich von Fall zu Fall unterschiedlich große Zellpopulationen befinden. Die Bedeutung des Leukogramms einer Patientenprobe besteht darin, daß seine Betrachtung eine schnelle Unterscheidung normaler und pathologischer Proben zuläßt; dabei ist bei pathologischen Proben eine Abschätzung des Ausmaßes der Veränderungen möglich.

## 2. Material und Methoden

---

Neutrophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und atypische Zellen können hierdurch getrennt quantifiziert werden; Monozyten und basophile Granulozyten erscheinen als gemeinsame Zellpopulation. Die Population der Neutrophilen umfaßt hierbei sowohl die reifen segmentkernigen Granulozyten als auch Vorstufen der Granulopoese vom Stabkernigen bis zum Promyelozyt. Eine Unterscheidung von reifen und unreifen Zellen ist hier nicht möglich. Weiterhin existiert ein Feld (LUC: large unstained cells), das große, peroxidasenegative Zellen enthält. Hierunter fallen im wesentlichen reaktiv veränderte Lymphozyten, Blasten, Pfeifferzellen und Plasmazellen.<sup>15,27,31</sup>



1. Erythrozyten (lysiert), Thrombozyten, Störsignale durch Elektronik und Reagenzien (=Rauschen)
2. Eosinophile
3. Lymphozyten
4. Monozyten und Basophile
5. LUC (large unstained cells, z.B. große lymphatische Reizformen, Blasten, Pfeifferzellen)
6. Neutrophile (Segment- und Stabkernige, Metamyelo-, Myelo-, Promyelozyten)

Abbildung 5: Leukogramm

Von Bedeutung ist auch der Anteil der peroxidase-positiven Zellen an der Gesamtzahl der untersuchten Zellen, die mittlere Peroxidaseaktivität der Probe. Unter Verwendung der mittleren Peroxidaseaktivität der Probe berechnet das Gerät einen mittleren Peroxidaseaktivitätsindex MPXI.

$$MPXI = 100 \frac{MPX_a - MPX_n}{MPX_n}$$

$MPX_a$  ist die mittlere Peroxidaseaktivität der untersuchten Probe,  $MPX_n$  die im Gerät gespeicherte mittlere Peroxidaseaktivität eines Normalkollektivs. Der Normalbereich des  $MPXI$  reicht von -10% bis +10%.<sup>27</sup>

Mit dem zytochemischen Peroxidaseachweis werden nicht alle für das Leukozyten-Differentialblutbild nötigen Informationen gewonnen. Es fehlen noch die Basophilen und Aussagen über die reaktive beziehungsweise pathologische Linksverschiebung; diese Information liefert der Basophilen-, auch Kernsegmentierungskanal genannt.<sup>15, 27, 32</sup>

### **Basophilen- oder Kernsegmentierungskanal; Laser-Streulichtmessung der Leukozytenkerne (zytometrisch) in zwei Winkelbereichen**

Vor der Messung werden hier in stark saurem detergenzhaltigem Milieu alle Zellen mit Ausnahme der Basophilen von Ihrem Zytoplasma befreit (Zell-Stripping). Die verbleibenden Zellkerne werden dann im Laserstreulicht in zwei verschiedenen Winkelbereichen (Klein- und Großwinkelstreuung) als rund oder segmentiert erfaßt. Dabei wird die Intensität der Kleinwinkelstreuung auf die Y-Achse und die der Großwinkelstreuung auf die X-Achse aufgetragen. Auf diese Weise erhält man das Nukleogramm.<sup>4, 15, 27, 32</sup> Ein beispielhaftes Nukleogramm enthält Abb. 6.

Das Nukleogramm einer jeden Probe kann in vier Felder eingeteilt werden, in denen sich folgende Zellpopulationen befinden: mononukleäre Zellen, polymorphnukleäre Zellen (segmentkernige Neutrophile und Eosinophile), Basophile und sonstige Zellen ohne medizinische Bedeutung (Rauschen).<sup>33, 34</sup>

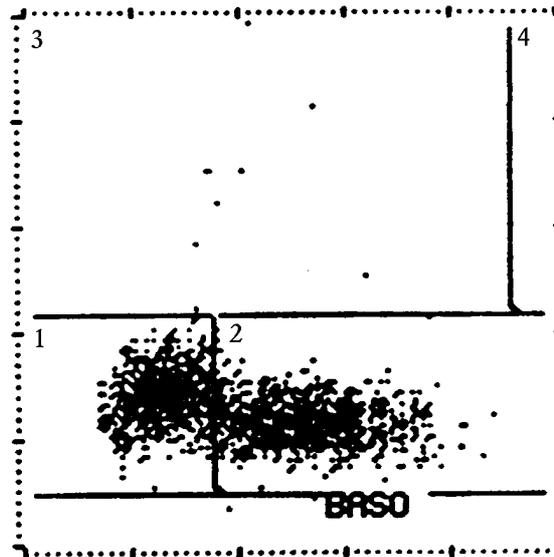
Zu den rundkernigen, „mononukleär“ genannten Zellen (MN) zählen die Lymphozyten und Monozyten, aber auch die rundkernigen Vorstufen der Granulopoese (vom Metamyelozyten bis zum Blasten). Die „polymorphnukleär“ bezeichneten Zellen (PMN) umfassen die segmentkernigen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Die MN und PMN-Populationen werden durch eine senkrechte Schwelle voneinander getrennt. Im Normalfall hat die MN-Population eine runde, die PMN-Population ein langgestreckte Form.

Der Kernsegmentierungsindex  $LI$ , auch Lobularitätsindex genannt, wird durch die folgende Beziehung definiert:

$$LI = \frac{\text{Lage des Maximums der PMN's auf der X-Achse}}{\text{Lage des Maximums der MN's auf der X-Achse}}$$

Aus dem Kernsegmentierungsindex sowie aus der Ausprägung und Lage der senkrechten PMN/MN-Schwelle resultiert die Beurteilung der reaktiven Linksverschiebung.

Im Übergangsbereich zwischen mononukleären und polymorphnukleären Zellen finden sich die stabkernigen Granulozyten. Das Feld 1 wird — allerdings unsichtbar —



1. Mononukleäre Zellen
2. Polymorphnukleäre Zellen
3. Basophile
4. Zellen ohne bzw. mit unbekannter medizinischer Bedeutung (Rauschen)

Abbildung 6: Nukleogramm

durch eine zusätzliche Schwelle bei 8 Skalenteilen der waagerechten Achse in zwei Felder unterteilt. Die links davon liegenden Zellen werden als Blasten zugeordnet.

Einzig die basophilen Granulozyten sollen im Milieu des Basophilen-Kanals intakt bleiben. Durch ihre Streulichteigenschaften unter diesen Bedingungen setzen sich die Basophilen deutlich von den übrigen Populationen ab und werden an dieser Stelle des Analysevorgangs quantifiziert.<sup>4,15</sup>

### Kombinierte Auswertung beider Kanäle

Die kombinierte Information aus beiden Meßkanälen, dem Peroxidase- und dem Basophilen-Kanal, erlaubt die Unterteilung der Leukozyten in fünf Populationen. Neutrophile, eosinophile Granulozyten und Lymphozyten können allein aus ihren Signalen im Peroxidase-Kanal quantifiziert werden. Hier werden zusätzlich auch die LUCs bestimmt. Monozyten und basophile Granulozyten werden durch Kombination von Informationen aus dem Peroxidase- und Basophilen-Kanal identifiziert.<sup>15,27,31</sup>

Durch einen Zählvergleich beider Meßkanäle schließt das Gerät auf die Plausibilität der ermittelten Gesamtleukozytenzahl. Darüber hinaus werden aus einer Gegenüberstellung bestimmter Zellpopulationen aus beiden Meßkanälen einige Hinweise auf Blutbildveränderungen abgeleitet und durch morphologische Warnsignale charakterisiert:<sup>15</sup>

## 2. Material und Methoden

---

- Eine vermehrte Zellzahl im Übergangsbereich zwischen „mononukleären“ und „polymorphkernigen“ Zellen im Basophilen-Kanal deutet das Gerät als reaktive Linksverschiebung der Granulopoese; d.h. eine Erhöhung der Stabkernigen, deren Kerne nicht mehr ganz rund, aber noch nicht segmentiert sind. Je nach Ausprägung wird in der Rubrik *Linksverschiebung* das Signal „+“ oder „++“ angegeben.
- Wird für den Kernsegmentierungsindex ein Wert  $LI < 1.9$  gefunden, so wird unter *Linksverschiebung* das Signal „+“ gesetzt.
- Überwiegen die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, gezählt im Peroxidase-Kanal, gegenüber den polymorphkernigen Zellen aus dem Basophilen-Kanal [ $\text{Neut}(\text{Perox}) + \text{Eos}(\text{Perox}) - \text{PMN}(\text{Baso}) > 10\%$ ], wird der Verdacht auf das Vorliegen unreifer Vorstufen der Granulopoese signalisiert. Im Ausdruck erscheint unter *Sonstige* das Signal „IG“ (immature granulocytes). Zusätzlich wird unter *Linksverschiebung* das Signal „+“ gesetzt. Dahinter steht der Gedanke, daß derartige Vorstufen (ab Metamyelozyten) im Basophilen-Kanal als „rundkernige“ Zellen klassifiziert werden und damit unter die „mononukleären“ Zellen fallen. Die verbleibende Population der PMN aus dem Basophilen-Kanal wird damit kleiner als die der Granulozyten aus dem Peroxidase-Kanal.<sup>15,27</sup>
- Treten im Basophilen-Kanal Zellkerne auf, welche ein geringes Großwinkelstreu-licht erzeugen (im Ausdruck finden sich diese im linken Bereich im Feld der „mononukleären“ Zellen), erscheint in der Rubrik *Blasten* das Signal „+“.
- Werden mehr als 4% der Zellen dem Feld „LUC“ zugeordnet, so gibt das Gerät je nach Volumen der hier eingeordneten Zellen in den Rubriken „Blasten“ und/oder „Atyp“ das Signal „+“.
- Unter *Sonstige* werden verschiedene zusätzliche Signale gegeben, die auf Störeffekte (etwa durch Luftblasen) oder Schwierigkeiten bei der Differenzierung in einem bestimmten Kanal zurückgehen können.

Zur Beurteilung mancher morphologischer Warnsignale wird zusätzlich die mittlere Peroxidaseaktivität *MPXI* herangezogen.

Bei starker Normalwertüberschreitung, z.B. Leukozytose, Neutrophilie, Lymphozytose sowie bei Kennzeichnung einer Blutprobe durch Flags mit Hinweis auf Abnormitäten in der Leukozyten-Morphologie ist eine mikroskopische Nachdifferenzierung erforderlich. Um einen schnellen Überblick zu gewährleisten, codiert das Technicon H\*1 die morphologischen Signale zu einer vierstelligen Zahl, dem Leukosignal. Jede Stelle dieser Zahl gibt Hinweise auf ein bestimmtes pathologisches Merkmal:<sup>5,33</sup>

1. Stelle	2. Stelle	3. Stelle	4. Stelle
Linksverschiebung	Atypische Zellen	Blasten	Sonstige

## 2. Material und Methoden

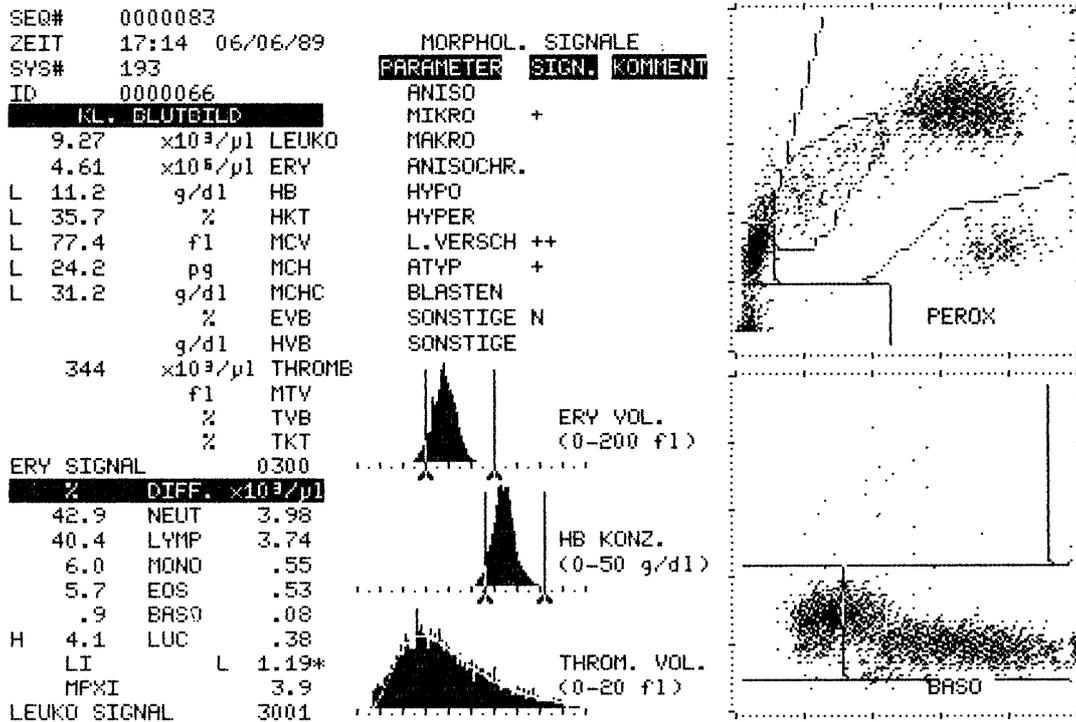


Abbildung 7: Pathologisches Differentialblutbild des Technicon H\*1

Abb. 7 stellt einen typischen Ausdruck des Technicon H\*1 dar.

Auch ohne morphologische Warnsignale ist in den folgenden Fällen eine mikroskopische Nachuntersuchung unerlässlich:

- Peroxidase-mangel (falls Neutrophile ins Monozytenfeld und Monozyten ins LUC-Feld hineinstreuen)
- Auffällige Veränderungen im Leukogramm (z.B: überlappende diffuse, zusätzliche oder anomal positionierte Punktwolken)
- Auffällige Veränderungen im Nukleogramm (z.B. Streuen von MN-Population in das Basophilenfeld)
- Extreme Veränderung in den Verteilungskurven (z.B. Doppelgipfeligkeit, starke Asymmetrie)<sup>15</sup>

## 2.4 Analyse am Sysmex NE-8000

Der Sysmex NE-8000 ist ein Hämatologie-Analysator, der neben den üblichen Parametern des kleinen Blutbildes eine zusätzliche Leukozytendifferenzierung auf physikalischem Wege erlaubt.<sup>35</sup>

Das Differenzierungsgerät basiert auf dem Widerstands-Meßprinzip, der hydrodynamischen Fokussierung und der Verwendung methodenspezifischer Lysemittel. In diesem Konzept wird die Kombination der direkten Strommessung (Impedanzmethode) und der Radiofrequenzmessung zunutze gemacht, um respektive Zellvolumen, Kerngröße und Kerncharakter zu bestimmen.<sup>16, 35</sup>

Zur Erstellung des großen Blutbildes sind 200  $\mu$ l Vollblut erforderlich; das angesaugte Blut wird über das Scherventil auf die fünf analytischen Kanäle des Gerätes verteilt.

Für die Leukozytendifferenzierung am Sysmex NE8000 werden 12  $\mu$ l Vollblut im Scherventil abgetrennt. Mit einer spezifischen Verdünnungslösung und einem Lyse-Mittel wird dieses im Verhältnis 1:250 gemischt. 250  $\mu$ l dieses temperierten Ansatzes gelangen danach durch die 100  $\mu$ m- Kapillare eines Meßwandlers (Widerstands- Meßprinzip). In diesem Kanal wird eine Simultanmessung mit Gleichstrom (DC) und einem überlagerten Wechselstrom (HF, MHz-Bereich) durchgeführt. Das übliche Widerstands-Meßprinzip ist durch eine überlagerte Hochfrequenz-Spannung erweitert: Beim Durchtritt der Zellen durch die Meßöffnung werden der durch die Meßöffnung fließende Gleichstrom und die überlagerte Hochfrequenz in charakteristischer Weise beeinflusst. Der im Gleichstromkreis erhaltene Impuls ist dem Volumen der Zelle proportional; das Hochfrequenzspannungssignal wird in Abhängigkeit von der Kerngröße und -struktur verändert. Der Lyseprozeß beeinflusst die Leukozyten in charakteristischer Weise; nicht nur die einzelnen Leukozyten-Klassen, sondern auch unreife Vorstufen zeigen jetzt gegenüber DC und HF ein unterschiedliches und reproduzierbares Verhalten.

Jedem Leukozyt läßt sich in dieser Weise ein DC- und ein HF-Signal zuordnen. Beide Kenngrößen sind gegeneinander darstellbar und aufzutragen: Abszisse = DC-Signal, Ordinate = HF-Signal. Aus der Gesamtzahl der gemessenen Leukozyten entsteht so das charakteristische Scattergramm, das am Bildschirm und im Ergebnisausdruck erscheint. Es zeigt die in einem Mikroliter Blut erfaßten Leukozyten.

Während im Leuko-Kanal das DC-Signal im wesentlichen von der Zellgröße und der (durch die Beweglichkeit der Ionen gegebenen) Leitfähigkeit des Zellplasmas abhängt, haben Größe und Dichte des Zellkerns sowie Zahl und Art der Zellorganellen bestimmenden Einfluß auf das HF-Signal.

Die einzelnen Zellstrukturen im Inneren des Leukozyten mit ihrer unterschiedlichen Leitfähigkeit wirken wie ein System von Kondensatoren, die innerhalb des Zellplasmas parallel und in Reihe geschaltet sind. Mit der Hochfrequenz wird daher der von vielen physiologischen Faktoren beeinflusste kapazitive Widerstand des einzelnen Leukozyten erfaßt.

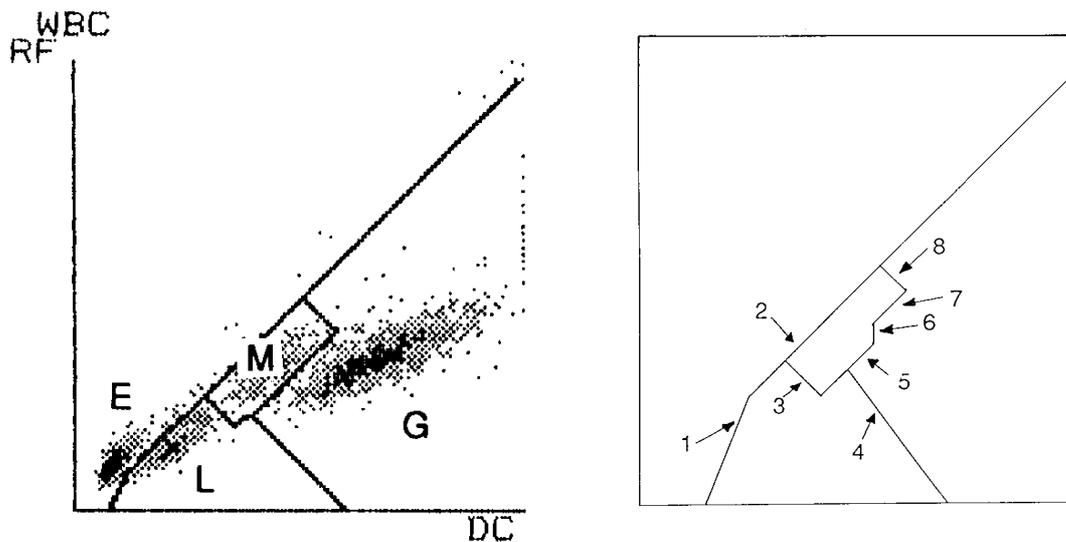
Im HF-Kanal wird neben den wesentlichen Parametern des Differentialblutbildes auch die Gesamtleukozytenzahl bestimmt. Bewegliche Schwellen unterteilen die Leuko-

## 2. Material und Methoden

zytenpopulation in Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und unreife Vorstufen aller Leukozyten. Ausserdem werden teillysierte Erythrozyten sowie kernhaltige Vorstufen und Blutplättchenaggregate abgetrennt.<sup>6, 11, 16, 35, 36</sup>

Die Leukozytenzählung wird daher wenig von typischen hämatologischen Störgrößen beeinflusst.<sup>35, 36</sup>

Das Scattergramm zeigt für Normal-Blutproben deutlich getrennte Populationen (sogenannte Dot-Plots), die den teillysierten Erythrozyten, den Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zugeordnet werden können (Abb. 8).



- E Erythrozyten-Fragmente und Plättchen
- L Lymphozyten
- M Monozyten
- G Granulozyten und unreife Vorstufen aller Leukozyten

Abbildung 8: Scattergramm des NE8000

Hier setzen automatisch arbeitende Diskriminatoren — insgesamt acht — Grenzen in jeweils typischer Position (siehe Abb. 8). In den Feldern werden die Einzelimpulse gezählt und somit die Konzentration der Lymphozyten, der Monozyten und Granulozyten ermittelt. Werden atypische Dot-Plots oder andere Anomalitäten im Scattergramm bemerkt, werden Warnhinweise oder Hinweise in Richtung einer Ergebnis-Interpretation gegeben. Die drei Populationen des Scattergramms werden auch in Histogramm-Form ausgedrückt. Hierbei enthält der rechte Peak die neutrophilen, eosinophilen und die basophilen Fraktion. Der mittlere Peak zeigt nur die Monozyten, während der linke Peak durch die Lymphozyten gebildet wird<sup>16</sup> (Abb. 9).

Durch das Histogramm besteht eine zusätzliche Beurteilung der Blutzelldifferenzierung und stellt eine sinnvolle Ergänzung zum Scattergramm dar. Der unterlegte gepunktete Bezirk gibt den Normalbereich an.

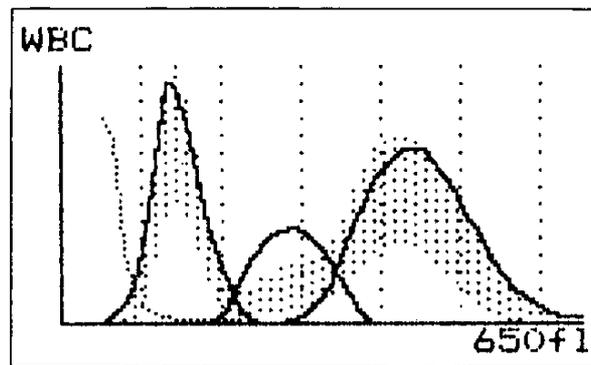


Abbildung 9: Leukozyten-Histogramm des NE8000

Für die Zählung der Eosinophilen und der Basophilen stehen zwei weitere, voneinander unabhängige Kanäle zur Verfügung, die ebenfalls nach dem Widerstands-Meßprinzip arbeiten, allerdings ohne überlagerte Hochfrequenz.

Beide Kanäle besitzen Meßwandler mit  $100 \mu\text{m}$  Öffnung. In jedem dieser Kanäle wird ein Aliquot der Blutprobe mit einem spezifischen Lysemittel inkubiert, das alle übrigen Leukozyten bis auf die Eosinophilen beziehungsweise die Basophilen lysiert und nur die zu bestimmenden Zellen intakt läßt. Die bei der Messung erhaltenen Signale lassen eine deutliche Unterscheidung zwischen Debris der lysierten Zellen und Eosinophilen beziehungsweise Basophilen zu. Automatische Schwellen legen die Grenze fest, ab der die Eosinophile und Basophile gezählt werden. Sowohl von dem Eosinophilen- als auch von dem Basophilen-Kanal erscheint ein Histogramm und wird im Ergebnisausdruck mit erstellt; anhand dieser Histogramme kann die Funktion beider Kanäle beurteilt werden.<sup>7,16,35,37</sup> Typische Histogramme stellen Abb. 10 dar.

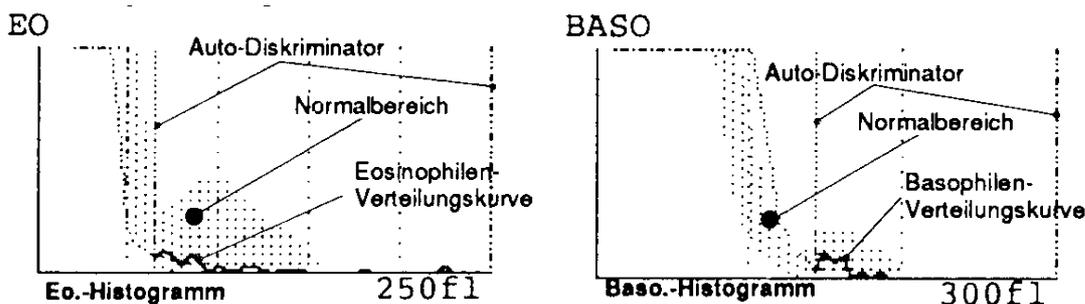


Abbildung 10: Eosinophilen- und Basophilen-Histogramme

Das übersichtlich gegliederte Ergebnisformular liefert mit den Zahlenwerten zunächst die bekannten Daten des kleinen und des großen Blutbildes. Alle Zahlenwerte werden beim Über- oder Unterschreiten von anwenderprogrammierbaren Grenzwerten mit „+“ oder „-“ gekennzeichnet. Ergebnisse, die das Programm nicht akzeptiert, werden nicht

## 2. Material und Methoden

ausgedruckt und mit einem „\*“ markiert. Neben den numerischen Daten werden fünf Histogramme und das Scattergramm dargestellt (Abb. 11); diese können bei entsprechender apparativer Ausstattung auch farbig ausgedruckt werden.<sup>16</sup>

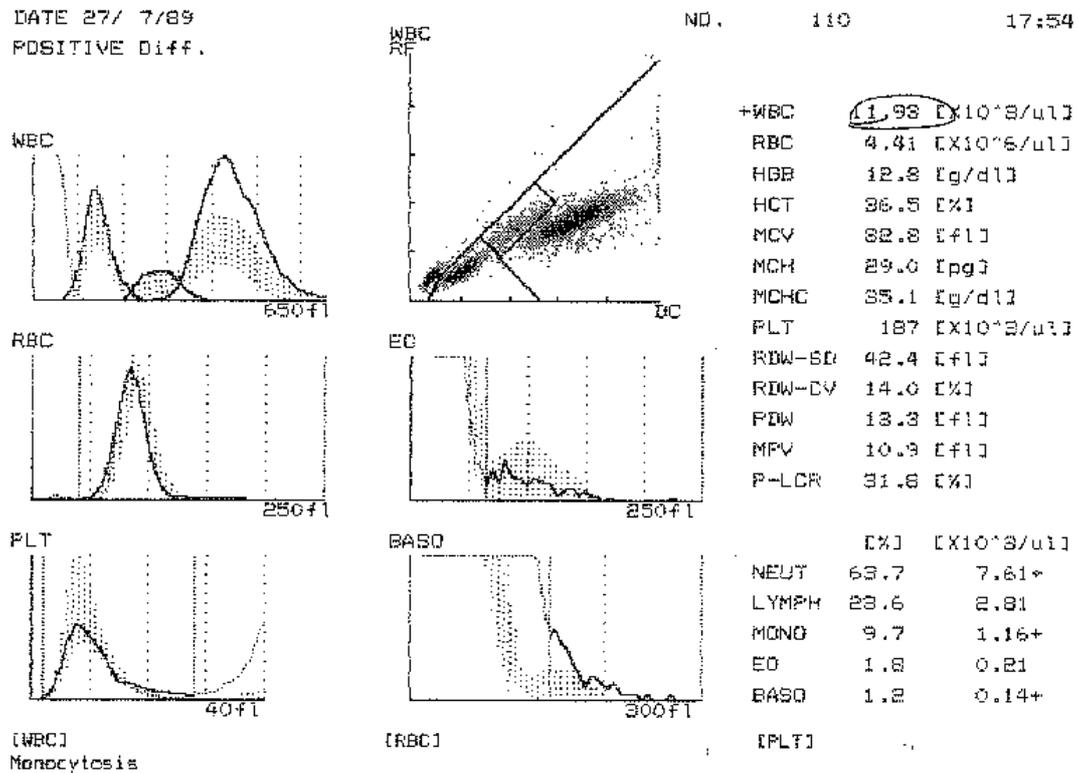


Abbildung 11: Ausgabe eines Differentialblutbildes am NE8000

Aus den Zahlenwerten, dem Scattergramm und den Histogrammen werden vom NE8000 Warn- und Interpretationshinweise abgeleitet, die am Unterrand des Bildschirms beziehungsweise des Graphikausdrucks ausgegeben werden. Dazu werden zwei Arten von Meldungen benutzt, mit denen die Ergebnisse ergänzt werden:

- numerisch differenzierte Meldungen
- morphologische Meldungen

Numerisch differenzierte Meldungen sind meist aus den Zahlenwerten abgeleitet; z.B. Lymphopenie, Neutrophilie, etc. Morphologische Markierungen sollen beim Erkennen auffälliger Proben helfen. Sie umfassen folgende Angaben :

- Blasten?
- Unreife Granulo?

## 2. Material und Methoden

---

- Linksverschiebung?
- Atypische Lymphozyten?
- Erythroblasten?

Abb. 12 zeigt eine schematische Darstellung der Lokalisation der verschiedenen Leukozytenpopulationen in der Ausgabe des NE8000.

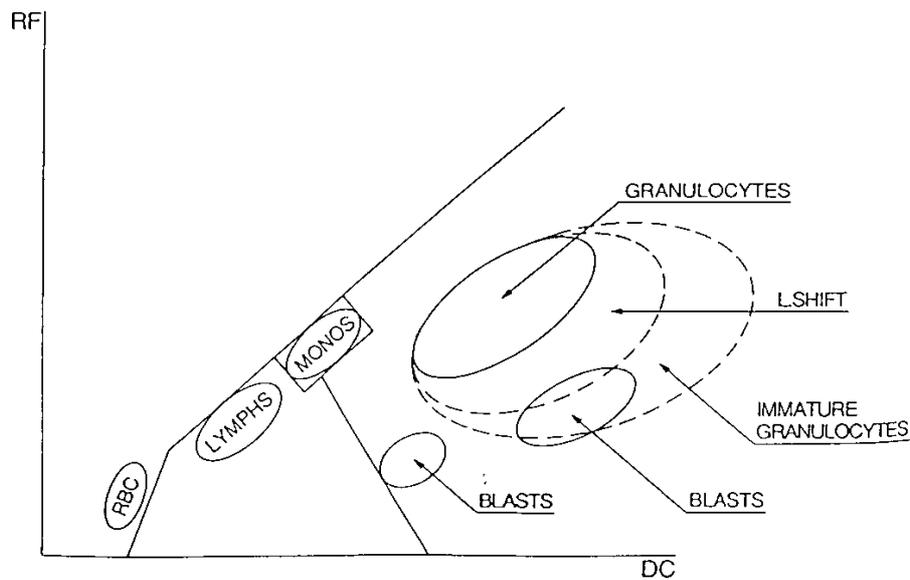


Abbildung 12: Lage einzelner Leukozytenpopulationen im Scattergramm des NE8000

Auffällige Befunde müssen stets abgeklärt werden. Markierte („geflaggte“) Proben, welche die Morphologiekriterien betreffen, erfordern eine mikroskopischer Nachdifferenzierung. Gekennzeichnete Proben, welche die Zahlenwerte betreffen, sind im Zusammenhang mit den anwenderspezifischen Referenzbereichen zu bewerten.

Die Abb. 13 zeigt ein pathologisches Differentialblutbild am NE8000.

## 2. Material und Methoden

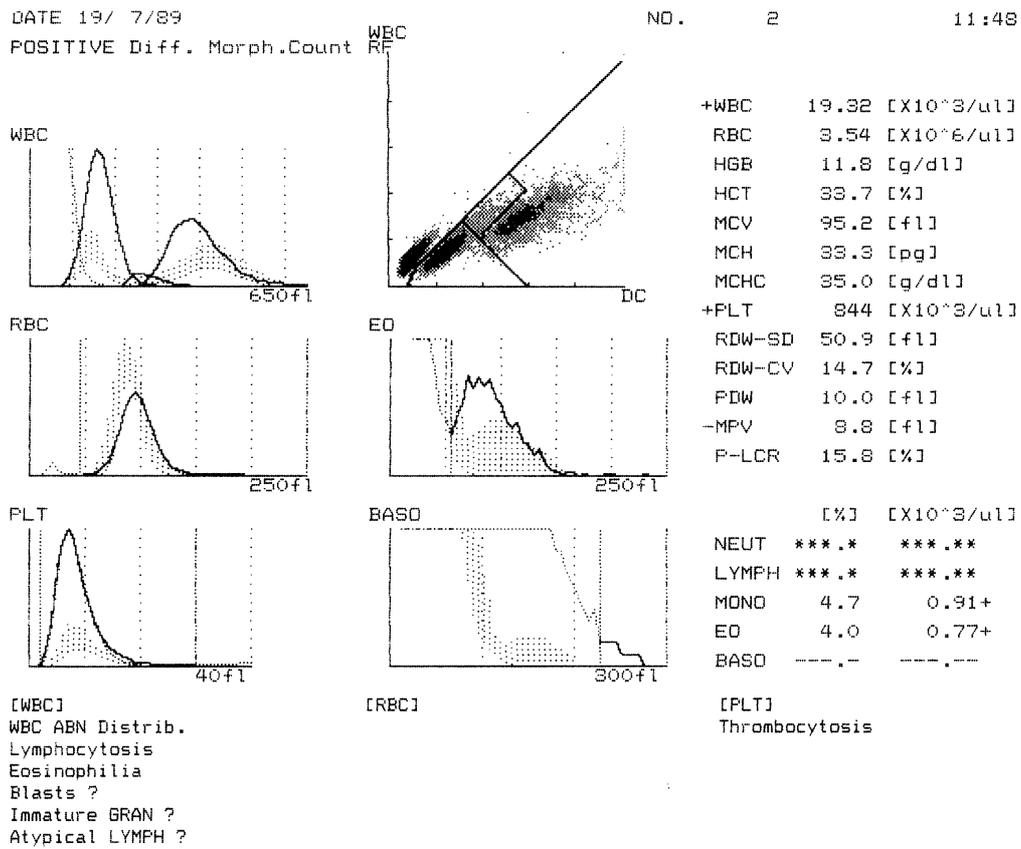


Abbildung 13: Ausgabe eines pathologischen Differentialblutbildes am NE8000

## 2.5 **Zusätzliche Anmerkungen**

Unabhängig vom verwendeten Gerät sollte eine mikroskopische Nachdifferenzierung erfolgen, wenn eine Leukozytose ( $>18.000/\mu\text{l}$ ) oder eine Leukopenie ( $< 3.000/\mu\text{l}$ ) vorliegt; außerdem bei starken quantitativen Verschiebungen der fünf Zellpopulationen.

Wie schon erwähnt, kann mit den Differenzierungsautomaten Technicon H\*1 und Sysmex NE8000 auch eine Bestimmung des roten Blutbildes erfolgen. Erythrozyten sowie das Hämoglobin werden mittels Zentralstrahlprinzips erfaßt; außerdem wird das Hämoglobin durch Photometrie bestimmt. Aus diesen Daten werden in üblicher Weise die Erythrozytenquotienten errechnet, die einen hohen Aussagewert besitzen. Aus den Größenverteilungskurven der Erythrozyten und der Plättchen werden zusätzliche Parameter abgeleitet, die Aussagen über die Kurvenform (Verteilungsbreite) zulassen. Da eine visuelle Beurteilung der Kurvenform übersichtlicher ist als ein abgeleiteter Zahlenwert (z.B. Doppelpopulationen), werden diese Kurven mit angezeigt und im Ergebnis mit ausgedruckt. Auch hier werden sowohl bei morphologischen als auch bei quantitativen Auffälligkeiten der Blutprobe unterschiedliche Markierungen gesetzt.

Auf die Erstellung des roten Blutbildes und ihrer Schwierigkeiten durch die Geräte wurde nicht näher eingegangen.

Mit dem Coulter VCS war lediglich die Erstellung des Differentialblutbildes möglich.

## 2.6 **Statistische Auswertung**

Die prozentualen Verteilungen der Zellpopulationen bei mikroskopischer und automatisierter Differenzierung am Coulter VCS, am Technicon H\*1 und am Sysmex NE8000 wurden durch lineare Regression ausgewertet. Hierzu kam das Programm „PlotIt“ zum Einsatz. Darüberhinaus wurden die 95% Vertrauensbereiche des PEARSON-Korrelationskoeffizienten und die Regressionsgerade ermittelt.

## 3 Ergebnisse

Im ersten Teil der Untersuchung wurden die an den verschiedenen Analysatoren ermittelten Anteile der neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten an der Zahl der Leukozyten mit den mikroskopisch ermittelten Anteilen verglichen. In der Darstellung der Ergebnisse aus 646 Blutproben wurden die von den Analysegeräten ermittelten Anteile auf der Abszisse gegen die durch mikroskopische Differenzierung ermittelten Werte auf der Ordinate aufgetragen und durch lineare Regressionsanalyse ausgewertet; ferner wurde der PEARSON-Korrelationskoeffizient ermittelt. Die Regressionsgerade wurde in der Form  $y = mx + b$  angegeben. Allgemein konnte für alle Zelltypen festgestellt werden, daß bei Vorliegen kleiner Zellpopulationen von den Meßgeräten eher zu hohe, bei großer Zellpopulation eher zu niedrige Werte ermittelt wurden.

Auf eine direkte Korrelation der basophilen Granulozyten sowohl zwischen den verschiedenen Blutzelldifferenzierungssystemen und der mikroskopischen Methode als auch zwischen den Analysegeräten untereinander, wurde wegen der geringen absoluten und relativen Zellzahlen verzichtet. Bei allen Blutproben lag der durchschnittliche Anteil der basophilen Granulozyten bei den Differenzierungssystemen bei 1.2%, während er mittels mikroskopischer Differenzierung mit 0.8% etwas niedriger bestimmt wurde.

Blutproben, die eine fragliche qualitative oder quantitative Abnormität aufwiesen (geflaggte Proben) sollten von den Differenzierungsanalysatoren als kontrollbedürftig gekennzeichnet werden.

### 3.1 Quantifizierung von Leukozytenpopulationen

Die vollständige numerische Auswertung der Quantifizierungsergebnisse findet sich im Tabellenanhang.

#### 3.1.1 Neutrophile Granulozyten

Die Bestimmung der neutrophilen Granulozyten ergab in den verschiedenen Altersgruppen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den mechanisierten Differenzierungssystemen untereinander sowie im Vergleich zur mikroskopischen Analyse.

Der Vergleich zwischen mikroskopischer Differenzierung und den unterschiedlichen Analysesystemen zeigte für die Gruppe „geflaggte und ungeflaggte Proben“ an allen Systemen eine befriedigende bis gute Übereinstimmung.

Hierbei konnten durch die zytochemischen Methode am Technicon H\*1 PEARSON-Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.90$  in der Gruppe „Neugeborene, 0. – 4. Woche“,  $R = 0.94$  in der Altersgruppe „Säuglinge, 5. Woche – 1 Jahr“ und  $R = 0.95$  in den beiden anderen Altersgruppen ermittelt werden (Abb. 14 links). Der Vergleich zwischen der Streulicht-konduktometrischen Bestimmung am Coulter VCS und der mikroskopischen Bestimmung ergab Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.90$  und  $R = 0.93$  (Abb. 14 mit-

te), während bei der Bestimmung durch die Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyseselektive Methode am Sysmex NE8000 im Vergleich zur mikroskopischen Differenzierung nur Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.86$  und  $R = 0.91$  gefunden werden konnten (Abb. 14 rechts).

Wurden die „ungeflaggten“ Blutproben gesondert betrachtet, so konnte vor allem zwischen dem Analysegerät Sysmex NE8000 und den mikroskopisch ermittelten Ergebnissen eine bessere Übereinstimmung erzielt werden; die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen  $R = 0.91$  und  $R = 0.94$  (Abb. 15).

Zwischen den verschiedenen durchflußzytometrischen Analysesystemen konnten sehr gute Übereinstimmungen in allen Altersstufen gefunden werden mit Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.92$  und  $R = 0.96$  bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben; besonders gute Übereinstimmungen zeigten sich, wenn nur die unmarkierten Proben miteinander verglichen wurden. Zwischen der Streulicht-konduktometrischen und der Streulicht-zytochemischen Methode wurden in jeder der Altersgruppen Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.99$  ermittelt. Beim Vergleich zwischen Coulter VCS und Sysmex NE8000 konnten in den unterschiedlichen Altersgruppen Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.96$  und  $R = 0.98$  gefunden werden; die entsprechenden Diagramme sind in Abb. 16 dargestellt.

Der Anteil gemessener neutrophiler Granulozyten lag bei den mechanisierten Analysesystemen im Vergleich zur mikroskopischen Messung in den Bereichen mit geringerem Neutrophilenanteil insgesamt etwas höher, in den Bereichen mit hohem Neutrophilenanteil niedriger. Dies zeigte sich in den durchweg positiven y-Achsenabschnitten im Vergleich zwischen mikroskopischer und mechanisierter Differenzierung; die y-Achsenabschnitte lagen zwischen  $b = 1.42$  und  $b = 8.13$ , die Steigungen fanden sich zwischen  $m = 0.85$  und  $m = 0.94$ . Zwischen den verschiedenen Altersstufen konnten dabei keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Eine Abweichung hiervon zeigte sich in der Gruppe „Kinder ab 5 Jahren“ im Vergleich zwischen der mikroskopischen Differenzierung und der Analyse am Sysmex NE8000 mit einem y-Achsenabschnitt von  $b = 13.56$  und einer Steigung von  $m = 0.75$  bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben. Die ausschließliche Betrachtung unmarkierter Proben brachte keine wesentliche Verbesserung, es konnte ein y-Achsenabschnitt von  $b = 11.42$  und eine Steigung von  $m = 0.80$  festgestellt werden.

Vergleicht man die Analysegeräte untereinander, so lag am Coulter VCS mit der Streulicht-konduktometrischen Meßmethode die Bestimmung der Neutrophilenzahl in der niedrigsten Altersstufe „Säuglinge, 0. – 4. Woche“ leicht über den mit der Streulicht-zytometrischen Meßmethode ermittelten Werten am Technicon H\*1 mit  $b = -1.21$ ,  $m = 1.01$  bei den „geflaggten und ungeflaggten Proben“. Dies trifft ebenso für den Vergleich des Technicon H\*1 mit der Gleichspannungs-Radiohochfrequenz-lyseselektive Methode am Sysmex NE8000 zu ( $b = -0.30$ ,  $m = 1.05$ ). In den anderen Altersstufen lagen die Zählergebnisse für Neutrophile am Coulter VCS leicht unter den Messungen am Sysmex NE8000 und dem Technicon H\*1 (Abb. 16).

Wie zu erwarten, fanden sich in den verschiedenen Altersstufen unterschiedliche Neu-

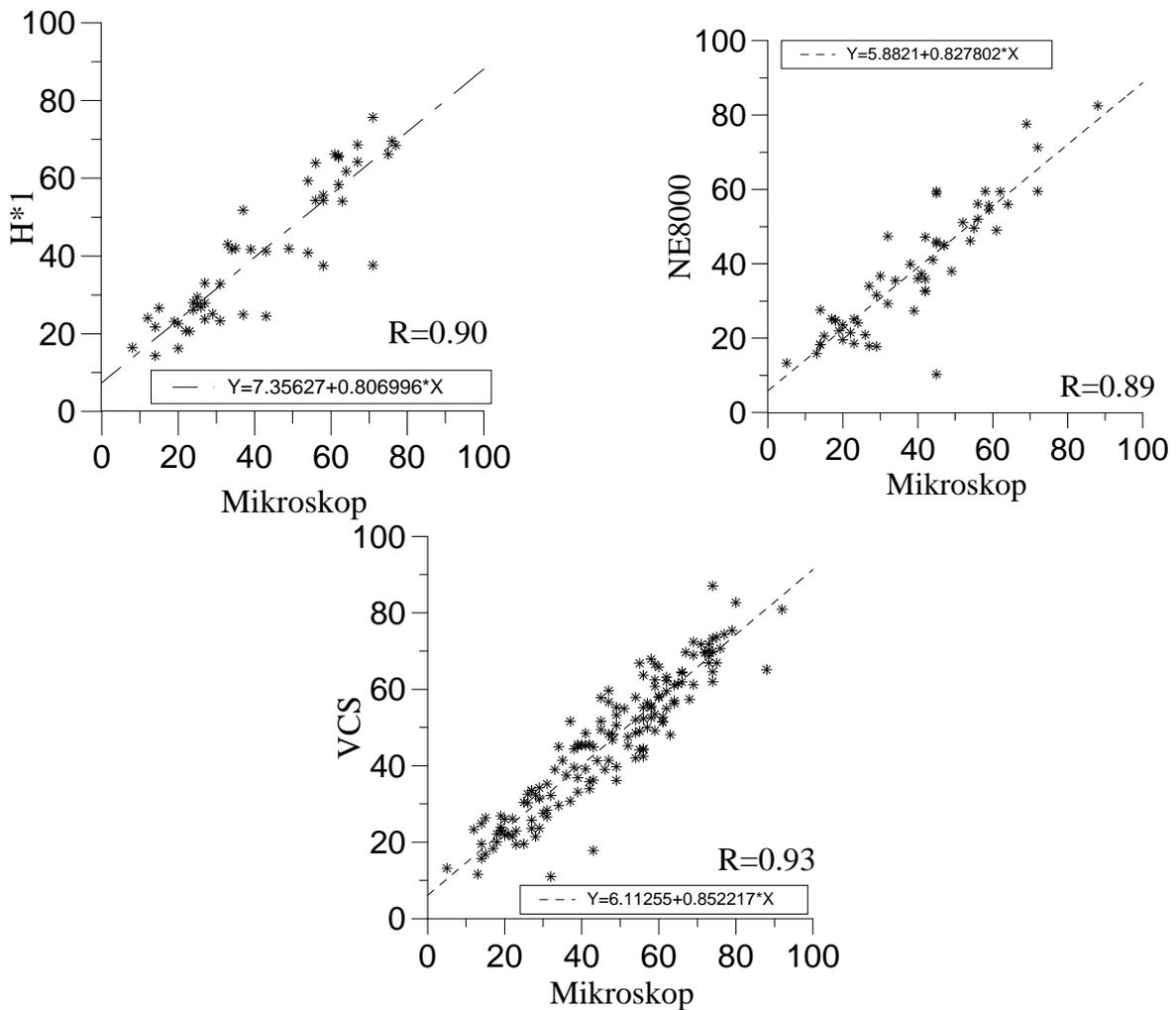


Abbildung 14: Neutrophile Granulozyten

Neugeborene, 0. – 4. Woche, „geflaggte und ungeflaggte“ Proben. Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Granulozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen bzw. „Mikroskop“ gekennzeichnet.

trophilenpopulationen. In der jüngsten Altersgruppe „Neugeborene (0. – 4. Woche)“ wurden bei der mikroskopischen Bestimmung im Mittel 42% neutrophile Granulozyten gezählt. In der Altersgruppe „Säuglinge (5. Woche – 1. Jahr)“ lag der Mittelwert der neutrophilen Granulozyten bei 34%. Bei den „Kindern (1. – 5. Lebensjahr)“ konnte ein Mittelwert von 52% festgestellt werden, während sich in der Altersstufe „Kinder ab 5 Jahren“ ein Mittelwert von 53% fand.

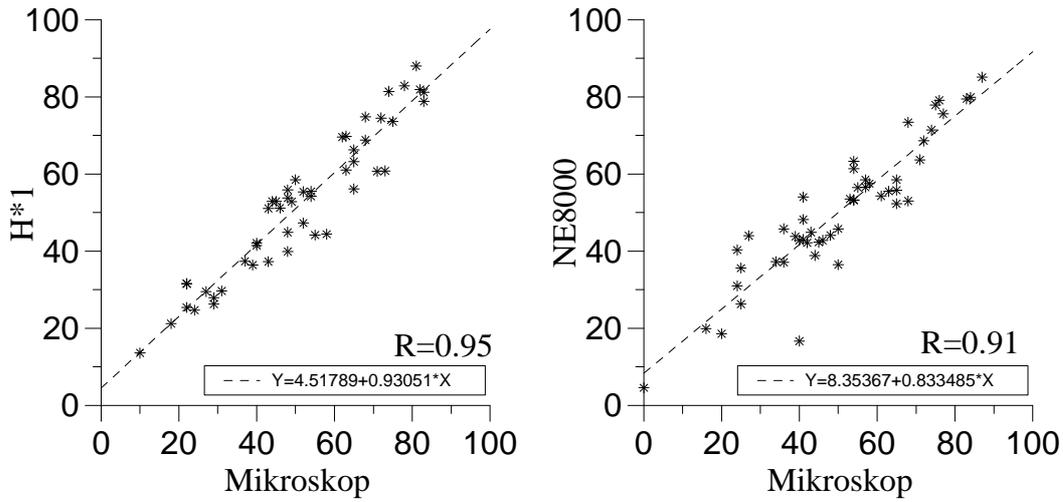


Abbildung 15: Neutrophile Granulozyten; Kinder, 1. – 5. Jahr, „geflaggte und ungeflaggte“ Proben

Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Granulozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen bzw. „Mikroskop“ gekennzeichnet.

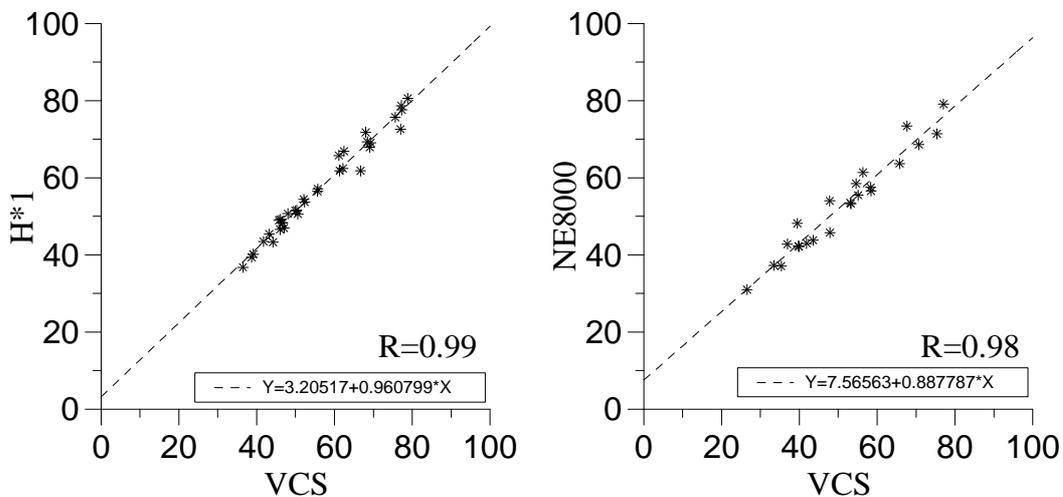


Abbildung 16: Neutrophile Granulozyten; Kinder ab 5 Jahren, „ungeflaggte“ Proben

Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Granulozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen gekennzeichnet.

Wurden die arithmetischen Mittel aus den Meßwerten der Analysegeräte berechnet, so wichen sie in den verschiedenen Altersstufen und für die untersuchten Geräte nur unwesentlich von den mikroskopisch differenzierten mittleren Neutrophilenzahlen ab.

#### 3.1.2 Lymphozyten

Bei der Bestimmung der Lymphozytenpopulation bestanden in den verschiedenen Altersgruppen zwischen apparativer und visueller Differenzierung insgesamt gute Korrelationen.

Im Gegensatz zur Neutrophilendifferenzierung, bei der sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den Analysesystemen innerhalb der verschiedenen Altersstufen nachweisen ließ, ergaben sich bei der Lymphozytenbestimmung gerätespezifische Abweichungen.

Bei der Streulicht-zytochemischen Methode am Technicon H\*1 konnte im Vergleich zur mikroskopischen Analyse in der Alterstufe „Neugeborene, 0. – 4. Woche“ bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben nur ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0.80$  festgestellt werden (Abb. 17 links). Dieser verbesserte sich auch bei Vergleich der „ungeflaggten“ Blutproben nicht und lag hier nur bei  $R = 0.77$ . In den anderen Altersstufen fanden sich bei Vergleich Technicon H\*1/Mikroskop durchweg zufriedenstellende Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.86$  und  $R = 0.93$  für die „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben. Bei Betrachtung lediglich der „ungeflaggten“ Blutproben verbesserten sich die Korrelationskoeffizienten und lagen zwischen  $R = 0.91$  und  $R = 0.94$  (Abb. 18 links).

Die beste Übereinstimmung zwischen mechanisierter und mikroskopischer Bestimmung der Lymphozytenpopulation konnte für die Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyse-selektiven Methode am Sysmex NE8000 gefunden werden. Hier lagen die Korrelationskoeffizienten in den unterschiedlichen Altersgruppen zwischen  $R = 0.91$  und  $R = 0.93$  bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben (Abb. 17 rechts); wurden nur die „ungeflaggten“ Proben isoliert betrachtet, verbesserten sich die Korrelationskoeffizienten geringfügig und lagen zwischen  $R = 0.92$  und  $R = 0.96$  (Abb. 18 rechts). Erwähnenswert ist allerdings, daß trotz dieser guten Übereinstimmung die Lymphozytenbestimmung durch den Sysmex NE8000 in der jüngsten Altersstufe „Neugeborene (0. – 4. Woche)“ schwierig war, da bei 60% der gemessenen Blutproben kein Wert für die Lymphozyten ausgegeben wurde: von 91 gemessenen Blutproben in der Altersgruppe „Neugeborene“ wurde nur bei 38 Blutproben ein Ergebnis für Lymphozyten angegeben. Dies tritt auf, wenn das Analysegerät keine zuverlässige Diskrimination einzelner Leukozytenpopulationen erreicht. In den anderen Altersstufen kam dieses Phänomen nur sehr vereinzelt vor.

Vergleicht man die Streulicht-konduktometrische Analyse am Coulter VCS mit der mikroskopischen Untersuchung, so konnten befriedigende Übereinstimmungen nachgewiesen werden, die bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben mit Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.86$  und  $R = 0.93$  lagen (Abb. 17 mitte). Bei den „ungeflaggten“ Blutproben konnte der Korrelationskoeffizient zwischen  $R = 0.90$  und  $R = 0.95$

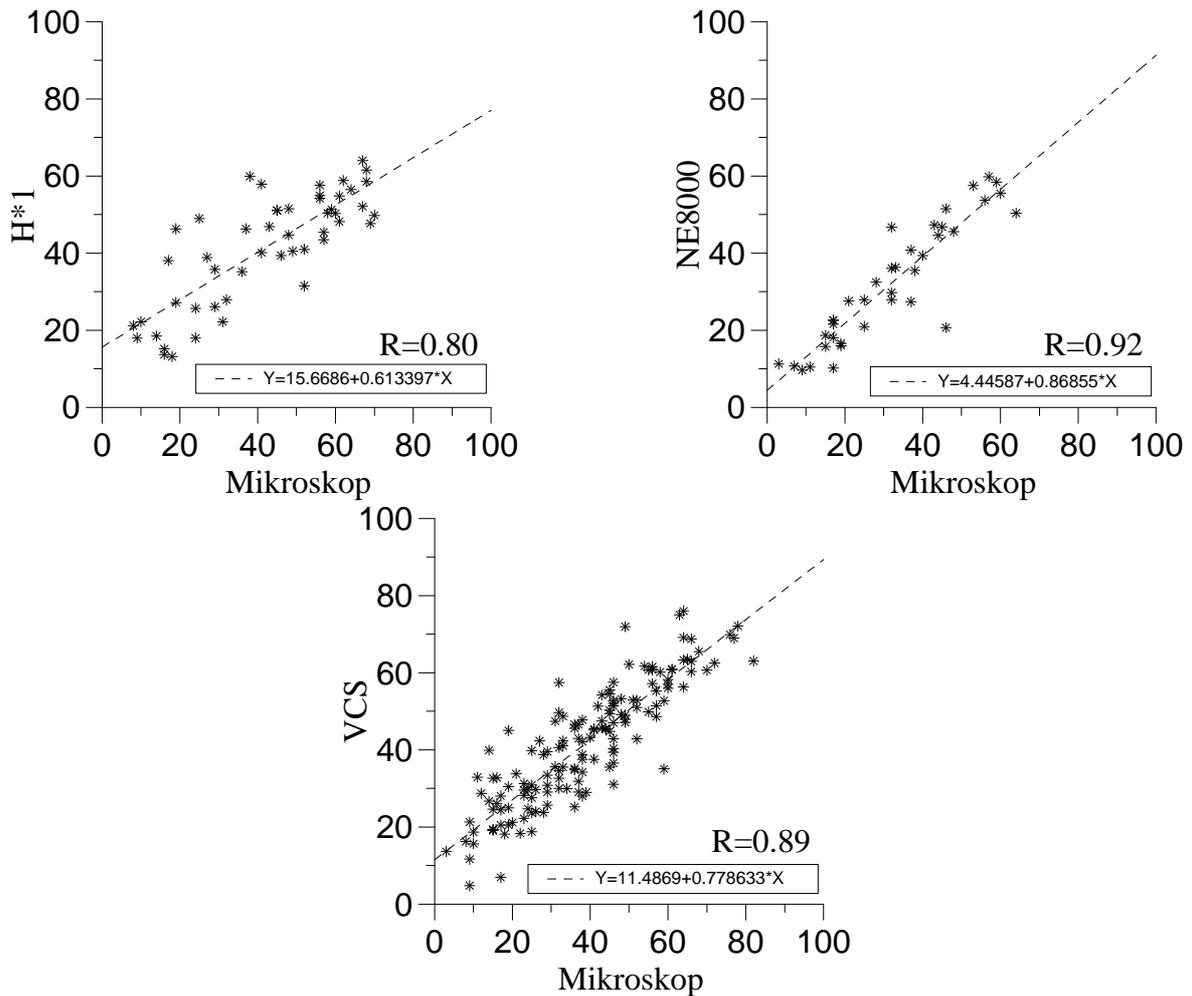


Abbildung 17: Lymphozyten

Neugeborene, 0. – 4. Woche, „geflaggte und ungeflaggte“ Proben. Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Lymphozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen bzw. „Mikroskop“ gekennzeichnet.

gefunden werden, wobei sich in den verschiedenen Altersstufen keine wesentliche Unterschiede ergaben (Abb. 18 mitte).

Auch bei der Quantifizierung der Lymphozyten konnte festgestellt werden, daß mit allen drei mechanisierten Meßmethoden im Vergleich zur mikroskopischen Untersuchung bei niedrigen Zellzahlen eine höhere Lymphozytenzahl bestimmt wurde, während bei höheren Zellzahlen im Vergleich zum Mikroskop eher zu niedrige Werte ermittelt wurden. Wie bei der Neutrophilenbestimmung konnten auch bei der Lymphozytenzählung im

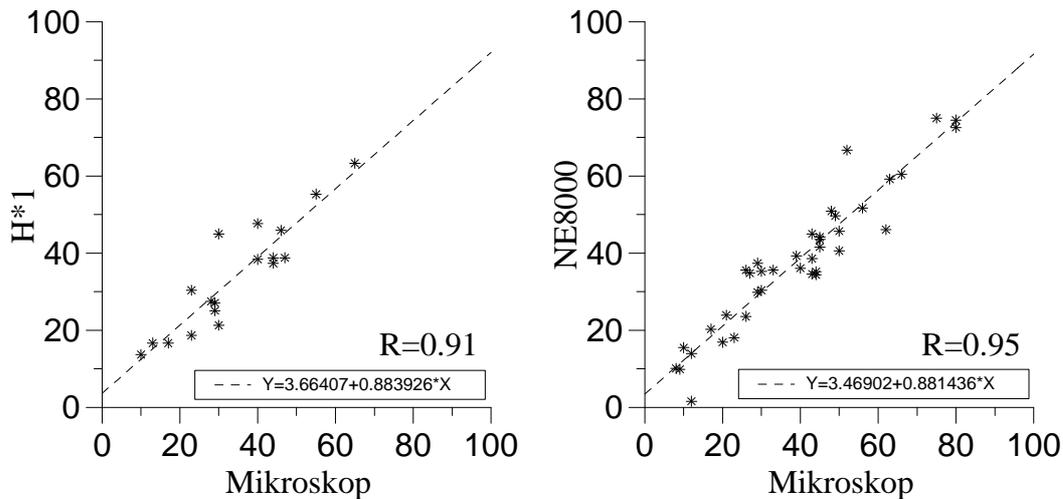


Abbildung 18: Lymphozyten

Kinder, 1. – 5. Jahr, „ungeflaggte“ Proben. Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Lymphozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen bzw. „Mikroskop“ gekennzeichnet.

Vergleich zwischen der mikroskopischen Differenzierung und den drei mechanisierten Analyseverfahren in allen Altersstufen nur positive y-Achsenabschnitte gefunden werden. Diese lagen im Mittel zwischen  $b = 4.45$  und  $b = 8.09$ . Allerdings fanden sich auch hier zwei Abweichungen in der Altersstufe „Neugeborene (0. – 4. Woche)“ sowohl für den Technicon H\*1 mit einem y-Achsenabschnitt von  $b = 15.67$  und einer Steigung von  $m = 0.61$  als auch für den Coulter VCS mit einem y-Achsenabschnitt von  $b = 11.49$  und einer Steigung von  $m = 0.78$  bei Betrachtung der „geflaggte und ungeflaggte“ Proben. Dies änderte sich bei alleiniger Betrachtung nur der „ungeflaggte“ Proben nicht wesentlich.

Wurden die Analysesysteme untereinander verglichen, fanden sich ausgesprochen gute Korrelationen, die bei isolierter Betrachtung der von jeweils beiden Geräten nicht markierten Blutproben noch besser waren. Beim Vergleich „geflaggte und ungeflaggte Proben“ zwischen Coulter VCS und der Bestimmung am Sysmex NE8000 ergaben sich Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.90$  (Neugeborene) und  $R = 0.98$  (Kinder ab 5 Jahren). Wurden zum Vergleich dieser beiden Meßmethoden lediglich die ungeflaggte Blutproben herangezogen, so konnten hervorragende Übereinstimmungen mit Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.96$  (Kinder, 1. – 5. Jahr) beziehungsweise  $R = 0.98$  (Kinder ab 5 Jahren) festgestellt werden (Abb. 19 rechts). Im Vergleich Technicon H\*1/Coulter VCS waren die Ergebnisse ähnlich gut (Abb. 19 links); eine Abweichung hiervon fand sich allerdings in der Altersgruppe „Säuglinge“ „geflaggte und ungeflaggte“ Blutproben mit  $R = 0.84$ .

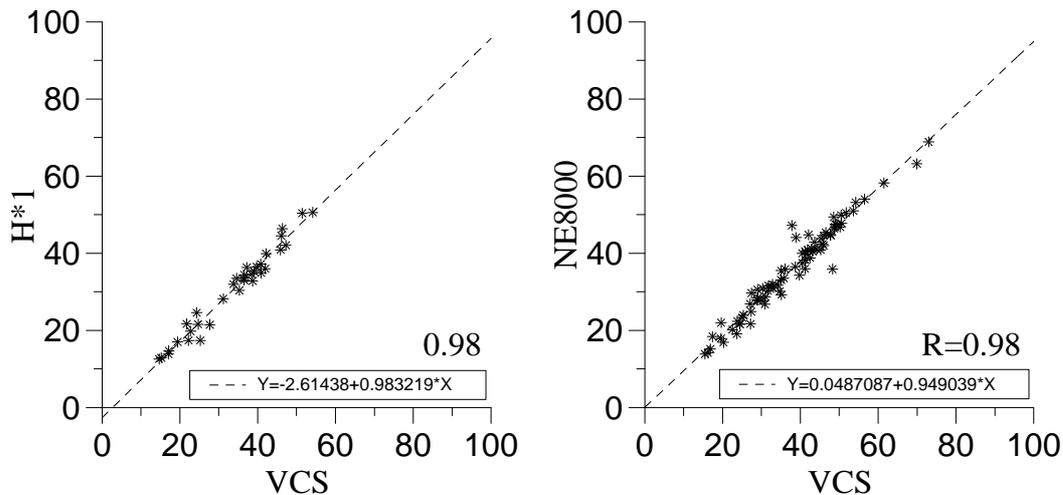


Abbildung 19: Lymphozyten

Kinder ab 5 Jahren, „ungeflaggte“ Proben. Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Lymphozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen bzw. „Mikroskop“ gekennzeichnet.

Vergleicht man die Lymphozytenbestimmung an den Analysegeräte miteinander, so konnte festgestellt werden, daß mit der Streulicht-konduktometrischen Methode am Coulter VCS generell etwas höhere Werte ermittelt wurden als mit den beiden anderen Methoden am Technicon H\*1 und Sysmex NE8000. Dies ist in allen Altersgruppen bei den nicht markierten Blutproben am deutlichsten zu erkennen. Hier lag der y-Achsenabschnitt zwischen  $b = 0.05$  und  $b = -7.34$ . Eine Ausnahme findet sich jedoch in der Altersgruppe „Säuglinge und Kinder, 5. Woche – 1 Jahr“; hier lag die Lymphozytenpopulation bei der Bestimmung am Coulter VCS mit 15% in den unteren Bereichen niedriger ( $b = 15.09$ ); in den oberen Bereichen jedoch etwas höher ( $m = 0.70$ ).

Generell konnte auch hier festgestellt werden, daß die in den verschiedenen Altersgruppen unterschiedlichen Lymphozytenkonzentrationen durch die mikroskopischen Methode im Mittel übereinstimmend gut von den verschiedenen Differenzierungsgeräten erkannt wurden. So lagen die Werte bei der mikroskopischen Bestimmung in der Gruppe „Neugeborene“ bei 37%; in der Gruppe „Säuglinge“ bei 54%. Bei den „Kindern, (1. – 5. Lebensjahr)“, konnte ein Lymphozytenanteil von 38% ermittelt werden; in der Altersgruppe „Kinder ab 5 Jahren“ wurden 34% Lymphozyten gefunden.

### 3.1.3 Monozyten

Für die Vergleiche mikroskopisch erhaltener Ergebnisse mit den an den Analysegeräten gewonnenen Monozytenanteilen fanden sich unterschiedliche Korrelationskoeffizienten.

Der deutlichste Unterschied fand sich im Vergleich zwischen der mikroskopischen Be-

### 3. Ergebnisse

stimmung und der Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyseselektiven Methode am Sysmex NE8000. Hier konnte in der Gruppe „Neugeborene“, „geflaggte und ungeflaggte“ Blutproben, keine Übereinstimmung bei  $R = 0.29$  gefunden werden (Abb. 20 rechts); wurden die „ungeflaggten“ Blutproben in dieser Altersgruppe isoliert betrachtet, konnte überraschenderweise sogar nur ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0.08$  ermittelt werden.

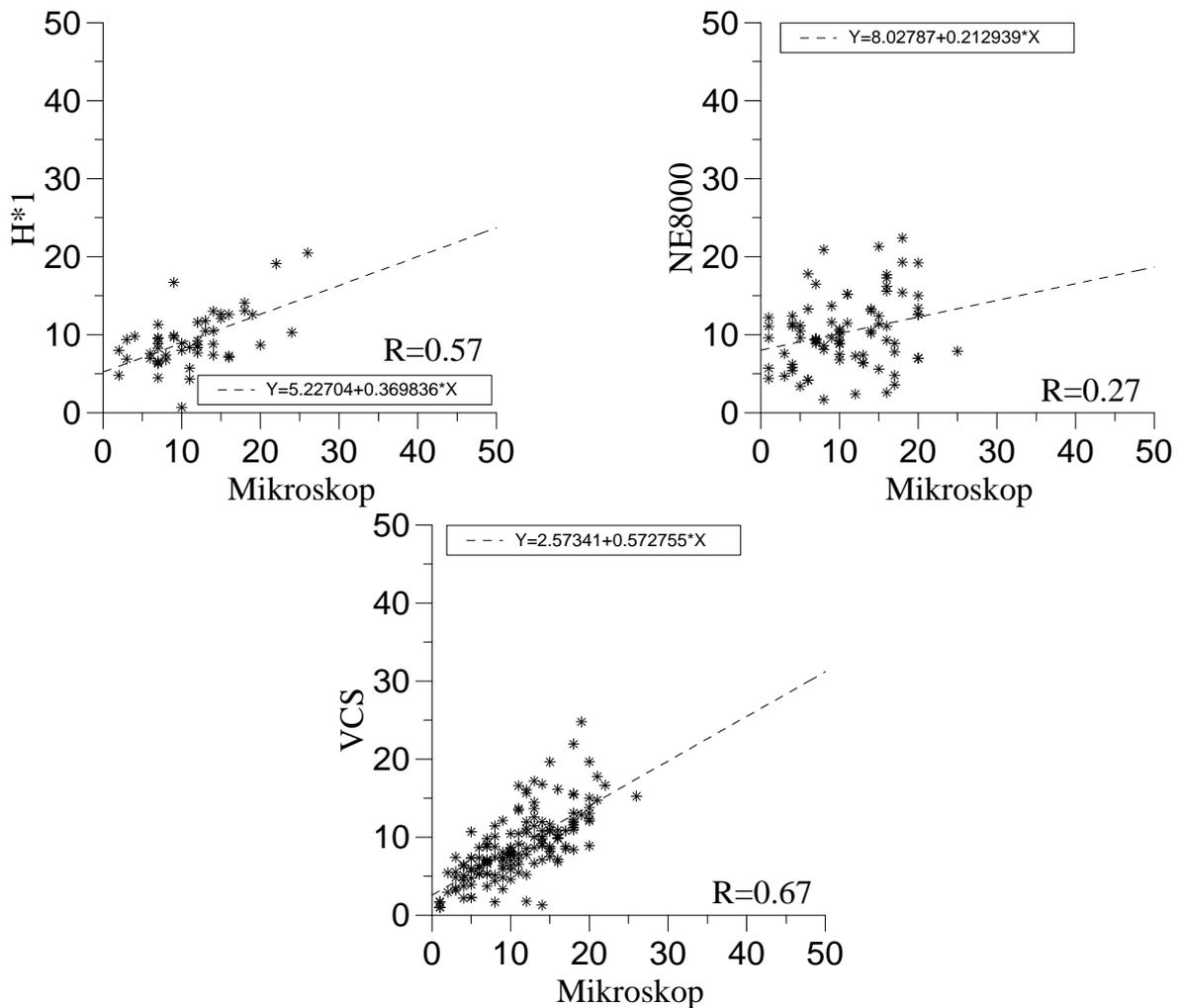


Abbildung 20: Monozyten

Neugeborene, 0. – 4. Woche, „geflaggte und ungeflaggte“ Proben. Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Monozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen bzw. „Mikroskop“ gekennzeichnet.

In den übrigen Altersgruppen fand sich für den Sysmex NE8000 im Vergleich mit

der mikroskopischen Differenzierung eine mäßige Übereinstimmung mit Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.61$  und  $R = 0.66$ , wobei sich zwischen den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben und nur „ungeflaggten“ Blutproben kein wesentlicher Unterschied ergab (Abb. 21 rechts).

Von allen Analysegeräten konnte bei der Monozytenbestimmung die beste Korrelation zur mikroskopischen Zählung für die Streulicht-konduktometrischen Methode am Coulter VCS festgestellt werden. Hier konnten bei den „ungeflaggten“ Blutproben fast durchweg Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.82$  und  $R = 0.88$  nachgewiesen werden, so daß hier eine befriedigende Übereinstimmung zu verzeichnen war (Abb. 21 mitte). Eine Ausnahme hiervon fand sich in der Gruppe „Kinder, 1. – 5. Jahr, ungeflaggte Proben“; hier konnte für den Vergleich Coulter VCS/Mikroskop nur ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0.71$  gefunden werden. Bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben lagen die Korrelationen zwischen  $R = 0.64$  und  $R = 0.87$  und waren somit bestenfalls befriedigend (Abb. 20 mitte).

Zwischen der Bestimmung am Technicon H\*1 und der mikroskopischen Differenzierung fand sich eine mäßige bis befriedigende Korrelation mit Koeffizienten zwischen  $R = 0.52$  und  $R = 0.86$ , wobei sich in den Altersgruppen „Neugeborene“ und „Säuglinge“ schlechtere Übereinstimmungen fanden (Abb. 20 links); geringfügig verbesserte sich der Korrelationskoeffizient, wenn nur die „ungeflaggten“ Blutproben miteinander verglichen wurden (Abb. 21 links).

Wurden die Ergebnisse der Geräte untereinander in Beziehung gesetzt, so konnten teilweise sehr gute Übereinstimmungen erzielt werden. Zwischen den Differenzierungsgeräten Coulter VCS und Technicon H\*1 lagen die Korrelationskoeffizienten bei den „ungeflaggten“ Blutproben zwischen  $R = 0.84$  und  $R = 0.98$  (Abb. 22 links). Durch Einbeziehen „geflaggten“ Blutproben wurde die Übereinstimmung schlechter, mit Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.61$  und  $R = 0.89$ . Beim Vergleich des Coulter VCS mit dem Sysmex NE8000 zeigte sich für die beiden Altersgruppen „Kinder, 1. – 5. Jahr“ sowie „Kinder ab 5 Jahren“ sowohl für die „geflaggten und ungeflaggten“ als auch für die „ungeflaggten“ Blutproben eine befriedigende Übereinstimmung mit Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.70$  und  $R = 0.84$  (Abb. 22 rechts). In der Altersgruppe „Säuglinge“ konnte nur eine mäßige Übereinstimmung zwischen diesen beiden Analysegeräten festgestellt werden ( $R = 0.61$  und  $R = 0.68$ ), während sich bei den „Neugeborenen“ nur unbefriedigende Korrelationskoeffizienten mit  $R = 0.41$  beziehungsweise  $R = 0.39$  nachweisen ließen.

Vergleicht man den Coulter VCS mit dem Technicon H\*1, so lagen die am VCS-System ermittelten Monozytenwerte leicht unter denen mittels Streulicht-zytochemischem Verfahren am Technicon H\*1 mit einem y-Achsenabschnitt zwischen  $b = 0.73$  und  $b = 4.30$ . Allerdings fanden sich hierbei lediglich Steigungen mit  $m = 0.59$ , so daß in den oberen Bereichen die Monozytenzahl durch den Coulter VCS höher als durch den Technicon H\*1 festgestellt wurden. Eine Ausnahme fand sich in der Altersgruppe „Kinder, 1.– 5. Jahr“, nur „ungeflaggte“ Blutproben. Hier lag die Monozytenbestimmung am Coulter VCS mit einem y-Achsenabschnitt von  $b = -0.09$  und einer Steigung von

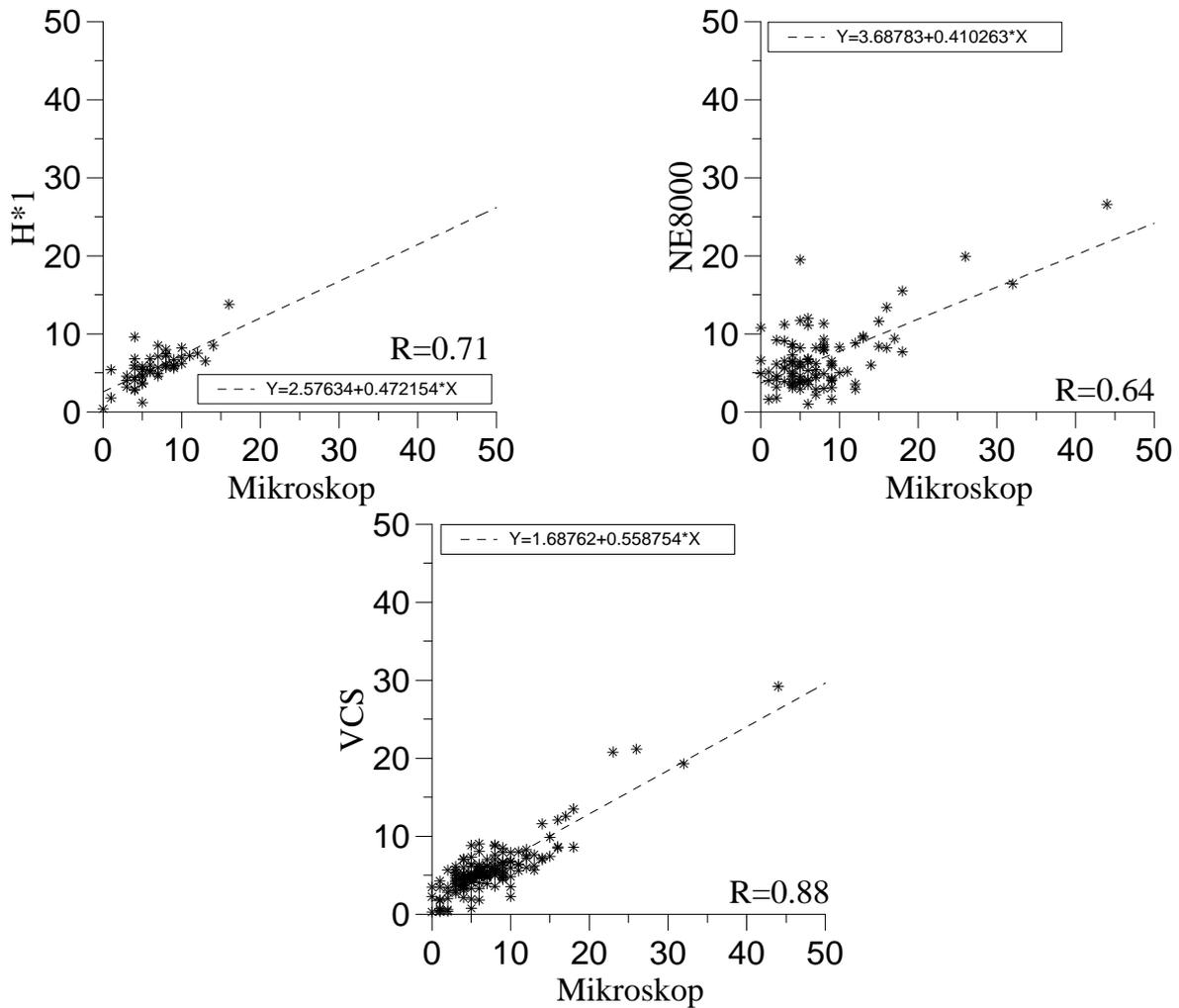


Abbildung 21: Monozyten

Kinder ab 5 Jahren, „ungeflaggte“ Proben. Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Monozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen bzw. „Mikroskop“ gekennzeichnet.

$m = 1.06$  in guter Übereinstimmung zum H\*1.

Wie bereits bei den Neutrophilen- und Lymphozytenbestimmungen konnte auch hier ein leicht erhöhtes Ergebnis der mechanisierten gegenüber der mikroskopischen Monozytenbestimmung in den unteren Bereichen sowie leicht erniedrigte Befunde in den oberen Bereichen durch die drei Analysegeräte im Vergleich mit der mikroskopischen Methode festgestellt werden. Generell fanden sich auch hier im Vergleich zwischen mikroskopischer Monozytenbestimmung und den verschiedenen Analysesystemen nur positive y-

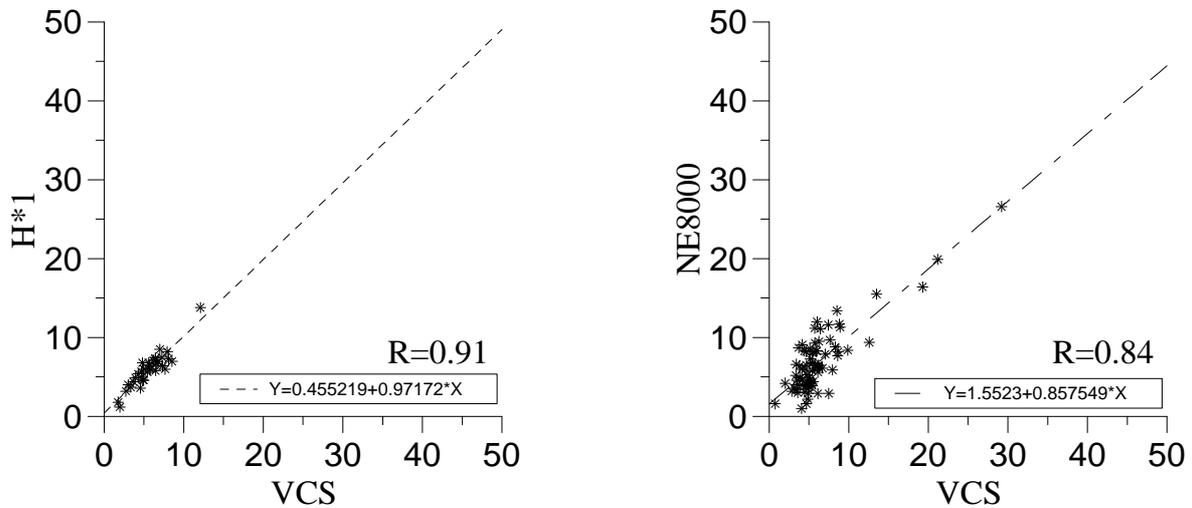


Abbildung 22: Monozyten; Kinder ab 5 Jahren, „ungeflaggte“ Proben

Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Monozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen gekennzeichnet.

Achsenabschnitte und Steigungen  $m < 1$ .

Erwartungsgemäß zeigten sich bei der Monozytenbestimmung in der jüngsten Altersgruppe im Vergleich zu den anderen Altersstufen höhere Monozytenzahlen mit durchschnittlich 10%. In den anderen Altersgruppen lag die Anzahl der Monozyten zwischen 6% und 7%. Tendenziell wurde dies von allen drei Analysegeräten erkannt, wobei festzustellen ist, daß die vom Technicon H\*1 und Coulter VCS ermittelten Werte leicht unter, die durch den Sysmex NE8000 gefundenen Monozytenzahlen leicht über den mikroskopisch differenzierten Werten lagen.

### 3.1.4 Eosinophile Granulozyten

Bei der Bestimmung der eosinophilen Granulozyten konnten durchweg bei allen drei Analysegeräten befriedigende bis gute Korrelationen zur mikroskopischen Differenzierung gefunden werden. Zwischen den verschiedenen Altersstufen gab es keine wesentlichen Unterschiede.

Die Korrelationskoeffizienten lagen für den Technicon H\*1 im Vergleich mit der mikroskopischen Bestimmung zwischen  $R = 0.82$  und  $R = 0.85$  bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben (Abb. 23 links). Im gleichen Bereich lagen die Korrelationskoeffizienten bei isoliertem Vergleich lediglich der „ungeflaggten“ Blutproben bei  $R = 0.84$  und  $R = 0.85$ . Bei der Bestimmung am Sysmex NE8000 ergaben sich bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben Korrelationskoeffizienten zur Mikroskopie zwischen

### 3. Ergebnisse

---

$R = 0.71$  und  $R = 0.95$  (Abb. 23 rechts). Für die „ungeflaggten“ Blutproben lagen die Korrelationskoeffizienten sogar etwas schlechter, nämlich zwischen  $R = 0.71$  und  $R = 0.85$ . Wurde der Coulter VCS mit der mikroskopischen Differenzierung verglichen, konnten Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.72$  und  $R = 0.87$  für die „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben ermittelt werden (Abb. 23 mitte). Bei den „ungeflaggten“ Blutproben fanden sich Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.79$  und  $R = 0.92$ .

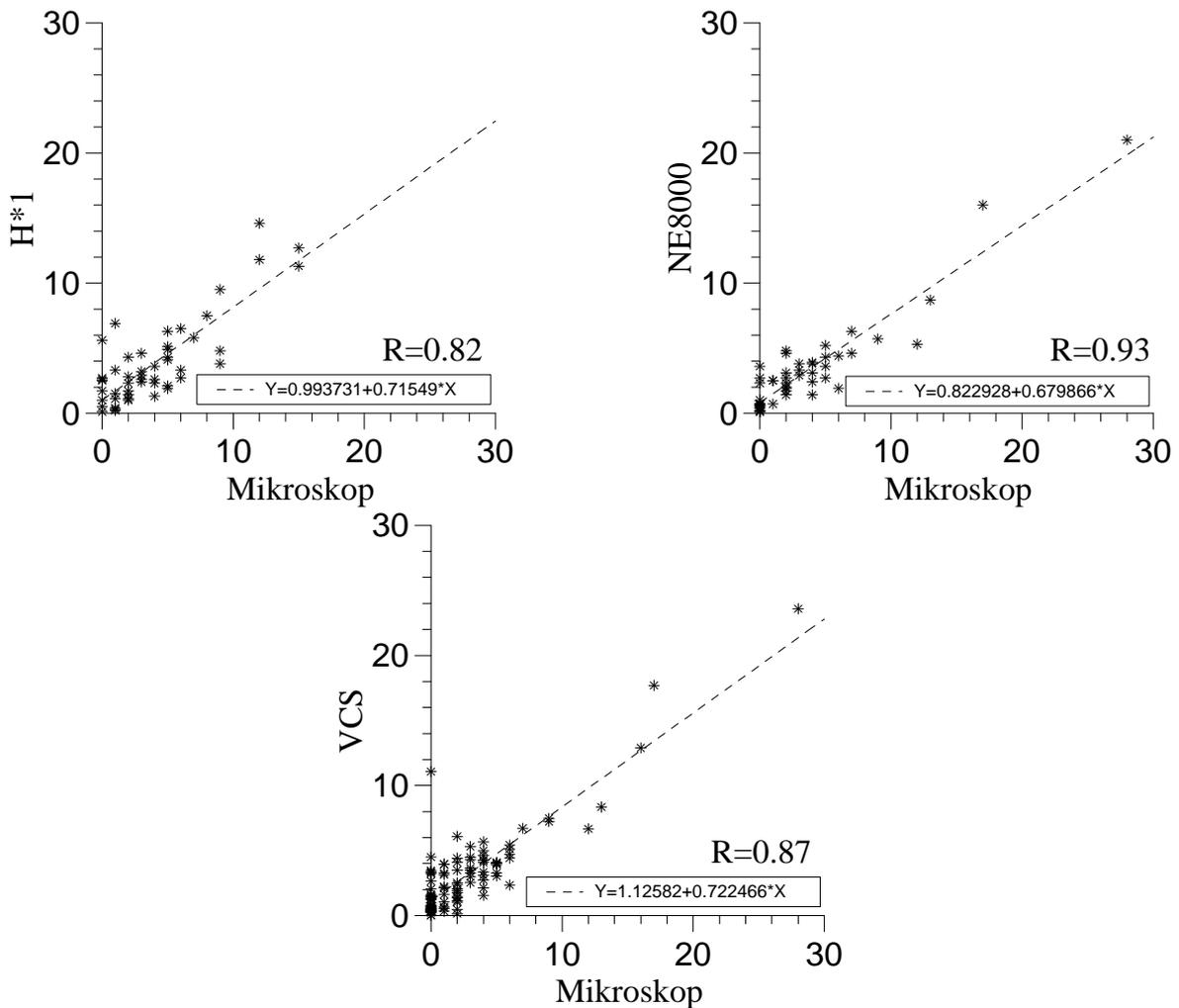


Abbildung 23: Eosinophile

Säuglinge, 5. Woche – 1 Jahr, „geflaggte und ungeflaggte“ Proben. Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Granulozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen bzw. „Mikroskop“ gekennzeichnet.

### 3. Ergebnisse

---

Unter den Differenzierungsgeräten konnten bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben gute Übereinstimmungen erzielt werden. So konnten zwischen Coulter VCS und Technicon H\*1 bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.79$  und  $R = 0.98$  nachgewiesen werden. Wurde die Streulichtkonduktometrische Verfahren am Coulter VCS mit der Gleichspannungs-Radiofrequenzlyse selektive Methode am Sysmex NE8000 verglichen, so lagen die Korrelationskoeffizienten bei den „geflaggten und ungeflaggten“ Blutproben zwischen  $R = 0.82$  und  $R = 0.98$ . Wurden bei den Analysegeräten nur die Blutproben miteinander verglichen, die von beiden Analysesystemen nicht signalisiert wurden, konnten für die Bestimmung der Eosinophilenzahl hervorragende Übereinstimmungen festgestellt werden mit Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.98$  und  $R = 0.99$  (Abb. 24).

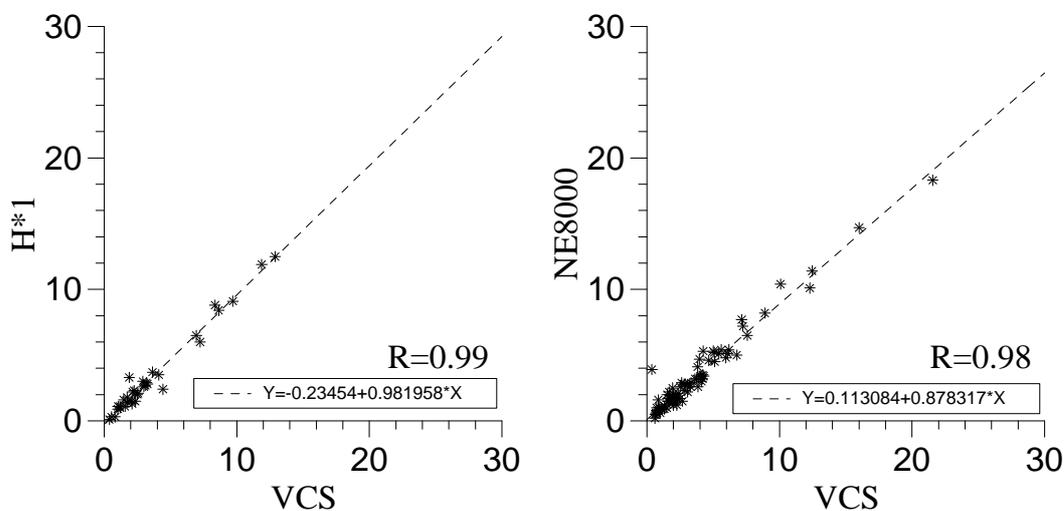


Abbildung 24: Eosinophile; Kinder ab 5 Jahren, „ungeflaggte“ Proben

Auf Abszisse und Ordinate sind die relativen Anteile der Granulozyten in % aufgetragen. Die Analyseverfahren sind durch die Gerätebezeichnungen gekennzeichnet.

Beim Vergleich der Analysegeräte untereinander lagen die gemessenen Eosinophilenzahlen am Technicon H\*1 und am Sysmex NE8000 fast durchweg geringfügig unter den am Coulter VCS ermittelten Werten.

Wiederum kann auch bei der Eosinophilenbestimmung festgestellt werden, daß in den Bereichen mit niedriger Eosinophilenzahl durch die verschiedenen durchflußzytometrische Analysegeräte leicht höhere Werte gemessen wurden als bei der mikroskopischen Bestimmung. Der y-Achsenabschnitt lag im Vergleich der mikroskopischen Differenzierung mit den verschiedenen Analysegeräten zwischen  $b = 0.58$  und  $b = 1.68$ ; die Steigungen zwischen  $m = 0.58$  und  $m = 0.87$ . Die niedrigste Eosinophilenzahl wurde in der Altersgruppe „Kinder, 1. – 5. Jahr“ mit durchschnittlich 2% bei der mikroskopischen Dif-

ferenzierung gefunden und von allen drei Analysegeräten gut übereinstimmend ermittelt. In den anderen Altersgruppen lag die Eosinophilenanteil zwischen 3% und 4%.

#### 3.1.5 Basophile Granulozyten

Wie eingangs erwähnt, wurden für die Basophilenbestimmung wegen der geringen relativen und absoluten Zahlen keine direkten Vergleiche durch Ermittlung von Korrelationskoeffizienten vorgenommen. Generell kann gesagt werden, daß die Basophilenzahl bei der mikroskopischen Bestimmung zwischen 0% und 3% lag und mittels durchflußzytometrischer Verfahren an den verschiedenen Analysesystemen leicht höher ermittelt wurde. Dies lag wohl daran, daß insgesamt bei allen drei Analysegeräten ca. 10000 Zellen differenziert wurden, so daß selbst bei nur 0.5% Basophilenanteil noch 50 basophile Granulozyten gefunden wurde. Von den verschiedenen Analysegeräte wurden fast nie 0% Basophile angegeben. In 32 Fällen von insgesamt 646 gemessenen Blutproben fanden sich mikroskopisch erhöhte Basophilenanteile zwischen 3% – 5%. Bei diesen Proben lieferte der Coulter VCS die geringsten Abweichungen, während der Sysmex NE8000 und der Technicon H\*1 diese Basophilenanteile niedriger feststellten.

Höhere Basophilenzahlen als mikroskopisch ermittelt, wurden vom Coulter VCS vor allem dann angegeben, wenn sich in den Blutproben pathologische Blutzellen nachweisen ließen. So wurden Blasten teilweise mit in die Gruppe der Basophilen eingeordnet; die Blutproben waren allerdings dann auch als pathologisch markiert. Beim Technicon H\*1 fand sich in Fällen mit nachweisbaren Blasten ein erhöhter LUC-Parameter (large unstained cells).

Falsch erhöhte Basophilenanteile konnten beim Coulter VCS-System auch bei überalterten Blutproben, welche älter als 20 Stunden waren, gefunden werden.

Echte Basophilien fanden sich in den untersuchten Blutproben nicht. Insgesamt kann bei der Bestimmung der basophilen Granulozyten zwischen der mikroskopischen Bestimmung und den verschiedenen Analysesystemen von einer orientierenden Übereinstimmung ausgegangen werden.

## 3.2 Signalisierung von Abnormalitäten

Bei der Leukozytendifferenzierung reicht es nicht aus, die fünf verschiedenen Zellpopulationen in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten sowie Monozyten und Lymphozyten zu unterteilen. Wichtig und entscheidend für die Qualität eines Differentialblutbildes ist auch die Aussage über das Vorkommen von abnormen beziehungsweise pathologischen Blutzellen.

Von den verschiedenen mechanisierten Analysegeräten wurden unterschiedliche Signale zur Erkennung von auffälligen Differentialblutbildern gesetzt. Die geräte-internen Spezifikationen der Markierungen bei den unterschiedlichen Analysesystemen wurden jedoch nicht berücksichtigt; wurde ein Flag durch das Analysegerät angegeben, so wurde die Blutprobe als kontrollbedürftig angesehen. Um eine Aussage über die Treffsicherheit

von Warnsignalen machen zu können, ist es notwendig zu wissen, wie zuverlässig qualitative pathologische Veränderungen der Leukozyten von den durchflußzytometrischen Analysegeräten signalisiert werden. Die Empfindlichkeit dieser Signalisierung wird durch die Sensitivität beschrieben.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der richtig-positiven}}{\text{Anzahl der falsch-negativen} + \text{Anzahl der richtig-positiven}}$$

Weiterhin stellt sich jedoch auch die Frage, ob eine normale Blutprobe durch das Analysegerät auch wirklich nicht als kontrollbedürftig angegeben wird. Dies entspricht der Spezifität.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der richtig-negativen}}{\text{Anzahl der falsch-positiven} + \text{Anzahl der richtig-negativen}}$$

Die Effizienz, welche sowohl die Zuverlässigkeit der Erkennung von positiven Proben als auch die der Erkennung von negativen Proben einbezieht, ist wie folgt definiert:

$$\text{Effizienz} = \frac{\text{Anzahl der richtig-positiven} + \text{Anzahl der richtig-negativen}}{\text{Anzahl der Gesamtzahl der Proben}}$$

Zur Einteilung in „sicher pathologische“ Blutbilder und „grenzwertig pathologische“ Blutbilder wurden die Vorgaben nach BEGEMANN<sup>18</sup> und RÜMKE<sup>19, 20</sup> verwendet, welche eingangs bereits im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben wurden.

Wurde eine Blutprobe bei der mikroskopischen Differenzierung als „grenzwertig pathologisch“ eingestuft und vom Analysegerät als kontrollbedürftig signalisiert, so wurde diese Probe der Gruppe „richtig-positiv“ zugeordnet; wurde diese Blutprobe vom Analysegerät nicht markiert, so wurde sie der Gruppe „richtig negativ“ zugerechnet.

Bei Blutproben mit Nachweis von Blutzellanomalien wie z.B. toxischen Granulationen, lymphatischen beziehungsweise monozytären Reizformen, DÖHLE-Körperchen und Fragmentozyten bei der mikroskopischen Differenzierung der Leukozyten, wurde die Blutprobe bei Signalisierung durch das Analysegerät ebenfalls der Gruppe „richtig-positiv“ zugerechnet; meistens fanden sich in solchen Fällen weitere Veränderungen wie starke Linksverschiebungen und andere Atypien beziehungsweise Leukopenien oder Leukozytosen.

Außerdem wurden Blutproben, welche eine ausgeprägte Leukozytose ( $> 18000/\mu l$ ) beziehungsweise eine deutliche Leukopenie ( $< 3200/\mu l$ ) aufwiesen und von den Differenzierungsgeräten „geflaggt“ wurden, der Gruppe der „richtig-positiv“ signalisierten Blutbildern zugezählt, da in solch einem Fall eine mikroskopische Kontrolle ebenfalls erfolgen sollte.

#### 3.2.1 Erkennung von abnormen beziehungsweise pathologischen Blutbildern in der Altersgruppe „Neugeborene, 0. – 4. Woche“

Der Anteil der mikroskopisch ermittelten pathologischen Blutbilder war in der Altersgruppe „Neugeborene, 0. – 4. Woche“ sehr hoch. Die „sicher pathologischen“ Blutbilder lagen bei 44%; 23% der Blutbilder waren „grenzwertig pathologisch“.

### 3. Ergebnisse

Bezüglich der Erkennung von pathologischen Blutbildern in der Altersstufe „Neugeborene, 0. – 4. Woche“ konnte durch das Analysegerät Sysmex NE8000 eine außerordentlich gute Sensitivität mit 90.7% erreicht werden (Abb. 25). Dementsprechend war die Rate der „falsch-negativen“ Blutproben mit 9.3% gering. Bei den „falsch-negativen“ und somit nicht „geflaggt“ Blutproben fanden sich reaktive Linksverschiebungen mit bis zu 16% Stabkernigen; dies trat allerdings nur in drei Fällen auf. Außerdem wurden in einem Fall 2% Plasmazellen sowie in zwei Fällen Normoblasten mit einem Prozentsatz von 5% übersehen. Aufgrund einer extrem hohen Signalisierungsrate durch den Sysmex NE8000 war allerdings die Rate an „falsch-positiven“ Blutproben mit 57.6% sehr hoch, so daß die Spezifität nur bei 42.3% lag.

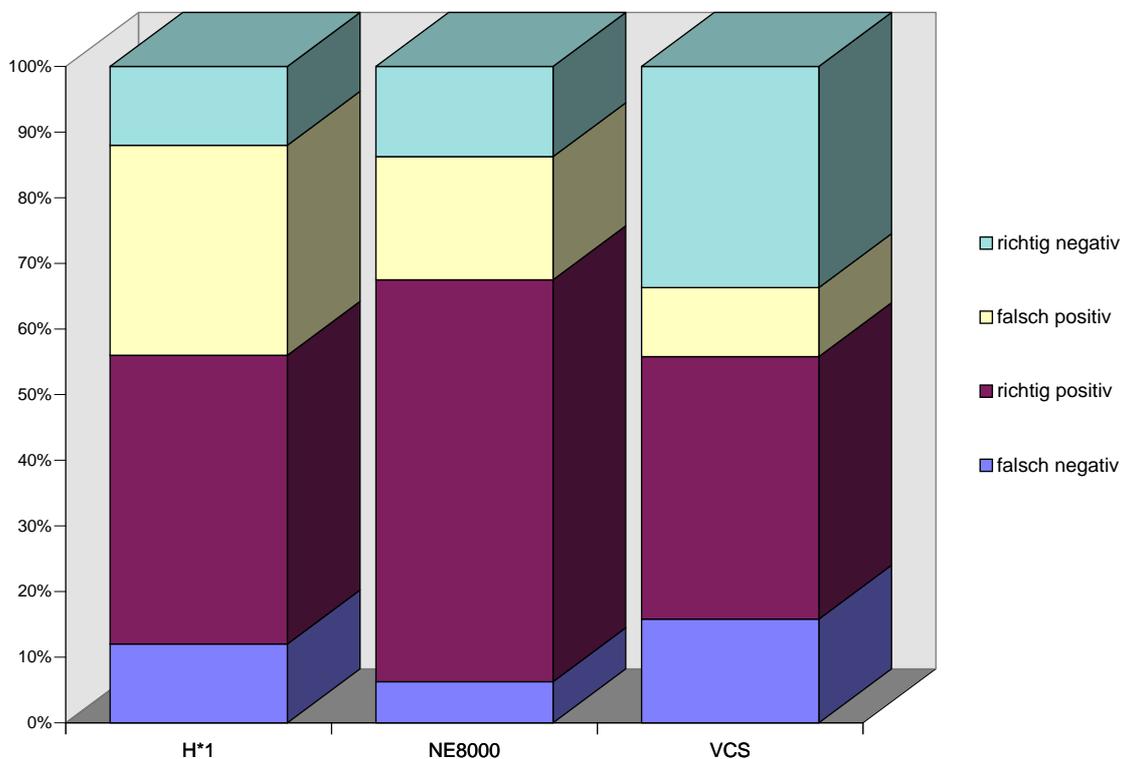


Abbildung 25: Erkennung qualitativer Abnormalitäten des Differentialblutbildes durch Analysensysteme im Blut Neugeborener

Eine zufriedenstellende Sensitivität von 78.6 % konnte für den Technicon H\*1 gefunden werden; beim Coulter VCS lag sie bei 71.7%. Falsch-negative Befunde waren somit beim Technicon H\*1 mit 21.4%, beim Coulter VCS mit 28.3% zu verzeichnen. Unter den pathologischen Blutproben, die vom Technicon H\*1 als solche nicht gekennzeichnet wurden, waren vor allem reaktive Linksverschiebungen mit bis zu 20% stabkernigen Granulozyten; in zwei Fällen fanden sich zusätzlich Myelozyten sowie in vier Fällen

Normoblasten bis zu 3%.

Ähnliche Fehleinstufungen fanden sich beim Coulter VCS. Hier fanden sich bei den „falsch-negativen“ Befunden ebenfalls häufig reaktive Linksverschiebungen mit bis zu 29% Stabkernigen und 2% Myelozyten; sowie in zwei Fällen normoblastenhaltige Blutproben. In einem Fall wurden 6% Plasmazellen nicht erkannt. In keinem Fall wurde von allen drei Analysegeräten das Auftreten von Blasten übersehen. Die beste Spezifität wurde beim Coulter VCS mit 76.2% erreicht; lediglich in 23.8% der Fälle wurden mikroskopische unauffällige Blutproben vom Coulter VCS-System fälschlicherweise als pathologisch angesehen. Beim Technicon H\*1 war die Spezifität mit 27.3% schlecht, so daß der Anteil der „falsch-positiven“ Proben mit 72.7% hier enorm hoch lag.

Die Effizienz war in dieser Altersgruppe am Sysmex NE8000 trotz guter Sensitivität durch die hohe Signalisierungsrate nur geringfügig besser als beim Coulter VCS, da beim Coulter VCS die Erkennung von nicht-pathologischen Blutproben hier deutlich besser erfolgte. Die Effizienz betrug beim Sysmex NE8000 75%, beim Coulter VCS lag sie bei 73.7%. Für den Technicon H\*1 mit einer beträchtlichen Rate an „falsch-positiven“ Befunden konnte trotz befriedigender Sensitivität nur eine Effizienz von 56% errechnet werden.

#### **3.2.2 Erkennung von abnormen beziehungsweise pathologischen Blutproben in der Altersgruppe „Säuglinge, 5. Woche – 1 Jahr“**

In der Altersstufe „Säuglinge, 5. Woche – 1 Jahr“ lag die Anzahl der mikroskopisch ermittelten „sicher pathologischen“ Blutproben bei 20%; die „fraglich pathologischen“ Blutproben lagen bei 24%.

Auch hier zeigte der Sysmex NE8000 in der Erkennung von pathologischen Blutproben ein sehr gutes Ergebnis mit einer Sensitivität von 86%. Ähnlich gut in der Signalisierung von pathologischen Blutproben in dieser Altersgruppe war der Technicon H\*1 mit einer Sensitivität von 81.3%, während der Coulter VCS mit 69.2% in der Erkennung von abnormen Blutbildern deutlich schlechter war (Abb. 26). Bei den nicht entdeckten pathologischen Blutbildern fanden sich auch hier vor allem reaktive Linksverschiebungen mit bis zu 27% stabkernigen Granulozyten. In zwei Fällen wurden Normoblasten bis zu 3% übersehen sowie in einem Fall 4% atypische Zellen bei mikroskopischem Nachweis von lympho-monozytären Reizformen. In einer Blutprobe wurden 3% Myelozyten nicht signalisiert. Am Sysmex NE8000 waren bei einem geringen Prozentsatz an „falsch-negativen“ ebenfalls reaktive Linksverschiebungen zu finden; in einem Fall sogar bis zu 33%, weiterhin wurden auch 2% Myelozyten nicht festgestellt. Beim Technicon H\*1 wurden in dieser Alterstufe in einem Fall 16% stabkernige Granulozyten nicht erkannt sowie bei zwei Blutproben mit 2% Plasmazellen kein Flag gesetzt. Auch in dieser Alterstufe wurde bei mikroskopischem Nachweis von Blasten im Blutausstrich von den drei verschiedenen Differenzierungsmethoden die Blutprobe markiert; allerdings erfolgte dies durch keines der Geräte mit gezieltem Hinweis.

Bezüglich der Spezifität fand sich beim Coulter VCS wie bereits in der jüngsten

### 3. Ergebnisse

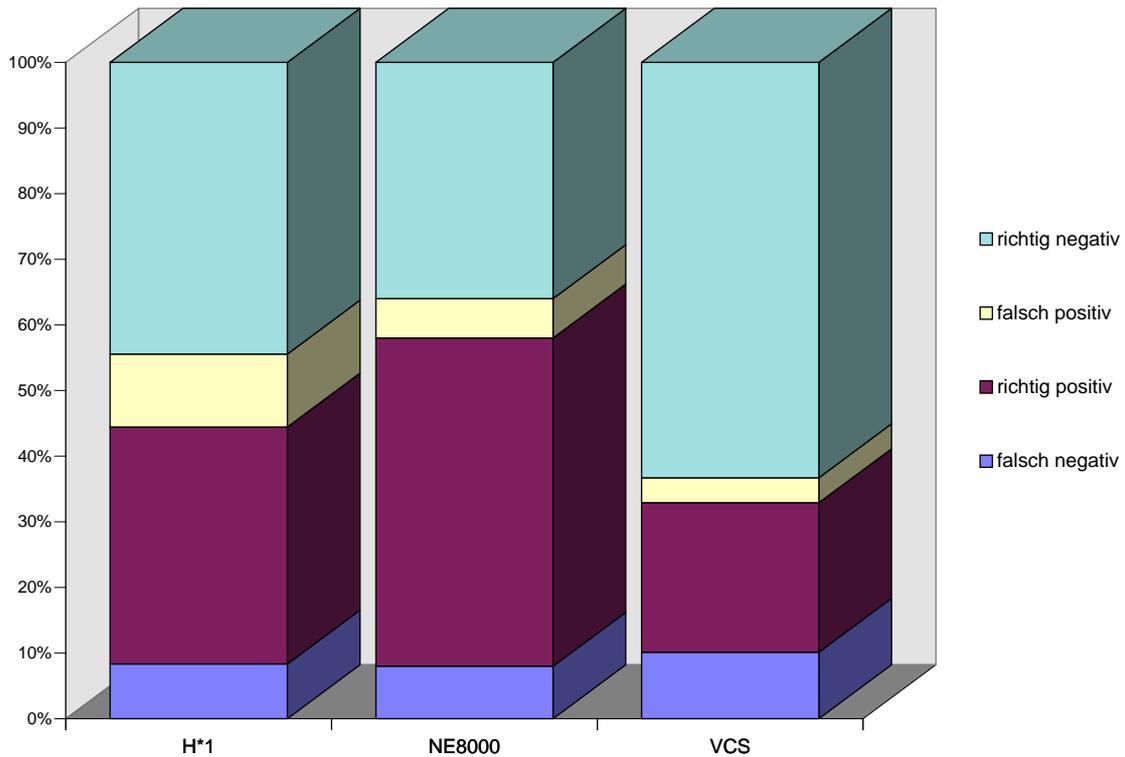


Abbildung 26: Erkennung qualitativer Abnormalitäten des Differentialblutbildes durch Analysesysteme im Blut von Säuglingen

Altersstufe eine gutes Ergebnis mit 94.3%; von 86 unauffälligen Blutproben wurden lediglich fünf markiert. Aber auch durch die beiden anderen Analysesysteme wurden die nicht-pathologischen Blutproben gut erkannt. Beim Sysmex NE8000 betrug die Spezifität 86.1%; beim Technicon H\*1 war sie mit 80.6% etwas schlechter.

In dieser Altersklasse zeigten die Analysegeräte Coulter VCS mit 86.1% und der Sysmex NE8000 mit 86.0% die gleichen Effizienzen, wobei auch hier durch den Sysmex NE8000 pathologische Proben bei höherer Signalisierungsrate häufiger markiert wurden, während der Coulter VCS bei zufriedenstellender Sensitivität nicht-pathologische Proben sicherer erkannte. Mit einer Effizienz von 80.6% war der Technicon H\*1 schlechter als die beiden anderen Differenzierungsgeräte, allerdings war auch hier wie bei den Neugeborenenblutproben die Sensitivität und damit die Erkennung von pathologischen Blutproben besser als beim Coulter VCS. Die Rate an „falsch-positiven Befunden“ lag auch in dieser Altersklasse beim Technicon H\*1 am höchsten.

### 3.2.3 Erkennung von abnormen beziehungsweise pathologischen Blutproben in der Altersgruppe „Kinder 1. – 5. Jahr“

Die durchschnittliche Anzahl der mikroskopisch ermittelten „sicher pathologischen“ Blutproben lag in dieser Altersgruppe bei 33%; die „fraglich abnormen“ Blutproben waren mit einem Anteil von zusätzlich 24% vertreten.

Hier konnte der Technicon H\*1 mit der Streulicht-zytochemischen Methode die pathologischen Blutproben am sichersten, nämlich mit einer Sensitivität von 84%, erkennen; der Sysmex NE8000 wies nur eine Sensitivität von 66.7% auf. Mittels Streulicht-konduktometrischer Bestimmung am Coulter VCS konnten in dieser Altersgruppe 74.4% aller abnormen Blutproben erkannt werden (siehe Abb. 27). Von allen drei Analysegeräten wurden auch hier vor allem reaktive Linksverschiebungen nicht signalisiert. Meistens wurden stabkernige Granulozyten zwischen 10% und 15% nicht signalisiert. Auch in dieser Altersgruppe fanden sich bis zu 28% stabkernige Granulozyten, welche nicht erkannt wurden. In einem Fall wurden außerdem durch den Sysmex NE8000 8% atypische Zellen nicht gemeldet; das Coulter VCS-System registrierte einmalig 5% lympho-monozytäre Reizformen mit Hinweis auf atypische Zellen nicht.

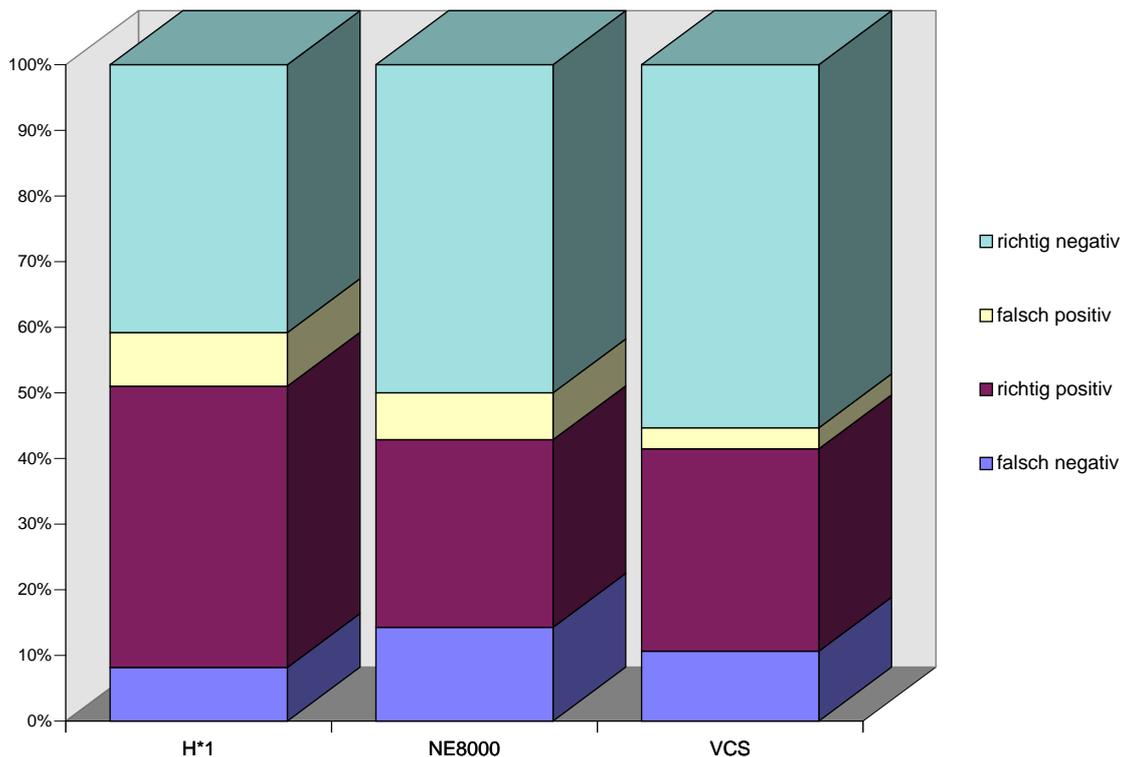


Abbildung 27: Erkennung qualitativer Abnormalitäten des Differentialblutbildes durch Analysesysteme im Blut von Kindern im 1. – 5. Jahr

Blutproben mit Blastennachweis im Blutbildausstrich fanden sich während des Zeitraumes unserer Messungen in dieser Altersgruppe nicht.

Auch hier zeichnete sich der Coulter VCS durch die beste Spezifität von 94.5% aus. Durch die Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyse selektive Bestimmung am Sysmex NE8000 konnten 87.5% der nicht-pathologischen Blutproben als „richtig-negativ“ nachgewiesen werden. Der Technicon H\*1 mit der besten Sensitivität in dieser Altersstufe zeigte hier die schlechteste Spezifität mit nur 84%; von 24 unauffälligen Blutproben wurden vier Blutproben „falsch-positiv“ gekennzeichnet.

Am Coulter VCS, bei wiederum guter Spezifität mit zufriedenstellender Sensitivität konnte in dieser Altersgruppe die beste Effizienz mit 86.4% ermittelt werden. Hier zeigte der Technicon H\*1 bei hoher Signalisierungsrate erneut eine gute Sensitivität, welche beim Sysmex NE8000 schlechter war, so daß in dieser Alterstufe die Effizienz am Technicon H\*1 mit 83.7% besser war als beim Sysmex NE8000 mit 78.6% (siehe Abb. 27).

#### 3.2.4 Erkennung von abnormen beziehungsweise pathologischen Blutproben in der Altersgruppe „Kinder ab 5 Jahren“

In der Altersstufe „Kinder ab 5 Jahren“ lag der Prozentsatz der mikroskopisch ermittelten „sicher pathologischen“ Blutproben bei 30%. Der Anteil der nur „grenzwertig pathologischen“ Blutproben wurde mit 18% festgestellt.

Obwohl die Blutproben in dieser Altersgruppe den Blutproben von Erwachsenen am ähnlichsten sind, war die Erkennung von pathologischen Blutproben nicht besser als in den anderen Altersgruppen.

Im Vergleich zwischen den Differenzierungsgeräten konnte in dieser Altersgruppe auch hier am Technicon H\*1 die beste Sensitivität mit 70% verzeichnet werden. Am Sysmex NE8000 konnten von insgesamt 42 pathologischen Blutproben nur 28 erkannt werden, was einer Sensitivität von 66.7% entspricht. Für den Coulter VCS lag die Sensitivität nur bei 66% (siehe Abb. 28). Wie bereits bei den anderen Altersstufen erwähnt, wurden auch hier von allen drei Differenzierungssystemen besonders reaktive Linksverschiebungen nicht signalisiert; beim Technicon H\*1 war dies sogar der einzige aufgetretene Fehler. Mit dem Sysmex NE8000 wurden außerdem in einem Fall 4% Blasten nicht gemeldet; desweiteren 2% Myelozyten nicht „geflaggt“ und in einer anderen Blutprobe 4% plasma-atypische Zellen nicht registriert. Beim Coulter VCS wurden ebenfalls in einem Fall 4% Blasten nicht signalisiert, weiterhin das Auftreten von Myelozyten mit 2% sowie atypischer Zellen mit bis zu 4% nicht markiert.

Bezüglich der Spezifität fanden sich in der Altersgruppe „Kinder, ab 5 Jahren“ für alle drei Analysegeräte befriedigende beziehungsweise gute Ergebnisse. Der Coulter VCS signalisierte von 188 nicht-pathologischen Blutproben lediglich 9 fälschlicherweise als auffällig, so daß die Spezifität mit 95.2% sehr gut war. In dieser Altersstufe konnte für den Sysmex NE8000 ebenfalls eine gute Spezifität mit 93.7% errechnet werden. Der Technicon H\*1 flaggte von 48 nicht-pathologischen Blutproben lediglich 7, so daß sich

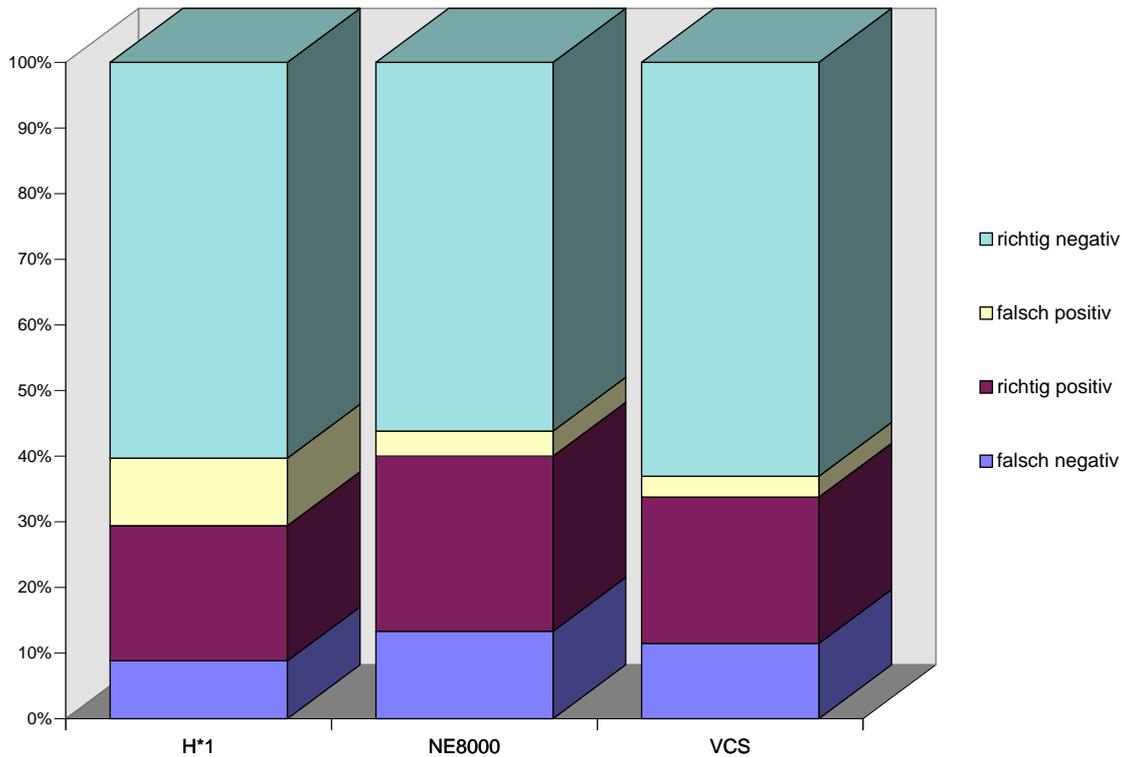


Abbildung 28: Erkennung qualitativer Abnormalitäten des Differentialblutbildes durch Analysesysteme im Blut von Kindern ab dem 5. Jahr

hier eine etwas weniger gute Spezifität von 85.4% errechnen ließ.

Auch in dieser Alterstufe konnte für den Coulter VCS die beste Effizienz mit 84.4% ermittelt werden, wobei sich das Analysegerät bezüglich der Signalisierung von pathologischen Blutproben von den anderen beiden Differenzierungssystemen nicht wesentlich unterschied. Allerdings war auch hier die Spezifität am Coulter VCS am besten. Hinsichtlich der Effizienz konnte für den Sysmex NE8000 ein Wert von 82.9% gefunden werden, beim Technicon H\*1 lag dieser bei 80.9% (siehe Abb. 28).

### 3.3 Signalisierungsübereinstimmung

Wie bereits erwähnt, konnte aufgrund des geringen Blutvolumens vor allem bei Neugeborenen nicht immer an zwei unterschiedlichen Differenzierungsgeräten vergleichend eine Zelldifferenzierung vorgenommen werden. Aus diesem Grunde wurde darauf verzichtet, einen direkten Vergleich bezüglich der Art der Signalisierung von pathologischen beziehungsweise nicht-pathologischen Blutproben durch die unterschiedlichen Differenzierungsmethoden vorzunehmen. Allgemein konnte festgestellt werden, daß die Übereinstimmung bei den Neugeborenenblutproben bezüglich der Signalisierung unabhängig

von der Art des Signals von pathologischen Blutproben am besten war; dies lag unter anderem daran, daß die Signalisierungsrate insgesamt hier bei allen drei Differenzierungsgeräten enorm hoch war. Bei über 60% aller Blutproben konnte bei den Neugeborenenblutproben eine Übereinstimmung in der Signalisierung von pathologischen Blutproben gefunden werden, wobei zwischen dem Coulter VCS mit dem Sysmex NE8000 die Übereinstimmung besser war als mit dem Technicon H\*1. Die Rate der divergierenden Markierungen von pathologischen Blutproben war somit wie zu erwarten bei den Neugeborenenblutproben mit einem Prozentsatz von 14% gering.

Die Rate der übereinstimmend geflaggtten pathologischen Blutproben – auch hier ohne Berücksichtigung der Art des gesetzten Signals – lag in den anderen Altersstufen zwischen 30% und 40% und somit deutlich niedriger als bei den Neugeborenenblutproben. Während die Anzahl der divergierend geflaggtten pathologischen Blutproben hier mit durchschnittlich 25–35% höher lag, konnten vor allem in der Altersgruppe „Kinder, 1. – 5. Jahr“ mit über 50% deutliche Unterschiede in der Signalisierung pathologischer Blutproben nachgewiesen werden, wobei der Sysmex NE8000 in dieser Altersgruppe häufiger unterschiedlich zum Coulter VCS signalisierte als zum Technicon H\*1. Bezüglich der Erkennung von nicht-pathologischen Blutproben zeigte sich ab der Altersklasse „Kinder ab 5 Jahren“ eine gute Übereinstimmung bei den Differenzierungsgeräten, sie lag hier bei über 90%. In den übrigen Altersklassen war die Übereinstimmung bezüglich der Erkennung von nicht-pathologischen Blutbildern schlechter und lag nur bei 35%, wobei zwischen dem Technicon H\*1 und dem Coulter VCS ein etwas besseres Verhältnis bestand.

## 4 Diskussion

Vorbedingung für die Beurteilung des weißen Blutbildes ist die Kenntnis der Leukozyten-Normalwerte und ihrer physiologischen Schwankungsbreite. Schon die Gesamtzahl der Leukozyten, welche je nach Lebensalter sehr unterschiedlich ist, hat eine gewisse differentialdiagnostische Bedeutung.<sup>38</sup>

Aussagekräftiger sind aber die Verschiebungen der einzelnen Zellformen innerhalb des Differentialblutbildes. Die Verteilung der einzelnen Zellformen läßt Rückschlüsse auf typische Reaktionsabläufe zu, da sie von bestimmten Regulationsmechanismen abhängig sind. Dies trifft besonders dann zu, wenn die Gesamtzahl der Leukozyten keine oder nur wenig charakteristische Veränderungen zeigt.

Die Gesamtleukozytenzahl liegt bei der Geburt am höchsten und fällt im Laufe der Kindheit auf Erwachsenenwerte ab. Der Anteil der neutrophilen Granulozyten überwiegt in den ersten Lebenstagen und nach dem 4. Lebensjahr bis ins Erwachsenenalter, während in den ersten drei Lebensjahren eine relative und absolute Lymphozytose besteht. Auffallend ist der relativ hohe Monozytengehalt während der ersten Lebenswochen (5–20%), später gelten die Erwachsenenwerte mit 2–6%.<sup>39,40</sup>

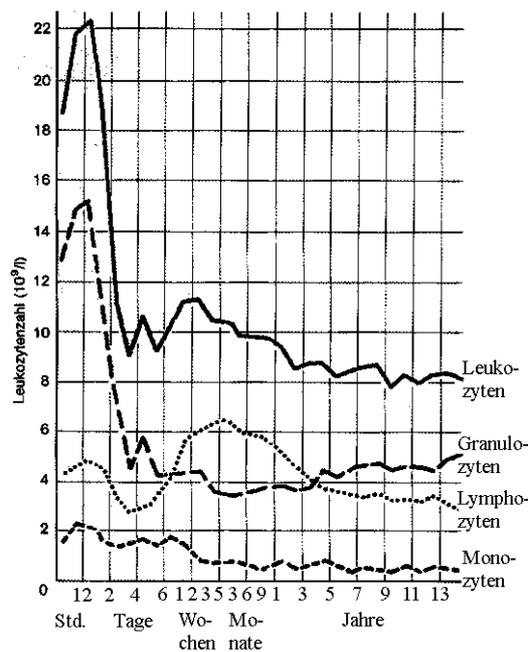


Abbildung 29: Verlauf der Leukozyten und ihrer Einzelfractionen nach KATO<sup>41</sup>

## 4.1 Quantitative Leukozytendifferenzierung

### 4.1.1 Neutrophile Granulozyten

Die Zuverlässigkeit der Neutrophilenerkennung an verschiedenen mechanisierten Analysesystemen wurde bei Blutproben von Erwachsenen bereits in mehrfachen Studien belegt.<sup>1,3,7,42-46</sup>

Die Ergebnisse der Neutrophilenbestimmung in Kinderblutproben im Vergleich zur mikroskopischen Auswertung mit den unterschiedlichen Analysemethoden zeigten in dieser Arbeit bei allen Altersgruppen befriedigende bis gute Übereinstimmungen, so daß bezüglich der Neutrophilenbestimmung kein Differenzierungsproblem zu sehen ist.

Die Neutrophilenpopulationen, welche zwischen 5% und 92% der Leukozyten ausmachten, wurden von den verschiedenen Analyseverfahren gut erkannt, wobei festgestellt werden konnte, daß die Übereinstimmung bei den nicht-pathologischen Blutbildern geringfügig, jedoch nicht signifikant besser war als bei den pathologischen und nicht-pathologischen Blutproben.

Die beste Übereinstimmung bei der Neutrophilenbestimmung zwischen mikroskopischer Methode und Analysegerät konnte für die Streulicht-zytochemische Methode am Technicon H\*1 nachgewiesen werden, gefolgt vom Streulicht-konduktometrischen Verfahren am Coulter VCS.

Ähnliche Ergebnisse konnten JOHANNESSEN ET AL.<sup>47</sup> bei Neugeborenenblutproben im Vergleich zwischen Coulter VCS und Technicon H\*1 finden, wobei die Neugeborenenblutproben eine etwas schlechtere Übereinstimmung zeigten als normale Blutproben von Erwachsenen. Auch VERHEUL ET AL.<sup>8</sup> konnten für die Neutrophilendifferenzierung bei Neugeborenenblut gute Ergebnisse am Coulter STKS nachweisen. In Übereinstimmung mit KATZ ET AL.<sup>48</sup> in einer Studie unter anderem am Technicon H\*1, fanden auch wir bei der Bestimmung der neutrophilen Granulozyten durch die Analysesysteme vor allem im unteren Bereich zwischen 30% und 60% geringfügig höhere Werte als bei der mikroskopischen Differenzierung. Leicht höhere Neutrophilenbestimmungen konnten auch BUTTARELLO ET AL. am Sysmex NE8000 nachweisen.<sup>49</sup>

Die gute Erkennung eines reifen neutrophilen Granulozyten wird durch charakteristische Eigenschaften wie z.B. den segmentierten Kern und das an Granula reiche Zytoplasma sowie bei der zytochemischen Methode durch die endogene Granulozytenperoxidase erreicht. Da die Bestimmung der Neutrophilenzahl bei Neugeborenen- und Kinderblut bereits sehr sicher durch die verschiedenen Analysegeräte erfolgt, müssen diese Merkmale, welche zur eindeutigen Klassifizierung und Zuordnung der Zellen erforderlich sind, schon weitgehend vorliegen.<sup>44</sup>

### 4.1.2 Lymphozyten

Auch die Bestimmung der Lymphozytenpopulation durch die unterschiedlichen Analysesysteme zeigte befriedigende bis gute Ergebnisse, wobei angemerkt werden muß, daß sich zwischen „geflaggten“ und „ungeflaggten“ Blutproben ein Unterschied nachwei-

sen ließ. Weiterhin bestanden Unterschiede hinsichtlich der Übereinstimmung zwischen mikroskopischer und mechanisierter Lymphozytenbestimmung in den unterschiedlichen Altersklassen. Die Lymphozytenpopulationen erstreckten sich über einen Bereich von 5 bis 100%.

Bei der Lymphozytenbestimmung in Neugeborenenblutproben traten bei allen drei Differenzierungsverfahren Schwierigkeiten auf. Die schlechteste Korrelation fand sich im Vergleich der mikroskopischen Differenzierung mit der Streulicht-zytochemischen Methode am Technicon H\*1; ähnliche Ergebnisse fanden auch JOHANNESSEN ET AL.<sup>47</sup> In dieser Studie waren die Lymphozyten durch den Technicon H\*1 unterschätzt worden. STAMMINGER ET AL.<sup>9</sup> konnten in ihrer Untersuchung von Kinderblutproben mit dem Technicon H\*1 für die Lymphozytenbestimmung nur mäßige Übereinstimmungen mit der Mikroskopie feststellen.

Hier gilt es allerdings zu berücksichtigen, daß der Technicon H\*1 eine Aufteilung in Lymphozyten und einen LUC-Wert anbietet. Im LUC-Feld finden sich große, variant aussehende Lymphozyten wie lymphoide Zellen beziehungsweise lymphatische Reizformen, aber auch peroxidase-negative Blasten, Sézary-Zellen, Haarzelleukämie-Zellen sowie inadäquate Monozyten, Zellen mit Myeloperoxidasemangel und gegebenenfalls Erythroblasten.<sup>2</sup> Ein Anteil von vier Prozent, der normalerweise als Warngrenze für Atypien gilt, wurde bei den Neugeborenenblutproben nicht selten überschritten. So lagen von den 50 gemessenen Blutproben am Technicon H\*1 in unserer Studie nur 15 mit dem LUC-Wert unter vier Prozent. Dieses Phänomen mit häufigem Überschreiten des LUC-Wertes im Kindesalter wurde auch in diversen anderen Studien festgestellt.<sup>9,50,51</sup> Durch Hinzuzählen des LUC-Wertes zur Lymphozytenpopulation konnten JOHANNESSEN ET AL.<sup>47</sup> die Übereinstimmung der Lymphozytenzahl zwischen Mikroskop und H\*1 deutlich verbessern.

In Vergleichsstudien unter Verwendung von Blutproben Erwachsener am Technicon H\*1 von THOMAS ET AL. und SWAIM ET AL. wurde der LUC-Wert ebenfalls den Lymphozyten zugeordnet.<sup>2,42</sup>

Die besten Ergebnisse beim Vergleich der Lymphozytenbestimmung von Neugeborenenblutproben zwischen der mikroskopischen Differenzierung und Analysegerät konnten am Sysmex NE8000 erreicht werden. Am NE8000 wurde Lymphozyten allerdings nur in weniger als 50% der Proben differenziert, die dann in guter Übereinstimmung mit der mikroskopischen Differenzierung standen.

Beim Coulter VCS war die Übereinstimmung mit der mikroskopischen Differenzierung bei einem Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.89$  für „geflaggte und ungeflaggte“ Blutproben befriedigend. Bei der Anwendung der VCS-Technologie konnte JOCHMANN in Blutproben von Kindern unter drei Monaten im Lymphozytenfeld des Leukoplots bei einem gewissen Prozentsatz der untersuchten Fälle eine distinkte Zweitpopulation feststellen; ob es sich dabei um eine Unterpopulation von Lymphozyten oder um spezielle Erythrozyten, eventuell Erythroblasten handelt, wurde in dieser Arbeit nicht genau bestimmt.<sup>52</sup>

In unserer Untersuchung konnten wir bei Neugeborenenblutproben am Coulter VCS

ebenfalls vereinzelt Ausdrücke mit angedeuteter zweigeteilter Lymphozytenpopulation finden, allerdings wurden die Erythroblasten mit großer Sicherheit durch den Coulter VCS dem Feld „5“ im Leukoplot<sup>a</sup> zugeordnet.

Die generell etwas schlechtere Korrelation bei der Lymphozytenbestimmung liegt im übrigen wohl unter anderem daran, daß die Lymphozyten keineswegs eine uniforme Zellpopulation darstellen, vielmehr haben sie funktionell sehr unterschiedliche Potenzen.<sup>38</sup> So unterliegen sie je nach einwirkenden Reizen erheblichen Änderungen, die eine Klassifizierung der Einzelzelle erschweren. Auch im Lichtmikroskop variiert das Erscheinungsbild eines Lymphozyten vom „Nacktkernigen“ bis hin zu lympho-monozytären Reizformen und weist daher deutliche volumetrische und morphologische Unterschiede auf. Neben kleinen Lymphozyten, die mit einem Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  die größte Gruppe bilden, finden sich im Differentialblutbild große Lymphozyten, die einen Durchmesser von 25  $\mu\text{m}$  aufweisen. Die meisten Lymphozyten haben ein ungranuliertes Zytoplasma, bei 10–20% der Zellen findet sich aber eine spärliche Granulation.<sup>38</sup>

Eine weitere Schwierigkeit bei der Differenzierung von Kinderblutproben besteht darin, daß im Kindesalter eine sehr starke Reaktionsfähigkeit des lymphatischen Systems mit einer deutlichen Neigung zur Lymphozytose vorliegt. Dabei kann es sich überwiegend um kleine Lymphozyten handeln (z.B. beim Keuchhusten) oder es dominieren größere Lymphozyten mit verbreitertem Plasma und deutlicher oder schwach ausgeprägter Basophilie bis hin zu Zellen, die nur schwer von Monozyten zu unterscheiden sind (lymphatische Reizformen, z.B. beim Pfeifferschen Drüsenfieber).<sup>39</sup> Eine Lymphozytose tritt bei Säuglingen und Kleinkindern oft als Antwort auf Infektionen auf, die bei Erwachsenen eine neutrophile Reaktion auslösen würden.<sup>38</sup> Im Säuglingsalter sind Lymphozytenvermehrungen bis zu 60–70% keine Seltenheit und werden vielfach im Verlauf von harmlosen Infekten beobachtet. Ausgeprägte Lymphozytosen mit atypischen transformierten Lymphozyten finden sich u. a. auch bei Zytomegalie-, Toxoplasmose- und Herpes simplex-Infektionen, bei akuter lymphatischer Leukämie und Prolymphozyten-Leukämie sowie bei Tuberkulose, Brucellose und Syphilis.<sup>38,53</sup> Generell erscheinen die Lymphozyten bei Neugeborenen, speziell bei Frühgeborenen, sehr groß und weniger reif.<sup>51,54</sup>

Wurden in unserer Studie bei Neugeborenenblutproben nur die „ungeflaggten“ Blutproben korreliert, so fanden sich für den Sysmex NE8000 und den Coulter VCS eine bessere Übereinstimmung mit der Mikroskopie, während sich beim Technicon H\*1 keine Änderung gegenüber der Betrachtung aller Proben ergab.

In den anderen Alterstufen konnten befriedigende bis gute Übereinstimmungen mit der Mikroskopie erzielt werden, wobei die „ungeflaggten“ Blutproben ebenfalls bessere Korrelationen aufwiesen. Die besten Lymphozytenübereinstimmungen im Vergleich mit der mikroskopischen Methode konnte in allen Altersstufen durchweg mit der Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyse-selektiven Methode am Sysmex NE8000 erreicht werden.

Daß die Lymphozytenerkennung und -zuordnung in den anderen Altersstufen besser

---

<sup>a</sup>Feld, welches sich unterhalb der Leukozytenbasislinie befindet und Normoblasten sowie Thrombozytenaggregate abtrennt

durchgeführt werden konnte als bei den Neugeborenenblutproben und am besten in der Altersklasse „Kinder ab 5 Jahren“ erfolgte, lag unter anderem wohl daran, daß ab diesem Alter keine Erythroblasten mehr im peripheren Blut nachzuweisen sind, die Lymphozytenvolumina weitgehend denen von Erwachsenen entsprechen und das Auftreten von lymphatischen Reizformen weniger häufig vorkommt.<sup>9</sup>

MINDE ET AL.<sup>55</sup> konnten in ihrer Untersuchung von Neugeborenenblut am Technicon H\*1 feststellen, daß nach Verdünnung der Blutproben die Lymphozytenpopulationen besser mit der Mikroskopie korrelierten, was wohl daran lag, daß sich im Blut von Neugeborenen lyseresistente Erythrozyten finden, welche beim Technicon H\*1 im Peroxidase-Kanal zu den Leukozyten mitgezählt werden. Wurden die Blutproben von Neugeborenen verdünnt, so reichte die Lysekapazität des Reagens wohl aus. Dies konnte auch von CHARACHE ET AL.<sup>56</sup> und CATHERINE ET AL.<sup>57</sup> bestätigt werden. Eine erhöhte Lyseresistenz zeigten vor allem einige Neugeborenenblutproben mit erhöhtem fetalen Hämoglobin.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Patienten mit anderen Hämoglobinopathien gemacht werden.<sup>58</sup>

#### 4.1.3 Monozyten

Bei der Monozytenbestimmung konnten mit allen drei Blutzellendifferenzierungsgeräten und ihren unterschiedlichen Analysemethoden in allen Altersklassen keine insgesamt befriedigend guten Ergebnisse erzielt werden. Die Monozytenpopulationen lagen in unserer Studie zwischen 0 und 32%.

Daß die Monozytenbestimmung nicht nur bei Kinderblutproben ein Problem darstellt, wurde bereits in diversen Untersuchungen bei Erwachsenenblutproben nachgewiesen.<sup>2, 49, 59, 60</sup>

Die schlechtesten Ergebnisse fanden sich in unserer Untersuchung bei der Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyse-selektiven Methode am Sysmex NE8000 bei Blutproben von Neugeborenen. Hierbei konnte eigentlich keine Übereinstimmung zwischen mikroskopischer und mechanisierter Differenzierung festgestellt werden. In den anderen Alterstufen waren die Ergebnisse am Sysmex NE8000 etwas besser, allerdings ließen sich auch hier nur Korrelationskoeffizienten zwischen  $R = 0.45$  und  $R = 0.66$  errechnen.

Bessere Übereinstimmungen konnten für die Streulicht-zytochemische Methode am Technicon H\*1 nachgewiesen werden.

Die besten Ergebnisse bezüglich Monozytenbestimmung im Vergleich zur mikroskopischen Bestimmung wurden mittels VCS-Technologie am Coulter Counter geliefert, wobei in der Gruppe „Kinder ab 5 Jahren“ mit Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.87$  und  $R = 0.88$  befriedigende Übereinstimmungen erreicht wurden.

Vergleichbare Ergebnisse erhielten auch GOOSSENS ET AL.<sup>59</sup> in ihrer Studie bei Erwachsenenblutproben, wobei als Referenzmethode sogar eine Differenzierung von 800 Zellen im Mikroskop erfolgte. Auch hier konnten für den Sysmex NE8000 nur schlechte Korrelationen nachgewiesen werden, während sich für den Technicon H\*1 bessere Übereinstimmungen zeigten und beim Coulter VCS teilweise zufriedenstellende bis gute

Ergebnisse feststellen ließen. Ähnliche Ergebnisse stellten auch SWAIM ET AL.<sup>2</sup> in ihrer Vergleichsstudie bei Erwachsenenblutproben fest.

Im Gegensatz dazu fand KLOSSON<sup>61</sup> bessere Ergebnisse am Technicon H\*1 als am Coulter VCS bei leicht höheren Monozytenwerten am Technicon H\*1 im Vergleich zu den mikroskopisch erstellten Werten. KLOSSON registrierte beim Coulter VCS keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit ermittelten wir bei der Monozytenbestimmung mit dem Technicon H\*1 und dem Coulter VCS im Vergleich zur mikroskopischen Differenzierung meist zu geringe Werte. Dagegen wurden die Monozyten am Sysmex NE8000 eher leicht überrepräsentiert. Auch GOOSSENS ET AL.<sup>59</sup> fanden bei der Streulicht-zytochemischen Methode am Technicon H\*1 und bei der Streulicht-konduktometrischen Methode am Coulter VCS leicht niedrigere Werte als bei der mikroskopischen Auszählung. Ähnliche Resultate erhielten VERHEUL ET AL.<sup>8</sup> am Coulter STKS, was in guter Übereinstimmung mit den Befunden von WARNER und REARDON<sup>3</sup> stand.

BARNARD ET AL.<sup>62</sup> konnten beim Coulter VCS eher leicht überhöhte Ergebnisse der Monozytenzählung zur Mikroskopie finden. Auch KATZ ET AL.<sup>48</sup> und LOTZ ET AL.<sup>44</sup> konnten bei der Monozytenbestimmung am Coulter VCS höhere Monozytenanteile (bis zu 30%) nachweisen als bei der mikroskopischen Differenzierung. In ähnlicher Weise zeigte sich dies auch in einer Untersuchung von MARTI ET AL.<sup>63</sup> Auch hier lagen die Monozytenbestimmungen am Coulter VCS und beim Technicon H\*1 höher als bei der mikroskopischen Differenzierung, wobei die Monozytenbestimmung ähnlich unserer Studie beim Vergleich mit der mikroskopischen Differenzierung und der Messung durch das VCS-System besser war als am Technicon H\*1.

In weiteren Untersuchungen wurde die mäßige Übereinstimmung der mikroskopischen Monozytendifferenzierung mit am Coulter VCS, Technicon H\*1 und vor allem am Sysmex NE8000 erhaltenen Werten belegt.<sup>1, 2, 6, 44, 49, 64</sup>

Wegen der natürlichen Polymorphie des Monozyten stellt sich das Problem der sicheren Erkennung von Monozyten jedoch schon im normalen Blutausstrich. BEGEMANN und RASTETTER<sup>65</sup> bieten in ihrem Atlas fünfzehn unterschiedlich aussehende, jedoch als normal zu differenzierende Abbildungen an. Dem wenig Geübten fällt die Erkennung der Monozyten wegen ihrer Polymorphie schwer. Auch beim Geübten beträgt die Rate der Fehlzuordnung im Durchschnitt immerhin 9.1%.<sup>66-69</sup>

Ein weiteres Problem bei der Monozytenbestimmung stellt der mikroskopische Handausstrich dar. Beim Ausstreichen des Blutes kommt es zu einer sehr wechselnden Verteilung der kernhaltigen Zellen mit vermehrtem Auftreten der größeren Zellen am Randbereich, während sich die kleineren Zellen vermehrt in der Mitte finden. Hier soll das Durchmustern der Blutausstriche in der „Mäanderform“ einen gewissen Ausgleich schaffen.<sup>17, 38</sup> Eine repräsentativere Verteilung ist an Spinner-Ausstrichen zu gewinnen. Dabei entsteht ein dünner Ausstrich, auf dem die Zellen gleichmäßig in einer Schicht verteilt und nebeneinander zu liegen kommen.<sup>69</sup> Aus wirtschaftlichen Gründen steht die Spinner-Ausstrichtechnik in der übergroßen Zahl der Laboratorien nicht zur Verfügung.

Aufgrund der nur kleinen Zellzahl ist bei der Monozytenbestimmung bei Auszählung

von nur 100 Leukozyten mit dem Mikroskop außerdem ein gewisser statistisch-mathematischer Fehler zu berücksichtigen. Allerdings ist die mangelnde Korrelation nur teilweise darauf zurückzuführen (HABERMANN und PATZ<sup>70</sup>).

Auffallenderweise konnten zwischen den Analysegeräten befriedigende bis sehr gute Korrelationen gefunden werden. Zwischen dem Technicon H\*1 und dem Coulter VCS konnte in der Gruppe „Kinder 1.–5. Jahr ungeflaggte Proben“ ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0.98$  errechnet werden. Zwischen dem Coulter VCS und dem Sysmex NE8000 war die Übereinstimmung etwas schlechter; es konnte jedoch auch hier bei den „Kindern ab 5 Jahren ungeflaggte Proben“ ein Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.84$  erreicht werden. Vor allem bei den Neugeborenenblutproben zeigte sich, wie bereits durch JOHANNESSEN ET AL.<sup>47</sup> und VERHEUL ET AL.<sup>8</sup> beschrieben, ein Zuordnungsproblem der Monozyten.

Die bei Neugeborenen vorkommende physiologische Monozytose wurde mittels Streulicht-konduktometrischer Methode am Coulter VCS am besten erkannt, wobei die Streulicht-zytochemische Methode am Technicon H\*1 ebenfalls noch ausreichende Ergebnisse lieferte. Am Sysmex NE8000 fand sich die größte Streuung zwischen mikroskopisch und mechanisiert ermitteltem Ergebnis.

In einer Studie von HABERMANN und PATZ,<sup>70</sup> welche mittels immunologischer Methode mit FITC-markierten Panleukozytenantikörpern (CD45) und PE-markierten Monozytenantikörpern (CD-14) eine sichere Differenzierung am FACScan in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten erreichten, korrelierte die Monozytenbestimmung mit der Streulicht-zytochemischen Methode am Technicon H\*1 erstaunlich gut. Da bei diesem Vergleich der Monozytenbestimmung sowohl beim Technicon H\*1 als auch mittels immunologischer Methode mehr Monozyten als am Mikroskop gefunden wurden, vermuteten HABERMANN und PATZ, daß bei der morphologischen Differenzierung ein Teil der Monozyten als solche nicht erkannt und den Lymphozyten zugeordnet werden. AVENARIUS ET AL.<sup>69</sup> konnten ähnliche Befunde durch Vergleich mit immunologischen Methoden für die Analysensysteme Coulter MAXM und den Coulter STKS nachweisen.

Hieraus folgern HABERMANN und PATZ,<sup>70</sup> daß die zytochemische-zytometrische Methode des Technicon H\*1 der mikroskopischen Bestimmung nicht nur gleichwertig, sondern sogar deutlich überlegen sei, zumal auch der statistisch-mathematische Fehler bei Differenzierung von fast 10000 Zellen kleiner ist. Auch GOOSSENS ET AL.<sup>59</sup> gaben bei ihrer Studie zu bedenken, daß für die Monozytenbestimmung nach einer anderen Referenzmethode gesucht werden sollte, und hielten die Bestimmung mittels monoklonaler Antikörper für die bessere Lösung.

ROWAN<sup>71</sup> gibt in einer Schrift anlässlich eines Seminars über die neuen Entwicklungen von Referenzmethoden bei der Blutzellzählung ebenfalls zu bedenken, ob die mikroskopische Differenzierung überhaupt die korrekte Referenzmethode ist. Andere Arbeiten hinterfragten bereits früher die Validität des mikroskopischen Verfahrens als Referenzmethode.<sup>72,73</sup>

Neuere Entdeckungen über die Physiologie und Pathophysiologie der Monozyten haben diese Zellart wieder in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Insbesondere durch

Erkenntnisse über die Funktion der Monozyten bei viralen und bakteriellen Infektionen einerseits sowie Tumoren andererseits hat diese Zellart an Bedeutung gewonnen.<sup>70</sup>

Eine Vermehrung der Monozyten findet sich regelmäßig als zweite Phase des biologischen Leukozytenverlaufs von Schilling<sup>53</sup> im Rahmen von Infekten (monozytäre Überwindungsphase). Daneben sind zahlreiche Krankheiten bekannt, bei denen eine langandauernde Vermehrung der Monozyten vorkommt und differentialdiagnostisch bedeutungsvoll sein kann. Hier sind in erster Linie die Endokarditis lenta, Tuberkulose, Parotitis epidemica, Malaria und Lues zu nennen. Unter den nichtinfektiösen Erkrankungen gehen häufig die Agranulozytose, Lymphogranulomatose, Retikulose, Leberzirrhose, Karzinome und das Banti-Syndrom mit einer Monozytose einher.<sup>53</sup>

Die Monozytenbestimmung ist vor allem für onkologische Patienten im Verlauf einer Zytostatikatherapie bedeutsam. So zeigt ein Erscheinen der Monozyten nach Leukopenie schon frühzeitig die Erholung der Leukozytenproliferation an.<sup>42</sup>

#### 4.1.4 Eosinophile Granulozyten

In unserer Untersuchung konnte bei der Eosinophilenbestimmung durch die drei mechanisierten Analysemethoden befriedigende bis gute Übereinstimmungen festgestellt werden. Bezüglich der verschiedenen Altersklassen existierten keine wesentliche Unterschiede. Die Eosinophilenpopulation beliefen sich auf 0 bis 28%. In einem Fall konnten bei einer leukopenischen Blutprobe 82% eosinophile Granulozyten in der mikroskopischen Differenzierung festgestellt werden, welche vom Sysmex NE8000 mit 66% eosinophiler Granulozyten beziffert wurde; der Coulter VCS zeigte hier kein Ergebnis.

Auffällig war, daß teilweise bei Vergleich eines Analysegeräts mit der mikroskopischen Differenzierung nur eine mäßige Übereinstimmung zu finden war, die Analysegeräte untereinander jedoch hervorragende Korrelationen zeigten. Dies konnte bereits in mehreren Studien, u. a. auch bei Neugeborenenblut, nachgewiesen werden.<sup>1, 3, 42, 50, 74</sup>

Für die Abweichung, welche bei Vergleich zwischen dem mikroskopischen Befund und Analysegeräten festgestellt werden konnte, wurde bereits eindeutig gezeigt, daß diese bei der Eosinophilenbestimmung vor allem durch den statistisch-mathematischen Zählfehler bei der mikroskopischen Differenzierung bedingt ist.<sup>3, 6, 7, 60, 75, 76</sup> Die Ursache hierfür liegt in der geringen Anzahl ausgezählter Zellen im Ausstrichpräparat und dem geringen Anteil eosinophiler Granulozyten im peripheren Blut. Bei vergleichsweise hohem Anteil von 10 eosinophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl ergibt sich bei Auszählung von 100 Zellen ein 95%-Vertrauensbereich von 5–17% eosinophiler Granulozyten. Die Differenzierung von rund 10000 Zellen hingegen grenzt ihn auf 9–11% ein.<sup>77, 78</sup> HABERMANN ET AL.<sup>75</sup> sprechen hier von der Überlegenheit der mechanisierten Differentialgeräte gegenüber der optischen Auszählung, wobei sich in mechanisierten Systemen Eosinophile von Neutrophilen eindeutig abgrenzen lassen.

Ein spezielles Problem stellt die Eosinophilenbestimmung bei vererbtem Peroxidase-

mangel<sup>b</sup> beziehungsweise völligem Fehlen der Peroxidase bei zytochemisch arbeitenden Analysegeräten wie dem Technicon H\*1 dar.<sup>80-83</sup>

Obwohl der Technicon H\*1 in diversen Vergleichsstudien fast durchweg bessere Ergebnisse bei der Eosinophilenbestimmung im Vergleich mit der mikroskopischen Analyse zeigte als andere Analysensysteme, wies BAIN<sup>84</sup> darauf hin, daß bei einem Myeloperoxidasemangel beziehungsweise Fehlen der Peroxidase der eosinophilen Granulozyten, diese beim Technicon H\*1 nicht zu bestimmen sind. Beim Technicon H\*1 ist zur Eosinophilenbestimmung vor allem die Peroxidaseaktivität ein wichtiger Indikator.<sup>80</sup> Ist die Myeloperoxidaseaktivität nur geringfügig erniedrigt, können die eosinophilen Granulozyten teilweise im Neutrophilenfeld liegen, was daran liegt, daß bei der Messung mehr Streulicht die Zellen durchdringt, die Zellen somit größer wirken und damit den neutrophilen Granulozyten ähnlich sind. Bei normalen eosinophilen Granulozyten kann nur wenig Streulicht die Zellen durchdringen, damit wirken diese kleiner und werden im Scattergramm weiter unten angesiedelt.<sup>84</sup> Besitzen die eosinophilen Granulozyten nur eine schwache Myeloperoxidaseaktivität, so können diese eventuell auch im Monozytenfeld zu finden sein.<sup>85,86</sup> Wurde gar keine Peroxidaseaktivität festgestellt, lagen die eosinophile Granulozyten im LUC-Feld.<sup>84</sup> Wird jedoch nicht nur auf die angegebene Zahl der eosinophilen Granulozyten im Ausdruck geachtet, sondern zusätzlich das Scattergramm mit ausgewertet, so fällt das Phänomen des Peroxidase mangels der eosinophilen Granulozyten auf (BAIN<sup>84</sup>). Bei ansteigender Monozytenzahl sowie erhöhtem LUC-Wert sollte daher an einen Peroxidase mangel gedacht werden und eine mikroskopische Kontrolle unbedingt erfolgen.<sup>84,87</sup>

CAPPELLETTI ET AL.<sup>88</sup> geben an, daß das teilweise oder völlige Fehlen der Myeloperoxidase bei eosinophilen Granulozyten mit einem Fall auf 14000 nicht so selten ist wie häufig gedacht. Unter dem Mikroskop sehen diese eosinophilen Granulozyten vollkommen unauffällig aus. Die Bedeutung des Myeloperoxidasemangels für die Humanpathologie ist allerdings noch nicht geklärt.<sup>88</sup> VAUPEL ET AL.<sup>89</sup> konnten bei Untersuchungen am Technicon H\*1 überraschenderweise auch einen hohen Anteil von Patienten mit partiellem Peroxidase mangel unter HIV-infizierten Patienten finden.

Die Vermehrung der eosinophilen Zellen im peripheren Blut ist charakteristisch für bestimmte Phasen im Ablauf von Infekten, wobei das Auftreten dieser Zellen auf die beginnende Ausheilung hinweist (eosinophile Heilphase=Morgenröte der Heilung). Einige Infektionskrankheiten gehen jedoch von vorneherein mit einer Eosinophilie einher; zu nennen sind hier Scharlach, Erythema infectiosum und Masern. Auch bei der chronischen myeloischen Leukämie und der Polyzythämie kommt eine Eosinophilie häufig vor.<sup>53</sup> Die postinfektiöse reaktive Eosinophilie kann bei jungen Säuglingen, insbesondere Frühgeborenen, kurzfristig auf Werte um 30% steigen.<sup>90</sup> Ein besonderer diagnostischer Wert kommt den eosinophilen Granulozyten als morphologischem Kennzeichen der allergischen Reaktionslage zu. Man findet sie daher regelmäßig vermehrt bei allen allergischen

---

<sup>b</sup>Arbeiten von PRESENTEY<sup>33,79</sup> und SZAPIRO zeigten, daß der Peroxidase mangel autosomal rezessiv vererbt wird.

Diathesen (Asthma bronchiale, Heuschnupfen, Serumkrankheit, Arzneimittlexanthem, Urtikaria, QUINCKE-Ödem usw.); weiterhin bei Wurmkrankheiten (typisch bei der Trichinose, Echinococcus, Ankylostomiasis, Strongyloides etc.); aber auch bei einem Teil der Lymphogranulomatosen und dem Erythema nodosum. Meist bleibt das Ausmaß der Eosinophilie begrenzt; in seltenen Fällen kann sie jedoch zum hämatologischen Leitsymptom werden.<sup>38</sup>

Das Fehlen der eosinophilen Granulozyten kann diagnostisch ebenso wichtig sein wie der Grad der Linksverschiebung der neutrophilen Granulozyten und auf eine besonders schwere Infektion hinweisen, auch wenn Fieber und andere alarmierende Symptome fehlen oder nur schwach ausgebildet sind. Bei Wiederauftreten der eosinophilen Granulozyten ist mit einem baldigen Abklingen der Krankheitserscheinungen zu rechnen. Eine deutliche Verminderung oder gar Fehlen der eosinophilen Granulozyten findet man bei hormonalen Störungen, die mit einer vermehrten Ausschüttung von ACTH oder Nebennierenrinden-Steroiden einhergehen.<sup>38</sup>

HABERMANN ET AL.<sup>75</sup> sehen in der höheren Präzision der Eosinophilenbestimmung durch die Analysegeräte eine gute Methode zur Überwachung von allergiegefährdeten Patienten, welche sofort verfügbar und im Vergleich zur IgE-Spiegel-Bestimmung im Serum wesentlich kostengünstiger ist. So konnte bei Dialysepatienten, welche wegen der Gefahr einer zu erwartenden Allergisierung gegen das Desinfektionsmittel Ethylenoxid in regelmäßigen Abständen überwacht werden müssen, in der Bestimmung der Eosinophilenzahl eine wesentlich bessere Methode gefunden werden, als in der Bestimmung des Gesamt-IgE-Spiegels.

#### 4.1.5 Basophile Granulozyten

Aufgrund der geringen absoluten und relativen Zellzahlen der basophilen Granulozyten von im Mittel einem Prozent bis maximal fünf Prozent der Gesamtleukozytenzahl wurde in unserer Studie auf eine Korrelationsanalyse der Zählergebnisse von basophilen Granulozyten verzichtet.

MARTI ET AL.<sup>63</sup> sowie NILSSON<sup>91</sup> konnten beim Vergleich der basophilen Granulozyten am Technicon H\*1 und der mikroskopischen Differenzierung insgesamt befriedigende Übereinstimmungen feststellen; bessere Übereinstimmungen erreichte das Vorgängergerät Technicon H6000. In einer Vergleichsstudie von BENTLEY ET AL.<sup>76</sup> konnte für den Technicon H\*2, welcher die Leukozytendifferenzierung wie der Technicon H\*1 vornimmt sowie für den hämatologischen Analysator Cell=Dyn 3000 eine befriedigende Übereinstimmung mit der mikroskopischen Differenzierung nachgewiesen werden. Für den Sysmex NE8000 und den Coulter STKS fanden sich demgegenüber keine befriedigende Ergebnisse.<sup>76</sup>

Daß es sich bei den schlechten Korrelationen der basophilen Granulozyten zwischen Mikroskop und Analysatoren um ein statistisches Problem handelt, wurde bereits von mehreren Autoren erörtert.<sup>42,74</sup> Aus dem Nomogramm nach RÜMKE<sup>19,42</sup> ist ersichtlich, daß in diesen Meßbereichen selbst bei der Differenzierung von 10000 Leukozyten die Zu-

verlässigkeit der gefundenen Meßergebnisse gering ist und ein großer statistischer Fehler entsteht.

Da die basophilen Granulozyten jedoch bei myeloproliferativen Erkrankungen einen wichtigen prognostischen Faktor darstellen,<sup>92-94</sup> ist für eine sinnvolle Verlaufskontrolle eine zuverlässige Basophilenzählung zu fordern.<sup>31</sup> Deutlich erhöhte Basophilen-Konzentrationen treten am häufigsten im Verlauf einer chronisch myeloischen Leukämie auf. Bei behandelten Patienten mit einer chronischen myeloischen Leukämie kann die Basophilie oftmals letztes, manchmal einziges verbleibendes und auf diese Krankheit hinweisendes Symptom sein. Selten ist eine Basophilenleukämie, die akut und chronisch verlaufen kann und eine Sonderform der myeloischen Leukämie darstellt. Häufig findet sich eine Erhöhung der Basophilenzahl auch bei einer Polyzythämie. Allerdings ist eine Basophilie im Vergleich zu einer Eosinophilie viel seltener. Eine leichte bis deutliche Vermehrung der basophilen Granulozyten wurde weiterhin bei Krankheitsbildern, die mit erhöhten Blutfettwerten einhergehen, so bei Diabetes mellitus, Nephrose und Myxödem gefunden. Häufig ist eine Vermehrung der basophilen Granulozyten auch mit einer Eosinophilie vergesellschaftet.<sup>38</sup>

Ein erhöhter Anteil basophiler Granulozyten wurde in unseren Untersuchungen von den Analysegeräten teilweise dann angegeben, wenn sich pathologische Blutzellen, u. a. Blasten, nachweisen ließen. Solche Pseudobasophilien konnten ETAVARD<sup>31</sup> bei viralen Erkrankungen und Lymphomen sowie bei ausgeprägten Leukozytosen am Technicon H\*1 beobachten. Ein von ETAVARD<sup>31</sup> beschriebenes, angeblich typisches Phänomen bei der Analyse von pädiatrischen Blutproben am Technicon H\*1, nämlich die Abknickung der mononukleären Zellen nach oben in das Basophilenfeld des Leukogramms hinein, die zu einer scheinbaren Basophilie führen soll, konnte von uns nicht reproduziert werden. Als Ursache für diese Pseudo-Basophilie, so ETAVARD, kommen sowohl die gegenüber Erwachsenen andere Größenverteilung der Lymphozyten wie auch eine erhöhte Resistenz gegenüber dem hier eingesetzten Lyseagens in Frage; allerdings sei diese Art der Pseudobasophilie eindeutig als solche im Nukleogramm zu erkennen. Weiterhin demonstrierte ETAVARD,<sup>31</sup> daß es zu einer scheinbaren Basophilie am H\*1 kommt, wenn sich pro  $\mu\text{l}$  Blut mehr als 50000 Leukozyten befinden. Da dieses Phänomen verschwindet, wenn die Blutprobe verdünnt wird, reicht wohl die Lysekapazität des Reagens nicht aus, so daß nur ein inkomplettes „Stripping“ der Zellen erfolgt und diese dann im Basophilenkanal als basophiler Granulozyt gezählt werden. Auch VAUPEL<sup>95</sup> wies darauf hin, daß eine Pseudobasophilie nach Verdünnung aller Blutproben mit einer Leukozytenzahl von mehr als 30000/ $\mu\text{l}$  vermieden werden könne.

Erhöhte Basophilenzahlen ermittelte in unserer Studie auch das Coulter VCS-System, wenn überalterten Blutproben untersucht wurden. Dieses Phänomen fand KLOSSON<sup>96</sup> in seiner Studie zum Einfluß der Alterung von Blutproben sowohl beim Technicon H\*1 als auch für den Coulter VCS. Auch in einer Studie von ETAVARD<sup>31</sup> am Technicon H\*1 war dieses Phänomen nachweisbar.

Der Basophilenanteil wurde durch die drei verschiedenen durchflußzytometrischen Analyseverfahren im Vergleich zur mikroskopischen Differenzierung eher leicht höher er-

mittelt. Insgesamt kann jedoch von einer befriedigenden Übereinstimmung ausgegangen werden. Der Technicon H\*1 lag mit der Bestimmung der basophilen Granulozyten im Gegensatz zum Coulter VCS und Sysmex NE8000 am niedrigsten. Dies könnte unter anderem daran liegen, daß der Technicon H\*1 ein spezielles LUC-Feld besitzt, in welches atypische Zellen eingeordnet werden: eine Population, die den anderen beiden Analysegeräten fehlt. In den Untersuchungen von ETAVARD<sup>31</sup> am Technicon H\*1 wurde kein Fall beobachtet, bei dem eine Basophilie übersehen worden wäre, wohl aber gab es Situationen, in denen der Technicon H\*1 andere Leukozyten fälschlicherweise den basophilen Granulozyten zuordnete.

## 4.2 Qualitative Erkennung

Von großer diagnostischer Bedeutung sind neben der quantitativen Zusammensetzung des Blutbildes aus normalen Zellen morphologische Veränderungen und Besonderheiten, die über Reaktionen und Funktionen der Leukozyten informieren<sup>53</sup> sowie das Auftreten von pathologischen Blutzellen. Abnormale Zellen können mechanisierte Systeme in der Regel nicht eindeutig zuordnen, sondern nur als abnormal erkennen. Die Geräte setzen daher in diesem Fall sogenannte „Flags“.

Bei den insgesamt 646 gemessenen Kinderblutproben war die Anzahl der qualitativ pathologischen Blutproben in der verschiedenen Altersklassen unterschiedlich hoch. Dementsprechend war auch die Signalisierungsrate der drei auf verschiedene Weise arbeitenden Differenzierungsgeräte unterschiedlich. Weiterhin zeigten sich bezüglich der Erkennung von pathologischen Blutbildern in den unterschiedlichen Altersklassen differente Ergebnisse.

Mit der Streulicht-konduktometrischen Methode am Coulter VCS konnten die konstantesten Ergebnisse bezüglich der Sensitivität und Spezifität für die Erkennung atypischer Zellen in den verschiedenen Altersklassen gefunden werden, wobei die Neugeborenenblutproben auch bei diesem Analysegerät ein Problem darstellten.

In verschiedenen Studien wurde bereits über die Signalisierungshäufigkeit beziehungsweise über die Erkennung von pathologischen Zellen im Blutbild unterschiedlicher Analysegeräte berichtet, wobei sich teilweise sehr unterschiedliche Resultate ergaben.<sup>2, 3, 9, 51, 55, 56, 61</sup>

Da sich bei der Erkennung von qualitativ pathologischen und nicht-pathologischen Blutproben in den Alterstufen ab 4 Wochen keine wesentlich unterschiedlichen Ergebnisse durch die verschiedenen Analysemethoden ergaben, wurden diese zusammenfassend abgehandelt.

### 4.2.1 Signalisierung von Abnormitäten bei Neugeborenenblutproben

Bei den insgesamt 141 gemessenen Neugeborenenblutproben war der Anteil der „sicher“ und „grenzwertig pathologischen Blutproben“ mit 77% extrem hoch.

Mittels Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyselektiver Methode am Sysmex NE8000 konnte in dieser Altersgruppe eine sehr gute Sensitivität für pathologische Zellen mit 91% erreicht werden. Da das Analysegerät jedoch einen hohen Prozentsatz der Neugeborenenblutproben markiert oder überhaupt nicht differenziert hat, war die Spezifität entsprechend schlecht. Dies schmälerte die Effizienz des Analysegerätes in dieser Altersstufe deutlich; sie lag nur bei 74%. Bei nahezu allen markierten Blutproben setzte der Sysmex NE8000 ein Blastensignal, häufig wurde zusätzlich noch das Signal „atypische Zellen“ angezeigt.

Auch der Technicon H\*1 zeigte in dieser Altersklasse eine sehr hohe Signalisierungsrate; die Erkennung von pathologischen Blutproben war jedoch schlechter als beim Sysmex NE8000. Die Anzahl falsch-positiver Befunde lag beim Technicon H\*1 mit einer Spezifität von lediglich 27.3% noch höher, was bedeutet, daß hier am häufigsten unnötigerweise eine mikroskopische Nachdifferenzierung erfolgen würde, bei schlechterem Erkennen der sicher pathologischen Blutproben durch das Analysegerät. Die vom Technicon H\*1 als pathologisch erkannten Neugeborenenblutbilder wurden, genau wie beim Sysmex NE8000, häufig mit den Signalen „Blasten“ und „atypische Zellen“ markiert.

Der Coulter VCS zeigte bei den Neugeborenenblutproben die niedrigste falsch-positive Signalisierungsrate, allerdings war der Anteil an falsch-negativen Befunden auch am höchsten. Bezüglich der Signalsetzung konnte am Coulter VCS bei Neugeborenenblutproben das Signal „X7“ (Diskriminator<sup>c</sup>) relativ oft gefunden werden.

Durch JOHANNESSEN ET AL.<sup>47</sup> konnte bei Neugeborenenblutproben für den Technicon H\*1 eine ähnlich hohe Signalisierungsrate nachgewiesen werden. Dabei wurde oftmals das Blastensignal gesetzt, weil häufig der LUC-Grenzwert, eingestellt auf vier Prozent, überschritten wurde.

Auch NELSON ET AL.<sup>51</sup> stellten bei Neugeborenenblutproben eine hohe Signalisierungstendenz durch die Streulicht-zytochemische Methode am Technicon H\*1 fest; hier wurde bei 85% aller gemessenen Neugeborenenblutproben ein Blastensignal gefunden. Dies liegt wohl daran, daß sich im Blut von Neugeborenen generell größere und weniger reif erscheinende Lymphozyten finden als bei Erwachsenen. So läßt sich auch, wie bereits erwähnt, die schlechte Korrelation der Zählergebnisse von Lymphozyten bei mikroskopischer und mechanisierter Differenzierung in diesem Lebensalter erklären.<sup>50,51</sup> In einer Vergleichsstudie von VERHEUL ET AL.<sup>8</sup> mittels VCS-Technologie ergaben sich für die Neugeborenenblutproben ebenfalls Signalisierungsraten bis zu 75% bei ebenfalls häufigem Blastensignal. Im Gegensatz dazu konnte bei den Erwachsenenblutproben eine Signalisierungsrate von 20% festgestellt werden.

Auch wenn sich bezüglich der Häufigkeit der Erkennung von pathologischen Blutbildern bei den verschiedenen Analysegeräten deutliche Unterschiede nachweisen ließen, so zeigte das Verteilungsmuster der nicht erkannten pathologischen Zellen doch keine wesentlichen Unterschiede. Von allen drei Analysesystemen wurden bei den Neugeborenenblutproben vor allem reaktive Linksverschiebungen, zum Teil mit einem beträchtlichen

---

<sup>c</sup>mit Hinweis auf einen in den unteren Bereich verschobener Lymphozytenpopulation, z.B. Plasmazellen

Anteil von bis zu 29% stabkerniger Granulozyten sowie geringen Anteilen von Myelozyten und Plasmazellen nicht angezeigt. Auch wurden von allen drei Analysegeräten Normoblasten nicht zuverlässig registriert.

Bezüglich der Effizienz waren der Sysmex NE8000 mit 75% und der Coulter VCS mit 74% bei Blutproben von Neugeborenen nahezu gleichwertig. Die Erkennung von pathologischen Blutproben war am Sysmex NE8000 bei den Neugeborenenblutproben signifikant besser als beim Coulter VCS, jedoch zeigte dieser bei deutlich geringerer Signalisierungstendenz eine wesentlich bessere Spezifität. Beim Technicon H\*1 war die Effizienz mit 56% merklich schlechter.

Die hohe Signalisierungsrate bei Neugeborenenblutproben liegt unter anderem daran, daß unser Patientenkollektiv einen großen Anteil von kranken Kindern beinhaltet. Andererseits enthält Neugeborenenblut lyseresistente Erythrozyten, welche z.B. im Peroxidase-Kanal des Technicon H\*1 als Leukozyten gezählt werden. Schließlich gibt es in Neugeborenenblut häufig Normoblasten und unreife Zellen, welche nicht richtig zugeordnet werden können.

Aufgrund der bei allen Differenzierungsgeräten hohen Signalisierungsrate bei Neugeborenenblut und der dadurch erforderlichen, hohen Rate an mikroskopischen Nachkontrollen ist hier der Einsatz von automatisierten Blutdifferenzierungsgeräten sicher nicht sinnvoll. Zu diesem Ergebnis trägt auch die zum Teil unzureichende Sensitivität bei. Ähnliche Resultate wurden bereits in mehreren Vergleichsstudien für den Technicon H\*1 und den Coulter VCS erzielt.<sup>8,50,51,55</sup>

#### 4.2.2 Signalisierung der Blutproben „Säuglinge 5. Woche–1. Jahr“, „Kinder 1.–5. Jahr“ und „Kinder ab 5 Jahren“

Die Effizienz war in den genannten Altersgruppen bei allen drei Analysegeräten höher als bei Neugeborenen, was vor allem darauf zurückgeht, daß hier die Spezifität höher lag und somit das Erkennen von nicht-pathologischen Blutproben zuverlässiger erfolgte.

##### **Coulter VCS**

Bezüglich der Spezifität zeigte der Coulter VCS auch in den weiteren Altersgruppen die besten Ergebnisse mit Werten von 94–95%. Ähnlich gute Ergebnisse mit Spezifitäten zwischen 88 und 97% konnten auch von anderen Untersuchern<sup>2,3,8,97,98</sup> festgestellt werden.

Der Coulter VCS zeichnete sich in unserer Studie insgesamt als das Analysegerät aus, welches nicht-pathologische Blutproben am besten erkannte, so daß die Rate an falsch-positiven Blutproben dementsprechend niedrig war. Ähnliche Werte konnten für Erwachsene auch CORNBLEET ET AL.<sup>97</sup> mit einer Rate falsch-positiver Befunde von 11% feststellen, während LOTZ ET AL.<sup>44</sup> mit der VCS-Technologie<sup>d</sup> falsch-positive Resultate bis zu 26% der Proben erhielten. SWAIM ET AL.<sup>2</sup> stellten in ihrer Vergleichsstudie am Coulter VCS eine fast zu vernachlässigende Anzahl an falsch-positiven Blutproben

---

<sup>d</sup>beim Coulter STKS

fest. Die durchschnittliche falsch-positive Rate lag am Coulter VCS – ausgenommen bei Neugeborenenblutproben – in unseren Untersuchungen bei 15%.

Während von ENNEN ET AL.<sup>1</sup> beim Coulter VCS und LOTZ ET AL.<sup>44</sup> am Coulter MaxM<sup>e</sup> bei hoher Signalisierungsrate und zahlreichen falsch-positiven Blutproben eine extrem gute Sensitivität mit bis zu 97% beschrieben, konnten wir in unseren Untersuchungen auch in diesen Altersstufen beim Coulter VCS nur Sensitivitäten zwischen 66 und 74% nachweisen. Ein ähnliches Ergebnis (67%) erhielten auch CORNBLEET ET AL.<sup>97</sup> am Coulter STKS, dem Nachfolgesystem des VCS, wobei auch in dieser Studie häufig reaktive Linksverschiebungen nicht signalisiert wurden. Allerdings gaben CORNBLEET ET AL. an, daß sich die Sensitivität steigern ließ, wenn der Prozentsatz der zu erkennenden abnormen Zellen angehoben wurde; so z.B. die Grenze der atypischen Zellen von einem auf fünf Prozent.

WARNER und REARDON<sup>3</sup> sowie FIALON ET AL.<sup>98</sup> machten in ihren Vergleichsstudien auch die Beobachtung, daß bei einer geringen Dichte von morphologisch abnormen Zellen der Coulter STKS diese wohl nicht erkennt und deshalb keine Signalisierung erfolgt. Eine unzureichende Signalisierung am Coulter VCS wurde von LOTZ ET AL.<sup>44</sup> ebenfalls bei Linksverschiebungen mäßigen Grades bemängelt.

In einem Fall wurde in unserer Untersuchung vom Coulter VCS ein in der mikroskopischen Differenzierung festgestellter Blastenanteil von vier Prozent nicht gekennzeichnet. Es handelte sich hierbei um eine grenzwertig leukopenische Blutprobe, so daß diese der mikroskopischen Kontrolle nicht entgangen wäre. Auch WARNER und REARDON<sup>3</sup> beobachteten in ihrer Untersuchung am Coulter STKS eine fehlende Signalisierung bei mikroskopischem Blastennachweis; auffällig waren diese Blutproben jedoch in einem Fall wegen Panzytopenie, in einem weiteren Fall lag eine Anämie mit Thrombozytopenie vor.

Die Rate an falsch-negativen Befunden lag in unseren Untersuchungen am Coulter VCS – Neugeborenenblutproben ausgenommen – zwischen 13 und 16%. BARNARD ET AL.<sup>62</sup> konnte beim Coulter VCS falsch-negative Signalisierungsraten von 12.2% feststellen. WARNER und REARDON<sup>3</sup> fanden lediglich eine falsch-negative Rate von 6.2%.

Eine sehr niedrige Rate an falsch-negativen Befunden und eine dementsprechend gute Sensitivität konnten KATZ ET AL.<sup>48</sup> in ihrer Vergleichsstudie für das Coulter VCS nachweisen. Dort wurden allerdings 31.6% der gemessenen Blutproben unnötigerweise durch das Gerät als kontrollbedürftig gekennzeichnet. In der gleichen Studie zeigte der Technicon H\*1 deutlich niedrigere Raten an falsch-positiven Befunden, nämlich 23.8%, und eine falsch-negative Rate von nur 18%. SWAIM ET AL.<sup>2</sup> fanden in ihrer Vergleichsstudie zwischen dem Technicon H\*1 und Coulter VCS eine ähnliche Signalisierungsrate der beiden Analysensysteme bei deutlich schlechterer Sensitivität am Technicon H\*1 als beim Coulter VCS, so daß sich in dieser Studie der Coulter VCS als das eindeutig effizientere Analysegerät zeigte.

Auch PUM ET AL.<sup>99</sup> ermittelten in ihrer Untersuchung beim Coulter VCS geringe falsch-negative Raten bei einer initial höher angegebenen Rate an falsch-positiven Be-

---

<sup>e</sup>Dieses Gerät erstellt das Differentialblutbild ebenfalls mittels VCS-Technologie.

funden (20.2%). Nach kritischer Durchsicht der Präparate konnte hier die Rate an falsch-positiven Befunden auf 8% reduziert werden, da sich noch Linksverschiebungen nachweisen ließen, welche zunächst wohl durch die Untersucher am Mikroskop nicht erkannt wurden.

#### **Technicon H\*1**

Die mit Werten zwischen 80 und 85% relativ niedrigere Spezifität, die wir für den Technicon H\*1 in diesen Altersstufen nachweisen konnten, ergab sich auch in anderen Vergleichsstudien.<sup>2,31,51</sup>

Bei insgesamt hohen Signalisierungsraten war die Sensitivität am Technicon H\*1 in den Altersgruppen „Kinder, 1.–5. Jahr“ und „Kinder ab 5 Jahren“ sogar etwas besser als beim Sysmex NE8000 und lag im Vergleich zum Coulter VCS auch in diesen Altersgruppen leicht über den dort erhobenen Sensitivitäten. Aufgrund höherer falsch-positiver Signalisierungsraten (bis zu 30%) waren die Spezifitäten beim Technicon H\*1 schlechter als bei den anderen Analysesystemen, so daß die Effizienz in diesen Altersgruppen am Technicon H\*1 schlechter war als beim Sysmex NE8000 und am Coulter VCS. Die Sensitivitäten erreichten für den Technicon H\*1 zwischen 70 und 83%. Somit wurden pathologische Blutbilder durch die Streulicht-zytochemische Methode befriedigend erkannt.

Die Rate an falsch-negativen Befunden betrug beim Technicon H\*1 zwischen 12 und 16%. Ein ähnliches Ergebnis ermittelten auch HABERMANN ET AL.<sup>64</sup> in ihrer Studie am Technicon H\*1, nämlich eine falsch-negative Rate von 12%. Im Gegensatz dazu gab ETAVARD<sup>31</sup> für die falsch-negative Rate am Technicon H\*1 einen Wert von 30% an. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß sich in ihrer Untersuchung – wie auch in unserer Studie – vor allem reaktive Linksverschiebungen fanden, wobei die Grenze von Etavard bei fünf Prozent stabkernigen Granulozyten gezogen wurde, während in unserer Studie eine Blutprobe, gemäß der Festlegung durch RÜMKE, erst ab einer Anzahl von zehn Prozent stabkerniger Granulozyten als „sicher pathologisch“ galt.<sup>20</sup>

KLOSSON<sup>61</sup> konnte in seiner Untersuchung nachweisen, daß der Technicon H\*1 morphologische Abnormitäten in 55 bis 100% der Fälle signalisiert. Beim Coulter VCS war dies in 50 bis 75% der Fall.

Dabei konnte KLOSSON<sup>61</sup> zeigen, daß Blutproben mit Veränderungen des weißen Blutbildes im Rahmen hämatologischer Grunderkrankungen sicherer erkannt wurden als Blutproben mit reaktiver Linksverschiebung und sogenannten „lymphatischen Reizformen“. Dieses Phänomen konnten auch wir in unserer Untersuchung bei den falsch-negativen Blutproben am Technicon H\*1, ebenso beim Sysmex NE8000 und Coulter VCS feststellen.

Bei den falsch-negativen Befunden fanden sich in unserer Studie vor allem reaktive Linksverschiebungen mit zum Teil sogar erheblichen Anteilen an stabkernigen Granulozyten, bei allerdings nur geringen Anteilen an Myelozyten. Blasten oder höhere Anteile von Plasmazellen wurden vom Technicon H\*1 auch in unserer Untersuchung, wie bereits durch andere Autoren bestätigt,<sup>31,89,100</sup> durch den Technicon H\*1 sehr sicher erkannt.

BENTLEY ET AL.<sup>76</sup> konnten beim Technicon H\*2, dem Nachfolgegerät des Technicon H\*1 im Vergleich zum Coulter STKS und Sysmex NE8000 beim Technicon-Gerät die niedrigste Rate an falsch-negativen Befunden feststellen. Dabei waren allerdings generell hohe Signalisierungsraten und somit höhere Anteile von falsch-positiven Befunden als bei den beiden anderen Analysegeräten zu beobachten.

Im krassen Gegensatz dazu sowie zu unseren Ergebnissen stehen die Befunde von SWAIM ET AL.<sup>2</sup> Bei hohen falsch-negativen Raten mit über 50% am Technicon H\*1 und einer nur schlechten Sensitivität von 41.2% war die Effizienz deutlich schlechter als die des Vergleichsgerätes Coulter VCS.

Bei geringer Spezifität, allerdings deutlich besserer Sensitivität als in der vorgenannten Studie, war die Effizienz des Technicon H\*1 in unserer Untersuchung – ausgenommen der Neugeborenenblutproben – befriedigend bis gut und kaum weniger effizient in seiner Einsetzbarkeit als die beiden anderen von uns geprüften Analysensysteme.

#### **Sysmex NE8000**

Beim Sysmex NE8000 konnten wir in diesen Altersstufen Spezifitäten zwischen 86 und 95% errechnen, welche etwas niedriger als beim Coulter VCS, aber leicht besser waren als beim Technicon H\*1.

HALLAWELL ET AL.<sup>7</sup> und VAN WERSCH ET AL.<sup>6,37</sup> zeigten in ihren Untersuchungen an Erwachsenen ähnlich befriedigende bis gute Ergebnisse am Sysmex NE8000 bezüglich der Erkennung von unauffälligen Blutproben. Auch BENTLEY ET AL.<sup>76</sup> fanden in ihrer Vergleichsstudie zwischen vier verschiedenen Differenzierungsgeräten die niedrigste Rate von falsch-positiven Befunden (15.9%) für den Sysmex NE8000 im Gegensatz zu unseren Untersuchungen. Die höchste Rate an falsch-positiven Befunden (31.7%) wurde beim Technicon H\*2 festgestellt.

Bei guter Spezifität mit einer entsprechend geringen Rate an falsch-positiven Befunden fand sich in der Studie von BENTLEY ET AL.<sup>76</sup> im Gegensatz zu unseren Ergebnissen am Sysmex NE8000 eine sehr hohe Rate an falsch-negativen Befunden, nämlich 61.5%. Mit durchschnittlichen Werten von 49% an falsch-negativen Befunden waren die Ergebnisse bei den drei weiteren untersuchten Analysensystemen Coulter STKS, Technicon H\*1, Cell-dyn-3000 ebenfalls schlecht (BENTLEY ET AL.<sup>76</sup>). BRIGDEN ET AL.<sup>101</sup> konnten am Sysmex NE8000 demgegenüber eine sehr gute Spezifität mit 96% zeigen, bei einer zufriedenstellenden Sensitivität von 87%. Hierbei wurden wie in unserer Untersuchung und in anderen Studien reaktive Linksverschiebungen sowie kleinere Anzahlen von atypischen Zellen und morphologische Abnormalitäten, wie z.B. hypersegmentierte neutrophile Granulozyten oder atypische Lymphozyten, nicht sicher signalisiert. BRIGDEN ET AL.<sup>102</sup> geben hierzu allerdings zu bedenken, daß eine klinische Relevanz für solche Veränderungen dann nicht besteht, wenn alle übrigen hämatologischen Parameter unauffällig sind.

Während die Sensitivität in unserer Studie am Sysmex NE8000 bei den Neugeborenenblutproben und auch noch bei den Säuglingsblutproben gute Werte erreichte, fanden sich in den beiden anderen Altersstufen weniger befriedigende Ergebnisse. So konnte

bei den Säuglingsblutproben noch eine Sensitivität von 86% nachgewiesen werden; im Gegensatz dazu fanden sich bei den Altersgruppen „Kinder, 1.–5. Jahr“ sowie „Kinder ab 5 Jahren“ nur noch Sensitivitäten von 67%. Die hohe, bei Neugeborenenblutproben ermittelte Sensitivität kann als Folge der allgemein hohen Signalisierungsrate in dieser Altersgruppe angesehen werden.

Bei einer falsch-negativen Rate zwischen 18 und 24% am Sysmex NE8000 wurden in unserer Studie vor allem reaktive Linksverschiebungen nicht signalisiert, aber auch atypische Zellen und Plasmazellen nicht konsequent registriert.

BRIGDEN ET AL.<sup>101</sup> konnten in ihrer Studie am Sysmex NE8000 eine extrem geringe falsch-negative Rate von unter 5% bei einer Sensitivität von 87% feststellen; die Spezifität wurde mit 97% beziffert. Hierbei wurden, allerdings bei einer sehr großen Untersuchungsanzahl, in zwei Fällen Blasten übersehen sowie reaktive Linksverschiebungen nicht immer sicher markiert.

### 4.3 Treffsicherheit von Warnsignalen

Neben der Frage, wie zuverlässig pathologische Veränderungen der Leukozyten signalisiert werden, stellt sich umgekehrt die Frage, wie treffsicher Signale auf pathologische Veränderungen hinweisen.<sup>48</sup> Hier wurde untersucht, mit welcher Zuverlässigkeit ein durch das Analysegerät gesetztes Signal auf nachweisbare pathologische Blutzellen hinweist.

#### 4.3.1 Erkennung von reaktiven Linksverschiebungen

Unter einer Linksverschiebung versteht man die Vermehrung von unreifen neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut, die in der Regel bei einer reaktiven Linksverschiebung nicht über eine Vermehrung der stabkernigen Granulozyten und Metamyelozyten hinausgeht. In schweren Fällen können auch vereinzelt Myelozyten auftreten.

Da man eine reaktive Linksverschiebung im Verlauf der meisten bakteriellen Infektionskrankheiten – insbesondere bei einer Sepsis – beobachtet, ist das Ausmaß der Linksverschiebung von erheblicher Bedeutung.<sup>30,53</sup> Des Weiteren ist eine Linksverschiebung auch bei malignen Tumoren in fortgeschrittenen Stadien zu finden.

Da bei Neugeborenen und Säuglingen in den ersten Lebenswochen die Grenze der Leistungsfähigkeit des Knochenmarks rascher erreicht ist, kann in der Linksverschiebung ein wichtiger Hinweis auf eine Sepsis vorliegen.<sup>90,103,104</sup> Außerdem ist bei vielen Virusinfektionen eine Verminderung der neutrophilen Granulozyten häufig, wobei die Neutrophilen eine Linksverschiebung zeigen können.<sup>90</sup>

„Stabkernige“ und „Segmentkernige“ werden jedoch nicht überall gleich definiert. Mancherorts spricht man von Segmentkernigen erst dann, wenn die Verbindung zwischen den Segmenten fadenförmig wird, und nicht schon, wenn die Brücke schmaler als ein Drittel des größten Durchmessers eines Kernsegmentes ist.<sup>77</sup> Nach BEGEMANN und RASTETTER<sup>65</sup> ist von einem „Segmentkernigen“ auszugehen, wenn die Brücke zwischen

zwei Kernsegmenten ein Drittel oder weniger der benachbarten Segmentdurchmesser ausmacht.

In unserer Untersuchung wurden in allen Altersgruppen und bei allen drei unterschiedlich arbeitenden Differenzierungsgeräten reaktive Linksverschiebungen nur sehr unzuverlässig signalisiert. Bei allen drei Analysegeräten wurde eine Unterteilung in stabkernige und segmentkernige Granulozyten nicht vorgenommen; beide Subpopulationen werden als „Neutrophile“ gemeinsam erfaßt. Die nur unzureichende Signalisierung von Linksverschiebungen konnte auch in anderen Vergleichsstudien nachgewiesen werden.<sup>2,101,105,106</sup> Signalisierung von Linksverschiebung erfolgt jedoch auch aufgrund des Vorhandenseins von Myelozyten, Pro- und Metamyelozyten, die als atypische Zellen der myeloproliferativen Reihe erkannt werden.

#### **Coulter VCS**

Wie bereits erwähnt, gibt der Coulter VCS zusätzlich zur „Positiv-Markierung“ einer pathologischen Blutprobe durch spezielle „Flags“ weitere Informationen. Da es sich hier jedoch nur um eine auffällige Lage von Diskriminatoren handelt, erfolgt kein dezidierter Hinweis auf pathologische Zellen; stattdessen werden sogenannte „X-Flags“ gesetzt, welche Rückschlüsse auf eine bestimmte Art von pathologischen Zellen zulassen.

Der „Flag X5“ mit Hinweis auf eine Linksverschiebung oder auf Vorstufen der myeloischen Reihe wurde in unserer Untersuchung besonders dann vorgefunden, wenn sich eine Leukozytose beziehungsweise eine absolute oder relative Neutrophilie nachweisen ließ. Da dies häufig mit einer reaktiven Linksverschiebung verbunden ist, wurden Blutbilder mit pathologischen Leukozytenzahlen und reaktiven Linksverschiebungen sehr sicher markiert. Im Gegensatz dazu wurden bei normalen Leukozytenzahlen und -populationen Linksverschiebungen durch den Coulter VCS wesentlich seltener gekennzeichnet und stabkernige Granulozyten mit Prozentsätzen von bis zu 29% nicht gemeldet. Allerdings wurden Blutbilder ohne reaktive Veränderungen bei bestehender Neutrophilie falsch-positiv markiert.

CORNBLEET ET AL.<sup>97,107</sup> konnten in ihrer Untersuchung für den Coulter STKS, mit einer Weiterentwicklung der VCS-Technologie eine Sensitivität für die Erkennung von unreifen Granulozyten und reaktiven Linksverschiebungen von 67% demonstrieren. Allerdings wurde hier auch eine überarbeitete Software mit einem neuen Algorithmus für die Signalisierung von Linksverschiebungen und unreifen Granulozyten benutzt.

KLOSSON<sup>61</sup> machte am Coulter VCS und auch am Technicon H\*1 die Beobachtung, daß Blutproben mit Veränderungen des weißen Blutbildes im Rahmen hämatologischer Grunderkrankungen sicherer erkannt wurden als Blutproben mit reaktiver Linksverschiebung.

LOTZ ET AL.<sup>44</sup> fielen am Coulter VCS bei falsch-negativen Befunden auf, daß es sich hier vor allem um mäßiggradige Linksverschiebungen handelte. JOHANNESSEN ET AL.<sup>47</sup> konnten nur eine geringe Korrelation zwischen den Signalisierungsraten von Linksverschiebungen an den Analysegeräten Coulter VCS und Technicon H\*1 nachweisen. Ähnlich unbefriedigend war auch die Erkennung von Erythroblasten. VERHEUL ET AL.<sup>8</sup>

fanden im Gegensatz zu diesen Studien eher hohe falsch-positive Raten beim Coulter STKS.

#### **Technicon H\*1**

Wie bereits vorne ausgeführt, werden im Basophilen-Kanal des Technicon H\*1, basierend auf einer Streulichtanalyse in zwei Winkelbereichen, die Kerne der Leukozyten mit Ausnahme der basophilen Granulozyten, in eine rundkernige (MN) und segmentkernige (PMN) Population unterteilt, woraus der Lobularitätsindex errechnet wird, welcher als Grundlage für die morphologischen Signalgebung „Linksverschiebungen und unreife Granulozyten“ gilt. Zusätzlich wird der durch das Analysegerät errechnete mittlere Peroxidaseindex (MPXI) der Blutprobe herangezogen.

Bezüglich der spezifischen Signalgebung bei reaktiver Linksverschiebung war die Übereinstimmung am Technicon H\*1 mit der mikroskopischen Referenzmethode in unseren Untersuchungen nicht zufriedenstellend. ROSS ET AL.<sup>108</sup> stellten in ihrer Arbeit an Erwachsenenblut sogar keine Korrelation zwischen der Anzahl stabkerniger Granulozyten und dem LI (Kernsegmentierungsindex oder auch Lobularitätsindex) fest.

Häufig wurde allerdings in unserer eigenen Studie durch andere Signale auf die pathologische Blutprobe aufmerksam gemacht. Im übrigen ist in Übereinstimmung mit ETAVARD<sup>31</sup> festzustellen, daß das Ausmaß einer Linksverschiebung, wie sie sich unter dem Mikroskop präsentierte, häufig nicht mit der Abstufung des Gerätesignals (LV + bis +++) im Einklang stand. Die Rate an falsch-positiven Hinweisen auf eine Linksverschiebung wurde von ETAVARD<sup>31</sup> mit 50% extrem hoch angegeben, was wir in unserer Studie nicht beobachten konnten. Bestätigen konnten wir dagegen, daß bei etwa 30% der Proben mit einer reaktiven Linksverschiebung keine Markierung mit diesem speziellen Signal erfolgte.

Da in einer Studie von SWAIM ET AL.<sup>2</sup> vor allem stabkernige und unreife Granulozyten durch den Technicon H\*1 nicht festgestellt wurden, legt dies den Schluß nahe, daß dem Technicon H\*1 wohl ein Algorithmus zur Erkennung unreifer Granulozyten und/oder Linksverschiebungen fehlt.<sup>2</sup> Ähnlich schlechte Erkennung von reaktiven Linksverschiebungen anhand der Streulicht-zytochemischen Methode am Technicon H\*1 fanden auch MARTI ET AL.,<sup>63</sup> weshalb eine zu grobe Einstellung der Softwareparameter des Gerätes vermutet wurde.

Auch WENZ ET AL.<sup>106</sup> konnten in ihrer Studie keine Übereinstimmung von stabkernigen Granulozyten im mikroskopisch erstellten Differentialblutbild und dem gesetzten Signal „Left Shift“ durch den Technicon H\*1 finden. Sie geben jedoch zu bedenken, daß die automatische Bestimmung der Leukozytenzahl am Technicon H\*1 wesentlich genauer und sicherer ist als am Mikroskop. Da eine Leukozytose und eine Neutrophilie physiologische Antworten auf Stimuli wie Stress, Entzündung und Trauma sind, welche auch die stabkernigen Granulozyten im peripheren Blutbild erhöhen, seien dies sichere Parameter als Hinweis auf eine Infektion.<sup>109-111</sup> Tatsächlich änderten sich in deren Studie bei den meisten klinisch signifikanten Fällen das Differentialblutbild parallel mit der Änderung der totalen Leukozytenzahl.<sup>106</sup>

JOHANNESSEN ET AL.<sup>47</sup> fanden ebenfalls nur eine schlechte Erkennung einer Linksverschiebung bei Neugeborenenblutproben durch den Technicon H\*1. SCHNEIDER<sup>100</sup> hingegen wies in seiner Untersuchung besonders auf die detaillierten quantitativen und qualitativen Hinweise auf die wesentlichen pathologischen Zellen durch den Technicon H\*1 hin.

Nach FEHR<sup>112</sup> kann der Technicon H\*1 Linksverschiebungen zuverlässiger erkennen, wenn das Blut möglichst frühzeitig nach Blutentnahme vom Analysegerät untersucht wird.

HABERMANN<sup>64</sup> sieht wie andere Untersucher die unterschiedlichen Ergebnisse am Technicon H\*1 beim Erkennen bezüglich von reaktiven Linksverschiebungen unter anderem als Folge der individuellen Beurteilung von stabkernigen Granulozyten durch den Mikroskopierenden. Nach HABERMANN sollte zur sicheren Erkennung einer Linksverschiebung nicht nur das spezifische „L.VERSCH.-Signal“ sondern alle übrigen Nachdifferenzierungs-Kriterien beachtet werden.<sup>64</sup>

VAUPEL<sup>95</sup> konnte beim Technicon H\*1 eine recht zuverlässige Erkennung von (reaktiven) Linksverschiebungen finden; er stellte allerdings die Frage, welche Konsequenz aus klinischer Sicht das Übersehen einer marginalen Linksverschiebung mit einer geringen Anzahl von stabkerniger Granulozyten hat. Andererseits gab er zu bedenken, daß unabhängig von der Signalgebung eine Neutrophilie oder Leukozytose allein schon eine mikroskopische Nachuntersuchung veranlassen sollte.

#### **Sysmex NE8000**

Auch der Sysmex NE8000 zeigte bei der Signalisierung von reaktiven Linksverschiebungen deutliche Schwächen. Selbst bei einer großen Anzahl von stabkernigen Granulozyten wurde in einigen Fällen eine Signalisierung vermißt. Auch mit diesem Analysegerät war die Kennzeichnung von reaktiven Linksverschiebungen besser, wenn zusätzlich Myelozyten oder andere Vorstufen im mikroskopischen Differentialblutbild nachzuweisen waren. Die Signalisierung solcher Proben kam dann wohl dadurch zustande, daß die Zellen nicht in eine der vorgegebenen Kategorien zugeordnet werden konnten.

HALLAWELL ET AL.<sup>64</sup> zeigten in ihrer Untersuchung am Sysmex NE8000 eine befriedigende Signalisierung bei mikroskopisch festgestellter Linksverschiebung. Bei 43 Fällen mit nachgewiesener Linksverschiebung waren allerdings 42 mit Hinweis auf andere Abnormalitäten geflaggt und somit einer Kontrolle nicht entgangen. Auf eine Linksverschiebung wurde durch das Analysegerät dabei nicht hingewiesen, sie wurde somit wohl nicht anhand der Stabkernigen erkannt. Auffällig war in dieser Studie, wie auch in unserer Untersuchung, daß das „Left Shift“-Signal besonders häufig bei Vorliegen einer Neutrophilie gesetzt wurde.

BRIGDEN ET AL.<sup>101</sup> stellten in ihrer Studie am Sysmex NE8000 ebenfalls fest, daß selbst höhere Anzahlen von stabkernigen Granulozyten durch das Analysegerät nicht konsequent signalisiert wurden. Die klinische Relevanz dieser Abnormalität ohne gleichzeitige Veränderungen von weiteren hämatologischen Parametern wurde allerdings in Frage gestellt.<sup>102,113</sup> In Übereinstimmung mit WENZ ET AL.<sup>106</sup> kann davon ausgegangen

werden, daß in den meisten Fällen einer erhöhten Anzahl von stabkernigen Granulozyten die fünf typischen Leukozytenpopulation abnormal verteilt sind; dies geht oft mit einer Vermehrung der neutrophilen Granulozyten und einer Leukozytose einher.<sup>102</sup>

Da in vielen Fällen durch Bestimmungen von Akut-Phase-Proteinen, wie dem C-reaktiven Protein oder auch der Leukozyten-Elastase eine hohe Sensitivität für das Erkennen von akut entzündlichen Vorgängen erreicht wird, hat die Erkennung einer Linksverschiebung an Bedeutung eingebüßt. Es gilt jedoch weiterhin, daß die zuverlässigste Detektion von Vorstufen der Granulopoese bei entsprechender Indikation die Domäne des Mikroskops geblieben ist.<sup>31, 48, 106</sup>

#### 4.3.2 Erkennung von Toxischen Granulationen und DÖHLE-Körperchen

Unter den qualitativen Veränderungen der Granulozyten kommt den toxischen Granulationen eine besondere Bedeutung zu. Hierbei finden sich mittelgrobe, meist dunkelviolet gefärbte Granula im Zytoplasma. Sie kommen bei allen schweren Infektionen (z.B. Sepsis) oder toxischen Prozessen vor, die die Zellproliferation im Knochenmark beeinflussen. Aus Anzahl und Größe der Granula kann man bestimmte Rückschlüsse auf die Schwere des vorliegenden Krankheitsbildes ziehen. Die toxischen Granulationen sind einerseits als Reste der promyelozytären Granulation, andererseits aber als Ausdruck der Zellschädigung zu werten.<sup>53</sup>

DÖHLE-Körperchen findet man als „blaue Schlieren oder Flecken“ im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten, welche vorwiegend am Rand der Zellen liegen. Es handelt sich hierbei um Reste des noch nicht vollständig ausgereiften und deshalb noch basophilen Plasmas der Vorstufen (RNS-Reste), also um ein Zeichen überstürzter Reifung. Sie treten besonders im Verlauf von Infektionen, bei Verbrennungen und während zytostatischer Therapie auf.<sup>53</sup> Weiterhin können DÖHLE-Körperchen auch bei der CHEDIAK-HIGASHI-Anomalie und bei der MAY-HEGGLIN-Anomalie nachgewiesen werden, wahrscheinlich als Ausdruck einer partiellen plasmatischen Reifungsstörung.<sup>53</sup>

Häufig ist eine ausgeprägte Linksverschiebung mit einer toxischen Granulation und dem Auftreten von DÖHLE-Körperchen verbunden.

Allen drei Analysegeräten fehlt diesbezüglich ein spezieller Erkennungs- beziehungsweise Signalisierungsmodus. Da es sich hierbei jedoch um pathologisch veränderte Leukozyten mit diagnostischem Wert handelt, sollte auch ohne spezifische Zuordnung der betreffenden Zellen eine Signalisierung der Blutprobe erfolgen.

Am Coulter VCS konnte beobachtet werden, daß bei stärkerer toxischer Granulation zwar eine Differenzierung der Leukozyten vorgenommen, allerdings häufig nur eine geringere Anzahl von Leukozyten in die Differenzierung einbezogen wurde. Dies wurde auch im Ausdruck durch die geringere Zahl an differenzierten Zellen sowie dem Signal „INCOMPLETE“ angegeben. Auffällig war, daß Blutproben mit unreifen Granulozyten im Sinne einer reaktiven Linksverschiebungen bei Auftreten von toxischen Granulationen oder DÖHLE-Körperchen sicherer markiert wurden als bei bloßem Vorfinden von stabkernigen Granulozyten. Es fanden sich die Signale von „X2“ bis „X7“.

Auch durch den Technicon H\*1 wurden reaktive Linksverschiebungen sicherer signalisiert, wenn weitere Abnormitäten wie eine toxische Granulation oder DÖHLE-Körperchen zusätzlich vorlagen. Häufig wurde in solchen Fällen durch den Technicon H\*1 der Flaghinweis „Atypische Zellen“ gegeben.

In ähnlicher Weise traf dies für den Sysmex NE8000 zu. Häufig wurden hier die Signale mit Hinweis auf Blasten, Linksverschiebung oder unreife Vorstufen gegeben. Allerdings wurden auch durch den Sysmex NE8000 wie durch die beiden anderen Analysensysteme Proben mit toxische Granulationen und DÖHLE-Körperchen in einigen Fällen nicht markiert.

Bei mikroskopischem Nachweis einer toxischen Granulation bzw. von DÖHLE-Körperchen erfolgte durch den Coulter VCS eine Signalgebung am häufigsten, nämlich in ca. 75% aller Fälle, während der Technicon H\*1 und der Sysmex NE8000 hier seltener signalisierten.

Inwieweit die toxische Granulation selbst oder weitere Abnormitäten der Blutproben für die Signalisierung verantwortlich waren, konnte nicht geklärt werden. In einigen Fällen zeigten die Blutproben nur eine leichte toxische Granulation, trotzdem wurden diese markiert. In anderen Fällen fanden sich zwar schwere Veränderungen, es kam aber keine Signalgebung zustande.

#### 4.3.3 Erkennung von atypischen Lymphozyten

Eine Besonderheit des Kindesalters ist die Häufigkeit, mit der lymphatische Reizformen und Plasmazellen im Blut auftreten. Reizformen, welche morphologisch recht unterschiedlich sind und als atypische Lymphozyten oder Lymphoidzellen bezeichnet werden, sieht man vor allem bei den im Kindesalter häufigen Virusinfektionen. Jedoch sind diese lymphatischen Reizformen nicht nur bei Virusinfektionen, sondern auch bei septischen Prozessen und Verbrennungen nachweisbar.<sup>90</sup>

#### Coulter VCS

Blutproben mit gehäuften Vorkommen von lymphatischen Reizformen beziehungsweise nacktkernigen Lymphozyten oder jugendlichen Formen von Lymphozyten wurden am Coulter VCS relativ seltener signalisiert als Blutproben, bei denen toxische Granulationen beziehungsweise DÖHLE-Körperchen vorlagen. Häufig konnte hier ebenfalls nur eine geringere Anzahl von Leukozyten zugeordnet werden, so daß in der vorgegebenen Zeit, in welcher der Coulter VCS sein Differentialblutbild normalerweise erstellte, keine Differenzierung von ca. 8000 Zellen möglich war. Entweder wurden diese Blutproben ohne Signalisierung nur mit dem Hinweis auf eine zu geringe differenzierte Anzahl von Blutzellen, dem Signal „INCOMPLETE“ versehen, oder es erfolgte zusätzlich eine Signalisierung durch unterschiedliche „Flags“.

Überproportional häufig wurde der Flag „X7“ bei Neugeborenenblutproben, aber auch noch in der Gruppe „Säuglinge“ gefunden. Dieser Diskriminator weist auf verschobene Lymphozytenpopulationen, unter anderem aber auch auf Plasmazellen hin. Bei

so gekennzeichneten Blutbildern konnten oft lymphatische Reizformen beziehungsweise nacktkernige Lymphozyten in größerer Anzahl nachgewiesen werden. Häufig war dieses Signal mit anderen „Flags“ vergesellschaftet.

Auch hier ist die geringere Anzahl der differenzierten Zellen so zu verstehen, daß eine Zuordnung der veränderten Blutzellen, welche das Analysegerät „so nicht kennt“, nicht gelingt. Die Blutprobe ist hiermit als pathologisch zu werten, auch wenn kein zusätzlicher Flag gegeben wurde.

WARNER und REARDON<sup>3</sup> sowie Cornbleet et al<sup>97</sup> stellten auch in ihren Studien am Coulter VCS beziehungsweise Coulter STKS einen „Mangel“ bezüglich der Erkennung von Blutproben bei mikroskopischem Nachweis von lymphoiden Zellen oder reaktiven Lymphozyten fest.

#### **Technicon H\*1**

Mikroskopisch erhobene Befunde wie lymphatische Reizformen sowie große monozytäre Reizformen wurden durch den Technicon H\*1 sehr sicher markiert. Häufig wurde das Signal „atypische Zellen“ gegeben, gelegentlich in solch einem Fall auch der Flag „Blasten“ gesetzt. Hier fand sich oft eine erhöhte LUC-Wert. Da in Fällen mit veränderten Lymphozyten eine eindeutige Zuordnung der Lymphozyten nicht immer möglich war, zeigte der quantitative Vergleich hier schlechtere Korrelationen, wie bereits weiter vorne erwähnt wurde.

#### **Sysmex NE8000**

Die Signalgebung war bei Auftreten von atypischen Lymphozyten durch den Sysmex NE8000 sehr unterschiedlich. Es wurden die Signale „Left shift“ und „Blasts“ gefunden, seltener das eigentliche Signal „Atypical Lymph“. Auffällig war, daß Blutproben mit Nachweis von lympho-monozytären Reizformen sowie jugendlichen Lymphozyten eher mit dem Hinweis „Immature Gran“ versehen wurden; bei Blutproben mit Nachweis von nacktkernigen Lymphozyten fand sich dagegen öfter der Hinweis „Atypical Lymph“. Hier orientiert sich das Analysegerät bei der Signalgebung unter anderem wohl auch an der Größe der pathologischen Zelle.

#### **4.3.4 Blasten**

Blasten, welche unreife Vorstufen beziehungsweise wenig differenzierte Stadien der Granulozytopoese darstellen, kommen bei unterschiedlichen Leukosen vor, weshalb ihre Erkennung und Signalisierung von außerordentlicher Bedeutung sind.

#### **Coulter VCS**

Beim Coulter VCS wurde das Flag „X6“, das als Blastenhinweis gewertet werden kann, bei Vorkommen von Blasten in über 50% der Fälle beobachtet; fand sich jedoch auch bei Nachweis atypischer Zellen und von Normoblasten sowie von stabkernigen Granulozyten, so daß in diesem Diskriminator kein spezifischer Hinweis gesehen werden konnte.

VERHEUL ET AL.<sup>8</sup> konnten am Coulter STKS, welcher im Vergleich zum Coulter VCS genauere Angaben bezüglich der pathologischen Zellen vornimmt, bei Neugeborenenblutproben ebenfalls häufig das Blastensignal beobachten, obwohl kein mikroskopischer Blastennachweis vorlag. Aber auch bei den Erwachsenenblutproben stellten VERHEUL ET AL.<sup>8</sup> im Falle einer Blastensignalgebung durch den Coulter STKS nur bei einem geringen Anteil Blasten in der mikroskopischen Befundung fest. Besser war in ihrer Studie die Übereinstimmung bei dem Flag „Variant lymphs“, wo von 84 gekennzeichneten Proben 73 durch die mikroskopische Methode bestätigt wurden.

#### **Technicon H\*1**

Dem Blastensignal beim Technicon H\*1 wurde in einigen Arbeiten eine besondere Sensitivität und Spezifität zugesprochen.<sup>114,115</sup> Auch in unserer Arbeit wurden durch den Technicon H\*1 keine Blasten übersehen, allerdings konnte das Blastensignal nicht nur bei mikroskopischem Nachweis von Blasten gefunden werden. Da das Blastensignal vor allem durch eine Erhöhung des LUC-Wertes in Zusammenhang mit der Laserstreulicht-Analyse der Leukozytenkerne im Basophilenkanal entsteht und bei Neugeborenenblutproben dieser LUC-Wert häufig überschritten wurde, war das Blastensignal in dieser Altersgruppe sehr häufig vorzufinden, auch wenn keine Blasten im mikroskopischen Blutbild festgestellt werden konnten. Von insgesamt 50 gemessenen Neugeborenenblutbildern am Technicon H\*1 wurden 16 und (damit 32% aller Blutbilder) mit einem Blastensignal versehen, obwohl nur in zwei Fällen ein Blastennachweis mikroskopisch geführt werden konnte. Häufig waren in den so markierten Blutbildern jedoch vermehrt lymphozytäre Reizformen und nacktkernige Lymphozyten vorzufinden. In den Altersgruppen „Kinder, 1.–5. Jahr“ sowie „Kinder ab 5 Jahren“ wurde das Blastensignal dann nur noch sehr vereinzelt nachgewiesen, wenn kein mikroskopischer Blastennachweis erfolgen konnte.

KLINKE ET AL.<sup>116</sup> zeigten bezüglich des Blastensignals eine deutlich verbesserte Spezifität, wenn Blutproben mit Leukopenien ( $< 1 \cdot 10^9/l$ ) aus der Untersuchung herausgenommen wurden. So stammte in ihrer Untersuchung die Mehrzahl der falsch-positiven Blastensignale (63%) von Patienten mit einer Leukopenie. Welche Zellen ursächlich zum Blastensignal geführt hatten, konnte nicht festgestellt werden. Man vermutet als Ursache T-Suppressor-Lymphozyten, welche im LUC-Feld identifiziert werden, wie schon LINCH ET AL.<sup>117</sup> und MARTIN ET AL.<sup>118</sup> beschrieben haben. Auch ETAVARD<sup>31</sup> konnte bei reaktiv veränderten Lymphozyten Interferenzen mit dem Blastensignal nachweisen. Bei Niereninsuffizienz, toxisch bedingten Leukopenien sowie nach Chemotherapie solider Tumoren wurde das Blastensignal gehäuft beobachtet, ohne daß sich dieser Hinweis mikroskopisch bestätigen ließ. Auch zeigte sich in solchen Fällen eine Instabilität des Blastensignals bei Mehrfachanalysen derselben Blutprobe.<sup>31</sup> Allerdings ermittelte ETAVARD<sup>31</sup> in ihrer Studie ebenfalls eine gute Sensitivität des Blastensignals. Bei über 90% der leukämischen Blutproben sowohl der myeloischen wie auch der lymphatischen Reihe wurde das Vorliegen von Blasten in der Studie von ETAVARD<sup>31</sup> im Blut Erwachsener am Technicon H\*1 richtig signalisiert.

Die Nützlichkeit der automatisierten zytochemischen Analysatoren im Hinblick auf

das Erkennen einer geringen Anzahl zirkulierender Blasten im peripheren Blut wurde in Fällen von akuter Leukämie bereits durch verschiedene Untersucher gezeigt.<sup>105, 114, 115, 119</sup> Dabei demonstrierte D'ONOFRIO ET AL.,<sup>115</sup> daß der Technicon H\*1 zirkulierende Blasten im peripheren Blut erkannte, obwohl bei der konventionellen morphologischen Begutachtung unter dem Mikroskop kein Nachweis von Blasten erfolgte. Diese scheinbar „falsch-positiven“ Befunde gingen allerdings im Knochenmarksbefund mit leukämischen Infiltrationen einher.<sup>115</sup> ORAZI ET AL.<sup>120</sup> sah bei erhöhten LUC-Werten am Technicon H6000, dem Vorgängergerät des Technicon H\*1, in Fällen bei myelodysplastischem Syndrom ebenfalls eine geringe Anzahl von Blasten im peripheren Blut durch einen „Blastenexzess“ im Knochenmark bestätigt.

Auch BOLLINGER<sup>121</sup> beschrieb in ihrer Studie am Technicon H\*1 bei der Blastenerkennung eine Sensitivität von 100%, jedoch mit einer falsch-positiven Signalisierungsrate von 30 bis 40%. Diese hohe falsch-positiven Rate erklärte man sich hier durch das verwendete Patientengut, welches größtenteils aus Patienten mit hämatopoetischen Malignomen zum Teil nach Chemotherapie mit assoziierter Leukopenie, Neutropenie, relativer Lymphozytose und Monozytose bestand. Ebenfalls hohe falsch-positive Blastensignale am Technicon H\*1 wurden von SWAIM ET AL.<sup>2</sup> beschrieben, während FEHR<sup>112</sup> eher eine zurückhaltende Signalgebung bei Blasten, atypischen Lymphozyten oder Haarzellen feststellte.

#### **Sysmex NE8000**

Das Blastensignal konnte beim Sysmex NE8000 ähnlich wie beim Technicon H\*1 sehr häufig bei den Neugeborenenblutproben festgestellt werden.

Von insgesamt 81 gemessenen Neugeborenenblutproben am Sysmex NE8000 war bei 44 Blutproben (und damit bei 54%) am Sysmex NE8000 ein Blastensignal zu finden, häufig noch vergesellschaftet mit dem Signal „atypische Zellen“. Hierbei wurden alle durch die mikroskopische Differenzierung festgestellten Blasten in den Blutproben durch den Sysmex NE8000 signalisiert; ebenfalls war bei Nachweis von atypischen Zellen stets eine Signalisierung durch den Sysmex NE8000 erfolgt. Da aber nur bei sieben Blutbildern Blasten und nur bei fünf Blutbildern atypische Zellen mikroskopisch im übrigen vor allem reaktive Linksverschiebungen ohne „Left-Shift-Signal“ nachzuweisen waren, ist die Art der Signalgebung beim Sysmex NE8000 hier nicht als richtungsweisendes Signal zu verwerten. Da die hohe Signalisierung bei Neugeborenenblutproben durch die zum Teil unreiferen größeren Blutzellen sowie veränderten Lymphozyten erschwert ist, ist die Signalgebung vor allem in dieser Altersgruppe wenig aussagekräftig.

Ähnliche Beobachtungen konnten HALLAWELL ET AL.<sup>64</sup> in ihrer Untersuchung allerdings auch bei Erwachsenen machen. Häufig wurde eine pathologische Blutprobe durch den Sysmex NE8000 erkannt, jedoch stimmte das gesetzte Signal oft nicht mit den mikroskopischen Befunden überein. So wurde das Blastensignal in der Untersuchung in 20 Fällen angegeben, obwohl nur in vier Fällen ein Blastennachweis erfolgen konnte; bei den übrigen Blutproben fanden sich unreife Vorstufen von Granulozyten oder es handelte sich um Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen.

Wie bereits in mehrfachen Untersuchungen festgestellt, darf die Betrachtung nur eines Signals zur Beurteilung eines Blutbildes nie alleine verwertet werden.<sup>89</sup> Mit Recht formulierten WARNER und REARDON:<sup>3</sup>

„Es ist zweifelhaft, ob durch ein automatisches Differenzierungsgerät alle abnormalen Blutzellen sicher identifiziert und zugeordnet werden können.“

### 4.4 Probleme und Fehlerquellen bei der Probenpräparation

#### 4.4.1 Generelle Probleme und Fehlerquellen bei der Blutentnahme

Zwingender als in anderen Disziplinen ist in der Pädiatrie die Forderung nach Minimierung des Prüfungsmaterialaufwandes. Bei Neugeborenen – wie bereits eingangs erwähnt – wurde auch in unserer Studie Kapillarblut verwendet.

Ein Abnahmefehler durch starkes Drücken der Fingerbeere kann eine Verdünnung des zu entnehmenden Blutes durch Gewebsflüssigkeit zur Folge haben. Auf diese Weise ist ein Volumenfehler bis zu 15% möglich.<sup>30</sup> ZÖLLNER ET AL.<sup>122</sup> zeigten in ihren Untersuchungen, daß mit Kapillarblut anstelle von Venenblut nahezu alle klinisch-chemischen und hämatologischen Routineparameter ermittelt werden können, wenn Abweichungen der Resultate von bis zu 5% toleriert werden. Einschränkend wurde allerdings darauf hingewiesen, daß bei Patienten mit zentralisiertem Kreislauf sowie mit größeren Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt kein Kapillarblut für diagnostische Zwecke eingesetzt werden kann.

In einer Untersuchung von KUSE und HAUSMANN<sup>123</sup> konnte im Vergleich von EDTA-Venenblut zu Kapillarblutproben ein eindeutig höheres Zählergebnis der Leukozytenzahl und der zellulären Zusammensetzung festgestellt werden, wenn die ersten Blutstropfen aus dem Ohrläppchen oder der Fingerkuppe verglichen wurden. Aus diesem Grunde wurde gefordert, daß bei nicht zu umgehenden Kapillarblutentnahmen die ersten vier Blutstropfen nicht für die Leukozytenzählung verwendet werden sollen. Relativ vermehrt waren meist die Monozyten.<sup>78</sup>

Generell ist bei jeder Art der Blutgewinnung besonders darauf zu achten, daß es nicht zur Gerinnselbildung in der Blutprobe kommt. Auch Schaumbildung sollte bei der Abnahme verhindert werden, da es hierdurch zur Lyse vor allem der Erythrozyten kommt, wodurch das Ergebnis des kleinen Blutbildes verfälscht wird.<sup>17</sup> Fehlermöglichkeiten in der präanalytischen Phase können bei falscher Patientenvorbereitung und nicht berücksichtigtem Patientenstatus auftreten. Nach STATLAND<sup>110</sup> existieren sogar bei „normierter“ Blutabnahme individuell sehr verschiedene Referenzbereiche für Leukozyten und die verschiedenen Leukozytenpopulationen, die sich zum Teil nicht einmal überlappten. Nach seiner Ansicht hätte man einen empfindlicheren Index für „pathologische Werte“, wenn man diese individuellen Referenzbereiche zum Maßstab der klinischen Beurteilung machte und nicht den Referenzbereich eines Kollektivs. Die physiologischen Schwankungen der Leukozytenzahl sind insgesamt erheblich.<sup>77,110</sup> Fast alle biologischen Größen weisen circadiane und zum Teil auch jahreszeitliche Schwankungen auf.<sup>124</sup> Allerdings bringt

die zeitliche Standardisierung der Probennahme nur für die eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie die Meßgrößen Hämoglobin und Hämatokrit eine Verminderung der biologischen Streuung.<sup>110</sup>

#### 4.4.2 Fehlerquellen in der Blutausstrich-Präparation

Schwierigkeiten in der Zellzuordnung können durch unzureichende Vorbereitungen der Blutausstriche bezüglich der Ausstrichtechnik, Färbequalität und randomisierten Verteilungen der Zellen beim Ausstreichen entstehen.<sup>125, 126</sup> Beim Ausstreichen des Blutes auf dem Objektträger kann es zu einer uneinheitlichen Verteilung der Zellen kommen, insofern, als schwerere Zellen wie Monozyten und Granulozyten nach außen abgedrängt werden und so an den Rändern des Objektträgers in höherer Dichte als in den zentralen Anteile zu liegen kommen, wo vor allem Lymphozyten zu finden sind.<sup>38, 77, 127</sup> Wird das manuell erstellte Präparat nicht nach Vorschrift mäanderförmig, sondern in der Richtung des Ausstreichens differenziert, so werden fälschlicherweise zu viele Lymphozyten und zu wenige Granulozyten gefunden. Werden nur die Randbezirke durchmustert, so erhält man fälschlich einen zu hohen Prozentsatz an Granulozyten.<sup>30</sup> Durch das mäanderförmige Durchmustern des Blutausstriches soll ein gewisser Ausgleich geschaffen werden.<sup>17</sup>

Bei Verwendung von Spinner-Geräten zur Herstellung der mikroskopischen Präparate fällt dieser Effekt weg, weshalb verschiedenen Autoren in ihren Untersuchungen die Spinner-Technik empfehlen.<sup>99, 128</sup> Vorteil des hierbei angefertigten Zentrifugalausstrichs ist, daß die Leukozyten bei gleichbleibender prozentualer Verteilung im Ausstrich auf die doppelte Dichte angereichert und die Blutplättchen äußerst gleichmäßig verteilt werden. Ein Nachteil ist, daß eine höhere Infektionsgefahr aus dem fein versprühten Blut als bei sauberem manuellem Ausstreichen auf dem Objektträger besteht.<sup>129</sup>

Weitere Fehlerquellen bei der mikroskopischen Differenzierung von Leukozyten können entstehen, wenn die Farblösung nach dem Färbvorgang nicht wie vorgeschrieben mit aqua bidest. von der Seite her abgespült, sondern stattdessen zuerst abgekippt wird. Dann können sich dichte Farbniederschläge im Präparat finden. Sind trotz vorschriftsmäßiger Arbeitsweise Farbpartikelchen im Präparat enthalten, was die Beurteilung erschwert, so kann dies durch Ausfällung der Farbstoffe in den übersättigten Lösungen bedingt sein.<sup>30</sup> Sind solche Farbniederschläge in den Ausstrichen enthalten, so kann gelegentlich nicht entschieden werden, ob bei den neutrophilen Granulozyten eine toxische Granulation beziehungsweise ob bei den Erythrozyten eine basophile Tüpfelung vorliegt oder nicht. In solchen Fällen wird ein Filtrieren der Farblösungen vor Gebrauch empfohlen.<sup>77</sup>

Des weiteren muß bei der Färbung der pH des Wassers beachtet werden. Zu saures Wasser liefert rotstichige, zu alkalisches Wasser blaustichige Bilder. Außerdem ist die Farbintensität der Stammlösungen nicht immer gleich.<sup>38</sup>

Abgesehen von der Schwierigkeit der Erkennung einzelner Blutzellen sowie der heterogenen Erscheinung von Blutzellen, kommt bei der Blutzelldifferenzierung am Mikroskop

die individuelle Beurteilung des Untersuchers zum tragen. Daher gilt es bei der mikroskopischen Methode der Blutzellendifferenzierung immer den individuellen Kenntnisstand des jeweiligen Untersuchers zu berücksichtigen.<sup>44, 66, 130</sup>

#### 4.4.3 Einfluß der Lagerungszeit der Blutproben auf die Leukozytendifferenzierung

Antikoagulantien führen innerhalb kurzer Zeit zu morphologischen Veränderungen der Leukozyten, die Anlaß zur Nichtklassifizierbarkeit oder zu fehlerhafter Zuordnung geben können.<sup>131</sup> Die Aufbewahrung der Blutprobe bei Zimmertemperatur ist der im Wärme- oder Kühlschrank vorzuziehen.<sup>124</sup> PARL<sup>132</sup> stellte fest, daß akzeptable Blutbildausstriche zwei oder drei Stunden nach der Blutabnahme noch gemacht werden können. Andere Autoren berichteten dagegen, daß morphologische Veränderungen der Blutzellen bereits innerhalb von drei Stunden nach Blutentnahme auftreten können.<sup>133–135</sup> So können bei neutrophilen Granulozyten bereits nach drei Stunden Kernsegmente aufgetrieben und Segmentbrücken verkürzt sein. Dadurch sind PELGER-ähnliche Formen mit zwei Segmenten häufiger zu sehen. Im normalen Blutbild ist schon nach drei Stunden die relative Zahl der Stabkernigen diskret, aber statistisch signifikant angestiegen.<sup>134</sup> Außerdem kommt es zu einer Vakuolisierung des Zytoplasmas, Pyknose, Verschwinden der Granula und spezifischen kleeblattförmigen Formveränderungen des Lymphozytenkerns. Desweiteren entsteht eine Anisozytose der Erythrozyten und ein Anschwellen der Thrombozyten. Daraus können fehlerhafte Zuordnungen oder Nichtklassifizierbarkeit von Zellen entstehen.

In unserer Untersuchung konnten wir feststellen, daß mit zunehmender Alterung der zu differenzierenden Blutprobe bei Raumtemperatur der Anteil an markierten Blutbilder deutlich anstieg. Ähnliche Feststellungen machte auch KLOSSON<sup>96</sup>

Häufig waren diese „geflaggt“ Blutbilder durch die Differenzierungsgeräte mit Hinweisen auf eine Linksverschiebung gekennzeichnet. Entsprechend zeigte die mikroskopische Beobachtung eine Verplumpung des Zellkerns und Verkürzung der Segmentbrücken. Differentialblutbilder sollten daher spätestens innerhalb der ersten fünf Stunden nach der Entnahme erstellt werden. Am Pattern-Recognition-System, welches eine weitestgehende Annäherung an das visuelle Differenzierungsverfahren verfolgt, ergab eine Studie über den Einfluß der Probenalterung von NEUMANN<sup>136</sup> eine Vermehrung der Lymphozyten und eine Abnahme der Granulozyten mit Zunahme der Zeit.

WARNER und REARDON<sup>3</sup> fanden am Coulter STKS, ähnlich der Untersuchung von NEUMANN<sup>136</sup> am Pattern-Recognition-System, in Blut bei Raumtemperatur (20°C) nach 12–24 Stunden eine Zunahme der gemessenen Lymphozyten und eine Abnahme der neutrophilen Granulozyten. Ebenfalls wurden die eosinophilen Granulozyten und die Monozyten niedriger ermittelt, während die Anzahl der basophilen Granulozyten anstieg. Wurden die Blutproben bei 4°C gelagert und anschließend gemessen, waren die Ergebnisse sogar wesentlich länger konstant. Wurden die Blutproben, nachdem sie längere Zeit bei 4°C gekühlt worden waren, wieder aufgewärmt und für nur 15 Minuten bei 20°C

gehalten, so wurden Lymphozyten fälschlicherweise den neutrophilen Granulozyten gezählt.

KREOFKY ET AL.<sup>137</sup> konnten in ihrer Vergleichsstudie bei einer Lagerung der Blutproben bei 4°C noch nach 48 Stunden mit frischem Blut übereinstimmende Differenzierungen für die drei untersuchten Differenzierungsgeräte Technicon H\*2, Sysmex NE8000 und Coulter STKS nachweisen.

Im Gegensatz dazu wiesen HALLAWELL ET AL.<sup>64</sup> in ihrer Studie am Sysmex NE8000 bei einer Lagertemperatur von 4°C zwar für alle Parameter des roten Blutbildes und auch die Leukozytenzählung eine gute Reproduzierbarkeit nach, allerdings ergab die Leukozytendifferenzierung nur für ungefähr 12 Stunden nach der Blutabnahme stabile Werte. Die Lymphozytenzahl war während der 72-stündigen Lagerung konstant, allerdings nahm die gemessene Monozytenwerte nach 12 Stunden zu, gegenläufig dazu nahm die Population der neutrophilen Granulozyten ab. BRIGDEN ET AL.<sup>101</sup> beobachteten in ihrer Untersuchung bezüglich der Stabilität von Blutproben für die Leukozytendifferenzierung bei 4°C am gleichen Gerät sofort und nach 30 Stunden ähnlich gute Korrelationen mit der mikroskopischen Differenzierung für alle fünf Zelltypen. Anders gestaltete sich dies jedoch bei Lagerung der Blutproben bei Raumtemperatur (22°C). Hier stieg, wie von HALLAWELL ET AL.<sup>64</sup> bereits beschrieben, ebenfalls der Anteil der Monozyten an, während die neutrophilen Granulozyten relativ dazu abnahmen. Auch die Lymphozyten wurden tendenziell geringfügig niedriger gezählt, während sich die eosinophilen und basophilen Granulozyten auch hier sehr stabil zeigten.

ETAVARD<sup>31</sup> berichtete am Technicon H\*1 bei einer Lagerungszeit der EDTA-Blutproben von 12–24 Stunden über einige typische Veränderungen, zu denen auch eine falsche Basophilie gehört. Dies konnte in unserer Untersuchung ebenfalls am Technicon H\*1 beobachtet werden; ähnliche Phänomene waren auch am Coulter VCS nachweisbar.

Auch ULDALL ET AL.<sup>138</sup> konnten in ihrer Studie bei älteren Blutproben eine höhere Basophilenzahl als bei der mikroskopischen Differenzierung demonstrieren. Ursache ist hier wohl ein analytischer Fehler des Technicon H\*1, eventuell als Folge unvollständiger Lyse von Blutzellen.

ROSIER ET AL.<sup>139</sup> geben an, daß rein morphologische Bestimmungen auch bei größeren präanalytischen Einflüssen immer noch mit größerer Präzision und Richtigkeit durchgeführt werden, als Messungen, die auf der Bestimmung von Enzymaktivitäten beruhen.

PUM ET AL.<sup>99</sup> fanden beim Coulter VCS sowohl bei Raum- als auch bei Kühl-schranktemperatur nach einer Lagerung von mehr als zwölf Stunden eine Veränderung der Zelleigenschaften. Allerdings war die Fallzahl in ihrer Untersuchung für eine statistische Aussage zu klein, tendenziell wurde eine Abnahme der Lymphozyten und eine Zunahme der gemessenen Neutrophilenzahlen gefunden. Aus diesem Grunde wurde Einsendematerial zur Messung am Coulter VCS kritisch bewertet.

Ähnlich wurde dies bereits von GUDER<sup>135</sup> geäußert. Er stellte fest, daß mit der Größe des Einzugsgebietes eines Laboratoriums die Fehlerquellen und die organisatorischen Aufgaben wachsen. Eine kritische Sichtung der Blutproben vor der Analyse sollte zur

Zurückweisung ungeeigneten Untersuchungsmaterials führen.

Nach V. BOROVICZÉNY<sup>140</sup> stört eine Hämolyse der Probe die Leukozytenzählung zwar nicht grundsätzlich, jedoch muß dabei beachtet werden, daß während oder nach einer Hämolyse oft auch eine Leukolyse eintritt.

### 4.5 Fehlermöglichkeiten der Leukozytenbestimmung

Im gefärbten Blutaussstrich beziehungsweise in der Zählkammer werden die zellulären Bestandteile des Blutes anhand ihrer morphologischen Eigenschaften unterschieden. Hierzu sind hämatologische Analysensysteme nicht in der Lage. Sie „erkennen“ die Zellen vor allem anhand ihrer Größe, des Zellkerns und des Lyseverhaltens und bedienen sich dabei physikalischer Prinzipien wie z.B. der Widerstandsmessung oder optoelektronischer Verfahren.<sup>141</sup> Gegenwärtig existiert keine Methode, die eine Zählung der Leukozyten unter Ausschluß der Erythroblasten ermöglicht.

Kernhaltige Zellen sind postnatal z.T. deutlich erhöht, dabei ist ein Anteil von ca. 25% Erythroblasten bzw. Normoblasten bei Feten und Neugeborenen zu berücksichtigen. Aus einer Schätzung des Anteils der Erythroblasten im Blutaussstrich und einer Korrektur des Maschinenzählwertes kann keine exakte Angabe abgeleitet werden. STAMMINGER ET AL.<sup>9</sup> empfehlen daher bei Proben mit zu erwartendem höheren Anteil von Erythroblasten, wie dies bei Frühgeborenenblutproben der Fall ist, generell nur die Zahl kernhaltiger Zellen anzugeben.

Diese Problematik, so STAMMINGER, erschwert auch die Differenzierung der Erythroblasten von Lymphozyten, Lymphoidzellen und Myeloblasten bei der Leukozytendifferenzierung. Auch BARNARD ET AL.<sup>62</sup> stellen in ihrer Untersuchung fest, daß kernhaltige rote Blutkörperchen in manchen Analysatoren mit kleinen Lymphozyten verwechselt werden. Allerdings wurde in ihrer Studie am Coulter VCS durch Warnhinweise darauf aufmerksam gemacht, daß eine Fehlklassifikation der Normoblasten als Lymphozyten vorliegen könnte. NELSON ET AL.<sup>51</sup> sehen bei der Leukozytendifferenzierung von Kinderblut ein gewisses Problem, da es größere und weniger reif erscheinende Lymphozyten enthält als Erwachsenenblut.

Wie bereits erwähnt war bei allen drei Analysegeräten die Signalisierungsrate in unserer Untersuchung beim Neugeborenenkollektiv extrem hoch. Trotz häufiger Signalgebung wurden Normoblasten in geringen Konzentrationen von den Differenzierungsautomaten nur zum Teil gemeldet. Hohe Erythroblastenzahlen wurden jedoch stets registriert. Bei hohen Prozentsätzen von Normoblasten konnte beim Coulter VCS wie vorgesehen häufig das Signal „X1“ nachgewiesen werden, welches die Leukozytenbasislinie betrifft und die Normoblasten sowie Thrombozytenaggregate von den Leukozyten abtrennt. Auch am Sysmex NE8000 wurde bei einem höheren Anteil von Normoblasten häufig das Normoblasten-Signal (hier „NRBC“) gefunden. Am Technicon H\*1 fand sich bei mikroskopischem Nachweis von Normoblasten weniger oft eine Signalgebung auf Vorstufen der roten Zellreihe als bei den übrigen Analysatoren. Diese Schwäche der mechanisierten Differenzierung dürfte auch bei der Erythroleukämie und bei den Mittelmeeranämien auftreten,

bei denen sich ein erhöhter Erythroblastenanteil findet.<sup>11</sup>

Auch in unserer Studie waren Zuordnungen der verschiedenen Leukozytenpopulationen in Neugeborenenblut durch die Differenzierungsgeräte nicht immer möglich, so daß in einem hohen Prozentsatz bei Neugeborenenblutproben eine mechanisierte Differenzierung der Zellen nicht durchgeführt wurde. Am häufigsten verweigerte der Sysmex NE8000 die Differenzierung.

Falsch hohe Gesamtleukozytenzählungen und abnormale Punktwolkenverteilungen im Peroxidasekanal zeigten BOOTH ET AL.<sup>142</sup> am Technicon H6000 bei Patienten ohne Vorliegen von Normoblasten. Hier stellte sich das Vorliegen von Hämoglobin C enthaltenden Erythrozyten, einer Hämoglobinopathie als Ursache heraus welche zur Bildung von Schießscheiben-Erythrozyten und zu erhöhter Rigidität der Erythrozyten führt. Auch STROBEL ET AL.<sup>143</sup> konnten bei einem Patienten, welcher nach einer Bluttransfusion ein durch nicht lysierte Erythrozyten auffälliges Scattergramm zeigte, eine Hämoglobinopathie C feststellen. Hier besteht eine gesteigerte Lyseresistenz der Erythrozyten, so daß diese unerwarteterweise im Peroxidasekanal des Technion H6000 erfaßt werden und daher den Leukozyten zugezählt werden. Daß dies jedoch nicht ausschließlich ein Problem des Technicon-Systems ist, wurde bereits in mehreren Fällen an anderen Analysegeräten demonstriert.<sup>10</sup> So machten WARNER und REARDON<sup>3</sup> in ihrer Untersuchung am Coulter STKS ähnliche Beobachtungen. In einem Fall handelte es sich ebenfalls um eine Blutprobe mit einer Hämoglobinopathie mit Vorliegen von Hämoglobin SC. Auch hier erfolgte nur eine unvollständige Lyse der roten Blutzellen. Ebenfalls konnten mit dem Sysmex NE8000 durch auffällige Scattergramme Hämoglobinopathien aufgedeckt werden.<sup>144, 145</sup>

Falsch hohe Leukozytenzahlen konnten durch MINDE ET AL.<sup>55</sup> auch bei normalen Neugeborenenblutproben festgestellt werden. Wurden die Blutproben jedoch zunächst verdünnt und anschließend gemessen, so verschwand dieser Effekt, so daß zu vermuten ist, daß es sich bei der Ursache der Leukozytenfehlmessung um eine erhöhte Lyseresistenz der Erythrozyten bei Neugeborenen handelte. In den Blutproben mit falsch hohen Leukozytenzahlen konnten erhöhte Raten von HbF gefunden werden; allerdings führte ein erhöhtes HbF nicht zwingend zu einer zu hohen Leukozytenzahl.

Die für die Leukozytenzählung notwendige Lyse der Erythrozyten ist extrem zeitkritisch. Ist die Lysezeit zu lang oder sind die Leukozyten (z.B. durch eine Sepsis oder Chemotherapie) „vorgeschädigt“, so werden viele Leukozyten während des Meßvorgangs zu klein. Sie liegen dann mit ihren Impulsen unterhalb des Schwellenwertes und werden nicht den Leukozyten zugeordnet. Der Leukozytenwert wird falsch niedrig. Ist die Lysezeit jedoch zu kurz, so werden normale und besonders lyseresistente Erythrozyten nicht vollständig lysiert und als Leukozyten mitgezählt.<sup>141</sup>

Solche verringerten osmotischen Empfindlichkeiten der Erythrozyten konnten auch bei schweren chronischen Nierenerkrankungen und gelegentlich auch bei Eisenmangelanämie gefunden werden.<sup>141</sup>

Gute Analysensysteme warnen mit hoher Sensitivität vor dem Vorhandensein solcher Störungen.<sup>141</sup> In einem daraufhin durchgeführten Ausstrich kann die mögliche Ursache

erkannt werden. Die Leukozytenbestimmung hat dann in der Zählkammer zu erfolgen.

Weitere Laborartefakte können durch Serumproteine wie Kryoglobuline entstehen, welche eine temperaturabhängige Löslichkeit besitzen.<sup>146,147</sup> Die Präzipitation der Kryoglobuline ist neben der Temperatur abhängig von ihrer Konzentration, der Immunglobulinklasse und -subklasse und dem pH.<sup>148</sup> Das Erkennen von Kryoglobulinen im Labor bei Patienten mit zugrundeliegenden hämatologischen Erkrankungen ist wichtig, da eine genaue Leukozytenzählung und Differenzierung für die Einschätzung der Erkrankung entscheidend sein können. Kryoglobuline beeinträchtigen die Leukozyten- und Thrombozytenzählung in Richtung einer Pseudoleukozytose oder Pseudothrombozytose; dies wurde sowohl beim Technicon H\*1 als auch beim Coulter VCS festgestellt. Da der Technicon H6000 als Vorgängergerät des Technicon H\*1 die Blutprobe bei einem pH von 3.2 vorwärmt, wurde dieses Phänomen hier nicht beobachtet.<sup>149</sup> Die Präzipitate können sehr verschiedene Formen annehmen, Volumina >35fl haben und als Leukozyt oder Thrombozyt gezählt werden.<sup>147,150,151</sup> Vom Coulter VCS werden diese Blutproben, so BANFI ET AL.,<sup>152</sup> sehr sicher markiert.

Da bei den mechanisierten Verfahren spezifische Zelltypen nicht direkt erkannt, sondern durch Schwellenwerteneinstellung allgemeine Partikel bestimmter Größe erfaßt werden, können Störungen und falsche Messungen bei der Bestimmung der Leukozyten auch durch verschmutzte Lösungen und Chylomikronen auftreten.<sup>153</sup>

Bei Untersuchungen am Sysmex NE8000 durch HALLAWELL ET AL.<sup>64</sup> konnten Interferenzen bei der Leukozytenzählung durch hohe Cholesterin- sowie Bilirubinspiegel beobachtet werden. In allen Fällen wurden zu hohe Leukozytenzahlen angegeben; allerdings waren hierbei sowohl das Histo- als auch das Scattergramm in charakteristischer Weise auffällig. Solche Beobachtungen konnten auch WARNER und REARDON<sup>3</sup> bei einem Patienten mit erhöhtem Bilirubin aufzeigen, bei dem, vermutlich durch einen „Plasma-Quenching Effekt“, eine zu hohe Leukozytenzahl und ein falsches Differentialblutbild bestimmt wurde. Erwähnt werden muß hierbei jedoch, daß die Blutprobe durch ein abnormales Scattergramm, „Suspect-Flags“ und zusätzliche Hinweise gekennzeichnet wurde.

Um eine exakte Messung und damit repräsentative Aussagen zu erzielen ist eine homogene Suspension der Korpuskeln Voraussetzung. Diesem Ziel wirkt die natürliche Sedimentation entgegen, so daß für das Dispergieren Arbeit verrichtet werden muß. Bei Aufschwemmungen von Blutkörperchen spielt darüber hinaus auch die Agglomeratbildung durch Eiweißkörper mit Agglomerationsneigungen eine Rolle, deren Wirkung durch exogene Hemmfaktoren wieder aufgehoben werden kann.<sup>154</sup> Die Sedimentationsrate während der konduktometrischen Messung von Erythrozyten und Leukozyten kann zu fehlerhaften Meßergebnissen führen, jedoch immer mit der Konsequenz scheinbar zu niedriger Teilchenzahl. Dieser Fehler wirkt sich besonders bei Messungen über einen längeren Zeitraum, beispielsweise bei der Aufnahme von Größenverteilungskurven oder bei Wiederholungsmessungen auf die Reproduzierbarkeit aus. Eine erfolgreiche Stabilisierung in physiologischer Kochsalzlösung suspendierter Blutkörperchen läßt sich, so GERHARD ET AL.,<sup>155</sup> durch Zugabe von aromatischen Alkoholen oder Thiolen erreichen.

## 4.6 Vorteile der automatisierten Differenzierungsanalytoren

Ein wesentlicher Vorteil der mechanisierten Blutbilddifferenzierungsverfahren gegenüber der mikroskopischen Differenzierung liegt vor allem in einer wesentlich größeren Zahl von differenzierten Leukozyten. Während am Blutaussstrich mittels mikroskopischer Methode aus Zeit- und Kostengründen nur meist 100 Zellen differenziert und die Ergebnisse entsprechend hochgerechnet werden, werden bei mechanisierten Zellverfahren mehrere tausend Zellen gezählt (zwischen 8000 und 10000 Zellen), so daß allein aus statistischen Gründen die Präzision größer ist.<sup>78</sup>

Die statistische Genauigkeit einer Untersuchungsmethode zur Erfassung des wahren Zahlenwertes einer Leukozytenpopulation wird durch die Breite des 95% Konfidenzintervalls beschrieben.<sup>19</sup> Der statistische Fehler ist umso kleiner, je größer die Gesamtzahl der differenzierten Zellen und je höher der Anteil der differenzierten Leukozytenpopulation an der Gesamtzahl ist. Würde man beispielsweise bei der Differenzierung von 100 Zellen 10% stabkernige Granulozyten finden, so läge mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit der wahre Wert noch zwischen 4 und 16%. Dieser Fehler kann nur durch eine Erhöhung der Zahl der differenzierten Zellen vermindert werden. Allerdings ergibt sich aus der Tatsache, daß der Fehler umgekehrt proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der gezählten Zellen ist, daß zur Halbierung des Fehlers die vierfache Zahl von Zellen ausgezählt werden muß. Durch Differenzierung von 200 statt 100 Zellen kann nur eine geringfügige Verminderung des Fehlers erzielt werden; statt 4-16% umfaßt der 95%-Konfidenzbereich in diesem Beispiel 6-14%.<sup>153</sup>

Während bei den Leukozytenkategorien mit einem relativ hohen Anteil an der Leukozytenpopulation, wie neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, der statistische Fehler bei einer Zählung von 100 oder 200 Zellen noch relativ gering ist, kommt er bei kleineren Populationen, vor allem den basophilen Granulozyten ganz besonders zum tragen. Daß hier beim Vergleich der mikroskopischen Methode als Referenzmethode keine Korrelation mit den Analysegeräten zu erkennen war, hängt sicher nicht mit einer schlechten Erkennung von basophilen Granulozyten durch die Analysegeräte zusammen. Aus dem Nomogramm nach RÜMKE<sup>19</sup> ist ersichtlich, daß in diesem Meßbereich selbst bei einer Differenzierung von 10000 Leukozyten die Zuverlässigkeit der gefundenen Meßergebnisse gering ist (vgl. Kap. 4.1.5). Bei der Bestimmung der eosinophilen Granulozyten sprechen HABERMANN ET AL.<sup>75</sup> aufgrund dieses statistischen Fehlers von Überlegenheit der Analysegeräte gegenüber der mikroskopischen Methode.

Auch bei den Monozyten spielt dieser Fehler eine gewisse Rolle. In diversen Studie wurde dieses statistische Problem bereits erörtert.<sup>59,69</sup> Im Gegensatz zur mikroskopischen Differenzierung kann auch bei Leukopenie durch die mechanisierten Differenzierungsverfahren noch eine gute Meßgenauigkeit erreicht werden. Diese überlegene Präzision der Differenzierungsgeräte bei niedrigen Leukozytenzahlen ( $< 500/\mu\text{l}$ ) kann bei postzytostatischer Knochenmarksaplasie, wo tägliche Blutbildkontrollen erforderlich sind, zur Erkennung eines Wiedereintretens der myeloepoetischen Aktivität sehr hilfreich sein.<sup>112</sup> So berichten auch andere Studien von der Überlegenheit der automatischen Zell-

zähler bei leukopenischen Blutproben.<sup>50</sup> Bei mikroskopischer Auswertung von nur 100 Zellen im Differentialausstrich ist das Auftreten der Monozyten, welche frühzeitig die Erholung der Granulopoese anzeigen, statistisch nicht zuverlässig erfaßbar, wohl aber bei einer Messung von 2000 oder 10000 Zellen.<sup>42</sup>

Die Stärke der mechanisierten Analysesysteme besteht weiterhin darin, daß sie Leukozytenpopulationen mit relativ homogenen Merkmalen mit einem extrem hohen Maß an analytischer Konstanz analysieren können, während bei der mikroskopischen Methode individuelle Einflüsse des Untersuchers bei der Beurteilung des Differentialblutbildes mit eingehen.<sup>11, 130, 156</sup> Außerdem sind die Reagenzien und die Färbungsschritte der mechanisierten Analysesysteme standardisiert.

Des weiteren sind Veränderungen der Leukozytenenzyme, insbesondere der Peroxidase, durch die zytochemisch arbeitenden Analysesysteme wie das Technicon H\*1 diagnostizierbar geworden und eröffnen neben der morphologischen möglicherweise auch funktionelle Aspekte der Granulozytenfunktion.<sup>157</sup>

Ein weiterer Vorteil liegt in ihrer Arbeitsgeschwindigkeit bei der Erstellung eines Differentialblutbildes. So können in einer Stunde zwischen 60 und 90 Blutproben analysiert werden, so daß mehr Zeit für die Bearbeitung spezieller Fälle und Probleme bleibt. Automatische Blutprobennehmer mit speziellen Kassettsystemen bieten weitere Vorzüge, da eine Exposition mit potentiellen Infektionsproben, wie es beim Ausstreichen eines Blutbildes möglich ist, nicht mehr gegeben ist.

## 5 Zusammenfassung

Insgesamt wurden 646 unselektionierte Blutproben von Kindern bis 15 Jahren aus der Universitätskinderklinik Gießen untersucht. Hierbei wurde die Differenzierung von Leukozyten durch drei unterschiedlich arbeitende mechanisierte Analysensysteme untereinander und mit der mikroskopischen Differenzierung verglichen.

Zum Einsatz kamen der Technicon H\*1, welcher mittels Streulicht-zytochemischer Methode das Differentialblutbild erstellt sowie der Coulter VCS mittels Streulicht-konduktometrischer Methode und die Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyseselektiven Methode am Sysmex NE8000.

Es wurde die selektive quantitative Bestimmung der fünf normalen Leukozytenpopulationen und die Zuverlässigkeit der Signalisierung qualitativer Abnormalitäten untersucht.

Für die neutrophilen Granulozyten und die Lymphozyten zeigten alle drei Differenzierungsgeräte ohne wesentliche Unterschiede gute Übereinstimmungen mit der mikroskopischen Differenzierung. Eine Ausnahme hiervon bildete die Lymphozytenbestimmungen bei Neugeborenen. Bei allen Differenzierungsanalytoren waren die Übereinstimmungen hier deutlich schlechter und die Signalisierungshäufigkeit höher als in den anderen Altersgruppen.

Während bei Anteilen von bis zu 60% in den meisten Fällen die Bestimmung der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten geringfügig höher bestimmt wurden, wurden hohe Neutrophile- und Lymphozytenanteile durch die Analysegeräte im Vergleich zur mikroskopischen Methode leicht niedriger festgestellt.

Bei der Monozytenbestimmung konnten befriedigende Übereinstimmungen mit dem Mikroskop für das Streulicht-konduktometrischem Verfahren am Coulter VCS nachgewiesen werden, während im Vergleich der Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyseselektive Methode am Sysmex NE8000 mit dem Mikroskop bei der Monozytenbestimmung nur unbefriedigende Ergebnisse gefunden werden konnten. Bei den Neugeborenenblutproben war dagegen im Vergleich zwischen Sysmex NE8000 und dem Mikroskop gar keine Korrelation bei der Monozytenbestimmung nachzuweisen. Wurden die durch die mechanisierten Analysegeräte festgestellten Monozytenwerte untereinander verglichen, so konnten bei den „ungeflaggt“ Blutproben in allen Altersgruppen zwischen Technicon H\*1 und Coulter VCS befriedigende bis gute Korrelationskoeffizienten gezeigt werden. Am Coulter VCS und am Technicon H\*1 lagen die ermittelten Monozytenwerte im Mittel leicht unter den mikroskopisch gefundenen Werten, während sie beim Sysmex NE8000 darüber lagen.

Bei der Eosinophilenbestimmung konnten beim Vergleich Differenzierungsgerät und Mikroskop befriedigende Übereinstimmungen nachgewiesen werden. Zwischen den Analysegeräten ergaben sich hervorragende Korrelationen, so daß hier eher der statistische Fehler das Problem bei der Gegenüberstellung der Analysegeräte mit der mikroskopischen Methode war.

Aufgrund des geringen Anteils der basophilen Granulozyten (im Durchschnitt 1.2%)

und des zu erwartenden großen statistischen Fehlers wurde auf einen direkten Methodenvergleich verzichtet. Erhöhte Basophilenzahlen wurden von den verschiedenen Differenzierungsverfahren allerdings übereinstimmend gut erkannt.

Insgesamt war die Übereinstimmung zwischen den Systemen in Blutbildern besser, die keine qualitativen Veränderungen wie atypische Zellen aufwiesen, als in qualitativ pathologischen Blutbildern. Eine zuverlässige Identifikation von stabkernigen Granulozyten und von atypischen Zellen war mit den mechanisierten Analysesystemen nicht möglich. Auf das Vorliegen entsprechender Zellen sollte allerdings durch Signalgebung hingewiesen werden.

Bezüglich der Signalisierung von pathologischen Blutproben zeigten sich in den verschiedenen Altersgruppen deutliche Unterschiede. Bei extrem hohen Signalisierungsraten bei den Neugeborenenblutproben und zum Teil auch noch bei den Säuglingsblutproben war die Sensitivität am Sysmex NE8000 mit 90.7% sehr gut. Dies traf in ähnlicher Weise auch für den Technicon H\*1 mit einer befriedigenden Sensitivität von 78.6% zu. Die Spezifität und somit die Effizienz war jedoch am Technicon H\*1 mit 56% schlechter als beim Coulter VCS mit 73.7%. Auch in den Altersklassen „Kinder 1.–5. Jahr“ und „Kinder ab 5 Jahren“ zeigte das Streulicht-konduktometrische Verfahren am Coulter VCS ebenfalls eine die bessere Spezifität als der Technicon H\*1. Die Erkennung pathologischer Blutproben mittels Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyse-selektiver Methode am Sysmex NE800 zeigte im Vergleich mit den mikroskopisch erkannten pathologischen Blutproben mit einer Sensitivität von 67% in den Altersstufen „Kinder, 1.–5. Jahr“ und „Kinder ab 5 Jahren“ nur eine mäßige Übereinstimmung, wobei hier vor allem reaktive Linksverschiebungen bis 28% und atypische Zellen nicht signalisiert wurden. Die Signalisierung von reaktiven Linksverschiebungen erfolgte bei allen drei Differenzierungsverfahren generell schlechter als die Erkennung anderer pathologischer Veränderungen und wurde bei isolierter Linksverschiebung nur in ca. 50% der Fälle signalisiert. Hinsichtlich der Markierung bei Nachweis von Blasten im mikroskopischen Blutaussstrich wurden lediglich in einem Fall (von 31 Fällen) sowohl durch den Sysmex NE8000 als auch durch den Coulter VCS ein Prozentsatz von 4% Blasten nicht gemeldet; hierbei handelte es sich allerdings um eine grenzwertig leukopenische Blutprobe, welche somit der mikroskopischen Kontrolle nicht entgangen wäre. Durch den Technicon H\*1 erfolgte bei mikroskopischem Blastennachweis immer eine Signalisierung der Blutprobe, jedoch geschah dies wie bei den anderen beiden Analysesystemen nicht immer mit dem für Blasten spezifischen Signal.

## 6 Schlußfolgerung

Bei der selektiven quantitativen Bestimmung der fünf normalen Leukozytenpopulationen zeigten alle drei verschiedenen Analyseverfahren in den unterschiedlichen Altersklassen befriedigende bis gute Übereinstimmung mit der mikroskopischen Differenzierung, wobei sich bei den drei untersuchten Differenzierungsgeräten kein Analyseverfahren speziell auszeichnete.

Da die neutrophilen Granulozyten und die Lymphozyten den größten Teil der Leukozyten im peripheren Blut darstellen, weisen die Messungen im physiologischen Bereich eine geringere Streuung auf als eosinophile und basophile Granulozyten und zu einem gewissen Anteil auch die Monozyten. Dieses statistische Problem zeigte sich ganz besonders im Vergleich Analysegerät/Mikroskop bei der Eosinophilenbestimmung. Hier waren die Übereinstimmungen der Analysegeräte, welche bei der quantitativen Zelldifferenzierung durchschnittlich 8000 bis 10000 Zellen heranziehen, untereinander deutlich besser als die Vergleiche Analysegerät/Mikroskop. Die basophilen Granulozyten wurden wegen des großen statistischen Fehlers erst gar nicht miteinander verglichen. Bei der Leukozytendifferenzierung von Neugeborenenblutproben konnten Schwierigkeiten bei allen drei Analyseverfahren festgestellt werden, wobei vor allem die Lymphozytenbestimmung aufgrund der noch sehr jugendlichen Formen ein Zuordnungsproblem darstellte. Die schlechteste Übereinstimmung mit dem mikroskopischen Befund fand sich hier bei der Streulicht-zytochemischen Methode am Technicon H\*1. Da beim Technicon H\*1 jedoch ein zusätzliches LUC-Feld existiert, in welchem sich große peroxidase-negative Zellen finden, konnten in anderen Studien durch Hinzuzählen des LUC-Wertes bessere Übereinstimmungen erreicht werden.<sup>2, 42, 50</sup>

Bezüglich der Monozytenbestimmungen ist besonders die Streulicht-konduktometrische Methode hervorzuheben, welche im Gegensatz zum Technicon H\*1 und Sysmex NE8000 wenigstens befriedigende Ergebnisse beim Vergleich mit der mikroskopischen Differenzierung zeigte. Besondere Schwierigkeiten bei der Monozytendifferenzierung konnten in unserer Studie bei der Gleichspannungs-Radiofrequenz-lyse-selektiven Methode am Sysmex NE8000 festgestellt werden. Neue Software mit der Möglichkeit, den Modus zur Klassifizierung der Monozyten zu verändern, soll die Bestimmung dieses Zelltyps verbessert haben.<sup>7</sup>

Hinsichtlich der Erkennung von pathologischen und nicht-pathologischen Blutproben ergaben sich in den verschiedenen Altersgruppen bei den Analysegeräten unterschiedliche Ergebnisse.

Extrem hohe Signalisierungsraten waren in der Gruppe der Neugeborenenblutproben bei allen drei Differenzierungsgeräten festzustellen. Trotz dieser hoher Signalisierungsraten und teilweise sehr hohen Anteilen von falsch-positiven Befunden wurden nicht alle pathologischen Blutbilder gemeldet. Sogar der Sysmex NE8000 registrierte trotz einer hohen Rate an falsch-positiven Befunden bei vereinzelt Neugeborenenblutproben deutliche Linksverschiebungen nicht. Dies ist gerade zur Feststellung eines bedrohlichen entzündlichen Zustandes von besonderer Wichtigkeit. Ähnliches gilt für die Streulicht-

zytochemische Methode am Technicon H\*1. Während die Sensitivität bei Neugeborenenblutproben am Coulter VCS etwas geringer war als beim Technicon H\*1, war die Erkennung von nicht-pathologischen Blutproben durch das Streulicht-konduktometrische Verfahren deutlich besser als durch die beiden anderen Analysensysteme.

CHARACHE ET AL.<sup>56</sup> geben in ihrer Studie bezüglich der Erkennung einer Sepsis bei Neugeborenen zu bedenken, daß die Erstellung eines Differentialblutbildes bei Neugeborenen auch für erfahrene Assistenten sehr schwierig sein kann. Desweiteren konnte in ihrer Untersuchung wie bereits in früheren Publikationen<sup>158</sup> festgestellt werden, daß sich in mehr als 90% aller Fälle bei der Diagnose einer Neugeborenensepsis eine erniedrigte Thrombozytenzahl sowie eine abnorme Leukozytenzählung mit degenerativen Veränderungen der neutrophilen Granulozyten am Differenzierungsgerät nachweisen ließ.

In den übrigen Altersgruppen war die Rate an falsch-positiven Ergebnissen am VCS-System ebenfalls niedriger als beim Technicon H\*1 und Sysmex NE8000. Das Gerät erreichte eine befriedigende Sensitivität und eine ausgesprochen gute Spezifität. Die höchste Rate an falsch-positiven Befunden konnte beim Technicon H\*1 festgestellt werden. Die gute Erkennung von Linksverschiebungen, wie sie in anderen Studien für den Technicon H\*1 teilweise beschrieben wurden,<sup>95,100,112</sup> konnten wir in unserer Studie nicht bestätigen. Blasten wurden durch den Technicon H\*1 im Gegensatz zum Coulter VCS und Sysmex NE8000 nie übersehen.

Im Gegensatz zum Technicon H\*1 und Sysmex NE8000, bei welchen eine dezidierte Angabe bezüglich der pathologischen Zellen gemacht werden konnte, bestand beim Coulter VCS diese Möglichkeit nicht. Hier gab es lediglich die Option „Positiv“ bzw. „Negativ“. Beim Nachfolgegerät Coulter STKS werden ebenfalls genauere Hinweise gegeben. Da diese morphologischen Signale jedoch mit einer gewissen Unsicherheit behaftet und nur eingeschränkt zu verwerten sind, ist hierdurch eine Reduzierung der zu differenzierenden Blutproben nicht zu erzielen.<sup>31</sup> Ein wesentlicher Vorteil durch diese Zusatzinformation besteht eigentlich nicht, auch wenn dem Blastensignal beim Technicon H\*1 eine gewisse Spezifität zugesprochen wird.

Ausgehend von unseren Daten sind wir der Meinung, daß die von uns untersuchten automatisierten Analysegeräte im hämatologischen Routinelabor – ausgenommen bei Neugeborenenblutproben – unter gewissen Kautelen zum Vorscreening eingesetzt werden können. Bezüglich der Einsatzfähigkeit zeigten die Differenzierungsverfahren, die Neugeborenenblutproben wiederum ausgenommen, keine wesentlichen Unterschiede. Der Coulter VCS zeichnete sich jedoch als das Analysegerät aus, welches sowohl bei der quantitativen als auch qualitativen Leukozytendifferenzierung fast durchweg die besseren Ergebnisse brachte. Allerdings lag die falsch-negative Rate am Coulter VCS geringfügig höher als beim Technicon H\*1, erscheint jedoch akzeptabel.

Damit wesentlich pathologische Blutbilder durch die Differenzierungsgeräte nicht unerkannt bleiben, sollten die Nachdifferenzierungskriterien streng gestellt werden, auch wenn man dadurch eine höhere Rate an Nachdifferenzierungen in Kauf nehmen muß.

Unserer Meinung nach sollten von allen gekennzeichneten Blutbilder einschließlich derer, welche am Coulter VCS durch eine geringere Anzahl an differenzierten Leukozy-

ten gekennzeichnet sind, sowie von Blutbildern mit auffälligen Leukogrammen ein Blutausrich angefertigt und nachdifferenziert werden. Außerdem sollten Blutproben mit deutlichen Leukopenien und ausgeprägten Leukozytosen der mikroskopischen Kontrolle unterzogen werden.

Wie bereits durch andere Autoren festgestellt, sollte zur Beurteilung eines Differentialblutbildes nicht nur ein Signal herangezogen werden, da sich erst aus der Komplexität des Befundausdruckes wichtige Informationen ergeben, die unter Umständen eine mikroskopische Untersuchung erforderlich machen (z.B. Neutrophilie, Leukozytose).<sup>89</sup> In der Informationsbroschüre von Digitana wird explizit daraufhingewiesen, daß selbst bei Normalbefunden das Scattergramm sowie die Verteilungskurven sorgfältig zu beachten sind und eine mikroskopische Kontrolle insbesondere auch dann erfolgen sollte, wenn die numerischen Daten im Grenzbereich liegen.<sup>16</sup>

Ob, wie ENNEN ET AL.<sup>1</sup> fordern, nicht nur *die* Blutbilder nachdifferenziert werden sollten, welche vom Analysegerät signalisiert werden, sondern auch solche, welche Zellpopulationswerte außerhalb der gängigen Richtwerte beziehungsweise pathologische Gesamtleukozytenzahlen aufweisen, sofern die Leukozytenerhöhungen/-erniedrigungen bei Kenntnis der Grunderkrankung nicht erklärt werden können, hängt von den Anforderungen des jeweiligen Labors ab.

Da die traditionelle mikroskopische Differenzierung des Blutausriches sehr zeitaufwendig und damit personal- und kostenintensiv ist, erfolgt die Erstellung des Differentialblutbildes bereits vielerorts durch automatische Analysensysteme. Dennoch zeigen die analytischen Grenzen eines jeden Automaten, daß auf die mikroskopische Differenzierung nicht verzichtet werden kann. Es ist unbestritten, daß die konventionelle Leukozytendifferenzierung mittels Mikroskop durch die momentan bestehenden durchflußzytometrischen Analysemethoden nur in beschränktem Maße ersetzt werden kann.<sup>3,8,31,47,51</sup> Zwar werden pathologische Zellen durch die Differenzierungsautomaten zumindest in Blutproben von Kindern > 1 Jahr und Erwachsenen mit befriedigender Sicherheit registriert, jedoch nicht zureichend charakterisiert. Zahlreiche diagnostisch wichtige Informationen wie DÖHLE-Körperchen, toxische Granulation, Abweichungen der Kernsegmentierung, z.B. PELGER-HUËT-Kernanomalie oder Pseudo-PELGER beziehungsweise Vakuolisierung lassen sich nur durch die eingehende mikroskopische Beurteilung der Zellen im gefärbten Blutausrich gewinnen, so daß hier weiterhin die Domäne der mikroskopischen Differenzierung gegeben ist. Außerdem erfaßt die Durchflußzytometrie in keiner Form Anomalien der Erythrozyten oder Thrombozyten. Trotz verschiedener Informationen über die Erythrozytopoese (Erythrozyten-Indizes, Zahl, Volumenverteilung u. a.) geben die Analysegeräte keine Auskunft über Abweichungen der Form, über Vorliegen von HOWELL-JOLLY-Körper u. a., so daß eine nachfolgende mikroskopische Kontrolle des Blutausriches zusätzliche Informationen liefern und damit zweckmäßig sein kann.<sup>78</sup>

Im Gegensatz zum Technicon H\*1 und Sysmex NE8000 bestand beim Coulter VCS zunächst lediglich die Möglichkeit der Leukozytendifferenzierung ohne Angaben der Leukozytengesamtzahl oder die Erstellung des kleinen Blutbildes. Dieser Nachteil ist mittlerweile durch die Integration des VCS in Analysatoren für das kleine Blutbild mit den Fol-

gegeräten des VCS beseitigt. PLONER ET AL.<sup>43</sup> sehen in dieser Möglichkeit den Vorteil, auch bei all jenen Patienten, bei welchen von seiten der Klinik keine Leukozytendifferenzierung verlangt wird, hämatologische Abnormitäten der Leukozytenzusammensetzung aufdecken zu können.

Auch wenn der Zeitaufwand und zusätzliche Kosten für die Erstellung eines Differentialblutbildes durch die Differenzierungsgeräte mittlerweile sehr gering ist, sollte unserer Meinung nach die Indikation für ein Differentialblutbild und deren Anforderung und Erstellung nicht wahllos, sondern gezielt und indiziert erfolgen. Da bei allen Kostenanalysen im Krankenhauslabor die Personalkosten sicher an erster Stelle stehen, kann durch eine Begrenzung der Labordiagnostik auf medizinisch notwendige Indikationen und durch Vermeidung aller medizinisch nicht begründbaren Anforderungen sowie durch Optimierung der Präanalysen, d. h. Vorbereitung des Patienten, Gewinnung und Kennzeichnung des geeigneten Probenmaterials, Transport und Aufbewahrung der Proben auch eine Kosteneinsparung erfolgen.<sup>159</sup>

Aufgrund des zunehmenden „Screenings“ mit dem „Automatenblutbild“ ist die Verantwortung in der morphologischen Nachauswertung nach Meinung vieler Hämatologen eher gewachsen.

Im Mittel kann die Anzahl der mikroskopisch erstellten Blutaussstriche durch die verschiedenen, von uns getesteten Analysegeräte – ausgenommen bei Neugeborenenblutproben – je nach Anforderung des Labors um ca. 50–60% reduziert werden. Ähnliche Ergebnisse konnten in anderen Studien gefunden werden.<sup>3, 13, 42, 43, 74, 76, 160</sup>

Bei schlechter qualitativer und teilweise nur befriedigender quantitativer Leukozytendifferenzierung aus Neugeborenenblutproben durch die drei verschiedenen Analyseverfahren ist eine automatische Erstellung des Differentialblutbildes von Neugeborenenblutproben mit den drei untersuchten Analyseverfahren unserer Meinung nach nicht sinnvoll. Zu diesem Ergebnis kamen auch NELSON ET AL.,<sup>51</sup> CATHERINE ET AL.,<sup>57</sup> JOHANNESSEN ET AL.<sup>47</sup> und MINDE ET AL.,<sup>55</sup> welche ebenfalls eine hohe Signalisierungsrate bei Neugeborenenblutproben feststellen konnten. Sie gaben jedoch zu bedenken, daß bestimmte Zelltypen durch die Analysensysteme sehr gut erkannt wurden und daß zum Beispiel durch Verdünnen der Blutproben eine Verbesserung der Differenzierung erreicht werden konnte.

Trotz großer technischer Fortschritte gehört die Untersuchung von fixierten und gefärbten Blutaussstrichen weiterhin zu den unverzichtbaren hämatologischen Standarduntersuchungen. Voraussetzung ist allerdings, daß die Technik der Ausstrichanfertigung und der Färbung optimal ist und die Untersuchung systematisch, d.h. durch mäanderförmige Inspektion des Ausstrichs erfolgt.

Aufgrund der Unverzichtbarkeit der mikroskopischen Nachkontrolle bestimmter Blutbilder entwickelte Coulter einen hämatologischen Analysator mit einem Ausstrichautomaten sowie einem Färbeautomaten. Der Coulter Gen. SM/ST fertigt in Abhängigkeit von morphologischen Warnhinweisen der Blutbilduntersuchung wie Über- oder Unterschreitungen von Labor-Normalwerten oder nach speziellen benutzerdefinierten Regeln nachgeschaltet einen Ausstrich an, trocknet diesen und legt ihn in Ausstrichkörbchen

ab. Von diesen Ausstrichkörben werden die Ausstriche zu einem Übergabepunkt zum Färbeautomaten befördert, welcher die Ausstriche wiederum gemäß benutzerdefinierten Protokollen anfärbt. Die so gewonnenen Ausstriche können dann der mikroskopischen Kontrolle unterzogen werden.<sup>161</sup>

DIEM<sup>141</sup> weist darauf hin, daß jeder Anwender von hämatologischen Analysesystemen die Meßprinzipien und Arbeitsweise „seines“ Gerätes kennen muß, um Störgrößen sicher erfassen und darauf adäquat reagieren zu können (z.B. Zählung der Blutzellen in der Zählkammer, Anfertigen eines Blutausstriches mit mikroskopischer Differenzierungsmöglichkeit). Diese Vorgehensweise sollte konsequent angewendet werden, um bei der Analyse jeder individuellen Probe den medizinisch begründeten Qualitätsanforderungen zu genügen.

Es ist daher zu fordern, daß jedes Labor, welches Differenzierungsautomaten zur Blutbildanalytik einsetzt, sowohl technisch als auch personell in der Lage sein muß, mikroskopische Differentialblutbilder zu erstellen und zu beurteilen, um die maschinell erstellten Befunde notwendigenfalls kontrollieren beziehungsweise ergänzen zu können.

Wenn es auch inzwischen in den meisten größeren Laboratorien Analysegeräte zur Blutzellendifferenzierung gibt, so sollte es weiterhin zum Routinehandwerk eines jeden Internisten, Pädiaters oder Allgemeinmediziners gehören, einen peripheren Blutausstrich beurteilen zu können.

## 7 Tabellen

Neutrophile Granulozyten, 0. – 4. Woche

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	50	7.36	0.81	0.90	7.95
Mikroskop	NE8000	57	5.88	0.83	0.89	7.74
Mikroskop	VCS	141	6.11	0.85	0.93	7.08
VCS	H1	32	-1.21	1.01	0.98	3.89
VCS	NE8000	45	-0.30	1.05	0.95	5.28
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	15	9.10	0.81	0.90	6.73
Mikroskop	NE8000	15	6.62	0.85	0.91	7.10
Mikroskop	VCS	76	7.56	0.81	0.93	5.43
VCS	H1	5	-6.10	1.14	0.99	1.45
VCS	NE8000	7	2.73	1.00	0.97	3.82

Neutrophile Granulozyten, 5. Woche – 1 Jahr

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	36	3.10	0.93	0.94	5.05
Mikroskop	NE8000	46	6.63	0.89	0.86	7.91
Mikroskop	VCS	103	1.42	0.90	0.92	6.37
VCS	H1	27	3.02	0.97	0.99	2.09
VCS	NE8000	43	6.12	0.95	0.93	5.86
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	17	3.02	0.94	0.94	5.81
Mikroskop	NE8000	28	6.17	0.91	0.92	7.33
Mikroskop	VCS	77	1.97	0.93	0.96	4.65
VCS	H1	11	-0.60	1.05	0.99	1.42
VCS	NE8000	20	4.37	1.00	0.96	4.99

## Neutrophile Granulozyten, 1. – 5. Jahr

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	49	4.52	0.93	0.95	5.89
Mikroskop	NE8000	50	8.35	0.83	0.91	7.53
Mikroskop	VCS	136	2.52	0.94	0.92	7.78
VCS	H1	43	7.43	0.89	0.98	3.57
VCS	NE8000	45	6.87	0.86	0.92	7.13
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	18	5.90	0.88	0.89	6.59
Mikroskop	NE8000	39	7.00	0.87	0.94	6.67
Mikroskop	VCS	97	4.60	0.88	0.93	5.36
VCS	H1	14	2.30	0.99	0.99	1.64
VCS	NE8000	23	6.36	0.91	0.97	2.94

## Neutrophile Granulozyten, ab 5 Jahren

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	68	5.59	0.91	0.95	5.19
Mikroskop	NE8000	105	13.56	0.75	0.87	7.76
Mikroskop	VCS	224	7.17	0.88	0.90	7.18
VCS	H1	53	9.24	0.85	0.93	5.20
VCS	NE8000	98	11.85	0.78	0.84	8.39
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	50	8.50	0.86	0.94	4.19
Mikroskop	NE8000	94	11.87	0.80	0.92	6.01
Mikroskop	VCS	188	7.44	0.86	0.93	5.29
VCS	H1	34	3.21	0.96	0.99	1.95
VCS	NE8000	79	7.57	0.89	0.98	2.95

## Lymphozyten, 0. – 4. Woche

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	50	15.67	0.61	0.80	8.71
Mikroskop	NE8000	38	4.45	0.87	0.92	6.39
Mikroskop	VCS	141	11.49	0.78	0.89	7.38
VCS	H1	32	3.30	0.84	0.89	6.71
VCS	NE8000	30	-0.24	0.92	0.90	6.67
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	15	11.70	0.73	0.77	9.89
Mikroskop	NE8000	16	0.82	1.02	0.94	5.71
Mikroskop	VCS	76	13.10	0.76	0.92	5.01
VCS	H1	5	-7.20	1.04	0.93	4.33
VCS	NE8000	7	-6.04	1.07	0.99	2.02

## Lymphozyten, 5. Woche – 1 Jahr

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	36	5.46	0.85	0.93	5.45
Mikroskop	NE8000	42	1.54	0.94	0.93	7.21
Mikroskop	VCS	103	8.18	0.87	0.89	8.76
VCS	H1	27	15.09	0.70	0.84	7.46
VCS	NE8000	37	-5.07	1.03	0.95	5.85
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	17	4.94	0.85	0.93	6.22
Mikroskop	NE8000	28	-0.07	0.98	0.96	5.27
Mikroskop	VCS	77	7.58	0.88	0.95	5.31
VCS	H1	11	-7.34	1.06	0.99	1.29
VCS	NE8000	20	-4.30	1.02	0.98	3.10

## Lymphozyten, 1. – 5. Jahr

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	49	5.03	0.79	0.92	6.63
Mikroskop	NE8000	50	5.43	0.86	0.93	6.40
Mikroskop	VCS	136	5.83	0.88	0.93	6.56
VCS	H1	43	0.21	0.90	0.98	3.51
VCS	NE8000	45	3.04	0.89	0.94	6.07
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	18	3.66	0.88	0.91	5.98
Mikroskop	NE8000	39	3.47	0.88	0.95	5.79
Mikroskop	VCS	97	7.69	0.85	0.92	5.37
VCS	H1	14	-2.83	0.97	0.99	1.82
VCS	NE8000	23	-3.09	1.02	0.96	3.77

## Lymphozyten, ab 5 Jahren

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	68	8.09	0.71	0.86	6.56
Mikroskop	NE8000	113	5.64	0.82	0.91	5.80
Mikroskop	VCS	224	6.66	0.83	0.86	7.49
VCS	H1	53	2.94	0.82	0.92	4.81
VCS	NE8000	101	0.61	0.94	0.98	2.92
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	50	3.29	0.85	0.94	3.82
Mikroskop	NE8000	94	5.51	0.84	0.92	4.93
Mikroskop	VCS	188	7.20	0.84	0.90	5.46
VCS	H1	34	-2.16	0.98	0.98	1.96
VCS	NE8000	79	0.05	0.95	0.98	2.58

## Monozyten, 0. – 4. Woche

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	50	5.23	0.37	0.57	2.93
Mikroskop	NE8000	80	8.03	0.22	0.27	4.46
Mikroskop	VCS	141	2.57	0.57	0.67	2.76
VCS	H1	32	2.12	0.88	0.74	2.63
VCS	NE8000	66	5.78	0.52	0.41	4.05
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	15	3.45	0.57	0.83	2.20
Mikroskop	NE8000	16	10.16	0.07	0.08	5.01
Mikroskop	VCS	81	3.32	0.47	0.85	1.58
VCS	H1	5	4.30	0.79	0.84	3.21
VCS	NE8000	7	0.48	0.98	0.39	4.88

## Monozyten, 5. Woche – 1 Jahr

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	36	3.06	0.48	0.65	3.03
Mikroskop	NE8000	50	2.78	0.60	0.61	3.67
Mikroskop	VCS	103	2.16	0.62	0.72	3.07
VCS	H1	27	2.72	0.59	0.62	3.31
VCS	NE8000	46	2.00	0.75	0.61	3.73
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	17	4.72	0.38	0.52	3.55
Mikroskop	NE8000	28	4.24	0.32	0.45	3.04
Mikroskop	VCS	77	2.29	0.59	0.82	2.04
VCS	H1	11	0.43	0.97	0.94	1.28
VCS	NE8000	20	1.10	0.85	0.68	2.37

## Monozyten, 1. – 5. Jahr

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	49	2.56	0.41	0.70	1.66
Mikroskop	NE8000	53	3.76	0.51	0.66	2.54
Mikroskop	VCS	136	2.96	0.43	0.64	2.14
VCS	H1	43	2.27	0.51	0.61	1.86
VCS	NE8000	49	1.54	0.98	0.78	2.22
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	18	2.36	0.46	0.86	1.52
Mikroskop	NE8000	39	3.71	0.53	0.64	2.66
Mikroskop	VCS	97	3.09	0.43	0.71	1.80
VCS	H1	14	-0.09	1.06	0.98	0.70
VCS	NE8000	23	0.82	1.04	0.75	2.08

## Monozyten, ab 5 Jahren

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	68	2.13	0.55	0.77	1.85
Mikroskop	NE8000	113	3.51	0.42	0.61	3.35
Mikroskop	VCS	224	1.72	0.56	0.87	1.75
VCS	H1	53	0.80	0.85	0.89	1.35
VCS	NE8000	103	2.20	0.79	0.70	3.14
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	50	2.58	0.47	0.71	1.56
Mikroskop	NE8000	96	3.69	0.41	0.64	3.16
Mikroskop	VCS	188	1.69	0.56	0.88	1.71
VCS	H1	34	0.45	0.97	0.86	1.13
VCS	NE8000	79	1.55	0.86	0.84	2.24

## Eosinophile Granulozyten, 0. – 4. Woche

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	50	0.85	0.61	0.82	1.91
Mikroskop	NE8000	71	1.68	0.58	0.71	2.91
Mikroskop	VCS	141	1.47	0.62	0.73	2.55
VCS	H1	32	0.74	0.77	0.79	1.89
VCS	NE8000	69	0.73	0.76	0.90	1.44
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	15	0.74	0.71	0.85	1.57
Mikroskop	NE8000	15	1.68	0.58	0.85	1.60
Mikroskop	VCS	76	1.22	0.68	0.79	1.89
VCS	H1	5	-0.16	0.99	0.99	0.12
VCS	NE8000	7	-0.07	0.99	0.99	0.40

## Eosinophile Granulozyten, 5. Woche – 1 Jahr

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	36	0.99	0.72	0.85	1.30
Mikroskop	NE8000	49	0.82	0.67	0.93	1.35
Mikroskop	VCS	103	1.21	0.72	0.87	1.88
VCS	H1	27	-0.11	0.91	0.98	0.48
VCS	NE8000	46	0.03	0.82	0.93	1.44
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	17	0.70	0.62	0.85	1.07
Mikroskop	NE8000	28	1.32	0.46	0.82	1.11
Mikroskop	VCS	77	1.02	0.73	0.92	1.62
VCS	H1	11	-0.10	0.95	0.97	0.49
VCS	NE8000	20	-0.13	0.90	0.97	0.48

## Eosinophile Granulozyten, 1. – 5. Jahr

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	49	0.57	0.75	0.83	1.28
Mikroskop	NE8000	53	1.15	0.80	0.71	2.40
Mikroskop	VCS	136	0.94	0.87	0.72	2.25
VCS	H1	43	0.04	0.86	0.90	1.06
VCS	NE8000	49	0.48	0.78	0.82	1.37
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	18	0.75	0.57	0.84	0.94
Mikroskop	NE8000	39	1.23	0.66	0.76	1.77
Mikroskop	VCS	97	0.86	0.84	0.89	1.16
VCS	H1	14	-0.14	0.89	0.98	1.00
VCS	NE8000	23	0.18	0.82	0.98	0.47

## Eosinophile Granulozyten, ab 5 Jahren

geflaggte und ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	68	0.58	0.66	0.85	1.43
Mikroskop	NE8000	113	0.73	0.79	0.95	2.14
Mikroskop	VCS	224	0.85	0.80	0.80	2.34
VCS	H1	54	-0.27	0.97	0.97	0.73
VCS	NE8000	103	0.25	0.81	0.98	0.73
nur ungeflaggte Proben						
<b>x</b>	<b>y</b>	<b>n</b>	<b>b</b>	<b>m</b>	<b>R</b>	$\epsilon$
Mikroskop	H1	50	0.79	0.66	0.84	1.57
Mikroskop	NE8000	94	0.89	0.67	0.88	1.46
Mikroskop	VCS	188	0.95	0.75	0.89	1.58
VCS	H1	34	-0.23	0.98	0.99	0.54
VCS	NE8000	79	0.11	0.88	0.98	0.66

### Abkürzungen

LUC	Large Unstained Cells
MPXI	Mittlerer Peroxidase-Aktivitätsindex
MN	Mononukleäre Zellen
PMN	Polymorphnukleäre Zellen
LI	Lobularitätsindex
DC	<i>direct current</i> , Gleichstrom
HF	Hochfrequenz

## Literatur

- [1] ENNEN, J. ; BÄURLE, R. ; SCHRIEWER, H.: Vergleich der Bestimmung von Leukozytenpopulationen am Coulter VCS mit der mikroskopischen Differenzierung. *Lab. med.* 14 (1990), 102–110
- [2] SWAIM, W.S.: Laboratory and Clinical Evaluation of White Blood Cell Differential Counts; Comparison of the Coulter VCS, Technicon H\*1, and 800-cell Manual Method. *Am. J. Path.* 95 (1991), 381–388
- [3] WARNER, B.A. ; REARDON, D.M.: A Field Evaluation of the Coulter STKS. *Am. J. Clin. Pathol.* 95 (1991), 207–217
- [4] WATSON, J.S. ; RICHARD, A.D.: Evaluation of Technicon H1 Hematology System. *Lab. med.* 18 (1987), 316–322
- [5] VAUPEL, G. ; KOSANKE, W.: Anwenderseminar Technicon H1 System: Tagungsunterlagen. (1987)
- [6] VAN WERSCH, J.W. ; BANK, C.: A New Development in Haematological Cell Counting: The Sysmex NE-8000, Automation for Cell Count and Physical Five-Part Leukocyte Differentiation. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28 (1990), 233–240
- [7] HALLAWELL, R. ; O'MALLEY, C. ; HUSSEIN, S. ; DAUER, R.J. ; TANTI, M. ; WOOTTON, A.M. ; MCGRATH, K.M.: An Evaluation of the Sysmex NE8000 Hematology Analyzer. *Am. J. Clin. Path.* 96 (1990), 594–601
- [8] VERHEUL, F.E.A.M. ; SPITTERS, J.M.C. ; BERGMANS, C.H.F.: Evaluation and Performance of the Coulter STKS. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 31 (1993), 3, 179–186
- [9] STAMMINGER, G. ; BOLLMANN, R. ; PRZYBILLA, D.: Kann man mit einem Hämatologie-System sicher zwischen fetalem und mütterlichem Blut unterscheiden? *Lab. med.* 14 (1990), 433–439
- [10] REES, J. ; WILLIAMSON, D. ; CARRELL, R.W.: Detection of abnormal haemoglobins by the Technicon H6000 automated cell counter. *Br. J. Haematol.* 59 (1985), 734–736
- [11] KUSE, R.: *Hämatologie für Praxis und Klinik: Mechanisiert erstelltes Blutbild.* Stuttgart-Jena-New York : Gustav Fischer Verlag, 1995
- [12] COULTER, Information: Automatische Differenzierung mit dem neuen Coulter STKS. *Extracta Diagnostica* 3 (1989), 103–106

- [13] BARNARD, D.F. ; BARNARD, S.A. ; CARTER, A. B. ; MACHIN, S.J. ; PATTERSON, K.G.: Detection of important abnormalities of the differential count using the Coulter STKR blood counter. *J. Clin. Pathol.* 42 (1989), 772–776
- [14] INFORMATION, Coulter: *Das Scattergramm Differential - die neue Dimension*. Krefeld: Fa. Coulter Electronics GmbH, 1988
- [15] Firma Technicon. Bad Vilbel: *Technicon H1 System: Kurzinformation*
- [16] Firmenbroschüre der Digitana AG: *Ergebnisse und Ergebnisinterpretationen zur Sysmex NE-Serie. Hämatologische Analysensysteme für das kleine Blutbild und das Differentialblutbild*. 1988
- [17] WENDT, F.: *Kleines Vademecum Haematologicum. Nordmark*. Uetersen : Stormarn-Verlag GmbH, 1983
- [18] BEGEMAN, H. ; HARWERTH, H.G.: *Praktische Hämatologie*. 6. Auflage. Stuttgart : Thieme-Verlag, 1974
- [19] RÜMKE, C.L.: Die Zelldifferenzierung in Blutaussstrichen: Variabilität der Ergebnisse. *Triangle* 4 (1960), 154–158
- [20] RÜMKE, C. L. ; BEZEMBER, B.C. ; KUIK, D.J.: Normal values and least significant differences for differential leukocyte counts. *J. Chron. Dis.* 28 (1975), 661–668
- [21] INFORMATION, Coulter: *Coulter VCS - Vorstellung einer neuen Dimension in der Zellanalyse*. Krefeld: Coulter Electronics GmbH, 1987
- [22] RICHARDSON-JONES, A.: *Evaluation of the Coulter VCS automated differential - a hematology flow cytometer*. Krefeld: Coulter Electronics GmbH, 1987
- [23] INFORMATION, Coulter: *Coulter VCS Information. Die neue Methode zur Leukozytendifferenzierung..* Krefeld: Coulter Electronics GmbH, 1988
- [24] ELECTRONICS, Coulter: *Coulter Hematology. Product Reference Manual. Preliminary Subject to Final Review. Coulter VCS automated cell counter*. Krefeld: Coulter Electronics GmbH, 1988
- [25] COULTER, S.T.: *Gerätebeschreibung*. Krefeld: Fa. Coulter Electronics GmbH, 1988
- [26] GARAND, R. ; ACCARD, F.: Evaluation of the Coulter STKR differential histogram and the Coulter VCS formula analysis: a strategy of joint utilization. *Pathol. Biol.* 37 (1989), 851–856
- [27] Firma Technicon. Bad Vilbel: *Kurzinformation. Technicon H1 System*

- [28] SCHNEIDER, W.: Ein notfalltaugliches Tischsystem für das kleine und große Blutbild. *Labormedizin* 8 (1985), 428–433
- [29] DE CRESCE, R.: The Technicon H\*1: A discrete fully automated complete blood cell analyzer. *Lab. med.* 17 (1986), 17–21
- [30] RICK, W.: *Klinische Chemie und Mikroskopie*. Berlin-Heidelberg-New York : Springer Verlag, 1977, 42
- [31] ETAVARD, N.: Das Nukleogramm des Technicon H1: Factum und Artefactum. *Lab. med.* 13 (1989), 322–328
- [32] SCHNEIDER, W.: Ein flexibler Hämatologie-Analysator mit neuartigen Meßtechniken und diagnostischen Aussagen. *MTA 5/86* (1986), 301–310
- [33] Technicon GmbH. Bad Vilbel: *Firma Technicon Product manual..* 1987. – Flaggschreibungen der Firma Technicon
- [34] BOLLINGER, P.B. ; DREWINKO, B. ; BRAILAS, C.D. ; SMEETON, N.A. ; TRUJILLO, J.M.: The Technicon H-1 an automated hematology analyzer for today and tomorrow. *Am. J. Clin. Pathol.* 87 (1987), 71–78
- [35] SEEGER, T.: Der Sysmex NE8000, ein Analysator für das große Blutbild. *Extracta Diagnostica* 3 (1989), 95–102
- [36] Firmenbroschüre der Digitana AG: *Der neue Differenzier- Automat von TOA Medical Electronics Sysmex NE-8000 für das kleine und große Blutbild*
- [37] VAN WERSCH, J.W. ; BANK, C.: Zellzählung mit zusätzlicher Dreipopulations- und Fünfpopulationsdifferenzierung des peripheren Blutes: Ein Vergleich von Sysmex E-4000 und NE-8000. *Lab. med.* 13 (1989), 205
- [38] BEGEMANN, H. ; BEGEMANN, M.: *Praktische Hämatologie: Diagnose - Therapie - Methodik*. 9. Auflage. Stuttgart - New York : Georg Thieme Verlag, 1989
- [39] SIMON, C.: *Pädiatrie: Lehrbuch der Kinderheilkunde*. 6. Auflage. Stuttgart-New York : Schattauer, 1991
- [40] SCHULTE, F.J. ; SPRANGER, J.: *Lehrbuch der Kinderheilkunde: Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter*. 27. Auflage. Stuttgart-Jena-New York : Gustav Fischer Verlag
- [41] THEML, H.: *Taschenatlas Hämatologie: Morphologische Diagnostik für die Praxis*. 2. Auflage. Springer Verlag, 1986, 20–24

- [42] THOMAS, L. ; MÜLLER, Th. ; RODRIAN, J.: Vergleich der Bestimmung von Leukozytenpopulationen am Technicon H\*1 mit der mikroskopischen Differenzierung. *Lab. med.* 13 (1989), 213–219
- [43] PLONER, F. ; LANTHALER, Th. ; OGRISEG, M.: Beurteilung der Volumen-Verteilungs-Kurve von Leukozyten am Coulter S Plus Jr. im Vergleich zur mikroskopischen Differenzierung. *Lab. med.* 16 (1992), 145–148
- [44] LOTZ, J. ; HAFNER, G. ; WIESENER, M. ; EHRENTHAL, W. ; PRELLWITZ, W.: Bestimmung von Differentialblutbildern mittels VCS-Technologie am Coulter MaxM im Vergleich zur zytochemisch-zytometrischen und lichtmikroskopischen Differenzierung. *Lab. med.* 16 (1992), 295–299
- [45] ENGLAND, A.P.: An assessment of Coulter STKS and the Technicon H2 automated blood cell counters. *Med. Technol.* 5 (1991), 1–10
- [46] WARNER, B.A. ; REARDON, D.M. ; MARSHALL, D.P.: Automated hematology analyses: a four-way comparison. *Med. Lab. Sci.* 47 (1990), 285–296
- [47] JOHANNESSEN, B. ; OMMUNDSEN, T. ; MINDE, T.E. ; HANEBERG, S.: Automated leukocyte differential counts in newborn infants. Comparison of Coulter VCS and Technicon H1 with manual counts. *Eur. J. Haematol.* 45 (1990), Suppl. 53, 41–44
- [48] KATZ, N. ; LENZ, T.: Vergleich der Volumen-Verteilungsanalyse von Leukozyten am Coulter Stacker mit der cytochemisch-cytometrischen Klassifizierung am Technicon H 6000 und der mikroskopischen Differenzierung. *Lab. med.* 12 (1988), 354–362
- [49] BUTTARELLO, M. ; GADOTTI, M. ; LORENZ, C. ; TOFFALORI, E. ; CESCHINI, N. ; VALENTINI, A. ; RIZZOTTI, P.: Evaluation of Four Automated Hematology Analyzers. *Am. J. Clin. Pathol.* 97 (1992), 345–352
- [50] JOHNSON, K.L. ; DOUGHERTY, C. ; VAUGHAN, W.P.: Rapid accurate absolute granulocyte count determination during severe leukopenia using the flow cytometer. *Am. J. Hematol.* 18 (1985), 171–177
- [51] NELSON, L. ; CHARACHE, S. ; WINGFIELD, S. ; KEYSER, E.: Laboratory evaluation of differential white count information from the Coulter S-Plus IV and Technicon H-1 in patient populations requiring rapid „turnaround“ time. *Am. J. Clin. Pathol.* 91 (1989), 563–569
- [52] JOCHMANN, H.: Anwendung der Coulter-VCS-Technologie zur Leukozytendifferenzierung von Kinderblut. *Lab. med.* 17 (1993), 218
- [53] BEGEMANN, H.: *Klinische Hämatologie*. 2. Auflage. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 1975

- [54] AGRASS, H. ; DOWNEY, H.: The blood picture of human new-borns, with special reference to lymphocytes. *Folia Haematol.* 55 (1936), 207–217
- [55] MINDE, T.E. ; VALLANGER, B. ; HANEBERG, B. ; SANDBERG, S.: Improved automated differential counts of leukocytes from newborn infants using pre-dilution of blood samples. *Eur. J. Haematol.* 45 (1990), Suppl. 53, 54–56
- [56] CHARACHE, S. ; NELSON, L. ; SAW, D. ; KEYSER, E. ; WINGFIELD, S.: Accuracy and Utility of Differential White Blood Cell Count in the Neonatal Intensive Care Unit. *Am. J. Clin. Pathol.* 97 (1992), 338–344
- [57] CATHERINE, N. ; CONTIE, G. ; SERGANT, P. ; TCHERNIA, G.: Performance of two automated blood counters in neonatology. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 29 (1987), 333–337
- [58] MUNING, F. ; VALLS, R.E. ; MORALES, I. ; FELIX, L. ; FERNANDEY, A.: Detection of hemoglobinopathies and thalassemias by continous flow cytometry. In: *Simson E., ed.: Hematology beyond the microscope*. 4th Technicon International Hematology Colloquium. Public Health/Communication/Project/MC, 1984, 165–171
- [59] GOOSSENS, W. ; VAN HOVE, L. ; VERWILGHEN, R.L.: Monocyte counting: Discrepancies in results obtained with different automated instruments. *J. Clin. Pathol.* 44 (1991), 224–227
- [60] STØLSNES, B. ; SKARE, E.V. ; P., Taverner ; OMMUNDSEN, T. ; AGA, I.B. ; SANDBERG, S.: A comparison of the differential white blood cell count using the Technicon H1, the Technicon H6000 and the Coulter VCS. *Eur. J. Haematol.* 45 (1990), Suppl. 53, 37–39
- [61] KLOSSON, R.J.: Vergleich der Ergebnisse cytometrischer, cytochemischer, konduktivmetrischer und mikroskopischer Verfahren zur Differenzierung der Leukozyten - ein Erfahrungsbericht. *Lab. med.* 13 (1989), 180
- [62] BARNARD, D.F. ; BARNARD, A.B. ; CARTER, K.G. ; PATTERSON, A.Y. ; MACHIN, S.J.: An evaluation of the Coulter VCS differential counter. *Clin. Lab. Haematol.* 11 (1989), 255–266
- [63] MARTI, B. ; LENZ, T. ; KATZ, N.: Vergleich der automatisierten Blutbilddifferenzierung durch Streulicht-cytochemische(H1) und Streulicht-konduktometrische Analyse (VCS). *Lab. med.* 13 (1989), 180
- [64] HABERMANN, J.: Leserbrief zu N. Etavard: „Das Nukleogramm des Technicon H-1: Factum und Artefactum“. *Lab. med.* 14 (1989), 41
- [65] BEGEMANN, H. ; RASTETTER, J.: *Atlas der klinischen Hämatologie*. 4. Auflage. Berlin-Heidelberg : Springer Verlag, 1987, 54

- [66] KLEMENT, V.: *Über die semantisch gestützte maschinelle Analyse bildhafter Information am Beispiel mikroskopischer Zellbilder*, TU Hannover, Dissertation, 1979
- [67] KOEPKE, J.A. ; DOTSON, M.A. ; SHIFMAN, M.A.: A critical evaluation of the manual/visual differential leukocyte counting method. *Blood Cells* 11 (1985), 173–186
- [68] KEITGES, P.W. ; J.A., Koepke: Report on hematology photomicrograph transparencies. *Am. J. Clin. Pathol.* 55 (1971), 291–301
- [69] AVENARIUS, H.J. ; DEINHARDT, J.: Die Erkennung der Monozyten im Differentialblutbild mit unterschiedlicher Technik. *Lab. med.* 16 (1992), 204–209
- [70] HABERMANN, J. ; PATZ, S.: Monozyten: Mikroskop versus cytochemisch-cytometrische, automatisierte Bestimmung. *Extracta diagnostica* 3 (1989), 108–111
- [71] ROWAN, R.M.: New developments in establishing reference methods in blood cell counting. *Lab. med.* 19 (1995), 191–201
- [72] ROWAN, R.M.: Advances in diagnostic haematology: The blood count. *Brit. J. Haemat.* 82 (1992), 185–187
- [73] LEBECK, L.K. ; MAST, B.J. ; HOUWEN, B: Flow cytometric white blood cell differentials: A proposed alternate method. *Sysmex Journal International* 3 (1993), 61–69
- [74] KLOSSON, R.J.: Evaluation des Technicon H2-Systems: Vergleichende Untersuchungen mit dem Technicon H\*1 und der mikroskopischen Differenzierung. *Lab. med.* 14 (1990), 445–449
- [75] HABERMANN, J. ; NIKEL, I. ; GOTTSMANN, M.: Medizinische und wirtschaftliche Bedeutung der präzisen Eosinophilenbestimmung bei Dialysebestimmung. *Extracta diagnostica* 2 (1988), 32–34
- [76] BENTLEY, S.A. ; JOHNSON, PHD.A. ; BISHOP, C.A.: A Parallel Evaluation of Four Automated Hematology Analyzers. *Am. J. Clin. Pathol.* 100 (1993), 626–632
- [77] BUCHER, U. ; BECK, E.A.: *Die einfachen hämatologischen Laboruntersuchungen: Eine Einführung für technisches Laborpersonal, Studenten und Ärzte*. Bern-Stuttgart-Wien : Verlag Hans Huber, 1978
- [78] STOBBE, H.: *Untersuchungen von Blut und Knochenmark: Klinische Laboratoriumsmethoden*. 4. überarbeitete Auflage. Berlin : Verlag Gesundheit, 1991, 173–188
- [79] PRESENTEY, B.: A new anomaly of eosinophilic granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* 39 (1968), 887–890

- [80] TAKUBO, T. ; KIKUCHI, T. ; HARUNARI, H. ; TAKEUCHI, A. ; INAI, S.: A case of lowered eosinophilic leucocyte peroxidase activity found unexpectedly using an automatd haematology analyser (the Technicon H6000 system). *Clin. Lab. Haematol.* 9 (1988), 289–296
- [81] LANZA, F. ; CASTOLDI, G.L. ; M., Masotti.: Eosinophil peroxidase deficiency detected by the Technicon H1 system. *Blut* 56 (1988), 143–144
- [82] BRIANI, G. ; BIZARRO, P. ; DORETTO, P.: Detection of eosinophilic total myeloperoxidase deficiency (EPOd) by flow cytometry. *Haematologica* 72 (1987), 469–474
- [83] VALDES, M.D. ; CALERO, M.A.: Deficiency of eosinophil peroxidase detected by automated cytochemistry. *Acta Haematol.* 78 (1987), 265
- [84] BAIN, B.J.: Erroneous automated eosinophil counts consequent on lowered eosinophil peroxidase activity. *Eur. J. Haematol.* 46 (1991), 252–253
- [85] LEJEUNE, F. ; DOURNOVO, M. ; TURPIN, f. ; SAULA, H. ; LORTHOLARY, P.: Deficit en peroxydase des eosinophiles: etude cytologique en microscopie optique et electronique a propos d'un cas. *Nouv. Rev. Fr. Haematol.* 30 (1988), 177–182
- [86] HOFFMANN, J.J.M.L. ; TIELENS, A.G.W.M.: Partial deficiency of eosinophil peroxidase. *Blut* 54 (1987), 165–169
- [87] TAKUBO, T.: Eleven cases with lowered eosinophil peroxidase activity. *Eur. J. Haematol.* 43 (1989), 80
- [88] CAPPELLETTI, P. ; DORETTO, P. ; SIGNORI, D. ; BIZARRO, N.: Eosinophilic Peroxidase Deficiency. Cytochemical and Ultrastructural Characterization of 21 New Cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 98 (1992), 615–622
- [89] VAUPEL, H.A. ; LANGE, R. ; ALPMANN, P.: Stellenwert des automatisierten Blutbildes beim Patientengut einer Medizinischen Universitäts-Klinik. *Lab. med.* 13 (1990), 234
- [90] KELLER, W. ; WISKOTT, A: *Lehrbuch der Kinderheilkunde*. Stuttgart-New York : Betke, K., Künzer, W. und Schaub, J.; Georg Thieme-Verlag, 1984, 20.22–20.25
- [91] NILSSON, T.A.: Allergy testing using degranulation of basophils and flow cytometry. *Eur. J. Haematol.* 45 (1990), Suppl. 53, 50–53
- [92] JACQUILLAT, C. ; CHASTANG, C. ; TANZER, J. ; BRIERE, J. ; WEIL, M. ; PEREIRA-NETO, M. ; GEMON-AUCLERC, F. ; SCHAISON, G. ; DOMINGO, A. ; BOIRON, M. ; BERNARD, J.: Facteurs de pronostic de la leucemie myeloide chronique. A propos de 798 observations. *Nouv. Rev. Fr. Hemat.* 15 (1975), 229–240

- [93] KAMADA, N. ; UCHINO, H.: Chronologic sequence in appearance of clinical and laboratory findings characteristic of chronic myelocytic leukemia. *Blood* 51 (1978), 843–850
- [94] THEOLOGIDES, A.: Unfavorable signs in patients with chronic myeloid leukemia. *Ann. Int. Med.* 76 (1972), 95–99
- [95] VAUPEL, H.A.: Leserbrief zu N. Etavard: „Das Nukleogramm des Technicon H-1: Factum und Artefactum“. *Lab. med.* 14 (1989), 42
- [96] KLOSSON, R.J.: Einfluß der Alterung von EDTA-Blutproben auf die Ergebnisse von hämatologischen Analysengeräten (einschließlich der Differenzierung der Leukozyten). *Lab. med.* 13 (1989), 181
- [97] CORNBLEET, P.J. ; MYRICK, D. ; LEVY, R.: Evaluation of the Coulter STKS Five-Part Differential. *Am. J. Clin. Pathol.* 99 (1993), 72–81
- [98] FIALON, M. ; BOISSEAU, M.R.: Evaluation of the white blood cell differential given by the new analyzer Coulter STKS in both hematological and non-hematological patient groups. *Pathol. Biol.* 38 (1990), 743–748
- [99] PUM, R. ; FISCHER, G. ; MÜHL, M. ; WEIJBORA, R. ; BAYER, P.M.: Rationalisierende Maßnahmen im hämatologischen Routinelaboratorium III: Der Einsatz eines neuen Differenziergerätes - Coulter VCS. *Österreichische Krankenhauszeitung* 29 (1988), 637–643
- [100] SCHNEIDER, W.: Der Technicon H\*1-Hämatologie-Analysator: Das Ergebnis einer langjährigen Erfahrung mit Durchflußzytometrie und Zytochemie. *Extracta diagnostica* 3 (1990), 172–181, 243–247
- [101] BRIGDEN, M.L. ; PAGE, N.E. ; GRAYDON, C.: Evaluation of the Sysmex NE-8000. Automated Hematology Analyzer in a High-Volume Outpatient Laboratory. *Am. J. Clin. Pathol.* 100 (1993), 618–625
- [102] BRIGDEN, M.L. ; PAGE, N.E.: The lack of clinical utility of white blood cell differential counts and blood morphology in elderly individuals with normal hematology profiles. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114 (1990), 394–398
- [103] ZIPURSKY, A. ; PALKO, J. ; MILNER, R. ; AKENZUA, G.I.: The hematology of bacterial infections in premature infants. *Pediatrics* 57 (1976), 839–853
- [104] K.A., Mathy ; J.A., Koepke: The clinical usefulness of segmented vs. stab neutrophil criteria for differential leukocyte counts. *Am. J. Clin. Pathol.* 61 (1974), 947–958

- [105] ROSS, D.W. ; BARDWELL, A.: Automated cytochemistry and the white cell differential in leukaemia. *Blood Cells* 6 (1980), 455–470
- [106] WENZ, B. ; RAMIREZ, M.A. ; BURNS, E.R.: The H\*1 Hematology Analyzer. Its Performance Characteristics and Value in the Diagnosis of Infectious Disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 111 (1987), 521–524
- [107] CORNBLEET, P.J. ; MYRICK, D. ; LEVY, R. ; JUDKINS, S.: The Authors' Reply. Correspondence and Corrections. *Am. J. Clin. Pathol.* 100 (1993), 464–465
- [108] ROSS, D.W. ; BENTLEY, S.A.: Evaluation of an automated hematology system (Technicon H-1). *Arch. Pathol. Lab. Med.* 110 (1986), 803–808
- [109] BULL, B. ; KORPMAN, R.A.: Characterization of the WBC differential count. *Blood Cells* 6 (1980), 411–419
- [110] STATLAND, B.E. ; WINKEL, P.: Physiologic variability of leukocytes in healthy subjects. In: *Differential Leukocyte Counting*. Aspen, Colo. Skokie, III, College of American Pathologists : Koepke, J.A., Presented at the College of American Pathologists Conference, 1977
- [111] BRECHER, G. ; ANDERSON, R.E. ; MCMULLEN, P.D.: When to do diffs: How often should differential counts be repeated? *Blood Cells* 6 (1980), 431–454
- [112] FEHR, J.: New wave in automated hematology. *Blut* 54 (1987), 321–324
- [113] BURRY, A.F. ; ROBINSON, L.G. ; PEREL, I.D.: Cutting corners in hematology. *Med. J. Aust.* 1 (1982), 982–984
- [114] KAWARABAYASHI, K. ; TSUDA, I. ; TATSUMI, N. ; OKUDA, K.: Leukemic blasts detected by the Technicon H1 blood cell counter. *Am. J. Clin. Pathol.* 88 (1987), 624–627
- [115] D'ONOFRIO, G. ; MANCINI, S. ; LEONE, G. ; BIZZI, B. ; MANGO, G.: Identification of blast cells in peripheral blood through automatic assessment of nuclear density: a new tool for monitoring patients with acute leukemia. *Brit. J. Haemat.* 66 (1987), 473–477
- [116] KLINE, A. ; BIRD, A. ; ADAMS, L. ; WALE, C. ; EDWARDS, F. ; PERREIRA, E.: Identification of blast cells in the peripheral blood of patients with acute leukaemia using the Technicon H1. *Clin. Lab. Haemat.* 11 (1989), 111–116
- [117] LINCH, D.C. ; KNOTT, L.J. ; THOMAS, R.M. ; HAPPER, P. ; GOLDSTONE, A.H. ; DAVIS, E.G. ; LEWINSKY, R.J.: T-cell regeneration after allogenic and autologous bone marrow transplantation. *Br. J. Haemat.* 53 (1983), 451–458

- [118] MARTIN, P.J. ; ANDERSON, C.C. ; JONES, H.M. ; LAI, A.P. ; LINCH, D.C. ; GOLDSTONE, A.H.: A rise in the percentage of large unstained cells in the peripheral blood determined by the Hemalog D90 automated differential counter is a feature of impending myeloid engraftment following bone marrow transplantation. *Clin. Lab. Haemat.* 8 (1986), 1–8
- [119] ROSS, D.W.: Sensitivity for the detection of leukemic cells. *Acta Haematol.* 72 (1984), 140–141
- [120] ORAZI, A. ; MILANESI, B.: The Technicon H6000 automated hematology analyser in the diagnosis and classification of the myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 75 (1990), 87–90
- [121] BOLLINGER, P.: The Technicon H1 Analyzer: Sensitivity and Specificity of Blast Identification in Peripheral Blood. *Copyright by Technicon Instruments Corporation* (1986)
- [122] ZÖLLNER, H. ; TITTELBACH-HELMRICH, W. ; RATZMANN, G.: Der Einsatz von Kapillarblut als Prüfmaterial in der pädiatrischen Laboratoriumsdiagnostik. *Lab. med.* 16 (1992), 155–156
- [123] KUSE, R. ; HAUSMANN, K.: Vergleichende halbautomatische Leukozytenzählung im Venen-, Ohrläppchen- und Fingerbeerenblut. *Dtsch. med. Wochenschr.* 98 (1973), 1904–1915
- [124] SCHNEIDER, W.: Einfluß der präanalytischen Phase auf hämatologische Untersuchungsergebnisse (Patientenvorbereitung, Probennahme, Probentransport, Probenverwahrung). *Lab. med.* 7 (1983), 136–142
- [125] LORBACHER, P.: Möglichkeiten und Grenzen der automatisierten Blutbild-Differenzierung. *Die Gruppenpraxis* 4 (1981), 20–37
- [126] VIVES CORRONS, J.L. ; JOU, J.M. ; INSA, M.J. ; AQUILAR I BASCOMPTE, J.L.: Evaluation of four differential blood cell counters in a University Hospital. / Editors V. Reicher, J.E. Barclay. Published by Technicon International Division, 1982. – Forschungsbericht
- [127] T.F., Dutcher: Automated leukocyte differentials: A review and prospectus. *Lab. med.* 14 (1983), 483–488
- [128] ROGERS, C.: Blood sample preparation for automated differential systems. *Am. J. Med. Technology* 39 (1973), 435–442
- [129] HECKNER, F.: *Praktikum der mikroskopischen Hämatologie*. 8. neubearbeitete Auflage. München : Urban-Fischer-Verlag, 1997

- [130] C.W., Barnett: The unavoidable error in the differential count of the leukocytes of the blood. *J. Clin. Invest.* 12 (1933), 77–85
- [131] NEUMANN, E.: Mechanisierung im hämatologischen Laboratorium. *Lab. med.* 7 (1983), 123–130
- [132] PARL, F.: Erfahrungen mit dem Vacutainer-Blutentnahmesystem aus amerikanischer Sicht. *Die Gruppenpraxis* 1 (1982), 26
- [133] NORBERG, B. ; SÖDERSTRÖN, S.: „Radial Segmentation“ of the Nuclei in Lymphocytes and Other Blood Cells Induced by some Anticoagulants. *Scand. J. Haemat.* 4 (1967), 68
- [134] HAUSWALDT, C. ; SCHRÖDER, U.: Differentialblutbilder im EDTA-Blut. *Dtsch. med. Wschr.* 98 (1973), 2391
- [135] GUDER, W.: Gewinnung und Sicherung des Untersuchungsmaterials für klinisch-chemische Untersuchungen. *Med. Welt* 28 (1977), 1249
- [136] NEUMANN, E.: Klinische Erprobung eines zytochemischen Verfahrens zur Differenzierung weißer Blutzellen mit dem Hemalog D. *Med. Labor* 31 (1978), 269
- [137] KREOFKY, T.J. ; WENDLAND, B. ; SCHMIDT, V.M. ; SUMAN, V. ; JOHNSON, R. ; PIERRE, R.V.: Evaluation of three hematology analyzers with five-part differential. *Am. J. Clin. Pathol.* 98 (1992), 365–366
- [138] ULDALL, A. ; JACOBSSON, L. ; RAJAMÄKI, A.: External quality assessment of automated blood leukocyte differential counts and other simultaneous measured quantities. *Eur. J. Haematol.* 45 (1990), Suppl. 53, 45–48
- [139] ROSIER, H. ; VAUPEL, H.A. ; KÖRBER, W. ; SAVIC, R.: Erfahrungen mit dem Cell-Dyn 3000, ein Gerät zur mechanisierten Erstellung des roten und weißen Blutbildes. *Lab. med.* 17 (1993), 47–58
- [140] VON BOROVICZENY, K.G.: Einführung in die Qualitätssicherung in der Hämatologie. *Das kleine Blutbild. Instand-Schriftenreihe* (1986), 551–572
- [141] DIEM, H.: Fehlermöglichkeiten bei der Quantifizierung von Blutzellen. *Lab. med.* 19 (1995), 295–302
- [142] BOOTH, F. ; MEAD, S.V.: Resistance to lysis of erythrocytes containing haemoglobin C - detected in a differential white cell counting system. *J. Clin. Pathol.* 36 (1983), 816–818
- [143] STROBEL, S.L. ; PANKE, T.W. ; ZELENSKI, K.: Hemoglobin C acquired via a blood transfusion. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 111 (1987), 565–568

- [144] HONDA, S.A.A. ; BHAGAVAN, N.V. ; GALLATY, C.R. ; RIOS, C.N.: Hemoglobino-  
pathies detected by Sysmex NE8000 hematology analyzer. *Am. J. Clin. Pathol.*  
98 (1992), 366
- [145] LAMB, A. ; MATTELIANO, S. ; FREEDMAN, J.J.: Detection of abnormal haemoglo-  
bins by the Sysmex NE-8000 automated cell counter. *Br. J. Haematol.* 77 (1991),  
567–568
- [146] BANFI, G. ; BONINI, P.A.: Detection of cryoglobulins by Coulter Counter model  
S-Plus IV/D. *Clin. Lab. Haematol.* 10 (1988), 453–459
- [147] BANFI, G. ; BONINI, P.A.: Interference by cryoglobulins in a light-scatter instru-  
ment. *Clin. Lab. Haematol.* 12 (1990), 112–114
- [148] DAMMACCO, F. ; MIGLIETTA, A. ; LOBREGGIO, G. ; BONOMO, L.: Cryoglobulins  
and pyroglobulins: an overview. *Ric. Clin. Lab.* 16 (1986), 247–267
- [149] VON SCHENCK, H.: Cryoglobulin detected through spurious increases in automated  
leukocyte counts. *Clin. Chem.* 31 (1985), 1086–1087
- [150] ZANDECKI, M. ; DUPRIEZ, B. ; FENAUX, P. ; JUDE, B. ; WATEL, A. ; DRACON,  
M. ; DEMORY, J.L. ; COSSON, A.: Cytological and ultra-structural assessment of  
free crystals of precipitates associated with pseudoleukocytosis and pseudothrom-  
bocytosis in cryoglobulinemia. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 31 (1989), 397–402
- [151] BREMMELGARD, A. ; NYGARRRGL, J.: Interference by cryoglobulins with white  
blood cell measurement on Coulter Counter. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 51 (1991),  
489–492
- [152] BANFI, G. ; GRAZIOLI, V. ; DOLCI, A. ; MURONE, M. ; BONINI, P.A.: Detection of  
a case of pseudolymphocytosis due to cryoglobulins. *J. Clin. Lab. Anal.* 4 (1990),  
319–323
- [153] GREILING, H. ; GRESSNER, A. M.: *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Patho-  
biochemie..* 2. Auflage. Stuttgart-New York : Schattauer-Verlag, 1989, 692–713
- [154] GERHARD, W. ; HERRMANN, J. ; GOWOREK, K.: Stabilisierung von Erythrozyten-  
und Leukozytensuspensionen für konduktometrische Messungen. *Lab. med.* 15  
(1991), 228–229
- [155] GERHARD, W. ; HERRMANN, J.: Verringerung der Sedimentationsrate von Leu-  
kozyten und Erythrozyten während der konduktometrischen Zählung. *J. Clin.  
Chem. Clin. Biochem.* 28 (1990), 719
- [156] BACUS, J.W.: The observer error in peripheral blood-cell classification. *Am. J.  
Clin. Pathol.* 59 (1973), 223–230

- [157] MAUBACH, P.A. ; EMMERICH, B. ; RASTETTER, J.: Mechanisierte Differenzierung von Blutzellen - Diagnose und Verlaufskontrollen von Leukämien - Vorteile und Grenzen. *Lab. med.* 7 (1983), 197–201
- [158] RODWELL, R.L. ; LESLIE, A.L. ; TUDEHOPE, D.I.: Early diagnosis of neonates sepsis using a hematologic scoring system. *J. Pediatr.* 11 (1988), 761–767
- [159] SCHRIEWER, H. ; FRANGENBERG, H.R.: Das wirtschaftliche Krankenhauslabor: Qualitätsverlust oder Effizienzsteigerung. *Deutsches Ärzteblatt* 18 (1998), 873–875
- [160] CARLSON, D. ; VELAQUEZ, F. ; DAIGNEAULT, R. ; STATLAND, B.E.: Evaluation of the Technicon H1, an automated complete blood count and differential analyzer. *Clin. Chem.* 6 (1986), 1173
- [161] GABRISCH, H.: Das Coulter Gen S(TM) mit Ausstrich (SM TM)- und Färbeautomaten (ST TM). *Das Beckmann-Coulter Magazin* 1 (1998), 24–27

Herrn Professor Dr. Dr. Norbert Katz danke ich für die interessante Themenstellung und die engagierte Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Frau Mersch als Leiterin der MTA-Schule sowie den medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten der Kinderklinik für die freundliche Hilfe.

Schließlich gebührt mein Dank den Mitarbeitern des Zentrallabors der Universitätsklinik sowie all jenen, die innerhalb und ausserhalb der Universität zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Gisela Barbara Grundhöfer
geboren	18. Mai 1963 in Speyer/Rhein
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Konfession	katholisch

## Schulausbildung

1970 – 1974	Grundschule Neustadt/Geinsheim
1974 – 1983	Käthe-Kollwitz-Gymnasium Neustadt/Weinstr.
Juni 1983	Abitur

## Studium

WS 1983/84 – SS 1985	Studium der Chemie an der Justus-Liebig-Universität Gießen
WS 1985 – SS 1991	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Gießen
August 1987	Ärztliche Vorprüfung
August 1988	Erste ärztliche Prüfung
September 1990	Zweite ärztliche Prüfung
Okt. 1990 – Okt. 1991	Praktisches Jahr
Oktober 1991	Dritte ärztliche Prüfung

## Ärztliche Tätigkeit

Nov. 1991 – Mai 1993	Ärztin im Praktikum am Kreiskrankenhaus in Schotten bei PD Dr. M. Graubner
Mai 1993	Approbation
Mai 1993 – Sept. 1997	Assistenzärztin am Kreiskrankenhaus in Schotten bei PD Dr. M. Graubner
seit Okt. 1997	Assistenzärztin am Kreiskrankenhaus Gießen in Lich bei Prof. Dr. G. Goubeaud