

Mechanisierte Analyse von Liquorzellen mit handelsüblichen Blutzellanalysegeräten

M.Wick, Institut für Laboratoriumsmedizin, LMU München

Problemstellung

Handelsübliche Blutzellanalysegeräte sind grundsätzlich nicht für die Untersuchung zellarmer Proben oder Liquores mit abnormen Zellen optimiert. Trotzdem wurde seit Jahrzehnten ein möglicher Einsatz dafür untersucht (Kleine T.O. 1991) oder gar in der Krankenversorgung auch durchgeführt. Bezüglich der klinischen Verwendbarkeit ist zwischen Zell- und Erythrozytenzählung einerseits und Zelldifferenzierung andererseits zu unterscheiden. Ferner beeinflusst auch das Messprinzip die analytische Leistungsfähigkeit: optisch bzw. durchflusszytometrisch messende Systeme bieten bei der Analyse kernhaltiger Zellen durch Markierungen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder enzymatischen Färbungen insgesamt mehr Möglichkeiten als bei ausschließlicher Impedanzmessung (Review: Fleming C. et al. 2015). Zu beachten sind auch Validierungsvorschriften aus dem Medizinprodukterecht bzw. den RiLiBÄK. Während einzelne optische Systeme eine US-amerikanische FDA-Zulassung auch für Liquor zumindest oberhalb der jeweiligen Quantifizierungsgrenze (z.B. Zellen $>50/\mu\text{l}$, Erythrozyten $>10\ 000/\mu\text{l}$: Kresie et al. 2005, neuere: Fleming C. et al. 2015) haben bzw. hatten, ist für europäisches Recht grundsätzlich eine entsprechende Validierung mit CE-Zertifizierung ausreichend. Liegt diese nicht oder nicht für alle Messbereiche vor, so ist der Anwender in der Pflicht, sie selbst für seine internen Bedingungen durchzuführen („in-house-Methode“). Dabei ist für Zellzählungen grundsätzlich zwischen der absoluten Nachweisgrenze (Limit of Detection) und der funktionellen Nachweisgrenze oder dem Limit of Quantification im Vergleich zur Kammerzählung als Referenzmethode zu unterscheiden (Armbruster D. und Pry T. 2008, Wick M. 2020). Internationale Anforderungen an die funktionelle Sensitivität (VK $<20\%$ ohne Berücksichtigung eines Bias) bzw. Quantifizierungsgrenze (VK $<20\%$ mit begrenztem Bias) sind dabei weniger streng als die übliche deutsche Definition einer quantitativen Methode (VK $<15\%$). Die Quantifizierungsgrenzen für automatisierte Systeme liegen in der Regel noch über dem Referenzbereich von $<5/\mu\text{l}$.

Zell- und Erythrozytenzählung

Eine ausreichende Sensitivität wird, wenn überhaupt, nur durch Zählung größerer Liquorvolumina und damit absoluten Zellzahlen im modifizierten sog. Body-fluid-Modus oder CSF-Programm erzielt (Kleine T.O.1991, Kresie L. et al 2005). Für die Quantifizierung ist nicht nur die Linearität, sondern daneben eine ausreichende Präzision (VK <15%) auch im unteren Messbereich erforderlich, dies wird auch in der Fuchs-Rosenthal-Kammer nur dann erreicht, wenn bei zellarmen Proben <20 Zellen/ μ l die gesamte Zählkammer ausgezählt wird. Automatisierte Zählgeräte haben in der Regel aufgrund mangelnder Präzision und Linearität im niedrigen Zellzahlbereich trotz Verbesserungen nicht nur eine höhere Quantifizierungsgrenze, geräteabhängig gegenwärtig mindestens ca. 20/ μ l (Boer K. et al. 2009, Fleming C. et al. 2015, Li A. et al. 2014, Xiaming L. et al. 2014, Zimmermann M. et al. 2011), ältere teilweise auch über 50/ μ l (Strik et al. 2005, Kresie L. et al. 2005, Glasser L. et al. 2009, de Smet D. et al. 2010), sondern auch eine systematische Abweichung nach oben, die sich im Messbereich <20/ μ l besonders stark durch falsch-pathologische Beurteilungen bemerkbar machen würde (Boer K. et al. 2009, de Jonge R. et al. 2010, Sandhaus L. et al. 2010, Zimmermann M. et al. 2011, Fleming C. et al. 2015), wenn man nicht den Referenzbereich von <5/ μ l geräteabhängig nach oben korrigiert. Bei einer vergleichenden Untersuchung von stabilisierten Kontrollproben in 10 Ringversuchen mit zahlreichen, damals handelsüblichen Analysesystemen wurde eine generell verbesserungsbedürftige Performance von Geräten mit unterschiedlichen Messprinzipien festgestellt (Kleine T.O. et al. 2010). Die Fehler nehmen bei mäßig blutigen Liquores tendenziell noch zu (Strik H. et al 2005, Heller T. et al. 2008, Eichhorn L. 2011, Zur B. et al. 2012), wenngleich die Analyse von stark blutigen Proben (>10000 Ery/ μ l) aus der Neurochirurgie mit gleichzeitig erhöhter Zellzahl (>20/ μ l) mittels mancher Automaten erhebliche praktische Vorteile bei akzeptabler Präzision bietet.

Auch wenn im Rahmen von technischen und Software-Verbesserungen jüngst niedrigere Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen auf der Basis wohl weniger stringenter internationaler Standards angegeben werden (Buoro S. et al. 2018, Wienefoet C. 2016), teilweise nur als „research mode“ (Fleming et al. 2016), so hat das nach eigenen Validierungen im Zeitraum 2005-2018 bei einem geforderten VK< 15% und begrenztem

Bias lediglich zu einer Absenkung der Quantifizierungsgrenze von ca. 50/ μ l auf ca. 20/ μ l , weiterhin mit Bias noch oben, geführt. Darunter ist in der Regel eine Überprüfung mittels Zählkammer erforderlich, um pathologische Befunde sicher zu erkennen, die für die Erstentscheidung in der Notaufnahme sowie die Diagnostik v.a. chronisch-entzündlicher ZNS-Erkrankungen benötigt werden. Eine Ausnahme können automatisierte Zählergebnisse darstellen, die sicher im Referenzbereich liegen, da die genannten Fehler nahezu nie zu falsch niedrigen Werten führen (de Smet D. et al. 2010, Sandhaus L. et al. 2010) und die Präzision innerhalb des Referenzbereichs klinisch nicht mehr relevant ist. Dies muss der Anwender jedoch im Zweifelsfall für sein Gerät selbst validiert haben. Bei höheren Zellzahlen (>50/ μ l) kann dagegen die automatische Zellzählung aufgrund der größeren gezählten Stichprobe präziser und schneller sein als die manuelle (Zimmermann M. et al. 2011).

Unabhängig vom Messbereich kann es durch andere Partikel als Zellen und Erythrozyten zu Störungen der Zellzählung kommen, die an Interferenzen im Scatterdiagramm erkennbar sind (Wienefoet 2016, Isenmann et al. 2017): Erreger wie Bakterien („Ghost-Bereich“) und Pilze, ggf. Pollen, Liposomen („Bananenform“), Zelldebris und –verbände (unkontrollierte Streuung im Bereich normaler Leukozyten oder auch im Hochfluoreszenzbereich). In diesem Fall sind grob falsche Zählergebnisse möglich, die zwingend in der Zählkammer kontrolliert werden müssen.

Auch wenn an die Präzision und Sensitivität der Erythrozytenzählung nicht die gleichen Anforderungen gestellt werden wie an die Liquorzellzählung, so sollten doch auch kleine, nicht sichtbare Blutbeimengungen (<1000 Ery/ μ l) zumindest erkannt (kleinere bzw. ältere SAB !) und größere quantifiziert werden, da sie u.a. auch für die Korrektur bei artifiziell blutigen Liquores benötigt werden. War die Quantifizierungsgrenze bei älteren Geräten noch bei 3 000-10 000 Ery/ μ l (Kresie L. et al. 2005, de Smet 2010), so liegt sie jetzt in der Größenordnung von 1000/ μ l (Boer K. et al. 2009, Sandhaus L. et al. 2010, Wienefoet C. 2016), theoretisch mögliche niedrigere oder genauere Dezimalangaben werden jedoch z.T. von der Hersteller-Software vermutlich wegen zu schlechter Präzision blockiert. Auch hier

ist ggf. bei positivem Teststreifen-Screening eine manuelle Kammer-Nachzählung erforderlich

Zelldifferenzierung

Während ausschließlich mit Impedanzmessung arbeitende Analysensysteme die Zellen im Wesentlichen anhand von Größe sowie Quellungs- und Schrumpfungseigenschaften bei Zugabe verschiedener Reagenzien zuordnen, erlauben optisch bzw. durchflusszytometrisch messende Geräte eine potentiell weitergehende Zelldifferenzierung, die auf den Streulichteigenschaften sowie auf Fluoreszenzmarkierungen z.B. der DNA oder differentieller Leukozytenlyse und zytochemischen Färbungen z.B. der Myeloperoxidase basiert. Auf diese Weise werden in der Standardauswertung auch im Liquor zumindest orientierende Leukozytendifferenzierungen in Granulozyten und mononukleäre Zellen generiert, bei sog. Forschungsanwendungen auch eine weitergehende Differenzierung (Harris N. et al. 2005, Wienefoet C. 2016, Zimmermann M. et al 2013). Doch bereits die Unterscheidung von Granulozyten und mononukleären Zellen kann abhängig von der Zellzahl einen Bias aufweisen (Kleine T.O. et al. 2010, Eichhorn L. 2011, Fleming C. et. al. 2015). Der Nachweis hochfluoreszierender Zellen kann auf das Vorliegen von Tumorzellen, Blasten, Makrophagen, Siderophagen, Plasmazellen etc. hindeuten, aber auch durch Zellverbände gestört sein (Wienefoet C. 2016). Tumorzellen können dadurch weder sicher nachgewiesen noch ausgeschlossen werden (Zimmermann M. et al. 2013, Cho Y. et al. 2015). Dies ist insbesondere auch bei Liquorproben mit normaler Zellzahl und entsprechendem Verdacht erforderlich (Bönig L. et al. 2019), deren Zellgehalt nahe der absoluten Nachweisgrenze auch moderner Analysengeräte liegt. Somit wird eine automatische Zelldifferenzierung, abgesehen ggf. von einer ersten Orientierung bei akut-entzündlichen ZNS-Erkrankungen, nicht empfohlen, da diagnostisch relevante Einzelzellen wie Tumorzellen, Blasten, atypische Lymphozyten, Erythro- oder Siderophagen, Plasmazellen etc. weder sensitiv detektiert noch gar sicher zugeordnet werden können (Cho Y. et al. 2015, Isenmann S. et al. 2017, Strik H. et al. 2005, Wick M. 2020). Der Goldstandard hierfür bleibt die Mikroskopie, ggf. ergänzt durch eine Immunphänotypisierung (Wick M. 2005).

Fazit:

Die Nachweisgrenzen und Präzisionen der Liquorzellzählung sind geräteabhängig und müssen vom Anwender im Einzelfall geprüft werden, insbesondere wenn vom Hersteller keine ausreichenden Validierungsdaten auch für den niedrigen Zellzahlbereich vorgelegt werden. Im Pleozytosebereich 5-30/ μ l ist die Ungenauigkeit der automatisierten Zellzählung generell am höchsten, der Befund sollte unterhalb der gerätespezifischen Quantifizierungsgrenze durch eine manuelle Kammerzählung bestätigt werden. Daneben können auch einzelne grobe Zählfehler durch andere Partikel vorkommen, die an einem gestörten Scatterdiagramm erkennbar sind. Die automatisierte Liquorzytologie liefert im Wesentlichen nur eine grobe Differenzierung in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Generell werden unabhängig vom Gerät diagnostisch relevante Einzelzellen wie Tumorzellen, Blasten, Siderophagen, Plasmazellen etc. nicht als solche erkannt, so dass die Zelldifferenzierung mit Automaten nicht empfohlen werden kann und weiterhin mikroskopisch im zytologischen Präparat durchgeführt werden muss.

Literatur:

Armbruster D. und Pry T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. Clin. Biochem. Rev. 29 Suppl 1, 49-52

Bönig L. et al. (2019). Leptomeningeal metastasis: the role of cerebrospinal fluid diagnostics. Front. Neurol. 10, 839

Boer K. et al. (2009). Evaluation of the XE 5000 for the automated analysis of blood cells in CSF. Clin. Biochem. 42, 684-691

Buoro S. et al. (2018). Two-site evaluation of the diagnostic performance of the Sysmex XN Body Fluid (BF) module for cell count and differential in CSF. Int. J. Lab. Hematol. 40, 26

Cho Y. et al. (2015). Body fluid cellular analysis using the Sysmex XN 2000 automatic hematology analyzer: focusing on malignant samples Int. J. Lab. Hematol. 37, 346

Fleming C. et al. (2015). Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease. Clin. Chem. Lab. Med. 53, 1689-1706

Fleming C. et al (2016). Evaluation of Sysmex XN 1000 high-sensitive analysis (hsA) research mode for counting and differentiating cells in cerebrospinal fluid. Am. J. Clin. Pathol. 145, 299-307

Eichhorn L. (2011) Evaluation der automatisierten Zellzählung und Zelldifferenzierung in blutigem und nichtblutigem Liquor mit dem ADVIA 2120 und XE 5000. Dissertation, Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Glasser L. et al. (2009). The clinical reliability of automated cerebrospinal fluid cell counts on the Beckman-Coulter LH750 and Iris iQ200. Am. J. Clin. Pathol. 131, 58-63

Harris N. et al. (2005). The ADVIA 2120 hematology system: flow cytometry-based analysis of blood and body fluids in the routine hematology laboratory. Lab. Hematol. 11,47-61

Heller T. et al. (2008). Automated cerebrospinal fluid cytology. Anal. Quant. Cytol. Hematol. 30,139-144

Isenmann et al. (2017). Liquorzytologie: Methoden und Möglichkeiten. Fortschr. Neurol. Psychiatr. 85, 616-630

de Jonge R. et al. (2010). Evaluation of the new body fluid mode on the Sysmex XE 5000 for counting leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and other body fluids. Clin. Chem. Lab. Med. 48, 665-675

Kleine T.O. (1991). Mechanisierte Zählung und Differenzierung von Liquorzellen. Lab. med. 15, 51-59

Kleine T.O. et al. (2010). Evaluation of cell counting and leukocyte differentiation in cerebrospinal fluid controls using hematology analyzers by the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Clin. Chem. Lab. Med. 48, 839-848

Kresie L. et al. (2005). Performance evaluation of the application of body fluids on the Sysmex XE-2100 series automated hematology analyzer. Lab. Hem. 11, 24-30

Li A. et al. (2014). Automated white blood cell counts in cerebrospinal fluid using the body fluid mode on the platform Sysmex XE 5000. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 74, 673-680

Sandhaus L. et al. (2010). Automated cerebrospinal fluid cell counts using the Sysmex XE 5000: Is it time for new reference ranges? *Am. J. Clin. Pathol.* 134, 734-738

de Smet D. et al.(2010). Use of the Cell-Dyn Sapphire hematology analyzer for automated counting of blood cells in body fluids. *Am. J. Clin. Pathol.* 133, 291-299

Strik H. et al. (2005). Automated cerebrospinal fluid cytology: limitations and reasonable clinical applications. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 27, 167-173

Xiaming L. et al. (2010). Automated cell analysis of cerebrospinal fluid with XE 5000. *Clin. Lab.* 60, 1785-1793

Wick M. (2005). Immunzytologie. In: *Klinische Liquordiagnostik* . Zettl U., Lehmitz R., Mix E. Eds., De Gruyter Verlag, Berlin pp.160-167

Wick M. (2020). *Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und klinischen Neurochemie*. Ed: Deutsche Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie e.V. , INSTAND Schriftenreihe Vol. II , Selbstverlag, Ulm Düsseldorf

Wienefoet C. (2016). Automated body fluid analysis. *Sysmex scientific customer services.* 1-57

Zimmermann M. et al. (2011). Automated vs. manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE 5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber . *Int. J. Lab. Hematol.* 33, 629-637

Zimmermann M. et al.(2013). Cellular origin and diagnostisc significance of high-fluorescent cells in cerebrospinal fluid detected by the XE 5000 hematology analyzer. *Int. J. Lab. Hematol.* 35,580-588

Zur B. et al. (2012). Evaluation of 2 hematology analyzers in body fluid mode versus flow cytometry immunophenotyping of mainly neurosurgical cerebrospinal fluid samples. *J. Neurol. Surg. Part A: Cent. Eur. Neurosurg.* 73, 93-98