J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 23, 1985, pp. 399–404

Automatisierte Thrombocytenzählung an thrombocytopenischen Patienten Ein Methodenvergleich

Von W. Stibbe, M. Weise und D. Seidel

Abteilung für Klinische Chemie (Leiter: Prof. Dr. D. Seidel),
Zentrum für Innere Medizin der Universität Göttingen

(Eingegangen am 20. August 1984/29. März 1985)

Zusammenfassung: An 157 EDTA-Blutproben thrombocytopenischer Patienten (Thrombocyten $<100 \cdot 10^9/l$) wurden mit den im Zentrallabor des Universitätsklinikums Göttingen zum Einsatz kommenden Blutzellzählgeräten die Thrombocytenkonzentrationen analysiert und auf Übereinstimmung der Ergebnisse untersucht.

Die Produktmoment-Korrelationskoeffizienten (r) der Thrombocytenzählungen am H 6000, Hemalog 8 (beide Technicon) und ELT-8 (Ortho Instruments) wiesen untereinander ein r zwischen 0,88 und 0,92 auf. Die Korrelation vom Thrombocounter (Coulter) zu diesen Geräten war mit $r = 0,84$ bzw. $r = 0,85$ etwas geringer.

Diskrepante Ergebnisse (Unterschied $>40 \cdot 10^9/l$) wurden mit dem *Neubauer*-Zählkammervorgang überprüft. Darauf bezogen, wurden von den insgesamt 354 Thrombocytenmessungen in drei Fällen die Thrombocytenkonzentrationen fälschlich zu hoch, in sieben Fällen fälschlich zu tief bestimmt.

Automated platelet counts in thrombocytopenic patients — A comparison of methods

Summary: 157 EDTA blood samples from thrombocytopenic patients (platelets $<100 \cdot 10^9/l$) were measured and the platelet counts compared using the various blood cell counters of the central laboratory, University Clinic, Göttingen.

Using the H 6000, Hemalog 8 (both Technicon) and ELT-8 (Ortho Instruments), product-moment correlation coefficients (r) ranging from 0.88 to 0.92 were obtained between the different counters. The correlation coefficients of the thrombocounter (Coulter) to the other instruments were only 0.84 and 0.85.

Discrepant platelet counts (difference $>40 \cdot 10^9/l$) were reinvestigated using the *Neubauer* chamber. From a total of 354 platelet measurements, falsely high concentrations were observed only in three cases and falsely low concentrations in seven cases.

Einführung

Die Methoden zur Thrombocytenzählung im peripheren Blut haben sich weiterentwickelt von eher abschätzenden Verfahren — wie dem Erythrocyten/Thrombocyten-Verhältnis im Ausstrichpräparat — über die mikroskopische Bestimmung in der Zählkammer bis hin zur automatisierten Zählung nach

unterschiedlichen Meßprinzipien. Wenn auch die Präzision automatisierter Thrombocytenzähler gegenüber manuell-visuellen Methoden unzweifelhaft besser ist (1), tauchen doch immer wieder Zweifel an der Richtigkeit der Meßwerte, besonders bei thrombocytopenischen Patienten, auf (2). Dabei sind gerade Thrombocytenkonzentrationen bis $100 \cdot 10^9/l$ von be-

sonderer klinischer Relevanz. So erfordert die Überwachung chemotherapeutisch induzierter Thrombopenien eine schnelle und richtige Thrombocytenzählung. Die Gabe von Thrombocytenkonzentrat wird in solchen Fällen sehr wesentlich oder ausschließlich von der Thrombocytenkonzentration abhängig gemacht.

Meßmethodisch ist die Thrombocytenzählung sicherlich problematischer als die Bestimmung der Erythrocyten- oder Leukocytenkonzentration. Die Gründe hierfür sind vornehmlich die große Spannweite der Thrombocytenkonzentration ($1-1000 \cdot 10^9/l$), die kleine und variable Zellgröße sowie die Aggregations-tendenz.

In Abhängigkeit von der Tageszeit und der Dringlichkeit der Anforderungen auf Erstellung von peripheren Blutbildern werden die zu analysierenden Patientenproben mit Hilfe technisch unterschiedlicher Blutzellzähler bearbeitet. In der Tagesroutine kommen dabei der H 6000 und der Hemalog 8 zum Einsatz, während eilige Proben mit dem ELT-8 gemessen werden. Der Thrombocounter wird bei Ausfall des ELT-8 eingesetzt.

Unabhängig vom verwendeten Analysensystem muß sichergestellt sein, daß vergleichbare richtige Zellkonzentrationen für die jeweiligen Patientenproben ermittelt werden. Zur Überprüfung dieser speziell im thrombopenischen Bereich wichtigen Forderung wurden innerhalb von vier Wochen alle im Routinelabor gemessenen Patientenproben mit Thrombocytenkonzentrationen unter $100 \cdot 10^9/l$ doppelt bestimmt und am ELT-8 und Thrombocounter nachgemessen. Diskrepante Thrombocytenwerte wurden in der Neubauer-Kammer nachgezählt.

Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial diente venöses EDTA-Vollblut (Sarstedt-Monovetten, Nümbrecht), das innerhalb von sechs Stunden nach der Blutentnahme analysiert wurde. Während der Thrombocounter (Coulter Electronics, Hialeah, Florida) die Zellzahl aus thrombocytenreichem Plasma durch eine Impedanzmessung bestimmt, zählen H 6000, Hemalog 8, (beide Technicon Instruments, Tarrytown, New York) und ELT-8 (Ortho Instruments, Westwood, Massachusetts) zu den optoelektronischen Vollblutmeßgeräten. H 6000 und ELT-8 arbeiten nach einem laminar-flow Prinzip, wobei nach hydrodynamischer Fokussierung die Zellidentifikation und Zellzählung nach der Streulichtmethode erfolgen. Alle Verdünnungsschritte werden bei diesen Geräten automatisch durchgeführt.

Sowohl beim ELT-8 als auch beim H 6000 können über on-line Plotter Thrombocytenverteilungskurven graphisch dargestellt werden. Der H 6000 liefert zusätzlich als errechnete Kenngrößen mittleres Thrombocytenvolumen (MTV), Thrombokrit (TK) und Thrombocytenverteilungsbreite (TVB).

Alle benutzten Geräte wurden nach den Empfehlungen der Apparatehersteller kalibriert und unter Routinebedingungen von medizinisch-technischen Assistenten bedient. Zur Kalibrierung des Hemalog 8 wurde der Technicon TQC Kalibrator verwendet. Der ELT-8 wurde mit dem Thrombocyten-Standard THK 3510 (Kabe Labortechnik, Nümbrecht) justiert. Als deklarierte Kontrollproben wurden am H 6000 und Hemalog 8 TESTpoint H 6000 Platelet Control (Technicon Instruments) und am ELT-8 und Thrombocounter THK abnormal (Kabe Labortechnik) und ORTHO Thrombocytenkontrolle (Ortho Diagnostic Systems, Heidelberg) eingesetzt. Zur weiteren Qualitätskontrolle für die on-line mit der Labor EDV (Silab) verbundenen Routinegeräte H 6000 und Hemalog 8 wurden nach der 50. Patientenprobe und bei Beendigung des Routineprogramms die Mediane der Meßwerte beider Geräte mit den entsprechenden Tagesmedianen der Vorwoche verglichen. Die Tagesmediane der Thrombocytenkonzentrationen schwankten je nach Wochentag bis zu 10%. Bei größeren Abweichungen nach der 50. Patientenprobe wurde die Justierung genau geprüft und ggf. nachkalibriert.

Ergebnisse

An insgesamt 157 EDTA-Blutproben, die einen Thrombocytengehalt von unter $100 \cdot 10^9/l$ aufwiesen, wurden Vergleichszählungen durchgeführt. Die Proben wurden nach einem anfangs festgelegten Verteilungsschlüssel den Vergleichsgeräten zugewiesen. Vor Korrelationsbetrachtungen sollten somit mögliche Stichprobenunterschiede Beachtung finden.

Die gute Vergleichbarkeit dieser Stichproben geht aus Tabelle 1 hervor. Insbesondere zeigen die univariaten Verteilungen der Meßwerte von H 6000, Hemalog 8 und ELT-8 insgesamt sehr ähnliche Standardabweichungen bei minimalen Mittelwertunterschieden. Die entsprechenden Thrombocounter Mittelwerte liegen bei vergleichsweise geringerer Streubreite jeweils etwas höher.

Wichen Meßwertpaare um mehr als 40% voneinander ab, wurden sie als offensichtliche Ausreißer von allen Berechnungen ausgeschlossen (Tabelle 3).

Die Ergebnisse der Korrelation und Ausgleichsrechnungen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Bei den gefundenen sehr ähnlichen Stichprobenbreiten lassen sich die Stärken der Zusammenhänge zwischen den einzelnen Meßverfahren gut über die Produktmoment-Korrelationskoeffizienten vergleichen. Die Messungen am H 6000, Hemalog 8 und ELT-8 weisen untereinander jeweils ein r von etwa 0,9 ($r^2 = 0,81$) auf (siehe auch Abb. 1 und Abb. 2). Die Korrelation vom Thrombocounter zu diesen Geräten beträgt etwa 0,85 ($r^2 = 0,72$) (vergleiche Abb. 3 und Abb. 4). Der Anteil der erklärten Varianz ist hier etwa um 10% geringer.

Tab. 1. Vergleich der Thrombocytenzählungen mit H 6000, Hemalog 8 (HL-8), ELT-8 und Thrombocounter: Univariate Kenngrößen der korrelierten Stichproben (Mittelwerte $\bar{x}$, $\bar{y}$; Standardabweichungen s_x , s_y ; Stichprobengröße N).

Gerät (x)	$\bar{x}$	s_x	Gerät (y)	$\bar{y}$	s_y	N
H 6000	68,5	25,5	HL-8	66,2	26,2	57
H 6000	62,2	25,4	ELT-8	61,0	26,1	108
H 6000	65,2	24,0	Coulter	68,2	21,7	44
HL-8	60,1	26,4	ELT-8	60,2	26,8	60
HL-8	61,9	25,3	Coulter	65,9	23,4	36
ELT-8	59,7	24,3	Coulter	64,2	22,1	49

Tab. 2. Korrelations- und Regressionskoeffizienten der Thrombocytenzählungen mit H 6000, Hemalog 8 (HL-8), ELT-8 und Thrombocounter: Stichprobengröße N, Pearson-Korrelationskoeffizient r, Steigung m und Achsenabschnitt b der Strukturgeraden sowie Standardabweichung $s_{y,x}$.

Gerät (x)	Gerät (y)	N	r	m	b	$s_{y,x}$
H 6000	HL-8	57	0,88	1,03	-4,3	12,4
H 6000	ELT-8	108	0,92	1,02	-2,7	10,5
H 6000	Coulter	44	0,84	0,91	9,1	11,8
HL-8	ELT-8	60	0,91	1,02	4,3	11,0
HL-8	Coulter	36	0,84	0,92	8,7	12,8
ELT-8	Coulter	49	0,85	0,91	9,7	11,6

Tab. 3. Ausreißer bei den vergleichenden Thrombocytenzählungen (*); MTV ist das mittlere Thrombocyten-Volumen der Messungen am H 6000.

Nr.	H 6000	HL-8	ELT-8	Coulter	Zählkammer	MTV
1	72*	142	151	191	150	9,3
2	82		135*	94	100	10,2
3	60*		122	114	130	9,2
4	64*		167	173	140	7,9
5	160		9*	136	150	10,7
6	19	82*	4	25	10	10,4
7	102*		223	266	230	7,8
8	99*		225	275*	210	8,5
9	78	133*	88	83	60	10,9
10	84*	234	242	273	240	6,0

Steigungen m und Achsenabschnitte b (siehe Tab. 2) der in den Abbildungen eingezeichneten Ausgleichsgeraden wurden nach dem Modell der Strukturrelation ermittelt („standardisierte Hauptkomponentenmethode“). Dies entspricht besser den tatsächlichen Gegebenheiten beim Methodenvergleich als das Regressionskalkül (3), denn hier soll die Übereinstimmung der Wertlage zweier Methoden anhand von Steigung und Achsenabschnitt aufgezeigt, nicht y aus x oder umgekehrt geschätzt werden.

Abb. 1. Korrelation der Thrombocytenzählungen ELT-8 vs. Hemalog 8. Gerade: Orthogonal-Regression.

Abb. 2. Korrelation der Thrombocytenzählungen ELT-8 vs. H 6000. Gerade: Orthogonal-Regression. Ausreißer (*) sind markiert.

Die Steigungen der Strukturgeraden beim Vergleich zweier opto-elektronischer Geräte liegen sehr nahe bei 1, die Absolutwerte der Achsenabschnitte sind kleiner als $5 \cdot 10^9/l$. Beim Vergleich der Thrombocounter-Messungen mit den opto-elektronischen Messungen werden Steigungen von ungefähr 0,9 erhalten, die Achsenabschnitte liegen bei etwa $10 \cdot 10^9/l$. Doch sollte dieser Unterschied in Anbetracht der Stichprobengröße von etwa 40 eher als signifikanzverdächtiger Trend bewertet werden, denn Steigungen der

Abb. 3. Korrelation der Thrombocytenzählungen Thrombocounter vs. H 6000. Gerade: Orthogonal-Regression.

Abb. 4. Korrelation der Thrombocytenzählungen Thrombocounter vs. ELT-8. Gerade: Orthogonal-Regression.

Strukturgeraden von 0,9 sind nach dem „likelihood-ratio-Kriterium“ (4) kaum signifikant von 1 verschieden (p etwa 0,1).

Mit $s(y, x)$ sind in Tabelle 2 auch die Standardabweichungen der Schätzungen y aus x aufgenommen. Systematische Unterschiede sind nicht erkennbar, obwohl die Präzision in Serie (Tab. 4) deutliche Unterschiede aufweist. Bei den opto-elektronischen Geräten wurden Variationskoeffizienten von etwa 3% ermittelt, beim Thrombocounter betrug der VK in Serie etwa 9,9%.

Tab. 4. Präzision der Thrombocytenzählung (Patientenprobe) in Serie ($n = 20$, bei $90 \cdot 10^9/l$).

Gerät	H 6000	HL-8	ELT-8	Coulter
VK (%)	3,6	3,3	2,8	9,9

Diskussion

Das Problem der Richtigkeitskontrolle von Thrombocytenzählverfahren muß heute immer noch als unbefriedigend gelöst angesehen werden. Dafür gibt es vornehmlich zwei Gründe. Die oft als Referenzmethode angeführte Kammerzählung ist aufgrund des oft ungünstig kleinen Verhältnisses von gezählten Zellen zu vorhandenen Zellen wenig präzise (5), selbst wenn man unterstellt, daß es sich bei der in der Zählkammer befindlichen Probe um eine zufällige Stichprobe aus dem zirkulierenden Blut handelt und keine Zählfehler gemacht wurden. Die Zählkammer sollte somit eher als Bezugsmethode gelten, um vermutete grobe Richtigkeitsfehler zu überprüfen. Des weiteren gibt es zur Vollblutprobe kein physiologisches Korrelat in Form einer käuflichen Richtigkeitskontrolle. Durch die Verwendung von membranstabilisierten Zellen tierischen oder humanen Ursprungs sind z. B. Fließverhalten, Form und Adhäsionseigenschaften humaner Thrombocyten während der Zellzählung nur schlecht imitierbar. Eine konstante Wiederfindungskonzentration im deklarierten Bereich bietet deshalb nur beschränkt Gewähr für eine richtige Messung von Patientenproben.

Zieht man in Betracht, daß nur Thrombocyten-Messungen unter $100 \cdot 10^9/l$ berücksichtigt wurden, kann die Korrelation der Thrombocytenzählung zwischen den Geräten insgesamt als recht gut bezeichnet werden. Die Standardabweichungen weisen jedoch darauf hin, daß in etwa 5% der Fälle mit Abweichungen von mehr als $20 \cdot 10^9/l$ (von Gerät zu Gerät) zu rechnen ist. Ein nicht unerheblicher Teil der Differenzen ist präzisionsbedingt. Nach Erfahrung der Autoren beträgt die Präzision von Tag zu Tag etwa das Doppelte der Präzision in Serie. Beim ELT-8 läßt sich bei Thrombocytenkonzentrationen von $100 \cdot 10^9/l$ ein VK von 4–5% von Tag zu Tag gut realisieren. Andererseits lassen sich auch methodisch bedingte Unterschiede beobachten.

Aus den Abbildungen 3 und 4 ist zu erkennen, daß Thrombocounter-Meßwerte unterhalb von $30 \cdot 10^9/l$ höher liegen als die der opto-elektronischen Vollautomaten. Dies erklärt die beobachteten Unterschiede in Verteilungsbreite, Korrelationskoeffizienten sowie Steigung und Achsenabschnitt der Strukturgeraden.

Oberhalb von $40 \cdot 10^9/l$ scheint dieser Trend nicht mehr zu bestehen. Die Meßpunkte streuen dann gleichmäßig um eine angenommene Gerade mit der Steigung 1 und dem Achsenabschnitt 0.

In Abbildung 2 sind neben den in die Rechnungen eingegangenen Meßwerten auch die Ausreißer eingezeichnet. Sieht man einmal von dem Wertpaar 160/9 (H 6000/ELT-8) ab, für das keine Erklärung gefunden werden konnte, fällt auf, daß Thrombocytenzählungen am H 6000 vereinzelt wesentlich niedrigere Werte ergeben als an den anderen Geräten (siehe auch Tab. 3). In Abbildung 5 sind die Differenzen der Meßwertpaare von H 6000 und ELT-8 gegen das am H 6000 bestimmte mittlere Thrombocytenvolumen (MTV) aufgetragen. Es ist gut zu ersehen, daß die Ausreißer vornehmlich Patientenproben betrafen, die ein gegenüber der Norm erniedrigtes MTV aufwiesen. Diese Abweichungen waren stets reproduzierbar und traten bei den betreffenden Patienten auch an nachfolgenden Untersuchungstagen auf. Eine Erklärung für diese am H 6000 teilweise fälschlich erniedrigten Thrombocytenkonzentrationen bei kleinem MTV können wir noch nicht geben. Sicherlich ist eine Mikrothrombocythämie nicht der alleinige Grund, da in der Mehrzahl der Fälle Mikrothrombocyten völlig korrekt gezählt wurden.

Um eine Meßwertbeeinflussung der automatisierten Probennahme am H 6000 und Hemalog 8 durch eine ungenügende Probendurchmischung ausschließen zu können, verglichen wir zusätzlich noch die Leukocytenkonzentrationen als quasi internen Standard der untersuchten thrombopenischen Patientenproben (Abb. 6). Die ausgezeichnete Übereinstimmung wird durch einen *Pearson-Korrelationskoeffizienten* $r = 0,994$ bei einer Steigung der Strukturgeraden von 1,02 und einem Achsenabschnitt von $-0,18 \cdot 10^9/l$ belegt. Die Standardabweichung ($s_{y,x}$) betrug 1,01. Die Leukocytenkorrelationen zwischen den anderen Geräten waren vergleichbar gut.

Während in der Literatur (6) vornehmlich über fälschlich erhöhte Thrombocytenkonzentrationen in thrombopenischen Proben bei der automatisierten Zellzählung berichtet wird, überwog in der vorliegenden Studie die Anzahl fälschlich erniedrigter Thrombocytenwerte. Ausreißer mit zu hohen Thrombocytenwerten wurden nur in drei Fällen beobachtet. Unseres Erachtens wird die Zählsicherheit vom H 6000 und ELT-8 wesentlich dadurch erhöht, daß beide Geräte Zellvolumen-Verteilungskurven der Erythrocyten und Thrombocyten graphisch bzw. optisch darstellen können. Auftretende Zellfragmente unter cytochemischer Therapie (7) oder mikrocytäre Erythrocy-

Abb. 5. Differenz der Thrombocytenzählungen (H 6000 — ELT-8) vs. mittleres Thrombocytenvolumen (MTV) am H 6000.

Abb. 6. Korrelation der Leukocytenzählungen ELT-8 vs. H 6000. Gerade: Orthogonal-Regression.

ten (8) werden so eindeutiger als „atypische Thrombocyten“ bzw. als zur Erythrocytenpopulation gehörig erkannt. Um fälschlich erniedrigte Thrombocytenkonzentrationen am H 6000 bei stark erniedrigtem MTV ($< 8,2 \text{ fl}$) mit hoher Sicherheit aufzudecken, werden diese Befunde mikroskopisch kontrolliert. Dies betrifft etwa 1%–2% des Patientengutes unserer Klinik.

Literatur

1. Drewinko, B., Bollinger, P., Rountree, M., Johnston, D., Corrigan, G., Dalton, W. T. & Trujillo, J. M. (1982) *Am. J. Clin. Pathol.* 78, 738–747.
2. Bessman, J. D., Williams, L. J. & Gilmer, P. R. (1981) *Am. J. Clin. Pathol.* 76, 289–293.
3. Haeckel, R. & Schneider, B. (1980) *GIT Labor-Medizin* 3, 99–104.
4. Feldmann, U., Schneider, B., Klinkers, H. & Haeckel, R. (1981) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 121–137.
5. Koopman, P. A. R. (1983) *Biometrics* 39, 1093–1096.
6. Mayer, K., Chin, B., Magnes, J., Thaler, H. T., Lotspeich, C. & Baisley, A. (1980) *Am. J. Clin. Pathol.* 74, 135–150.
7. Stass, S. A., Holloway, M. L., Peterson, V., Creëgan, W. J., Gallivan, M. & Schumacher, H. R. (1979) *Am. J. Clin. Pathol.* 71, 125–128.
8. Akwari, A. M., Ross, D. W. & Stass, S. A. (1981) *Am. J. Clin. Pathol.* 77, 220–221.

Dr. med. Dr. rer. nat. W. Stibbe
Zentrum Innere Medizin
Abt. für Klinische Chemie
Robert-Koch-Straße 40
D-3400 Göttingen