



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Analyse der Leukozytenpopulationen in der
Cerebrospinalflüssigkeit -
Vergleich zwischen manueller und automatisierter
Methode

verfasst von
Eran Margan

angestrebter akademischer Grad
Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl: A-442
Studienrichtung: Diplomstudium Anthropologie
Betreut von: Prim. Univ. Doz. Dr. Manuela Födinger

Nina und Liara

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	4
1. ANATOMIE DES LIQUORSYSTEMS	5
1.1. Äußere Liquorräume und Meningen	5
1.1.1. Dura mater	5
1.1.2. Arachnoidea	6
1.1.3. Pia mater	7
1.2. Innere Liquorräume und Ventrikelssystem	8
1.2.1. Ventriculi laterales	9
1.2.2. Ventriculus tertius	9
1.2.3. Ventriculus quartus	10
2. LIQUORPRODUKTION, ZIRKULATION UND RESORPTION.....	11
2.1. Produktion	11
2.2. Zirkulation	11
2.3. Resorption	12
3. LIQUORPUNKTION	13
3.1. Geschichtlicher Hintergrund der Lumbalpunktion	13
3.2. Indikationen und Kontraindikationen	13
3.3. Punktionsmethoden	14
3.3.1. Lumbalpunktion	14
3.3.2. Subokzipitalpunktion	15
3.3.2.1. Mediale Subokzipitalpunktion	16
3.3.2.2. Laterale Subokzipitalpunktion	16
3.3.3. Ventrikelpunktion	17
3.3.3.1. Der frontale Zugang	17
3.3.3.2. Der temporale Zugang	17
3.3.3.3. Der parietale Zugang	17
4. LIQUORINHALTSSTOFFE UND ZELLEN	18
4.1. Blut-Hirn-Schranke und Blut-Liquor-Schranke	18
4.2. Inhaltsstoffe des Liquors	19
4.2.1. Proteine	19
4.2.2. Lipide	20
4.2.3. Elektrolyte	20
4.2.3.1. Natrium	20
4.2.3.2. Kalium und Kalzium	20
4.2.4. Säure-Basen-Gleichgewicht	21
4.2.5. Glukose und Laktat	21
4.2.5.1. Glukose	21
4.2.5.2. Laktat	21
4.3. Zellen des Liquors	22
4.3.1. Leukozyten	22
4.3.1.1. Lymphozyten	22
4.3.1.2. Monozyten	23
4.3.1.3. Granulozyten	23
4.3.1.3.1. Neutrophile Granulozyten	24
4.3.1.3.2. Basophile Granulozyten	25
4.3.1.3.3. Eosinophile Granulozyten	26
4.3.2. Erythrozyten	27
4.3.3. Makrophagen	28
4.3.4. Tumorzellen	28
4.3.5. Ependymzellen, Plexuszellen, Knorpelzellen	29

5.	METHODEN DER ZELLZÄHLUNG UND ZELLDIFFERENZIERUNG IM LIQUOR.....	30
5.1.	Manuelle Zellzählung.....	30
5.2.	Manuelle Zelldifferenzierung.....	31
5.3.	Automatisierte Methoden zur Zellzählung	32
5.4.	Automaten für die Zellzählung im Liquor.....	33
5.4.1.	Der Automat von Beckman-Coulter.....	33
5.4.2.	Die Automaten von Sysmex.....	34
5.4.3.	Der Automat von Cell-Dyn	35
5.4.4.	Der ADVIA 120/2120 Automat	36
6.	MATERIAL UND METHODEN.....	39
6.1.	Patienten.....	39
6.2.	Methoden.....	39
6.2.1.	Manuelle Zellzählung.....	39
6.2.2.	Automatisierte Zellzählung mittels ADVIA 2120.....	41
6.2.3.	Herstellung eines Zytozentrifugenpräparates	42
6.2.4.	Färbung eines Zytozentrifugenpräparates	42
6.3.	Datenanalyse	43
6.3.1.	Vergleichsanalyse.....	43
6.3.2.	Statistik.....	43
6.3.2.1.	Korrelation der Zellzahlen zwischen manueller und automatische Methode	43
6.3.2.2.	Korrelation der mononukleären und polymorphkernigen Zellen zwischen manueller und automatische Methode.....	45
7.	RESULTATE.....	46
7.1.	Übereinstimmung der Zellzahl zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode in 74 Liquorproben.....	46
7.2.	Übereinstimmung der Zellzahl zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode in 60 Liquorproben.....	49
7.3.	Übereinstimmung der Zellzahl zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode bei Fällen mit einer Zellzahl > 12/3 (> 4/ μ l).....	50
7.4.	Übereinstimmung der Zelldifferenzierung zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode	54
8.	DISKUSSION	58
8.1.	Ergebnisse der Zellzahlbestimmung.....	58
8.2.	Ergebnisse der Zelldifferenzierung	60
8.3.	Vor- und Nachteile der manuellen Zellzählung	62
8.4.	Vor- und Nachteile der Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten	62
8.5.	Vor- und Nachteile der automatisierten Zellzählung/-differenzierung.....	63
8.6.	Ursachen für diskrepante Resultate bei der Zelldifferenzierung	63
8.7.	Einschränkungen der vorliegenden Arbeit	64
9.	ABSCHLUSS UND ZUSAMMENFASSUNG	65
	LITERATURVERZEICHNIS	66
	DANKSAGUNG	69
	ANHANG	71
	ABSTRACT	72
	LEBENS LAUF	75

Einleitung

Die Analyse der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF, Lat. Liquor cerebrospinalis) mit Bestimmung der Zellzahl und Differenzierung der Zellpopulationen stellt einen wichtigen diagnostischen Schritt bei der Abklärung von Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) dar. Zellzahl und Zelldifferenzierung tragen wesentlich zur Differenzierung zwischen bakterieller und viraler Meningitis bei und unterstützen das Diagnostizieren verschiedener neurologischer Störungen (z.B. Enzephalitiden).

Für die Zellzählung und die Zelldifferenzierung stehen manuelle und automatisierte Methoden zur Verfügung. Bis vor kurzem standen ausnahmslos manuelle Techniken mit mikroskopischer Zellzählung/Zelldifferenzierung zur Verfügung. Diese sind jedoch sehr aufwändig und zeitintensiv. Zudem sind die Messergebnisse subjektiv, da sie vom Beurteilenden determiniert werden. Dies hat direkten Einfluss auf die Präzision der Resultate, weshalb besonders erfahrenes Laborpersonal benötigt wird.

Mit der in dieser Diplomarbeit eingesetzten automatisierten Methode können die Zellen der CSF gezählt und die Leukozyten differenziert werden. Das Analysegerät ADVIA 2120 ermöglicht in einem eigenen Kanal die exakte Messung der Zellzahl. Anhand von Zellstruktur und Größe ist es ferner möglich neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten (polymorphkernige Leukozyten, PMN), sowie Lymphozyten und Monozyten (mononukleäre Zellen, MN) zu differenzieren. Die Ermittlung der Zahl der roten Blutkörperchen ermöglicht zudem Rückschlüsse auf Blutungen, sowie auf eine etwaige Kontamination der Probe mit peripherem Blut.

1. Anatomie des Liquorsystems

1.1. Äußere Liquorräume und Meningen

Das ZNS (Gehirn und Rückenmark) besteht aus einer sehr empfindlichen, weichen, gallertähnlichen Zellmasse, und wird durch das knöcherne Schädeldach bzw. die Schädelbasis und im weiteren Verlauf durch den Wirbelkanal besonders gut geschützt. Um zu verhindern, dass Gewebe des ZNS bei jeder Bewegung an die umliegenden Knochen prallt und bei Erschütterungen Blutgefäße und Nervenzellen eingeklemmt oder verletzt werden, werden Gehirn und Rückenmark von Meningen (Hirnhäuten und Rückenmarkhäuten) umhüllt und befestigt, wobei drei Häute unterschieden werden: Dura mater, Arachnoidea und Pia mater (Firbas, 1995). Der Übergang zwischen den Hirn- und Rückenmarkhäuten ist nicht genau definiert. Im Bereich des Foramen magnum am Os sphenoidale gehen die Häute kontinuierlich ineinander über. Als eine zusätzliche Schutzfunktion für das empfindliche Gewebe des ZNS dient der Liquor cerebrospinalis, der den Raum zwischen dem Gehirn bzw. dem Rückenmark und dem Knochen füllt (Firbas, 1995).

1.1.1. Dura mater

Die Dura mater (Pachymeninx oder harte Hirnhaut) besteht aus einem sehr festen, kollagenreichen Bindegewebe. Sie liegt dem Schädelknochen direkt an dessen Innenseite an und ist über die Lamina externa mit dem Periost des Knochens verwachsen. Eine Lamina interna stellt die eigentliche meningeale Schicht und die Verbindung mit dem Subarachnoidalraum dar. Die Laminae externa und interna trennen sich an Stellen, wo sich durale Sinus befinden. Die Dura mater wird nach außen hin (Schädelkalotte bzw. Wirbelkanal) durch einen durchgehenden Spalt, dem Epiduralraum, nach innen (Arachnoidea) durch den Subduralraum begrenzt (Abbildung 1.1.) (Firbas, 1995).

Durch den Verlauf der Dura mater wird der Schädelraum in Falx cerebri und Tentorium cerebelli geteilt. Die Falx zieht in die Fissura longitudinalis cerebri zwischen den zwei Großhirnhemisphären durch und beteiligt sich an der Bildung des Sinus sagittalis superior (Firbas, 1995). Das Tentorium umhüllt das Cerebellum und spannt sich zwischen Os occipitale (Sulcus sinus transversi) und Os temporale (Sulcus sinus petrosi superioris). Falx cerebri und Tentorium cerebelli treffen sich in der Mittellinie und formen zusammen den Sinus rectus (Firbas, 1995).

Das Rückenmark wird von Foramen magnum bis zur Höhe des dritten Sakralwirbels von der Dura mater spinalis umhüllt und geht dann bis Os coccygis in ein Filum terminale über (Firbas, 1995).

Die Dura mater spinalis wird auch hier in zwei Schichten unterteilt. Die Lamina externa verschmilzt hier mit dem Periost des Wirbelkanals, während die Lamina interna eine Art Duralsack bildet - in diesem befindet sich das Rückenmark. Die beiden Laminae sind nur an Stellen wo die Radices spinalis des Spinalmarks durch die Foramina intervertebralia hindurchziehen miteinander verbunden (Firbas, 1995).

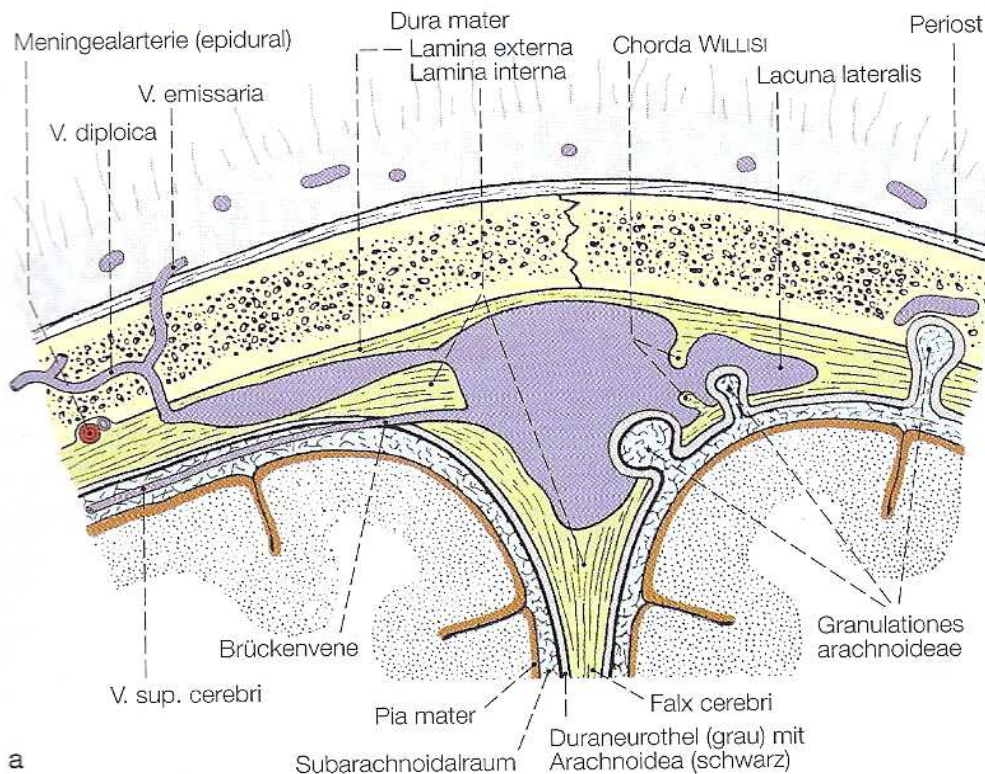


Abbildung 1.1. Hirnhäute des Gehirns, Frontalschnitt durch den Scheitel des Schädeldachs (Benninghoff, 2004)

1.1.2. Arachnoidea

Die Arachnoidea in Gehirn und Rückenmark liegt der Dura mater direkt an (Firbas, 1995). Es handelt sich dabei um eine dünne, gefäßlose Schicht, die über zarte Bindegewebsfasern mit der darunter liegenden Pia mater encephali verbunden ist. Zwischen Arachnoidea und Pia mater erstreckt sich die Cavitas subarachnoidalis (auch Subarachnoidalraum genannt), die Liquor cerebrospinalis enthält (Abbildung 1.1.).

Der Subarachnoidalraum ist nicht einheitlich aufgebaut und hängt stark von den Faltungen des Gehirns ab (Firbas, 1995). In Bereichen größerer Vertiefungen erweitert sich der Subarachnoidalraum zu Zisternen (Abbildungen 1.1. und 1.3.). Dabei ist die Cisterna cerebellomedularis die größte

und klinisch wichtigste Erweiterung des Subarachnoidalraums, denn sie kann durch eine Sub-okzipitalpunktion erreicht werden (Firbas, 1995).

Die Arachnoidea enthält Zellen, die den Liquorraum gegen die Dura mater abdichten. Sie formen an den Enden der Spinalnervenzurzel mehrere, aufgelockerte Zellverbände. Diese Zellen dienen der Regulation des Liquordrucks, da der Liquor durch sie abfließen kann. Im Bereich des ersten und zweiten Lendenwirbels befindet sich im Subarachnoidalraum eine weitere wichtige Erweiterung, die Cisterna lumbalis. Sie enthält die Cauda equina (gebildet aus dem Filum terminale und den Vorder- u. Hinterwurzel) und ist im Rahmen der Lumbalpunktion die bevorzugte Einstichstelle, um Liquor zu entnehmen. Die Einstichstelle liegt zwischen den Dornfortsätzen der Lendenwirbeln L3/L4 oder L4/L5. Hier kann das Rückenmark nicht mehr verletzt werden (Firbas, 1995).

1.1.3. Pia mater

Die Pia mater (Leptomeninge, weiche Hirnhaut) setzt sich aus dünnen, endothelähnlichen Zellschichten zusammen. Sie ist reich an Nervenzellen, Blutgefäßen und elastischen Fasern und ist an Gehirn und Rückenmark fixiert. Die äußere Schicht der Pia mater überzieht trichterförmig Blutgefäße und Nervenzellen, die an den Subarachnoidalraum angrenzen (Abbildung 1.2.). Der Raum zwischen der Pia mater und den Gefäßen heißt Virchow-Robin-Raum. Mit einer inneren Schicht überdeckt die Pia mater das Gewebe des ZNS und folgt diesem bis in die tiefen Furchen. Die Pia mater, die auch die Hirnventrikel auskleidet, dringt sogar mit Blutgefäßen in die oberen Schichten des Gehirn- u. Rückenmarkparanchyms. Die Pia mater beteiligt sich zusammen mit der Lamina epithelialis des Ependyms an der Bildung des Plexus choroideus (Firbas, 1995).

Die Dicke der Pia mater unterscheidet sich deutlich zwischen Gehirn und Rückenmark. Während die Pia mater im Bereich um das Großhirn sehr zart ist, wird sie nach caudal immer dicker und kräftiger (Firbas, 1995).

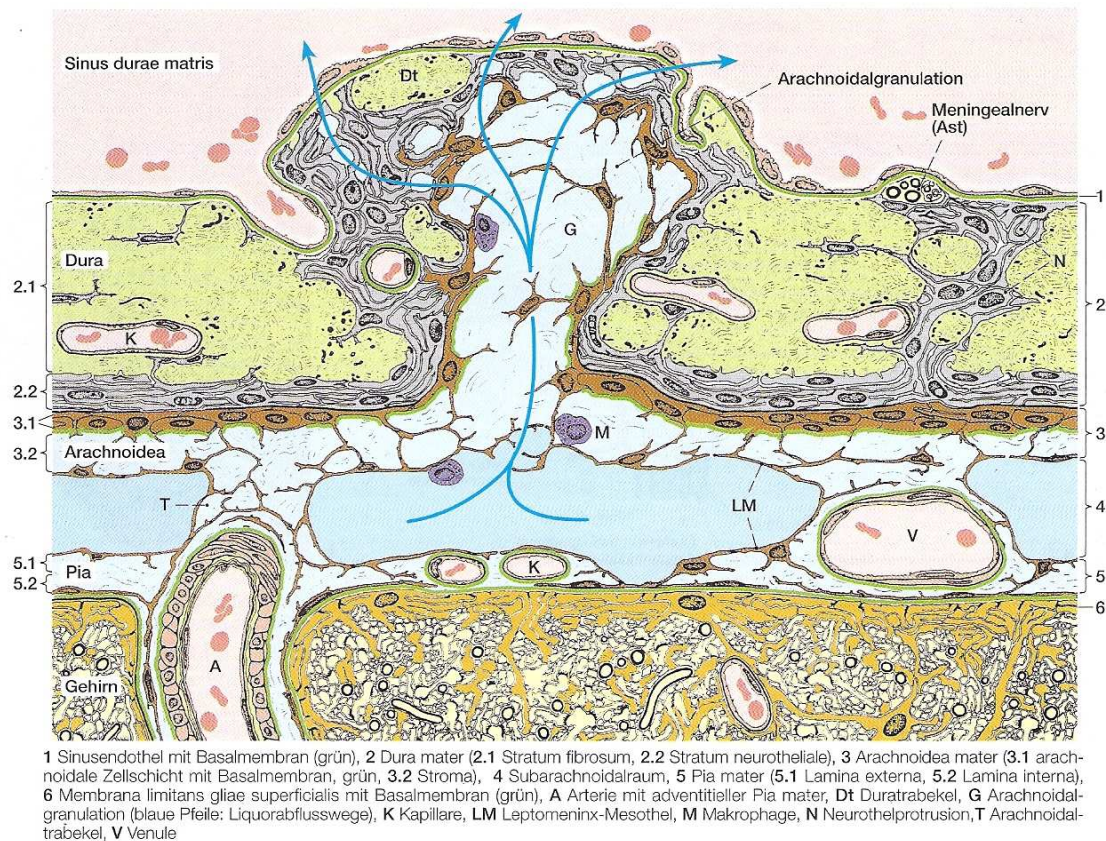


Abbildung 1.2. Histologie der Hirnhäute im Bereich der Arachnoidalgranulation und Liquorabflusswege (Benninghoff, 2004)

1.2. Innere Liquorräume und Ventrikelssystem

Das Ventrikelsystem, wie es in Abbildung 1.3.b. dargestellt wird, ist ein mit Liquor cerebrospinalis gefüllter Hohlraum, der sich bereits früh während der embryonalen Entwicklung des ZNS bildet (Firbas, 1995). Es gliedert sich aus zwei Seitenventrikeln (Ventriculi laterales), aus einem kleinen dritten Ventrikel (Ventriculus tertius) und einem länglichen vierten Ventrikel (Ventriculus quartus), der den Liquor über dem Canalis centralis in die Medulla oblongata zum Rückenmark führt (Firbas, 1995).



1.2.1. Ventriculi laterales

1.2.2. Ventriculus tertius

9

Ventriculus tertius dar (Benninghoff, 2004). Dadurch geht der Plexus choroideus der beiden Seitenventrikel in den Plexus des dritten Ventrikels über (Firbas, 1995) (Abbildung 1.3.c.).

Der dritte Ventrikel wird nach vorne durch die Commissura anterior (rostralis) und die Lamina terminalis begrenzt. Der Recessus pinealis und die Commissura posterior (habenularum) stellen die hintere Wand des Ventrikels dar. Die seitlichen Wände werden auf beiden Seiten durch den Thalamus und Hypothalamus begrenzt. Der Boden des dritten Ventrikels liegt im vorderen Teil direkt am Chiasma opticum und an der Hypophyse an. Hier bildet der Ventrikel den Recessus opticus und Recessus infundibuli. Nach hinten hin wird der Boden zunächst vom Tuber cinereum und Corpus mamillare und schließlich vom obersten Teil der Brücke (Pons) das Tegmentum mesencephali (auch Pars dorsalis pedunculi cerebri genannt) gebildet. Letzterer stellt auch gleichzeitig die ventrale Begrenzung der Öffnung des Aquaeductus mesencephali, dem Übergangskanal zum vierten Ventrikel, dar (Firbas, 1995).

1.2.3. Ventriculus quartus

Der vierte Ventrikel befindet sich im Rhombencephalon (Rautenhirn), das sich wiederum aus der Medulla oblongata (verlängerter Mark), dem Pons und dem hinteren Teil des Cerebellums (Kleinhirn) zusammensetzt (Waldeyer, 2009). Der Boden des vierten Ventrikels umfasst das Tegmentum des Pons und den oberen Teil der Medulla oblongata. Das Dach des Ventrikels, welches die Form eines Zeltes aufweist, gliedert sich in Vellum medullare superius und inferius (Benninghoff, 2004). Charakteristisch für den vierten Ventrikel ist die Bildung eines spitzenförmigen Fastigiums (Gipfel), welches durch anteriore Teile des Kleinhirns begrenzt wird (Firbas 1995). Caudal vom Fastigium, wird der Ventrikel wieder enger und bildet schließlich den Canalis centralis medullae spinalis (Benninghoff, 2004). Hier befindet sich die liquorproduzierende Tela choroidea ventriculi quarti mit dem Plexus choroideus (Waldeyer, 2009).

Am vierten Ventrikel befinden sich mehrere Öffnungen für den Zu- und Abfluss des Liquors. Sie stellen eine direkte Verbindung zum Subarachnoidalraum dar. Zwei Öffnungen befinden sich in der Höhe des Überganges zwischen Pons und Medulla oblongata. Sie werden als Aperturae laterales ventriculi quarti (Foramina Luschkae) bezeichnet. Weiter caudalwärts liegt die Apertura medialis ventriculi quarti (Foramen Magendii) (Bähr, 2003) (Abbildung 1.3.a.).

2. Liquorproduktion, Zirkulation und Resorption

2.1. Produktion

Der Hauptteil des Liquors cerebrospinalis, etwa 90% wird im fenestrierten Plexus choroideus der beiden Seitenventrikel und des dritten und vierten Ventrikels produziert. Die restlichen 10% stammen aus den nicht-fenestrierten Blutgefäßen des Gehirns und aus den teilweise fenestrierten Blutgefäßen des Subarachnoidalraums sowie aus dem Hirnparanchym, welches über Extrazellularräume mit dem Liquorraum in Verbindung steht (Zettl, 2005).

Das Gesamtvolumen des Liquorraumes beträgt bei Menschen je nach Alter und Geschlecht zwischen 150-170 ml. Untersuchungen des Liquors mittels Computertomographie haben ergeben, dass das Volumen des Liquors cerebrospinalis in den Ventrikeln $33 \pm 18,6$ ml beträgt während in den extraventrikulären Räumen die Liquorflüssigkeit 133 ± 43 ml ausmacht (Zettl, 2005).

Pro Tag wird der gesamte Liquor cerebrospinalis etwa 3 bis 4 male ausgetauscht (Zettl, 2005). Dieser Fakt errechnet sich aus dem Verhältnis zwischen dem Gesamtvolumen des Liquors und der täglichen Liquorproduktion. Letztere beträgt im Schnitt 500-600 ml pro Tag. Die Liquorsekretion umfasst jedoch nur weniger als 0,1 % des gesamten Wasseraustauschvolumens zwischen Blut und Gehirn, der insgesamt 600 l pro Tag beträgt (Zettl, 2005).

2.2. Zirkulation

Die Zirkulation der Liquorflüssigkeit ist ein dynamischer Prozess, der direkt mit der Liquorsekretion und -resorption zusammenhängt. Der Liquorkreislauf verläuft zwischen dem Ventrikelssystem und dem Subarachnoidalraum und wird durch die Druckwirkung, die die arteriellen Blutgefäße während der systolischen und diastolischen Phase erzeugen, ermöglicht (Zettl, 2005). Diese Druckunterschiede beeinflussen die Richtung des Liquorflusses, so dass es je nach Druckphase zu einem sogenannten „to and from-flow“ (einer Auf- und Ab-Pulsation) kommt (Zettl, 2005). Außerdem bestimmt die Pulsationsänderung die Maximalgeschwindigkeiten des Liquorflusses. Diese schwanken zwischen 0,5-3,5 cm/sec. Dadurch wird sichergestellt, dass in bestimmten Regionen eine allmähliche Durchmischung des Liquors stattfindet, während in anderen Regionen „steady-state“ Verhältnisse herrschen (Zettl, 2005).

2.3. Resorption

Die Liquorresorption vom Subarachnoidalraum erfolgt über zwei verschiedene Wege. Ein Teil des Liquors gelangt über die Arachnoidalzotten (Granulationes arachnoidales) in den mit venösem Blut gefüllten Sinus sagittalis superior (Zettl, 2005) (Abbildung 1.2.). Die Arachnoidalzotten sind pilzartige Ausstülpungen der Arachnoidea in die Dura mater (Benninghoff, 2004). Zusätzlich zur Resorption stellen sie einen Schutz des Gehirns bei sich schlagartig ändernden intrakraniellen Druck dar. Weiters finden hier nach neuen Erkenntnissen auch immunologische Reaktionen statt. Der Stoffaustausch erfolgt in diesem Bereich über eine dünne Endothelschicht und ist wesentlich weniger selektiv als jener der Blut-Liquor-Schranke (Zettl, 2005). Die Gesamtzahl der Arachnoidalzotten steigt mit dem Alter an (Firbas, 1995).

Der Rest des Liquors wird entlang der Perineuralscheiden der Hirn- und Spinalnerven bzw. über das Ependym resorbiert. Der Liquor gelangt, dort wo Nerven und Nervenwurzeln durch die Hirnhäute austreten, bevorzugt im Bereich des Nervus olfactorius und der Lamina cribrosa, des Nervus opticus und des Nervus vestibulo-cochlearis in die Lymphflüssigkeit (Zettl, 2005).

3. Liquorpunktion

3.1. Geschichtlicher Hintergrund der Lumbalpunktion

Bereits im Jahr 400 v. Chr. hat der griechische Arzt Hippokrates erste Versuche mit der Punktion der Gehirnflüssigkeit durchgeführt, in der Hoffnung Hydrocephalus zu kurieren (Zettl, 2005). Nachdem diese Untersuchungen im Laufe der Jahrhunderte in Vergessenheit gerieten, war es der belgische Arzt Andreas Vesalius im Jahr 1543, der die Flüssigkeit im Gehirn erneut untersuchte.

Etwa 200 Jahre später, führte Domenico Cotugno die erste Lumbalpunktion an Leichen durch (Zettl, 2005). Im Jahr 1825 nutzte Francois Magandie den Begriff Liquor cerebrospinalis, um die Flüssigkeit um das Gehirn darzustellen. Er führte zum ersten Mal eine Liquorpunktion der Cisterna magna an lebenden Tieren durch.

Mit dem deutschen Internisten Heinrich Quincke begann im Jahr 1891 die moderne Ära der Liquordiagnostik. Quincke entwickelte die neue, relativ schnell durchzuführende und komplikationslose Methode zur Untersuchung des Liquors, die Lumbalpunktion. Die Lumbalpunktion nach Quincke wird auch in der heutigen Zeit angewendet (Zettl, 2005).

Weitere Fortschritte der Punktion in der klinischen Praxis fanden gleichzeitig in Deutschland und in der USA im Jahr 1919 statt, als Mediziner in beiden Ländern unabhängig von einander die Methode der Suboccipital- und der Zisternenpunktion entwickelten (Zettl, 2005).

3.2. Indikationen und Kontraindikationen

Mit Hilfe der Liquorpunktion können Infektionen des ZNS nachgewiesen und neurologische Erkrankungen diagnostiziert werden. Eine Liquorpunktion kann aber in manchen Fällen auch als eine therapeutische Maßnahme genutzt werden. Dies ist zum Beispiel bei Hydrocephalus oder bei Tumorerkrankungen der Fall, wenn der Liquordruck im Gehirn bzw. Rückenmark reduziert werden muss. Weiters können über eine Liquorpunktion verschiedene Medikamente wie Antibiotika, Chemostatika oder Antispastika, welche nicht die Blut-Liquor-Schranke passieren können, direkt ins ZNS appliziert werden (Zettl, 2005). Auch Kontrastmittel, die im Rahmen bildgebender Verfahren benötigt werden, können über eine Liquorpunktion verabreicht werden.

Obwohl es sich bei der Liquorpunktion um einen relativ einfachen Eingriff handelt, der nur selten mit Komplikationen assoziiert ist, kann die Punktion nur dann durchgeführt werden, wenn vorher sichergestellt wurde, dass der Patient diesen Eingriff tatsächlich benötigt (Zettl, 2005).

Dazu müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein und mögliche Kontraindikationen ausgeschlossen werden. Zu den Kontraindikationen zählen zunächst Entzündungen an der Punktionsstelle, die die Haut bis hin zu tiefer liegendem Gewebe betreffen können (Zettl, 2005). Weiters stellt ein erhöhter intrakranieller Druck, vor allem im Bereich der hinteren Schädelgrube mit potentieller Einklemmung von Hirngewebe, einen Grund für die Ablehnung einer Liquorpunktion dar (Zettl, 2005). Auch die Einnahme von Medikamenten, welche die Blutgerinnung hemmen (sogenannte Antikoagulantien) spielen bei der Entscheidung, ob bei einem Patienten eine Liquorpunktion durchgeführt werden kann, eine wichtige Rolle. Ein erhöhtes Blutungsrisiko besteht ferner ab einer Thrombozytenzahl unter 50000/ μ l (Zettl, 2005).

3.3. Punktionsmethoden

3.3.1. Lumbalpunktion

Die Lumbalpunktion wird ausschließlich im Bereich der Lendenwirbel (LW) durchgeführt. Die Punktionsstelle befindet sich am Schnitt zweier gedachter Linien, die die beiden Beckenkämme mit der Wirbelsäule verbindet. Je nach Körperhöhe entspricht dieser Punkt dem Raum zwischen dem Processus spinosus des 2. und des 3. LW bzw. des 4. und des 5. LW (Zettl, 2005). Diese Stelle wird gewählt, da sich hier das Rückenmark verschmälert und endet (Conus medullaris), sodass die Wahrscheinlichkeit größere Nerven anzutreffen und zu verletzen gering ist (Zettl, 2005).

Die Lumbalpunktion kann sowohl im Liegen als auch im Sitzen durchgeführt werden. Der liegende Patient muss mit zur Brust gezogenen Beinen auf einer harten Unterlage liegen. Im Sitzen beugt sich der Patient mit dessen Oberkörper nach vorne (Abbildung 3.1.). Die Sitz- bzw. Liegeposition kann durch Kissen unter den Armen und Beinen unterstützt werden. Um die Stabilität der Lagerung während der tatsächlichen Lumbalpunktion zu gewährleisten, können die Patienten von einer zweiten Person unterstützt werden (Zettl, 2005).

Vor der Punktion muss die Haut an der Punktionsstelle mit Alkohol und einer speziellen Jodlösung sorgfältig desinfiziert werden. Anschließend kann das Lokalanästhetikum (2 ml einer 1-2%ige Lidocainlösung) direkt in tieferes Hautgewebe injiziert werden (Zettl, 2005).

Nachdem die schmerzhemmende Wirkung des Lidocains eingesetzt hat, wird die zur Lumbalpunktion vorgesehene Hautstelle mit zwei Fingern gestrafft (ein Rechtshänder nimmt die Zeige- u. Mittelfinger der linken Hand) und die Punktionsnadel ein wenig schräg in kranialer Richtung in den Zwischenwirbelraum eingeführt (Zettl, 2005). Beim Passieren der Dura mater (oder des Ligamentum flavum wenn die Punktion im Subokzipitalbereich stattfindet) wird ein deutlicher Widerstand verspürt. Danach ist das Einschieben der Punktionsnadel wieder leichter. Die Einstichtiefe kann je nach körperlichem Zustand, Alter und Gewicht des Patienten relativ stark variieren. Um die Position der Kanüle genau festzustellen, kann der Mandrin ein wenig herausgezogen werden. Die Liquorflüssigkeit soll dann spontan abtropfen (Zettl, 2005).



Abbildung 3.1. Lumbalpunktion (Zettl, 2005)

Um eine aussagekräftige Untersuchung des Liquors zu ermöglichen, müssen oft bis zu 15 ml Liquorflüssigkeit im Rahmen der Lumbalpunktion in einer Epruvette gesammelt werden. Bei zu geringer Menge kann der punktierende Arzt durch ein vorsichtiges Drehen oder durch eine Positionskorrektur der Kanüle das Abfließen des Liquors erleichtern. Weiters kann eine Erhöhung des Liquordrucks angestrebt werden. Dies gelingt dadurch, dass der Arzt dem Patienten hilft sich stärker nach vorne zu beugen oder ihn anweist im Bauchraum leicht zu pressen (Zettl, 2005) (Abbildung 3.1.).

Am Ende der Lumbalpunktion wird der Mandrin erneut in die Nadel platziert und mit dieser schließlich entfernt. Nachdem die Punktionsstelle steril verbunden wurde, muss der Patient noch weitere zwei Stunden am Bauch liegend verweilen.

3.3.2. Subokzipitalpunktion

Wenn die Lumbalpunktion nach Operationen, nach schweren Entzündungen oder bei Tumoren im Lendenwirbelbereich nicht durchgeführt werden kann, muss eine Subokzipitalpunktion

durchgeführt werden. Grundsätzlich werden zwei Zugänge unterschieden: eine mediale und eine laterale Subokzipitalpunktion (Zettl 2005).

3.3.2.1. Mediale Subokzipitalpunktion

Diese Methode wird auch zisternaler Zugang genannt. Die Einstichstelle befindet sich zwischen dem Processus spinosus des ersten Halswirbels und der Squama occipitalis (Abbildung 3.2). Die Punktion erfolgt zunächst in Richtung des unteren Randes des Os occipitale. Nachdem dieser erreicht wurde, wird die Kanüle in Richtung Glabella bewegt, wobei das Ligamentum Nuchae und die Dura mater durchgestochen werden. Sobald die Punktionsnadel in den Subarachnoidalraum eingeführt wurde, kann der Liquor cerebrospinalis spontan abfließen. Falls ein Unterdruck besteht (dieser Fall tritt oft bei sitzenden Patienten ein), muss der Liquor mittels Spritze vorsichtig aspiriert werden.

3.3.2.2. Laterale Subokzipitalpunktion

Diese Punktion erfolgt ausschließlich bei liegenden Patienten und befindet sich 1cm kaudal und 1cm dorsal vom Processus mastoideus direkt im Raum zwischen dem 1. und 2. Halswirbel (Abbildung 3.3).

Da bei der Methode mehrere Bänder durchgestochen werden, ist es relativ schwierig die genaue Position der Punktionsnadel zu ermitteln. Daher muss der Mandrin während des Einstechens mehrmals hinaus und hinein geführt und gleichzeitig mit einer Spritze vorsichtig aspiriert werden. Dieser Zugangsweg gilt als sicherer im Vergleich zur medialen Subokzipitalpunktion.



Abbildung 3.2. Mediale Subokzipitalpunktion
(Zettl, 2005)



Abbildung 3.3. Laterale Subokzipitalpunktion
(Zettl, 2005)

3.3.3. Ventrikelpunktion

Eine dritte Methode zur Liquorgewinnung stellt die Ventrikelpunktion dar. Sie ist jedoch komplexer, da die Schädelkalotte dabei durchgebohrt werden muss und wird daher selten verwendet. Auch hier werden mehrere Punktionsmöglichkeiten unterschieden: der frontale, temporale oder parietale Zugang (Zettl, 2005).

3.3.3.1. Der frontale Zugang

Dieser Zugang stellt die häufigste Methode einer Ventrikelpunktion dar. Ziel der Punktion sind die Vorderhörner der beiden lateralen Ventrikel. Zu diesen gelangt man durch Einführung einer Punktionskanüle 2-3cm seitlich der Schädelmittellinie vor der Sutura coronalis.

3.3.3.2. Der temporale Zugang

Durch diesen Eingriff wird angestrebt das Trigonum der Seitenventrikel zu erreichen. Um die genaue Punktionsstelle zu lokalisieren, wird vom oberen Ohransatz 3 cm nach kranial und 3 cm nach dorsal gemessen. Die Punktion erfolgt senkrecht zur Sagittalebene. Ein Vorteil dieser Methode ist die große Treffsicherheit auch bei kleineren Seitenventrikeln.

3.3.3.3. Der parietale Zugang

Mit dem parietalen Zugang werden die Hinterhörner der beiden Seitenventrikel punktiert. Die Punktionsstelle befindet sich etwa 5 cm oberhalb einer gedachten Linie, die von der Protuberantia occipitalis externa ausgeht und 3 cm lateral der Mittellinie endet (Zettl, 2005). Bei Säuglingen kann die Ventrikelpunktion direkt durch die großen Fontanellen erfolgen.

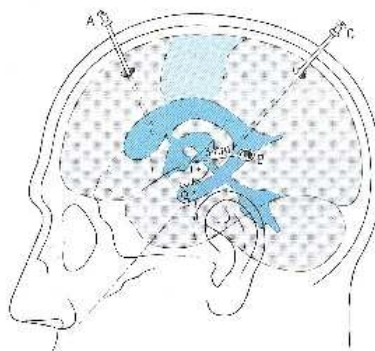


Abbildung 3.4. Ventrikelpunktion. a) frontale b) temporale c) parietale Punktion (Zettl, 2005)

4. Liquorinhaltsstoffe und Zellen

4.1. Blut-Hirn-Schranke und Blut-Liquor-Schranke

Zwischen der Blutbahn und dem Liquor cerebrospinalis einerseits und dem Extrazellularraum des ZNS andererseits befindet sich ein Barrierensystem, welche den Schutz der Zellen im Gehirn und Rückenmark vor Giften bzw. ausscheidungspflichtigen Stoffen sicherstellt. Durch die Fähigkeit dieser Barrieren nur bestimmte Stoffe hindurch zu lassen, wird gewährleistet, dass im Liquor stabile Verhältnisse von Ionenkonzentration und pH-Wert herrschen und die Nervenzellen mit wichtigen Inhaltsstoffen für die Signaltransduktionsprozessen versorgt werden (Waldeyer, 2009).

Um den Stoffwechsel zwischen Blut und ZNS aufrecht zu halten, müssen Moleküle nach dem „Vier-Kompartiment-Modell“ folgende Kompartimente durchqueren:

- § Vaskuläres Kompartiment: Umfasst die Lumina der Blutgefäße im Hirnparenchym, des Plexus choroideus und der meningealen Schichten
- § Intrazelluläres Kompartiment: Hierzu gehören alle Nerven- und Gliazellen
- § Extrazelluläres Kompartiment: Extrazellularraum des Hirnparenchyms
- § Liquorkompartiment: Enthält Liquor cerebrospinalis, der sich in den Ventrikeln und im Subarachnoidalraum befindet

Die Blut-Hirn-Schranke wird einerseits durch den speziellen Aufbau der Wand der Blutgefäße und andererseits durch Filterzellen ermöglicht.

Die Endothelzellen der kleinen Blutgefäße im ZNS sind miteinander durch „tight junctions“ verbunden, sodass es zwischen ihnen keine Spalten gibt. Die Permeabilitätsbarriere wird weiter durch die nicht-fenestrierten Kapillaren gebildet. Somit können wasserlösliche Stoffe (zum Beispiel bestimmte Aminosäure und Glukose) nur mit Hilfe von aktiven, „carrier“-vermittelten Transportsystemen in das Gewebe des ZNS gelangen. Im Gegensatz zu wasserlöslichen Substanzen können fettlösliche Stoffe (z.B. Nikotin, Alkohol, Steroide) sehr wohl durch die Blut-Hirn oder Blut-Liquor-Schranke diffundieren (Waldeyer, 2009).

Die Glia limitans stellt eine Art Filtermembran dar, die große Moleküle auffängt und deren Eintritt ins ZNS verhindert.

4.2. Inhaltsstoffe des Liquors

Der Liquor cerebrospinalis steht in direkter Verbindung zum Blutgefäßsystem, weshalb alle Inhaltsstoffe des Liquors (außer ZNS-spezifischen Proteinen) auch im Blut vorkommen. Die Liquorflüssigkeit wird vom Blut nur durch die Blut-Liquor-Schranke getrennt und kann als Ultrafiltrat des Bluts definiert werden, wobei die Inhaltsstoffe im Liquor in höherer Konzentration vorkommen. Durch diesen Zusammenhang zwischen Blut und Liquor ist es bei bestimmten neurologischen Erkrankungen unbedingt notwendig, den Liquorbefund im Vergleich zu Blut zu beurteilen (Zettl, 2005).

4.2.1. Proteine

Die Gesamtproteinkonzentration im Liquor beträgt 200-500 mg/l. Etwa 80% der Proteine, die im Liquor gefunden werden, stammen aus dem Blutgefäßsystem. Die wichtigsten Proteine im Liquor sind Albumin (150-350 mg/l) und die Immunglobuline IgG (40 mg/l) und IgA (6 mg/l) (Zettl, 2005). Die Relation zwischen der Proteinkonzentration im Liquor und Blut wird als Liquor/Serum Quotient bezeichnet. Dieser Quotient stellt einen wichtiger Indikator für akute und chronische Entzündungen im ZNS dar und dient als Marker für Schrankenfunktionsstörungen sowie für bestimmten Erkrankungen (zum Beispiel für Multiple Sklerose) (Zettl, 2005).

Proteine, die direkt im ZNS gebildet werden, machen 20 % der Gesamtproteinkonzentration im Liquor aus (Zettl, 2005). Sie werden hauptsächlich in den Hirnhäuten sezerniert. Die wichtigsten sogenannten intrathekale Proteine sind Transthyretin (17 mg/l), Prostaglandin-D-Synthase (15 mg/l) und Apolipoprotein E (6 mg/l) (Zettl, 2005). Diese Proteine verfügen über andere Transportmechanismen, als jene Proteine, die mit dem Blutstrom in den Liquor gelangen. So bleibt deren Konzentration relativ konstant, auch wenn die Gesamtproteinkonzentration aufgrund von pathologischen Veränderungen erheblich schwanken kann (Zettl, 2005).

Die Verteilung der Proteinkonzentrationen in den Liquorräumen ist unterschiedlich. Es existiert ein Gefälle zwischen ventrikulärem und lumbalem Liquor, wobei die Herkunft der Proteine eine wichtige Rolle spielt. Die Konzentration der Proteine, die aus dem Blutkreislauf stammen, steigt lumbalwärts auf das 2 bis 3 fache (Albumin 2,3-fach, IgG 2,6-fach).

Dagegen nimmt die Konzentration des intrathekalen Proteins Transthyretin (wird im Plexus choroideus synthetisiert) im lumbalen Liquor etwas ab, während die Konzentration des Proteins

Prostaglandin-D-Synthase (wird in den Leptomeningen gebildet) wiederum lumbal hin ansteigt (Zettl, 2005).

4.2.2. Lipide

Lipide im Liquor cerebrospinalis können unterschiedlicher Herkunft sein. Neben Serumlipide, werden auch Lymphozytenlipide und Hirnlipide unterschieden. Nervenzellen besitzen die höchste zelluläre Lipidkonzentration. Dennoch ist die Menge an freien Lipiden (10-20 mg/l) im Liquor im Vergleich zur Konzentration im Serum sehr gering. Das Verhältnis zwischen Serumlipiden und Liquorlipiden beträgt 300:1 (Zettl, 2005).

4.2.3. Elektrolyte

4.2.3.1. Natrium

Im Vergleich zum Blutserum zeigt der Liquor cerebrospinalis eine leichte hyperosmotische Charakteristik. Die Salzkonzentration im Liquor ist insgesamt etwas erhöht. Die Konzentration des Natriums beträgt unter physiologischen Bedingungen 136-146 mmol/l. Dies entspricht einer Natriumverteilung zwischen Liquor und Serum von 103-114% in Richtung Liquor. Auch die Chloridkonzentration im Liquor ist höher als im Serum. Sie liegt bei 108-118 mmol/l und macht daher 110-130% im Vergleich zur Konzentration im Serum aus (Zettl, 2005).

4.2.3.2. Kalium und Kalzium

Im Gegensatz zur Natriumkonzentration hängen die Konzentrationen von Kalium und Kalzium im Liquor direkt von der Konzentration dieser Ionen im Blut ab – und zwar indirekt proportional. Bei Hyperkaliämie bzw. Hyperkalzämie kommt es im Liquor cerebrospinalis zur Verminderung der Konzentration des Kaliums bzw. des Kalziums.

Beide Ionen weisen jedoch insgesamt eine geringere Konzentration im Liquor als im Blut auf.

Unter normalen, physiologischen Bedingungen beträgt die Kaliumkonzentration im Liquor 2,5-3,0 mmol/l (im Blut 3,6-4,8 mmol/l) und die Kalziumkonzentration 1,05-1,35 mmol/l (im Blut 2,2-2,6 mmol/l) (Zettl, 2005).

4.2.4. Säure-Basen-Gleichgewicht

Obwohl die Pufferkapazität des Liquor cerebrospinalis im Vergleich zu der des Blutes wesentlich geringer ist, bleibt der pH-Wert des Liquors sehr stabil. Das ZNS kann somit eine Verschiebung im Säure-Basen-Haushalt besser kompensieren als der Rest des Körpers. Dies beruht auf die Tatsache, dass die Pufferung im Liquor ausschließlich über das Bikarbonat-CO₂-System stabilisiert wird und nicht über die Proteinkonzentration.

Der pH-Wert des Liquors beträgt 7,306 und unterscheidet sich nur minimal vom pH-Wert des Blutes. Dieser wird unter physiologischen Verhältnissen mit 7,394 gemessen (Zettl, 2005).

4.2.5. Glukose und Laktat

4.2.5.1. Glukose

Die Glukose gelangt über speziellen „carrier“ in den Liquor. Die Glukosekonzentration im Liquor beträgt unter physiologischen Bedingungen 2,7-4,2 mmol/l. Dies entspricht etwa 60% der Konzentration im Blut und stellt u.a. einen Indikator für die Funktion der Blut-Hirn-Schranke dar. Erkrankungen des ZNS, vor allem im Rahmen einer bakteriellen Meningitis und bei Meningealneoplastosen, die oft mit einem Anstieg der Proteinkonzentration verbunden sind und zu Schrankenstörungen führen, führen zu einer Abnahme der Glukosekonzentration im Liquor (Zettl, 2005).

4.2.5.2. Laktat

Im Liquor cerebrospinalis ist die Laktatkonzentration höher als im Blut. Die Konzentration beträgt im Liquor 1,2-2,1 mmol/l, im Blut 0,5-2,2 mmol/l. Der Laktatspiegel wird u.a. durch den Zustand der Blut-Liquor-Schranke beeinflusst und steigt bei Funktionsstörung deutlich an. Dies wird durch einen vermehrten Austritt von Enzymen der Glykolyse aus Blutzellen verursacht. Weitere Faktoren, die die Laktatkonzentration beeinflussen, sind die Zahl der neutrophilen Granulozyten sowie das Vorkommen von Tumorzellen und Metastasen im ZNS, da diese eine hohe Affinität zur anaeroben Glykolyse haben. In der Praxis wird nur die Laktatkonzentration im Liquor bestimmt, da diese von der Konzentration im Serum unabhängig ist (Zettl, 2005).

4.3. Zellen des Liquors

4.3.1. Leukozyten

Der Liquor ist eine zellarme Flüssigkeit. Eine physiologische Zellzahl im Liquor liegt bei bis zu 4 Zellen/ μl vor. Bei einer Zellenzahl über 5/ μl spricht man von einer Pleozytose (Dörner, 2009).

Der normale, vom gesunden Menschen entnommene Liquor enthält neben einer sehr geringer Zahl von Erythrozyten hauptsächlich zwei Formen von weißen Blutkörperchen (Leukozyten): Mononukleäre (MN) und polymorphnukleäre Zellen (PMN). Zu den MN Zellen zählen Lymphozyten und Monozyten. Sie machen die überwiegende Mehrheit der Zellen im Liquor aus. Die PMN Zellen umfassen die gesamte Gruppe der Granulozyten. Diese kommen im normalen Liquor nur vereinzelt vor. Die MN und PMN Zellen gesunder Menschen befinden sich in einem inaktiven Zustand und weisen eine konstante Konzentration auf (Zettl, 2005).

Eine Vermehrung der Leukozyten führt zur Trübung der Liquorflüssigkeit. Eine leichte Trübung ist mit Zellzahlen zwischen 100-300/ μl , eine starke Trübung mit Zellzahlen über 2000/ μl assoziiert (Dörner, 2009). Eine hohe Zahl an Erythrozyten bzw. das Vorhandensein von bereits abgebauten Erythrozyten färbt die Flüssigkeit rosa, rot bis hin zu rotbraun. Blut im Liquor kann durch pathologische Ereignisse (z.B. Hirnblutungen) oder durch die Punktion verursacht sein. Letzteres wird als artifizielle Blutung bezeichnet. Für die Differenzierung einer artifiziellen von einer pathologischen Blutung müssen weitere Untersuchungen erfolgen (Dörner, 2009).

4.3.1.1. Lymphozyten

Die amöboid beweglichen normalen Lymphozyten sind klein und enthalten einen runden, chromatinreichen, dichten und daher dunkelgefärbten, zentral gelegenen Zellkern. Dieser wird von einem schmalen, etwas helleren, schwach basophilen Zytoplasmasaum umgeben (Wachtler, 2005).

Grundsätzlich wird zwischen kleinen Lymphozyten mit einem Durchmesser von 6-10 μm und großen Lymphozyten mit einem Durchmesser von 10-15 μm unterschieden (Wachtler, 2005). Die Größendifferenz beruht vor allem auf der unterschiedlichen Menge an Zytoplasma (Wachtler, 2005). Während die kleinen Lymphozyten die Immunzellen, also T- und B-Lymphozyten darstellen, stellen die großen Lymphozyten meist sogenannte „natural killer cells“ dar. Diese sind in der Lage bestimmte Antigene, zum Beispiel Tumorzellen, direkt zu vernichten ohne zuvor aktiviert zu werden (Wachtler, 2005). Große Lymphozyten zeigen meist einen lockeren, gebuchteten Zellkern und einen hellen, breiten, gelegentlich granulierten Zytoplasmasaum.

In der CSF sind die Lymphozyten relativ isomorph, wobei die T-Lymphozyten mit etwa 98% überwiegen (Zettl, 2005). Die Immunzellen des ZNS können zwischen Liquor und Blut offen zirkulieren und durchlaufen unterschiedliche Wege. Ein Teil der Zellen stirbt noch während des Aufenthalts im Liquor ab. Andere Zellen finden den Weg zur Arachnoidea und werden dort festgehalten oder kehren wiederum ins Blutsystem zurück.

4.3.1.2. Monozyten

Die Monozyten sind gut bewegliche große Zellen mit einem Durchmesser von 14-18 µm. Sie besitzen einen großen, bohnenförmigen oder gelappten, oft exzentrisch liegenden feinstrukturierten Zellkern. Das schwach basophile Zytoplasma enthält oft feine Azurgranula. Die Granula entsprechen Lysosomen, die eine hohe Konzentration an Enzymen wie Esterasen und Peroxydasen aufweisen (Wachtler, 2005). Das Zytoplasma kann dazu noch Vakuolen umschließen (Zettl, 2005).

Die Monozyten, zusammen mit den Lymphozyten, sind Bestandteil des MN Phagozytensystems. Sie erreichen den Liquor durch das Passieren der Blut-Hirn-Schranke einerseits über das Blut, andererseits direkt durch Umwandlung von Zellen der Pia mater bzw. der Mikroglia (Zettl, 2005).

4.3.1.3. Granulozyten

Die Gruppe der Granulozyten umfasst drei Zellformen, die je nach Färbeverhalten als neutrophile, basophile oder eosinophile Granulozyten bezeichnet werden.

Da alle Granulozyten einen segmentierten Nukleus haben, werden sie auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet. Die Kernsegmentierung stellt einen Vorteil bei der amöboiden Bewegung der Granulozyten dar. Der Zellkern ist basophil, chromatinreich und enthält keinen Nukleolus. Das Zytoplasma der Granulozyten färbt sich leicht acidophil und besitzt typische Granulationen (Bucher, 1997).

Im Gegensatz zu den MN-Zellen, die spezielle Überlebensformen im Liquor entwickeln, können die Granulozyten im Liquor nicht lange existieren. Deshalb kommen Granulozyten unter physiologischen Bedingungen im Liquor cerebrospinalis nur selten vor. Werden Granulozyten in der Liquorflüssigkeit entdeckt, so ist dies stets mit einer Störung der Blut-Hirn-Schranke verbunden (Zettl, 2005). Die schnelle Migrationsgeschwindigkeit ist charakteristisch für die Ausbreitung der

Granulozyten im Liquor. Die Zahl der Granulozyten kann dabei innerhalb weniger Stunden um das Mehrfache ansteigen (Zettl, 2005).

Ein charakteristisches Merkmal für die Vermehrung und Aktivierung von Granulozyten im Liquor ist der Anstieg des Laktatsspiegels. Nur aktivierte Granulozyten sind in der Lage durch Bildung von Phagosomen, Bakterien aufzunehmen. Diese Fähigkeit wird durch die anaerobe Glykolyse ermöglicht, deren Endprodukt Laktat darstellt (Glykolyse → Pyruvat → Laktat).

4.3.1.3.1. Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten stellen die wichtigste Gruppe des unspezifischen Abwehrsystems dar (Wachtler, 2005). Ihre gute Beweglichkeit verdanken sie einem dichten Netz aus Mikrofilamenten, welches sich im gesamten Zytoplasma verteilt. Mit diesen können sie durch sehr kleine Öffnungen gelangen, einem Mechanismus, der als Diapedese bezeichnet wird (Wachtler, 2005). Neutrophile Granulozyten werden auch als Mikrophagen bezeichnet, da sie die Fähigkeit besitzen Antigene ohne Markierung zu töten (unspezifische Phagozytose) (Bucher, 1997).

Ein typisches Merkmal der neutrophilen Granulozyten ist die Segmentierung des Nukleus. Der Segmentierungsgrad geht direkt mit dem Reifezustand der Zellen einher. Unreife neutrophile Granulozyten weisen einen stabförmigen Zellkern auf, während ältere neutrophile Granulozyten bis zu fünf Lappen (auch Segmente genannt) besitzen können (Bucher, 1997). Am häufigsten sind neutrophile Granulozyten mit drei Segmenten zu finden (Wachtler, 2005). Die Kernsegmente sind miteinander über feine Fäden verbunden. Die Segmente umgeben meist hufeisenförmig ein sogenanntes Zytozentrum (Wachtler, 2005).

Je nach Segmentierungsgrad kann eine Linksverschiebung, bei der neutrophile Granulozyten mit nur zwei Kernsegmenten von einer Rechtsverschiebung mit Überwiegen von Zellen mit mehreren Segmenten unterschieden werden. Eine Linksverschiebung deutet auf einen Anstieg der juvenilen neutrophilen Granulozytenformen und weist somit auf eine Überproduktion im Knochenmark hin (zum Beispiel im Rahmen einer Leukozytose oder einer Leukopenie). Dagegen stellt eine Rechtsverschiebung einen Hinweis auf eine verminderte Produktion der neutrophilen Granulozyten im Knochenmark dar (zum Beispiel bei einer perniziösen Anämie (Bucher, 1997)).

Im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten unterscheidet man spezifische und unspezifische Granula. Die spezifischen Granula enthalten vor allem Peroxidase und machen etwa 80% der Granulakörnchen aus (Bucher, 1997). Die unspezifischen Granula beinhalten hauptsächlich das Enzym Hydrolase (Wachtler, 2005).

Im Liquor haben die neutrophilen Granulozyten eine kurze Lebensdauer von wenigen Stunden. Im Gegensatz zum Blutaussstrich überwiegt hier die Zahl der übersegmentierten neutrophilen Granulozyten (Zettl, 2005). Die Präsenz von aktivierten neutrophilen Granulozyten im Liquor bedeutet, dass eine Infektion vorhanden ist. Um jedoch die bestimmte Ursache der Entzündung feststellen zu können, müssen die Qualität der neutrophilen Granulozyten und deren Dauer im Liquor analysiert werden (Zettl, 2005).

Eine bakterielle Infektion äußert sich durch eine hohe neutrophile Granulozytenzahl. Die Zahl steigt innerhalb kurzer Zeit an und bleibt mehrere Tage hoch. Erst nach 3 Wochen sinkt die Anzahl unter 5% der Gesamtzellzahl. Auch während einer viralen Infektion kann die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Liquor cerebrospinalis ansteigen. Deren Zahl ist jedoch wesentlich geringer als bei einer bakteriellen Entzündung und sinkt bereits am zehnten Tag der Infektion. Neutrophile Granulozyten werden häufig auch am Anfang einer Entzündung vom tuberkulösen Typ zusammen mit anderen Zellen des Abwehrsystems gefunden. Weiters sind neutrophile Granulozyten bei Entzündungen im Liquor zu finden, die durch Fremdkörper, Blut oder direkt in den Liquor verabreichte Medikamenten verursacht sein können (Zettl, 2005).

4.3.1.3.2. Basophile Granulozyten

Der segmentierte Zellkern basophiler Granulozyten wird im Ausstrichpräparat oft von sehr intensiv gefärbten und im gesamten Zytoplasma verteilten Granula überdeckt. Das Zytoplasma enthält typischerweise unterschiedlich große basophile Granula, die Histamin (Permeabilität der Gefäßwände), Heparin (Antikoagulation) (Bucher, 1997) und Bradykinin (Erweiterung der Gefäße) (Wachtler, 2005) enthalten. Diese Stoffe spielen bei der Entstehung der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle (Bucher, 1997).

Die basophilen Granulozyten können sich relativ gut bewegen. Sie folgen Reizen, welche durch andere Zellen während der Abwehrreaktion generiert werden, nach. Die Bewegung erfolgt wurmähnlich. Dabei ordnen sich die Granula hinter den Zellkern und werden zum Schluss nachgezogen (Wachtler, 2005).

Basophile Granulozyten kommen im Liquor sehr selten vor. Bei Säuglingen und Kleinkindern ist die Zahl der basophilen Zellen etwas häufiger als bei Erwachsenen (Zettl, 2005).

4.3.1.3.3. Eosinophile Granulozyten

Die Zellkerne der eosinophilen Granulozyten bestehen häufig aus zwei Segmenten (sogenannte Hantelform) und sind oft durch Granula verdeckt (Bucher, 1997).

Im Ausstrichpräparat liegen die braunroten Granula dicht verpackt im Zytoplasma zusammen. Die Granula der eosinophilen Granulozyten enthält eine spezifische Peroxydase, sodass sie während der Abwehrreaktion eine ähnliche Funktion aufweisen, wie neutrophile Granulozyten (Bucher, 1997). Die Peroxidase ist der Liquorflüssigkeit gegenüber besonders resistent und kann auch nach Auflösung des Zellkerns erhalten bleiben (Zettl, 2005).

Die eosinophilen Granulozyten werden am häufigsten im Rahmen einer allergischen Reaktion beobachtet. Ihre wichtigste Aufgabe besteht darin, Parasiten zu bekämpfen (Bucher, 1997). Sie werden mittels chemotaktische Signale (z.B. Histamin) an den Krankheitserreger gelockt. Dabei geben die eosinophilen Granulozyten ein sogenanntes „major basic protein“ ab, das vom Parasiten aufgenommen wird und diesen schließlich tötet (Zettl, 2005).

Ferner treten eosinophile Granulozyten gegen Ende einer bakteriellen Infektion als Teil der allgemeinen Immunreaktion auf (Zettl, 2005). Bei viralen Infektionen kommen eosinophile Granulozyten zeitgleich mit dem Höhepunkt der Lymphozyteninvasion im Liquor vor (Zettl, 2005). Auch bei Entzündungen vom tuberkulösen Typ und bei Entzündungen, die durch Fremdkörper entstanden sind werden eosinophile Granulozyten regelmäßig angetroffen. Sie machen aber nicht mehr als 5% der Gesamtzellzahl aus (Zettl, 2005). Außerdem kommen eosinophile Granulozyten auch während der Heilungsphase einer Entzündung im Liquor vor. Eine gewisse Rolle dabei spielen auch heparinsezernierende basophile Granulozyten und T-Lymphozyten (Zettl, 2005).

Eosinophile Granulozyten können auch bei malignen Tumoren, insbesondere bei malignen Lymphomen im Liquor cerebrospinalis auftreten. Dieses Phänomen wird als eosinophile Meningitis bezeichnet und kann der Erstdiagnose eines Lymphoms um mehrere Tage vorausgehen. Wahrscheinlich verursacht der Tumor eine T-Lymphozytenreaktion, die wiederum eosinophile Granulozyten anregt (Zettl, 2005).

4.3.2. Erythrozyten

Erythrozyten besitzen im reifen Stadium weder Zellkern noch Organellen und können sich daher nicht mehr teilen. Sie haben eine runde bis bikonkave Form und sind in der Mitte heller gefärbt (da geringere Dicke). Das Zytoplasma erscheint im Lichtmikroskop homogen. Im Blutaussstrich haben die Erythrozyten einen mittleren Durchmesser von 7,7 μm . In dieser Größe spricht man von sogenannten Normozyten, im Gegensatz zu pathologischen Mikro- bzw. Makrozyten (Wachtler, 2005).

Das Hämoglobin stellt einen wichtigen Bestandteil der Erythrozyten dar. Es besteht aus einem Häm-Molekül mit einem zweiwertigen Eisenmolekül im Zentrum und aus vier Globinketten (jeweils zwei α - und β -Ketten). Es macht etwa 35% der Zellmasse eines Erythrozyten aus und ermöglicht durch bestimmte Bindungseigenschaften des Eisenmoleküls den O_2 und CO_2 -Transport zu und von den Körperzellen. Die Erythrozyten überdauern etwa 120 Tagen im Blut bevor sie schließlich im Knochenmark, aber auch in der Leber und in der Milz, abgebaut werden (Bucher, 1997).

Da Blut im Liquor cerebrospinalis als Fremdkörper gilt, führt das Eindringen von Erythrozyten durch die Blut-Hirn-Schranke zu einer sofortigen Pleozytose (Anstieg der Zellzahl), einschließlich einer entzündlichen Reaktion der Hirnhäute (Zettl, 2005). Erste Zeichen einer Meningitis treten bereits vier Stunden nach Eintritt der Erythrozyten in den Liquor auf. Diese äußern sich zunächst durch eine kurzfristige Aktivierung der Monozyten, die bereits im Liquor vorhanden waren. Danach folgt eine deutliche Vermehrung der neutrophilen Granulozyten und anschließend der Makrophagen (Zettl, 2005).

Die aktivierten Makrophagen phagozytieren die Erythrozyten und bilden nach etwa 12 bis 18 Stunden charakteristische Verbände, die locker oder fest sein können. Dies führt schließlich zur Proliferation des Hirnhautgewebes. Während der Phagozytose wird das Hämoglobin-Molekül abgebaut, sodass die Erythrozyten ihre rote Farbe verlieren. Im Lichtmikroskop werden diese als optisch leere Vakuolen im Zytoplasma der Makrophagen dargestellt. Ab dem vierten Tag finden sich in den Makrophagen dunkelbraune bis grauschwarze lockere Hämosideringranula. Der Nachweis von Hämosiderin erfolgt über eine spezielle Färbemethode, der Berliner Blau Reaktion. Bei dieser wird Hämosiderin blau dargestellt (Zettl, 2005).

4.3.3. Makrophagen

Die Makrophagen zählen, wie die Monozyten zum mononukleär phagozytierenden System (Wachtler, 2005). Während sich die Monozyten im Blut befinden, halten sich Makrophagen vor allem im Gewebe auf. Die Funktion der Makrophagen umfasst die Phagozytose von verschiedenen Mikroben, die Abräumung von mutierten oder abgestorbenen Zellen und die Antigenpräsentation auf Lymphozyten („antigen presenting cells“, APC) (Zettl, 2005).

Die Makrophagen sind runde bis ovale Zellen, die je nach Menge des zu phagozytierenden Materials unterschiedlich groß sein können. Der helle, runde Nukleus ist deutlich erkennbar und enthält mehreren Nukleolen, eine Tatsache, die auf eine erhöhte Zellaktivität hinweist. In Abhängigkeit von der phagozytierten Substanz können Makrophagen zum Beispiel in Bakteriophagen, Leukophagen, Lipophagen, Erythrophagen, Pigmentophagen gegliedert werden (Zettl, 2005).

Phagozytiertes Material, welches nicht wieder verwendet werden kann, wird im Zytoplasma der Makrophagen in Form von Vakuolen abgelagert. Große Vakuolen können sich zusammenschließen und durch Verdrängung des Zellkerns zur Bildung sogenannter Siegelringzellen führen. Siegelringzellen können einen Durchmesser von über 100 µm aufweisen (Zettl, 2005).

4.3.4. Tumorzellen

Tumorzellen können im Liquor primär im Zuge von Tumoren des ZNS oder sekundär bei Metastasierung auftreten und werden grundsätzlich in gutartige und bösartige unterteilt. Die Kategorisierung eines Tumors als benigne oder maligne Neoplasie, die sogenannte Dignität eines Tumors, erfolgt anhand von Malignitätskriterien, wie zum Beispiel der Tendenz zur Infiltration, der Mitoserate, dem Kernpolymorphismus, der Kern-Plasma-Relation und der Neigung zur Metastasierung. In der Liquorflüssigkeit finden sich nur in etwa 15% der Tumore zirkulierende Tumorzellen (Zettl, 2005). Dies ist vor allem dadurch bedingt, dass im Gehirn vor allem gutartige Tumore vorkommen, welche eine geringe Tendenz zur Infiltration aufweisen.

4.3.5. Ependymzellen, Plexuszellen, Knorpelzellen

Die Ventrikelräume im Gehirn und der Zentralkanal des Rückenmarks werden von Ependymzellen und Zellen des Plexus choroideus überzogen. Diese Zellen können somit im Rahmen einer Liquorpunktion auch in Liquorproben als kleine Zellverbände vorhanden sein. Es sind zarte, isomorphe, epithelähnliche Zellen, die einen runden bis ovalen Zellkern aufweisen. Der chromatinreiche Kern erscheint im Lichtmikroskop dunkel bis dicht pyknotisch. Das Zytoplasma hingegen ist locker, hell und kann körnerähnliche Gebilde enthalten (Zettl, 2005). Die Möglichkeit Ependymzellen bzw. Plexuszellen in einer Liquorpunktion zu finden, ist bei einer Punktion des Ventrikelsystems relativ hoch. Bei Säuglingen deuten Ependymzellen bzw. Zellen des Plexus choroideus auf einen potenziellen Hydrocephalus hin. Ferner werden Ependymzellen bei der Einnahme von bestimmten Medikamenten, vor allem im Rahmen einer Chemotherapie vermehrt beobachtet (Zettl, 2005).

Neben Ependymzellen können auch Knorpelzellen als einzelne Zellen oder im Verband in der Liquorflüssigkeit gefunden werden (Kluge, 2005). Die Knorpelzellen sind durch ein stark azidophil gefärbtes Zytoplasma und durch einen kräftig blau bis schwarz gefärbten Nukleus charakterisiert. Sie gelangen im Rahmen einer Lumbalpunktion in den Liquor (Wildemann, 2006).

5. Methoden der Zellzählung und Zelldifferenzierung im Liquor

Bei der Cerebrospinalflüssigkeit handelt es sich um ein sehr empfindliches Probenmaterial, welches so rasch wie möglich untersucht werden muss. Wegen des geringen Proteingehalts kommt es bereits unmittelbar nach der Punktion durch die einsetzende Autolyse zu einer Reduktion der Zellzahl. Durch Licht und dem Kontakt mit der Luft wird unter anderem der Liquorprobe Kohlenstoffdioxid entzogen, sodass der pH-Wert ansteigt. Dies führt zur Beschleunigung des Zelltodes im zu untersuchenden Material. Insbesondere neutrophile Granulozyten sind davon betroffen und können innerhalb einer Stunde lysieren.

5.1. Manuelle Zellzählung

Das Bestreben Bestandteile des Blutes quantitativ zu erfassen, führte den deutschen Arzt Karl Vierordt bereits im Jahr 1852 dazu, die erste Methode zur Zählung von menschlichen Blutzellen zu entwickeln (Lehner et al., 2007). Er entnahm vom Frischblut eines Patienten ein Bluttröpfchen und übertrug dieses auf einen Objektträger. Anschließend bedeckte er den Objektträger mit einem Netzgitter aus dünnem Glas. Unter dem Lichtmikroskop konnte er deutlich die Anzahl an Erythrozyten erkennen und diese morphologisch differenzieren (Lehner et al., 2007).

Eine wichtige Weiterentwicklung der manuellen Zellzählung gelang Neubauer im Jahr 1924 mit der Konstruktion der ersten Zählkammer (Lehner et al., 2007). Diese bestand aus zwei unterschiedlich dicken Glasplatten (eine 4 mm dicke Grundplatte und ein dünnes, feingeschliffenes sogenanntes Deckglas), welche übereinander befestigt werden. Durch feine Bohrungen auf dem oberen Teil der Grundplatte und durch den kleinen $0,1 \text{ mm}^3$ großen Raum zwischen den Glasplatten entstand eine Zählkammer definierten Volumens (Abbildung 5.1).

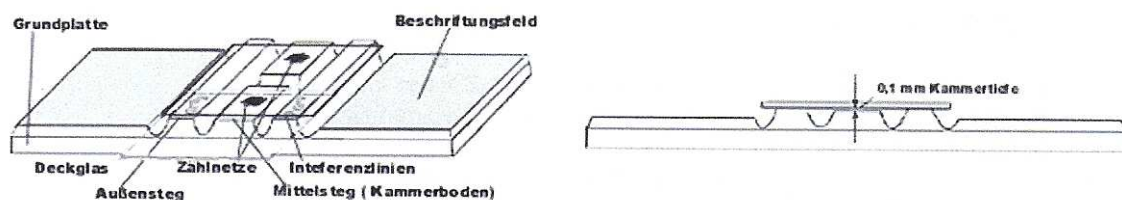


Abbildung 5.1: Aufbau einer Zählkammer (www.zaehlkammer.de)

Im Laufe der Zeit wurden weitere Zählkammern entwickelt (z.B. die Zählkammer nach Bürker, Fuchs-Rosenthal, Thoma, Schilling oder Türk). Die unterschiedlichen Kammern variieren vor allem

hinsichtlich Volumen und der Anzahl der Quadrate, in denen die Zellen gezählt werden. Alle Zellkammerarten sind bis heute in Verwendung (Lehner et al., 2007). Die Zellen des Liquor cerebrospinalis werden üblicherweise in der Fuchs-Rosenthal Zählkammer gezählt, da diese im Vergleich zu anderen Zählkammern ein etwas größeres Volumen fasst (3.2 μ l).

5.2. Manuelle Zelldifferenzierung

Die Zelldifferenzierung mittels Mikroskop setzt eine optimale Präparatvorbereitung voraus, damit die enthaltenen Liquorzellen morphologisch beurteilt werden können. Bei der Präparatherstellung relevant ist die Ausbeute, welche jenes im Liquor vorhandene Verhältnis zwischen den Zellen reflektieren muss. Grundsätzlich werden zwei Methoden der Präparatherstellung unterschieden: jene mittels SYAK-Kammer und jene mittels Zytozentrifugation. Sowohl in der SYAK-Kammer als auch bei der Zytozentrifugation werden zylinderförmige Röhrchen, welche auf einem Objektträger mittels speziellem Filterpapier stehen, fixiert, und mit 200 μ l Liquor befüllt.

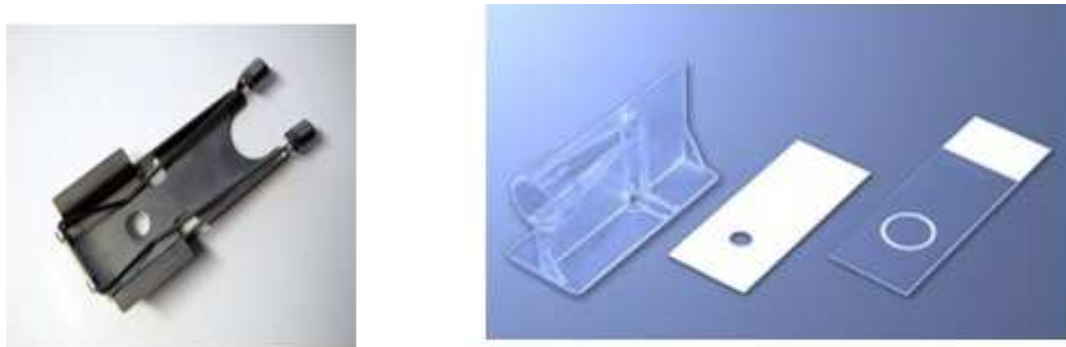


Abbildung 5.2.: Klammer (links) zum Fixieren des Filterpapiers (rechts)

Während bei der SYAK-Kammer Methode nach etwa 20-30 Minuten eine Sedimentationschicht aus Liquorzellen in den Zylinderkammern entsteht („Sedimentierkammerverfahren“, Wildemann, 2006), wird beim Zytozentrifugenverfahren bereits innerhalb von 5-10 Minuten ein Zellsediment generiert. Die Zellsedimente können nach dem Trocknen gefärbt und unter dem Lichtmikroskop differenziert werden (Abbildung 5.3.)

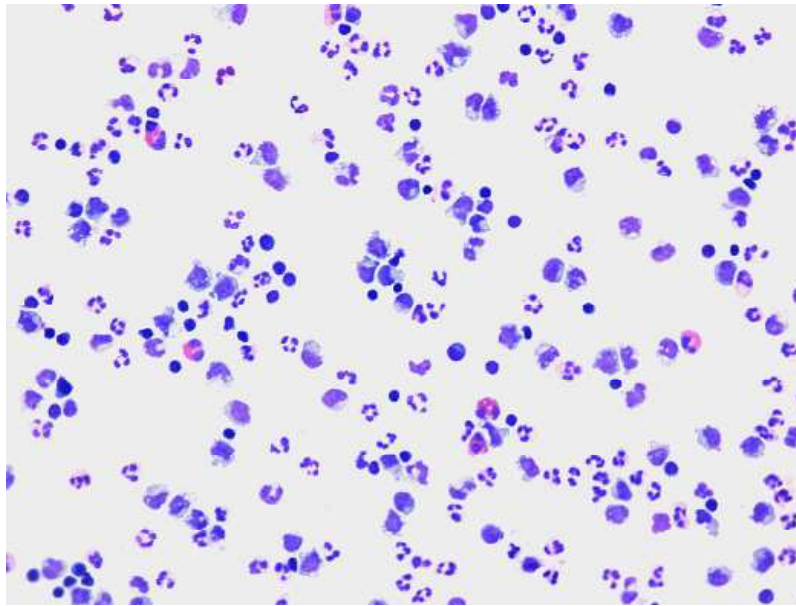


Abbildung 5.3.: Bild eines Zytopräparats

5.3. Automatisierte Methoden zur Zellzählung

Die erste automatisierte Methode wurde zunächst zum Zweck der Zählung zellulärer Komponenten des menschlichen Blutes entwickelt. Erste Versuche fanden in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts statt. Dabei wurde das entnommene Blut durch ein Kapillarsystem, welches sich in einem dunklen Zimmer befand, geführt (Lehner et al., 2007). Die Zellen durchquerten anschließend ein optisches Kammersystem, in dem Lichtsignale in elektrische Impulse umgewandelt wurden. Die Anzahl an Impulsen war der Anzahl der Zellen direkt proportional (Lehner et al., 2007). Der erste Zählautomat wurde von der Firma Wallace Coulter im Jahr 1956 gebaut (Lehner et al., 2007). Die Zählmethode basierte auf dem Prinzip der Impedanzmessung (Messung des Wechselstroms bzw. Scheinwiderstands). Dieses Analyseverfahren erlaubte zum ersten Mal eine große Anzahl von Blutzellen schnell und exakt zu zählen (Lehner et al., 2007).

Im Jahre 1963 konnten sich die Mitglieder des Kongresses der Europäischen Gesellschaft für Hämatologie auf eine Standardisierung der Zähl- bzw. Messmethoden für automatisierte Geräte einigen. Im Laufe der folgenden Jahre wurden Standards für Messdetektoren und Gerätematerialien sowie spezielle Kalibrationsverfahrens entwickelt. Ferner wurde der Volumensfluss standardisiert, Methoden zur Verhinderung der Rezirkulation bereits gezählter Zellen entwickelt und die Korrektur von Zählfehlern, welche durch lysierte Zellen generiert wurden, etabliert (Lehner et al., 2007). Diese Maßnahmen ebneten schließlich den Weg zu weiteren Fortschritten bis hin zur automatisierten Zelldifferenzierung.

Die automatisierte Bestimmung der Zellzahl im Liquor ist mit einem besonderen Problem konfrontiert: der niedrigen Zellzahl (Strik et al., 2005). Da die Zellzahl darüber hinaus stark variieren kann, gleichzeitig aber etwa um das 2000-fache niedriger ist als im Blut, hat es vergleichsweise lange gedauert, bis geeignete Automaten zur Verfügung standen (Strik et al., 2005). Die vier häufigsten für die automatisierte Zellzählung weltweit eingesetzten Geräte sind die Automaten von Beckman- Coulter, Sysmex, der Cell-Dyn und ADVIA 120/2120.

5.4. Automaten für die Zellzählung im Liquor

5.4.1. Der Automat von Beckman-Coulter

Der Hämatologie-Analyser von Beckman-Coulter ist ein Vollautomat zur Zählung von Zellen im Blut und anderen Körperflüssigkeiten (Aulesa et al., 2003). Dieses Gerät basiert auf dem sogenannten Coulter-Prinzip, welches von Wallace H. Coulter (1913-1998) entwickelt wurde. Der amerikanische Elektrotechniker ließ seine Erfindung im Jahr 1953 patentieren und baute die erste automatisierte Zählmaschine für Zellen im menschlichen Blut (Lehner et al., 2007).

Beim Coulter-Prinzip handelt es sich um ein System welches aus einer inneren und einer äußeren Elektrode besteht, die sich in einer Elektrolytlösung befinden. Partikel, wie zum Beispiel weiße oder rote Blutzellen, werden durch eine sehr kleine Öffnung (Apertur) zwischen den beiden Elektroden geführt. Die durchströmenden Zellen werden abhängig von ihrer Oberflächenelektrizität stark oder schwach abgelenkt (Dörner, 2009). Durch die Ablenkungsbewegung (Impedanz) und den Streuungsdurchfluss kommt es zu einer Verdrängung der Elektrolytlösung, die dem Volumen des Partikels entspricht (Abbildung 5.4.). Die Menge der verdrängten Lösung wird in einen elektrischen Impuls übersetzt. Zum Beispiel haben Thrombozyten einen geringeren Verdrängungswert als Leukozyten (die entstandenen Impulse sind proportional zum Volumen der Zellen). So können Zellen beim Durchqueren der dünnen Öffnung gezählt werden. Die Apertur fungiert dabei wie eine Schranke, sodass nur eine Zelle die Öffnung passieren und somit auch gleichzeitig differenziert werden kann.

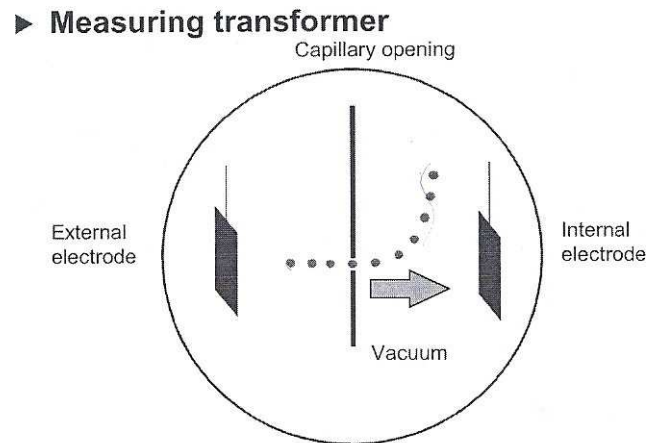


Abbildung 5.4.: Prinzip der Impedanz (Lehner et al., 2007)

Um Leukozyten zählen zu können, werden die Erythrozyten zunächst durch die Zugabe eines Ammoniumsalzes lysiert. Die Leukozyten verlieren dabei das Zytoplasma, sodass die Zählung und morphologische Differenzierung der Zellen aufgrund der Kerneigenschaften erfolgt (Lehner et al., 2007). Zum gleichen Zeitpunkt kann aus den lysierten Erythrozyten das Hämoglobin und der Parameter „mean cellular volume“ (MCV) der roten Blutkörperchen ermittelt werden. Weiters kann der Hämatokrit (relativer Anteil der zellulären Bestandteile am Volumen des Blutes) durch die Summe aller Impulse der Blutzellen ermittelt werden (Lehner et al., 2007).

In modernen Automaten werden Interferenz-Algorithmus-Verfahren angewendet, welche eine genauere Unterscheidung weißer Blutkörperchen von anderen kernhaltigen Zellen ermöglichen. Solche Zellen sind zum Beispiel kernhaltige rote Blutkörperchen, Riesenthrombozyten, Thrombozytenaggregate, unlysierte Erythrozyten und Erythrozytenfragmente. Durch diese Verfahren kann die Zählung der weißen Blutkörperchen durch das Gerät automatisch korrigiert werden (Lehner et al., 2007).

5.4.2. Die Automaten von Sysmex

Die Automaten der Sysmex X-Reihe stellen Multiparameter-Analysengeräte dar, welche im Jahr 1999 entwickelt wurden (Lehner et al., 2007). Die Sysmex-Technologie basiert auf der Methode der Durchflusszytometrie unter Verwendung eines Halbleiterlasers und von fluoreszierendem Licht (Pernè, 2012). Das Kernstück besteht aus drei Einheiten. Die Probenentnahmeeinheit („auto sampler unit“) führt die zu analysierende Probe in die Haupteinheit, in der diese mit gerätespezifischen Reagenzien gelöst und analysiert wird. Das Ergebnis der Analyse wird in die

Informationsverarbeitungseinheit („information processing unit“) geleitet, in der die Verarbeitung der Daten stattfindet.

Die Zellzählung im Liquor erfolgt, nachdem die Erythrozyten in der zu untersuchenden Liquorprobe lysiert wurden (Zimmermann et al., 2011). Anschließend wird ein fluoreszierender Polymethinfarbstoff, der an RNA- und DNA-Moleküle bindet, hinzugefügt (Boer et al., 2009). Auf diese Weise werden kernhaltige Zellen markiert, während kernlose Zellen (zum Beispiel Erythrozyten und andere Partikel) aus der Messung ausgeschlossen werden (Boer et al., 2009). Durch die Fluoreszenzfärbung senden die markierten Zellen Licht mit längerer Wellenlänge als jene des einfallenden Lichtes (Inoue, 1999). Wenn die auf diese Weise markierten Zellen die Probendüse des Gerätes passieren, werden sie mit Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt und sichtbar gemacht. Die Intensität der Fluoreszenz stellt einen wichtigen Faktor zur Unterscheidung zwischen den Zellen dar (Boer et al., 2009).

Zusätzlich zum Fluoreszenzlicht („side fluorescence“) werden die Zellen beim Durchströmen durch die Probendüse mit Laserlicht aus zwei Richtungen bestrahlt. Dabei werden ein Vorwärtstreulicht („forward scattered light, FSC“) und ein Seitenstreulicht („side scattered light, SCL“) unterschieden (Inoue, 1999). Das Streulicht entsteht dann, wenn das Laserlicht die Oberfläche einer Zelle trifft. Dadurch ändert sich die Orientierung des einfallenden Lichtes. Diese Änderung kann gemessen werden. Auf diese Weise lassen sich MN und PMN Zellen unterscheiden (Pernè, 2012). Durch die Bestrahlung jeder einzelnen Zelle kann die Größe der Zelle mittels Vorwärtstreulicht und die innere Zusammensetzung der Zelle durch das Seitenstreulicht ermittelt werden (Inoue, 1999).

5.4.3. Der Automat von Cell-Dyn

Dieses Gerät ist ein automatisiertes Durchflusszytometer, welches für die Zählung von Zellen in verschiedenen Körperflüssigkeiten geeignet ist. Der Automat verwendet zwei parallel laufende Systeme: einen optischen und einen Impedanz-basierten Kanal (De Smet et al., 2010). Während für die Zählung der Erythrozyten beide Systeme verwendet werden können, erfolgt die Zählung der Leukozyten nur mit Hilfe des optischen Kanals (Ziebig et al., 2000) („forward and side scatter“, „polarized and depolarized scatter“) (De Smet et al., 2010).

Der optische Kanal verwendet eine auf Fluoreszenz basierende MAPSS-Technologie („multi-angle polarized scatter separation“) (Lehner et al., 2007). Durch diese Methode können die verschiedenen

weißen Blutkörperchen differenziert, ihre Funktionalität beurteilt und kernhaltige Erythrozyten detektiert werden (Lehner et al., 2007 und Briggs et al., 2009). Die Trennung der Zellen erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Zellgröße, des Verhältnisses zwischen Zellkern und Plasma, der Kernform und dem polarisierten Licht der Zellgranula (Kleine et al., 2010). Die tatsächliche Zählung der durch das Gerät strömenden Leukozyten erfolgt durch die Bestrahlung mit fluoreszierendem Laserlicht. Davor werden die Erythrozyten und andere störende Partikeln lysiert und somit aus dem Zählungsvorgang ausgeschlossen. Das Zytoplasma der weißen Blutkörperchen wird ebenfalls lysiert (Kleine et al., 2010).

Der zweite Kanal verwendet die Grundsätze der Impedanz. Auch hier (wie oben beschrieben) beruht die Zellzählung auf den elektrischen Eigenschaften der einzelnen Zellen in einem elektrischen Feld (Dörner, 2009). Bei einer ausschließlichen Zählung von Erythrozyten werden keine Zellen lysiert (Kleine et al., 2010). Das Gerät weist eine hohe Präzision auch bei zellarmen Proben auf und ist in der Lage zwischen Leukozyten bzw. sonstigen kernhaltigen Zellen zu unterscheiden (Hoffmann, 2002).

5.4.4. Der ADVIA 120/2120 Automat

Bei diesem Automaten handelt sich um ein automatisiertes Durchflusszytometer (Strik et al., 2005), welches zusätzlich zu den hämatologischen Funktionen über ein spezielles Programm für die Analyse von Zellen in Liquorproben verfügt („ADVIA 120 CSF Assay“). Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen der Probe von einem Reagens ummantelt. Dadurch entsteht ein Einzelzellstrom, der es ermöglicht die Zellen zu messen (Abbildung 5.5.). Die Zellzählung und Differenzierung der Zellen erfolgt anhand der ermittelten Zellgröße und via Lichtabsorption.

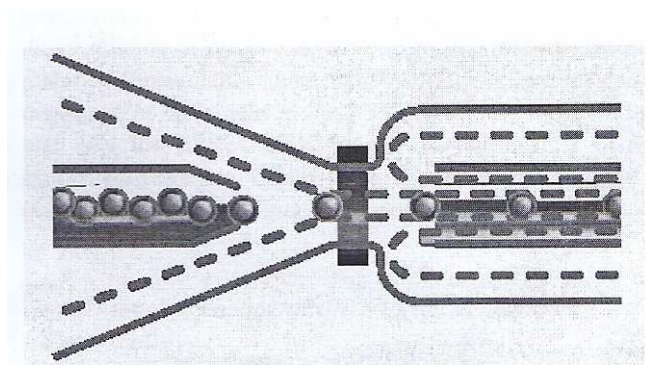


Abbildung 5.5.: Prinzip der Durchflusszytometrie (Lehner et al., 2007)

Der ADVIA 120 und das Modell 2120 verfügen über zwei unabhängige Kanäle in denen durch eine Kombination aus Lichtstreuung, zytochemischer Färbung und anhand der Kerndichte die Leukozyten gezählt und differenziert (PMN- und MN-Zellen) werden. Der ADVIA kann in einem Messverfahren Zellen sowohl zählen als auch differenzieren. Die Ergebnisse der Messung werden als Zytogramm und als spezielle Clusteranalyse dargestellt (Lehner et al., 2007).

Die Messung der Leukozyten erfolgt durch drei optische Signalübertragungen (Kleine et al., 2010). Sie gliedern sich in zwei Signale (Forward Scatter „FSC“ und Side Scatter „SSC“), die mittels Laserstreulicht erfasst (Abbildung 5.7.) und anschließend im sogenannten Baso-Kanal (Abbildung 5.5) dargestellt werden (Briggs et al., 2009).

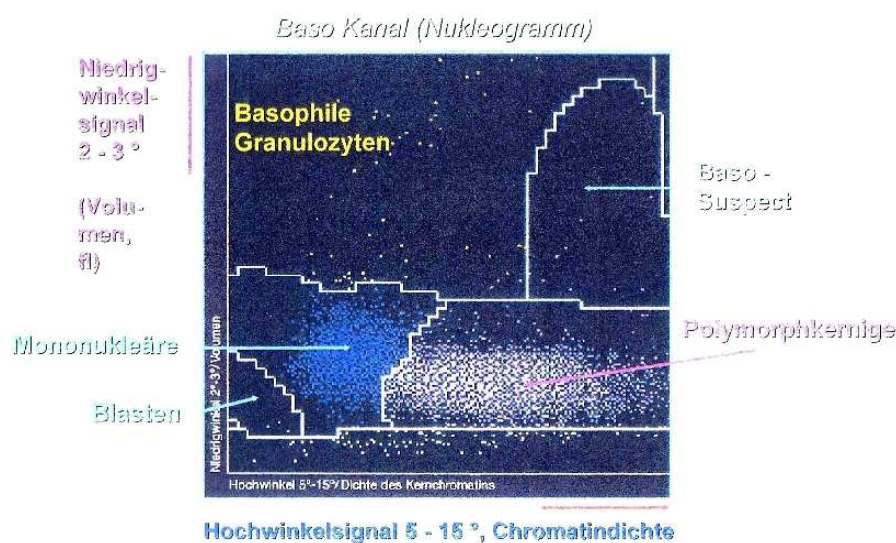


Abbildung 5.6.: Leukozyten im Baso-Kanal des ADVIA (Kosanke, Siemens)

Der Baso-Kanal setzt sich zusammen aus einem Niedrigwinkelsignal ($2-3^\circ$), welches dem Zellvolumen proportional ist und auf der y-Achse dargestellt wird und einem Hochwinkelsignal ($5-15^\circ$), welches dem auf der x-Achse aufgetragenen refraktiven Index (Brechungsindex) zwischen Granularität und Kernchromatin entspricht (Abbildung 5.6.). Erst die Kombination zwischen diesen Streulichtsignalen ermöglicht die Unterscheidung der Zellen in die jeweiligen Cluster des Scattergramms (Kosanke, Siemens). Das FSC-Signal ist proportional zur Zellgröße und spielt eine wichtige Rolle bei der Unterscheidung zwischen den einzelnen Zellarten. Das FSS-Signal weist eine besondere Sensibilität bei der Differenzierung der MN-Zellen auf. Mittels „side scatter signal“ (SSC) werden ferner Strukturen im Zellinneren unterschieden. Der wichtigste Differenzierungsfaktor dabei ist die Granularität der Zellen (Nguyen, 2003).

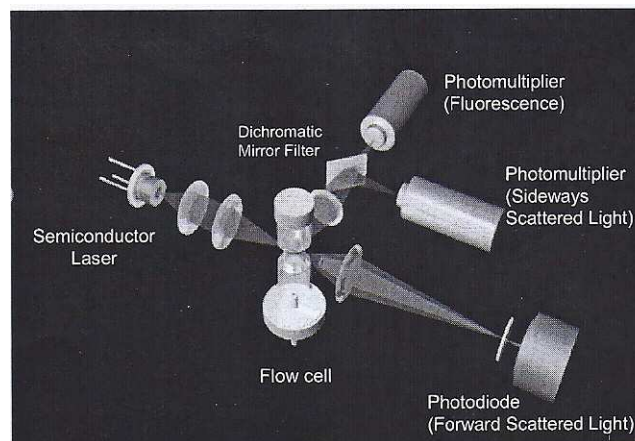


Abbildung 5.7.: Streulichtsignale des ADVIA
(Lehner et al., 2007)

Ein drittes Signal, welches im sog. Peroxidase-Kanal gezeigt wird, wird durch die Lichtabsorption erzeugt (Kleine et al., 2009). Dabei wird die Farbintensität der Peroxidasekonzentration gemessen. Diese stellt ein Maß für die Aktivität des Enzyms dar (Lehner et al., 2007) und wird im Scattergramm gegen das Hochwinkelsignal dargestellt (Abbildung 5.7). Monozyten bzw. neutrophile und eosinophile Granulozyten absorbieren weißes Licht aus der künstlichen Lichtquelle. Dies gilt als eine positive Peroxidaserreaktion. Da Lymphozyten und basophilen Granulozyten weißes Licht nicht absorbieren, weisen sie eine negative Peroxidaserreaktion auf. Die Färbung der Leukozyten-Peroxidase gilt als Gold-Standard für die Differenzierung von Leukozytensubpopulationen.

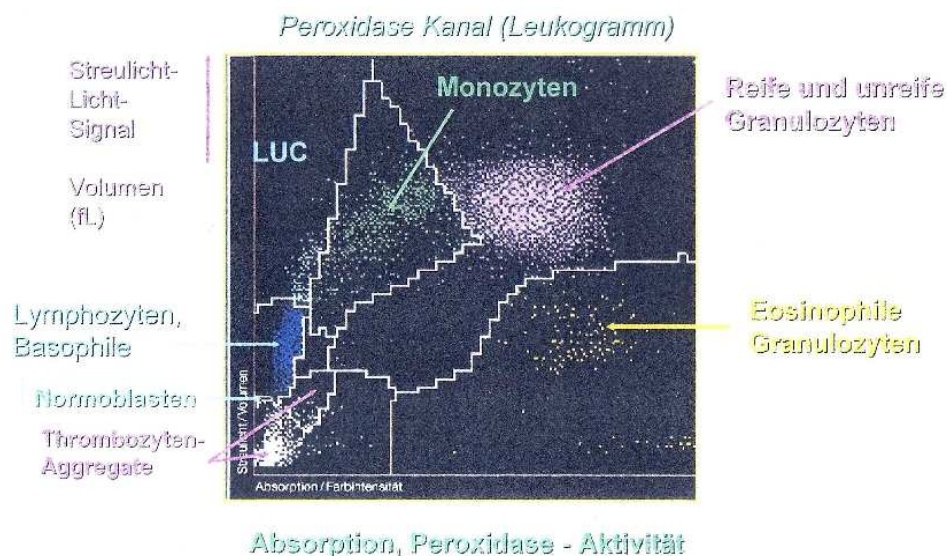


Abbildung 5.7: Peroxidase Kanal des ADVIA (Kosanke, Siemens)

6. Material und Methoden

6.1. Patienten

Insgesamt wurden 74 Liquorproben von männlichen und weiblichen Patienten im Alter zwischen 22 und 80 Jahren im Zeitraum zwischen März 2011 und Juni 2012 analysiert. Die Verdachtsdiagnosen für die Zuweisung zur Liquoruntersuchung waren: Lymphom (N=14), Multiple Sklerose (N=7), Encephalitis (N=6), Leukämie (N=5), Lues (N=5), Meningitis (N=3), Neuroborreliose (N=3), unklare Hirnstammläsion (N=2), Subarachnoidalblutung (N=1), Status post Mammakarzinom (N=1), Verdacht auf Normaldruckhydrocephalus (N=1), unklarer ZNS-Läsion (N=1), unklare Läsion im Magnetresonanztomogramm (N=1), Optomotorikstörung (N=1), Meningealkarzinomatose (N=1), posterior reversible Encephalopathiesyndrom (PRES, N=1), Verdacht auf entzündliches Liquor-zellsyndrom (N=1), Status fibrilis (N=1), Epileptischer Anfall (N=1), Verdacht auf akuter Polyradikulitis (Guillain-Barré Syndrom, GSB, N=1), Verdacht auf Creutzfeldt-Jacob-Syndrom (N=1), unklares Extrapiramidalsyndrom (OPS, N=1). Weiters gab es 3 Kontrolluntersuchung. In 10 Fällen wurden die Liquores ohne Verdachtsdiagnose zugewiesen.

Alle Liquorproben wurden von Patienten der neurologischen Abteilung des Kaiser-Franz-Josef Spitals im Rahmen der routinemäßigen Abklärung entnommen. Für die Analysen wurde bereits vorhandenes Restmaterial verwendet.

6.2. Methoden

In dieser Arbeit wurde die Zellzahl im Liquor manuell in der Fuchs-Rosenthal Zählkammer und mit dem Automaten ADVIA 2120 erhoben. Die Differenzierung der Leukozytensubpopulationen erfolgte mikroskopisch anhand von Zytozentrifugenpräparaten, sowie vollautomatisch (ADVIA 2120). Die händische Zellzählung, die Herstellung eines Zytozentrifugenpräparates und die mikroskopische Differenzierung der Leukozytensubpopulationen erfolgten im Laboratorium der neurologischen Ambulanz des Kaiser-Franz-Josef Spitals. Die automatische Zellzählung oder-differenzierung mittels ADVIA 2120 wurde im Zentrallabor des Spitals durchgeführt.

6.2.1. Manuelle Zellzählung

Wie bereits erwähnt, wurde für die Zellzählung die Fuchs-Rosenthal Zählkammer eingesetzt (Abbildung 6.1.)

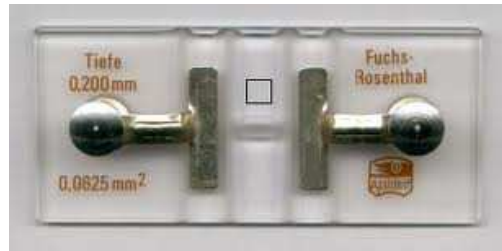


Abbildung 6.1: Fuchs-Rosenthal Zählkammer
(www.med4you.at)

Zunächst wurden in einem Kryostatröhrchen 10 μ l Liquorzählflüssigkeit vorgelegt und mit 100 μ l Liquor vermennt (Verhältnis 1 + 9). Anschließend erfolgte eine Inkubation von 3 Minuten (Raumtemperatur). Während dieser Zeit werden die Erythrozyten lysiert und die kernhaltigen Zellen angefärbt. Zwischenzeitlich wurde die von Verunreinigungen freie Zählkammer und das zugehörige Deckblatt seitlich befeuchtet und letzteres auf beiden Seiten der Zählkammer angebracht bis Newtonsche Ringe zu sehen waren. Das Deckblatt konnte anschließend mittels Schrauben fixiert werden.

In die nun vorbereitete Zählkammer wurde das gefärbte Liquormaterial mittels Pipette überführt. Es folgte erneut ein Inkubationsschritt von 10-20 Minuten, welcher den Zellen erlaubt, in die Zählkammer zu sedimentieren. Im Anschluss daran wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop innerhalb der 16 Großquadrate gezählt (Abbildung 5.3).

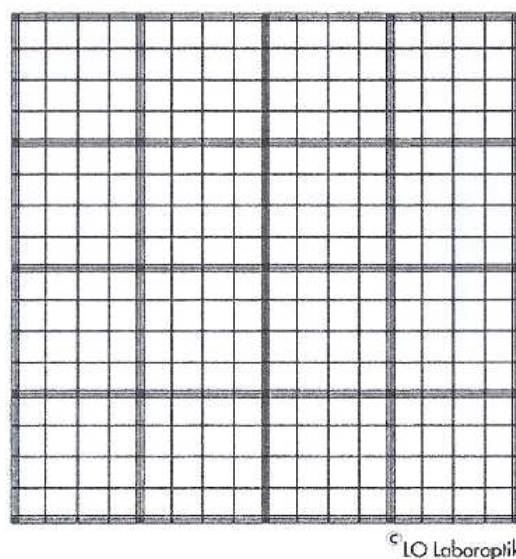


Abbildung 6.2: Netzsystem der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer
(www.zaehlkammer.de)

Um zu verhindern, dass Zellen mehrfach gezählt werden, verfolgt man eine bestimmte Zähltechnik, die in Abbildung 6.3. dargestellt wird.

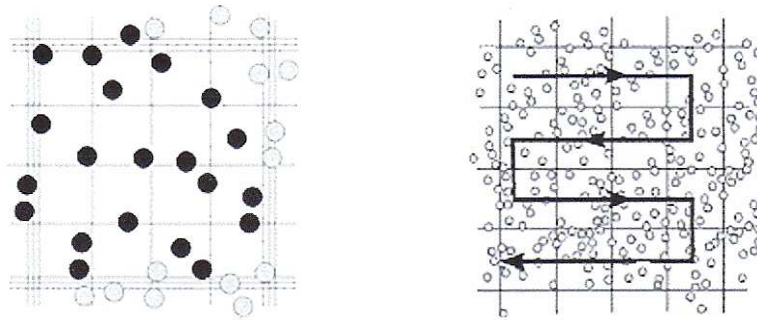


Abbildung 6.3: Zellraster und Zähltechnik (www.zaehlkammer.de)

Nach der Zählung wurde die Zählkammer in einer Wanne mit Desinfektionsmittel zwecks Reinigung deponiert.

Da der Kammerinhalt 3,2 µl beträgt, wird die ermittelte Zellzahl abgerundet und als Drittel ausgegeben, um die Zellzahl auf einen Mikroliter beziehen zu können. Eine Zellzahl unter 12/3 (entspricht 4 Zellen/µl) wird generell als normal betrachtet.

6.2.2. Automatisierte Zellzählung mittels ADVIA 2120

Für die automatische Zellzählung mittels ADVIA 2120 wurden drei Röhrchen vorbereitet:

- Röhrchen 1 enthielt ausschließlich 600 µl 0.9% Natriumchlorid. Dieses Röhrchen wird als sogenannte Leerwert-Messung bezeichnet und dient zur Gerätevorbereitung.
- Röhrchen 2 wurde mit 300 µl Liquor-Reagenz befüllt und mit 300 µl einer Kontrollprobe vermengt.
- Röhrchen 3 wurde ebenfalls mit 300 µl Liquor-Reagenz befüllt. Das Reagenz dieses Röhrchen wurde aber mit 300 µl Liquorflüssigkeit des Patienten versetzt.

Die Röhrchen wurden leicht geschwenkt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf dem ADVIA 2120 wurde im Gerät-Menü der Liquor-Kanal (LIQ-Kanal) aufgerufen, die Patientendaten im entsprechenden Fenster eingetragen, und der „Start“-Knopf betätigt bis die Hintergrundzählung grün wurde. Das Gerät war nun bereit, die Proben zu messen.

Die Proben wurden in der oben angeführten Reihenfolge (1-3) analysiert. Im ersten Röhrchen erfolgte die Leerwert-Messung, deren Ergebnis Null betragen musste. Falls dies nicht der Fall ist,

wird der ADVIA mit 1,5% Hypochlorid-Lösung und mit 0,9% Natriumchlorid gespült. Nach dem Leerwert wurde die Kontrollprobe und in der Folge die Patientenprobe analysiert. Ein Gerätausdruck wurde automatisch generiert.

6.2.3. Herstellung eines Zytozentrifugenpräparates

Für ein Zytozentrifugenpräparat wurde 500 µl Liquor benötigt. Im ersten Schritt wurde ein Objektträger mit 70%igem Ethanol gereinigt. Anschließend wurde auf einer Spannplatte der mit einem speziellen Filterpapier versehene Objektträger platziert und darauf eine Zytokammer mittels Spannring befestigt. Bei klaren Liquores wurde eine Zytokammer mit einem Volumen von 1 ml, bei blutigen, rosè gefärbten oder trüben Liquormaterialien eine Kammer mit einem Volumen von 4 ml vorbereitet und mit 500µl Liquor beschickt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zentrifugation bei 1500 U/min (Umdrehungen) für 5 Minuten. Im Anschluss daran wurde der Überstand durch kräftiges Schütteln in einen Behälter entleert. Nach Öffnen des Ringes wurde die Zytokammer verworfen. Anschließend erfolgte die Trocknung des Präparates durch neuerliche Zentrifugation bei 2500U/min für insgesamt 3 Minuten. Aus jeder Liquorprobe wurden zwei Zytozentrifugenpräparate hergestellt.

6.2.4. Färbung eines Zytozentrifugenpräparates

Die Färbung der getrockneten Präparate erfolgte nach dem Pappenheim Verfahren, bei dem das getrocknete Präparat zunächst mit May-Grünwald-Lösung bedeckt wird. Nach 5 Minuten wurde die Färbelösung durch vorsichtiges Abtropfen mit destilliertem Wasser abgewaschen und das Präparat für 9 Minuten in Giemsa-Lösung eingetaucht. Danach wurde das Präparat erneut mit destilliertem Wasser abgespült. Die Unterseite der Objektträger, auf dem sich das gefärbte Präparat befand, wurde mit 3%iger Salzsäure-Ethanol-Lösung gereinigt, und anschließend an der Raumluft getrocknet. Zum Schluss wurde das Präparat mit Einschlussharz versehen und mit einem Deckglas eingedeckt.

6.3. Datenanalyse

6.3.1. Vergleichsanalyse

Die Ergebnisse der manuellen Methoden (Zellzählung in der Fuchs-Rosenthal Zählkammer und Zelldifferenzierung mittels Zyto-Zentrifugenpräparat) und die Resultate des ADVIA-Automaten wurde in einer Excel-Tabelle gegenübergestellt und miteinander verglichen, wobei die händischen Techniken die Referenzmethoden repräsentierten.

6.3.2. Statistik

6.3.2.1. Korrelation der Zellzahlen zwischen manueller und automatische Methode

Die Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen dem ADVIA 2120 und der manuellen Referenzmethode in der Fuchs-Rosenthal Zählkammer wurde mittels Korrelationsanalyse untersucht. Dabei wird der sogenannte Korrelationskoeffizient bestimmt, welcher ausdrückt, wie stark der Zusammenhang zwischen den Messwerten ist. Korrelationskoeffizienten können Zahlenwerte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei das Vorzeichen angibt, ob es sich um eine positive oder um eine negative Korrelation handelt. Je näher der Zahlenwert bei ± 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang. Ist die Korrelation 0 liegt kein Zusammenhang vor. Bei perfekten Zusammenhängen (Korrelationskoeffizient = 1) liegen sämtliche Messwerte zweier Methoden auf einer Geraden.

Um zu überprüfen, ob (kleine) Korrelationen auf das Fehlen einer Korrelation zurückzuführen sind, muss ein Signifikanztest durchgeführt werden. Dieser ist immer notwendig, da Messwerte eine gewisse Ungenauigkeit zeigen. Mit einem statistischen Signifikanztest ist es möglich, die Frage zu beantworten, ob ein Unterschied zwischen Messwerten durch die Messungenauigkeit zustande gekommen ist. Erst wenn die Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied so klein ist, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 5% oder weniger davon ausgegangen werden kann, dass kein Unterschied zwischen den Messwerten vorliegt, darf eine Korrelation interpretiert werden (Boltz, 2005).

Da die Korrelationsanalyse auf die Entdeckung linearer Zusammenhänge beschränkt ist, ist es notwendig, vorher die zu vergleichenden Werte in einem Diagramm zu erfassen. Die Darstellung

der Ergebnisse in einem Streudiagramm („Scatterplot“) ermöglicht den (linearen) Zusammenhang zwischen Messergebnissen sichtbar zu machen und vor allem auch Ausreißer darzustellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Korrelationsanalyse die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson eingesetzt, bei dem r für die Korrelation steht. Ist $r < 0$ liegt eine negative Korrelation vor, ist $r > 0$ eine positive. Bei $r = 0$ liegt keine, bei $r = 1$ eine 100% (perfekte) Korrelation vor (Rudolf, 2008).

Ferner wurde die lineare Regression nach Passing & Bablok (Passing, 1983) appliziert, da diese unabhängig von der Verteilung der Messwerte und von Messfehlern angewandt werden kann. Voraussetzung für eine lineare Regressionsanalyse ist eine lineare Beziehung zwischen den beiden Variablen (z.B. Messwerten). Darüber hinaus muss die Varianz der Verteilung der abhängigen Variable für alle Werte der unabhängigen Variable konstant sein d.h. mit steigenden Werten der abhängigen Variable sollten die Werte der abhängigen Variable nicht weiter streuen (Passing, 1983). Eine weitere Prämisse für eine lineare Regressionsanalyse ist die Unabhängigkeit der Daten untereinander (z.B. eine Messung automatisch, die andere händisch). Sowohl Varianz als auch Linearität lassen sich gut mittels Scatterplot beurteilen. Ferner wurde die Linearität der Ergebnisse mittels CUSUM Test untersucht. Diese Analysenmethode dient der Entdeckung von Änderungen in einer sequentiellen Datenreihe (kumulative Summe, CUSUM) (Passing, 1983).

Bei der Regressionsanalyse ($y = ax + b$) nach Passing-Bablok werden der Anstieg (b ; „slope“) und das Absolutglied (a ; „intercept“) mit dem 95% Konfidenzintervall kalkuliert. Das Absolutglied a ist ein Maß für den systematischen Unterschied zwischen zwei Methoden (Passing, 1983). Mit dem 95% Konfidenzintervall kann die Hypothese $a=0$ getestet werden. Die Hypothese $a=0$ wird akzeptiert, wenn das Konfidenzintervall von a den Wert 0 beinhaltet. Wenn die Hypothese abgelehnt wird ist bestätigt, dass a signifikant von 0 differiert und dass beide Methoden zumindest in einem konstanten Ausmaß von einander differieren. Der „slope“ b ist ein Maß für die proportionalen Unterschiede zwischen zwei Methoden. Mit dem 95% Konfidenzintervall kann die Hypothese $b=1$ getestet werden. Die Hypothese $b=1$ wird akzeptiert, wenn das Konfidenzintervall von b den Wert 1 beinhaltet. Wenn die Hypothese abgelehnt wird ist bestätigt, dass B signifikant von 1 differiert und dass zumindest eine proportionale Differenz zwischen den beiden Methoden besteht (Passing, 1983).

Um die Güte einer Regressionsanalyse zu beurteilen, wird der Determinationskoeffizient (Bestimmtheitsmaß) bestimmt (Rudolf, 2008). Im Falle der bivariaten Regression (nur eine

unabhängige Variable) ist der Determinationskoeffizient einfach das Quadrat des Korrelationskoeffizienten r (also r^2). Der Determinationskoeffizient gibt an, welcher Anteil der „Abweichungsquadrate“ (z.B. Varianz) von y durch das Modell erklärt wird und erlaubt Rückschlüsse auf die Validität des Modells. Er stellt somit ein Maß dar, wie nahe die Messwerte an der Regressionsgeraden liegen (Rudolf, 2008).

6.3.2.2. Korrelation der mononukleären und polymorphkernigen Zellen zwischen manueller und automatische Methode

Die Korrelation zwischen den Ergebnissen der manuellen (Zytozentrifugenpräparat) und der automatischen Zelldifferenzierung (ADVIA 210) wurde bei Fällen mit pathologischer Zellzahl (z.B. $> 12/3$ in der manuellen Referenzmethode) erhoben. Die Übereinstimmung wurde anhand der beiden Rangkorrelationskoeffizienten Kendall-Tau-b und Spearman-Rho analysiert. Ferner wurden MN- und PMN-Zellen einer Passing-Bablok-Regressionsanalyse mit anschließendem CUSUM-Test zugeführt. Für die Darstellung der Linearität, der Varianz und von Ausreißern wurde ein Scatterplot benutzt. Um die Gesamtverteilung der MN- bzw. PMN-Zellen bei manueller versus automatischer Messung darzustellen, wurden Histogramme generiert gebildet.

7. Resultate

Von 74 Liquorproben, welche analysiert wurden, waren 10 Proben blutkontaminiert (13,5%). Bei einer Probe mit Blutbeimengung bestand der Verdacht auf Subarachnoidalblutung. Weitere 2 Proben zeigten Zellschatten und frei liegende Kerne. In einer weiteren Liquorprobe fand sich eine große Anzahl an kleinen, pyknotischen Zellen, alles Veränderungen im Einklang mit älterem Probenmaterial. Somit standen 60 Liquorproben ohne Blutkontamination und ohne überalterte Proben für die Analysen zur Verfügung.

7.1. Übereinstimmung der Zellzahl zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode in 74 Liquorproben

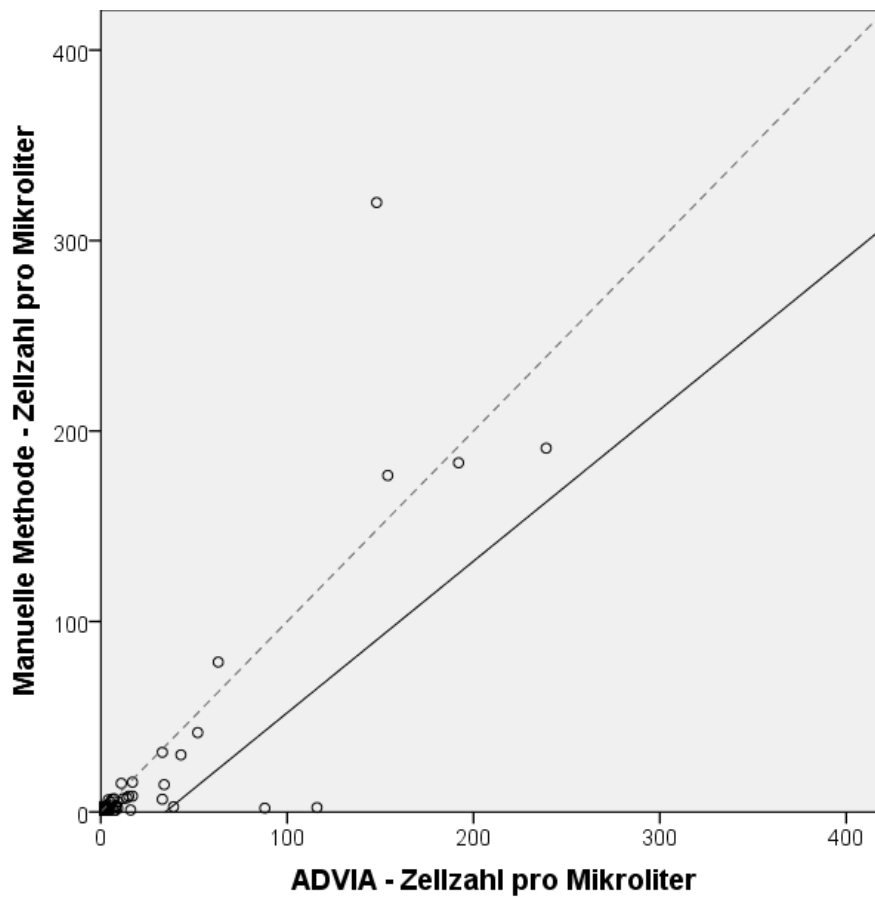
Unter Verwendung der manuellen Referenzmethode zeigten 22 von 74 Liques (29,7%) eine Zellzahl $> 12/3$ (> 4 Zellen/ μl) und unter Verwendung der automatischen Methode 34 von 74 Liques (45,9%). Der Mittelwert der Messungen mittels manueller Methode betrug 39,4 Zellen/ μl , mittels ADVIA 2120 25,0 Zellen/ μl (Tabelle 7.1.). Die Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,796$ (Tabelle 7.1.; Abbildung 7.1.). Die Korrelation war auf dem Niveau von 0,000 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 7.1.: Vergleich der Zellzahlen pro Mikroliter zwischen der automatischen Methode auf dem ADVIA 2120 und der manuellen Methode in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer: Mittelwert und Korrelationskoeffizient in 74 Liques

Zellzahl im Liquor ADVIA 2120 versus manuelle Methode

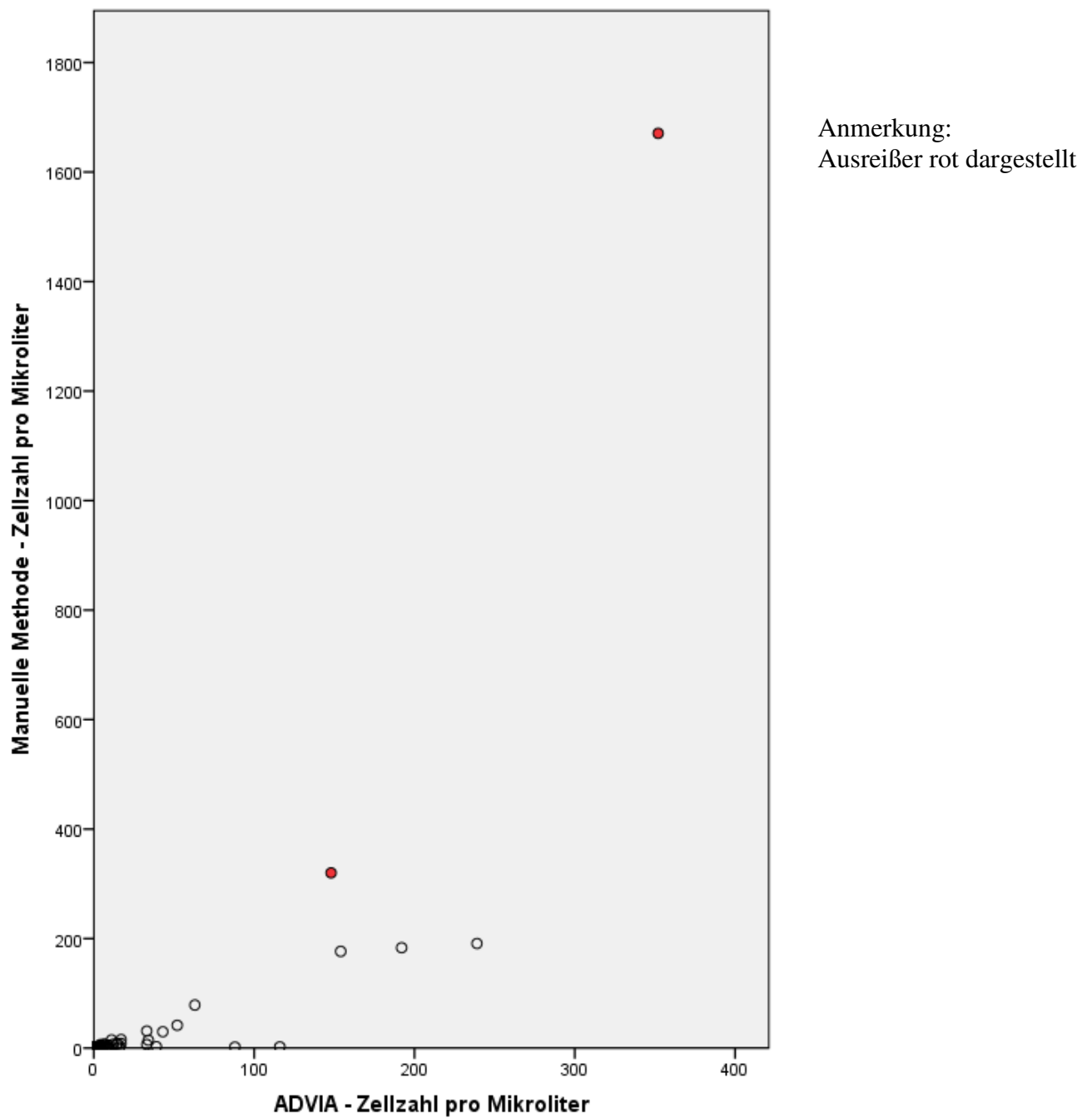
	Mittelwert Zellzahl pro μl			Korrelation
	ADVIA 2120	Manuelle Methode	Differenz	r
Liquorproben (N=74)	25,0	39,4	-14,5	0,796

Abbildung 7.1.: Korrelation der Zellzahlen pro Mikroliter zwischen der automatischen Methode auf dem ADVIA 2120 und der manuellen Methode in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer in 74 Liquorproben:



Im Scatterplot wurden zwei Ausreißer identifiziert (Abbildung 7.2.).

Abbildung 7.2. Zellzahl pro Mikroliter mittels ADVIA 2120 versus manuelle Methode im Scatterplot von 74 Liquorproben:



Bei den beiden Ausreißern wurde mittels ADVIA 2120 ein Wert von 1056/3 (entsprechend 352 Zellen/ μ l) und händisch ein Wert von 5012/3 (1671 Zellen/ μ l) ermittelt, sowie 960/3 Zellen (320 Zellen/ μ l) mittels ADVIA und 444/3 Zellen (148 Zellen/ μ l) in der manuellen Messung.

7.2. Übereinstimmung der Zellzahl zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode in 60 Liquorproben

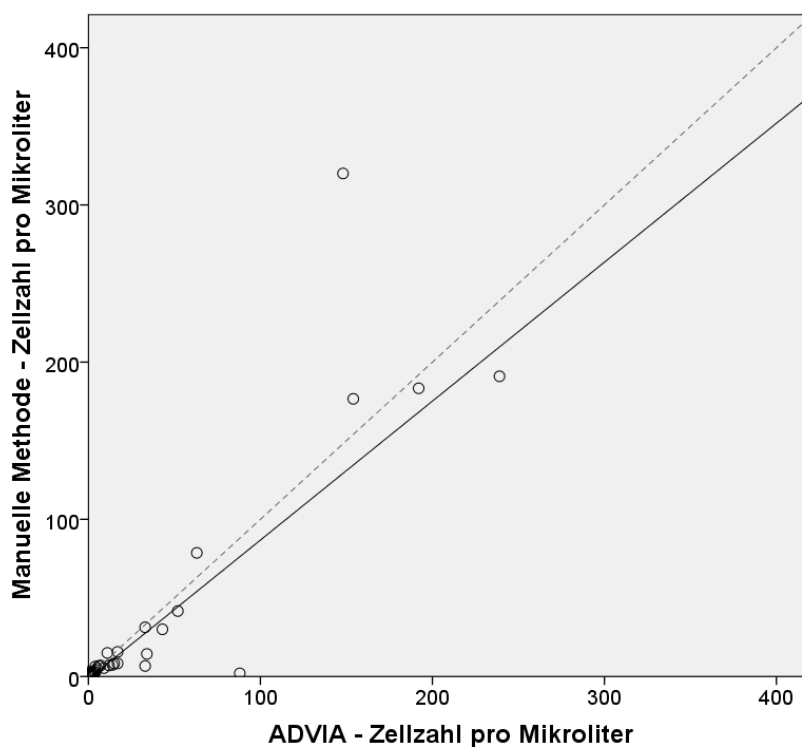
In den 60 Liquores ohne Blutkontamination bzw. überalterte Proben betrug der Mittelwert der Messungen mittels manueller Methode 20,4 Zellen/ μ l, mittels ADVIA 2120 20,9 Zellen/ μ l (Tabelle 7.2.). Die Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,884$ (Tabelle 7.2.; Abbildung 7.3.). Die Korrelation war auf dem Niveau von 0,000 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 7.2.: Vergleich der Zellzahlen pro Mikroliter zwischen der automatischen Methode auf dem ADVIA 2120 und der manuellen Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer: Mittelwert und Korrelationskoeffizient in 60 Liquores:

Zellzahl im Liquor ADVIA 2120 versus manuelle Methode

	Mittelwert Zellzahl pro μ l			Korrelation
	ADVIA 2120	Manuelle Methode	Differenz	r
Liquorproben ohne Blutkontamination / alte Fälle (N=60)	20,9	20,4	0,5	0,884

Abbildung 7.3: Korrelation der Zellzahlen pro Mikroliter zwischen der automatischen Methode auf dem ADVIA 2120 und der manuellen Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer in N=60 Liquores:



7.3. Übereinstimmung der Zellzahl zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode bei Fällen mit einer Zellzahl > 12/3 (> 4/ μ l)

Unter Verwendung der manuellen Referenzmethode zeigten 22 von 74 Liquores (29,7%) eine Zellzahl > 12/3 (> 4 Zellen/ μ l). Die Verdachtsdiagnosen und jene mit der händischen bzw. automatischen Methode erhobenen Zellzahlen sind in der Tabelle 7.3. dargestellt.

Tabelle 7.3. Verdachtsdiagnosen bei 22 Patienten mit einer manuellen Zellzahl > 12/3 (> 4 Zellen/ μ l)

Verdachtsdiagnose	Zellzahl	
	ADVIA	Manuell
Bekannte Lues	156/3	125/3
Hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom	27/3	16/3
Kontrollpunktion bei entzündlichem Liquorzellsyndrom	21/3	21/3
Periphere Facialisparese/ Verdacht auf Neuroborreliose	576/3	550/3
Subarachnoidalblutung	99/3	20/3
Unklare Ataxie bei Status post Mammakarzinom	189/3	236/3
Status post Neuroborreliose	99/3	94/3
Unklare Hirnstammläsion	51/3	47/3
Unklare zerebrale Läsion im Magnetresonanztomogramm	462/3	530/3
Unklares Extrapiramidalsyndrom	36/3	21/3
Verdacht auf chronische Meningitis	717/3	573/3
Verdacht auf basale Meningitis	444/3	960/3
Verdacht auf Lues	33/3	45/3
Verdacht auf Meningitis mit Pneumokokken	1056/3	5012/3
Verdacht auf Multiple Sklerose	12/3	19/3
Verdacht auf Multiple Sklerose	45/3	25/3
Verdacht auf Multiple Sklerose	18/3	20/3
Verdacht auf Neuroborreliose	129/3	90/3
Verdacht auf Varicellen zoster Encephalitis	102/3	43/3
/ (keine Angabe)	15/3	15/3
/ (keine Angabe)	42/3	22/3
/ (keine Angabe)	51/3	25/3

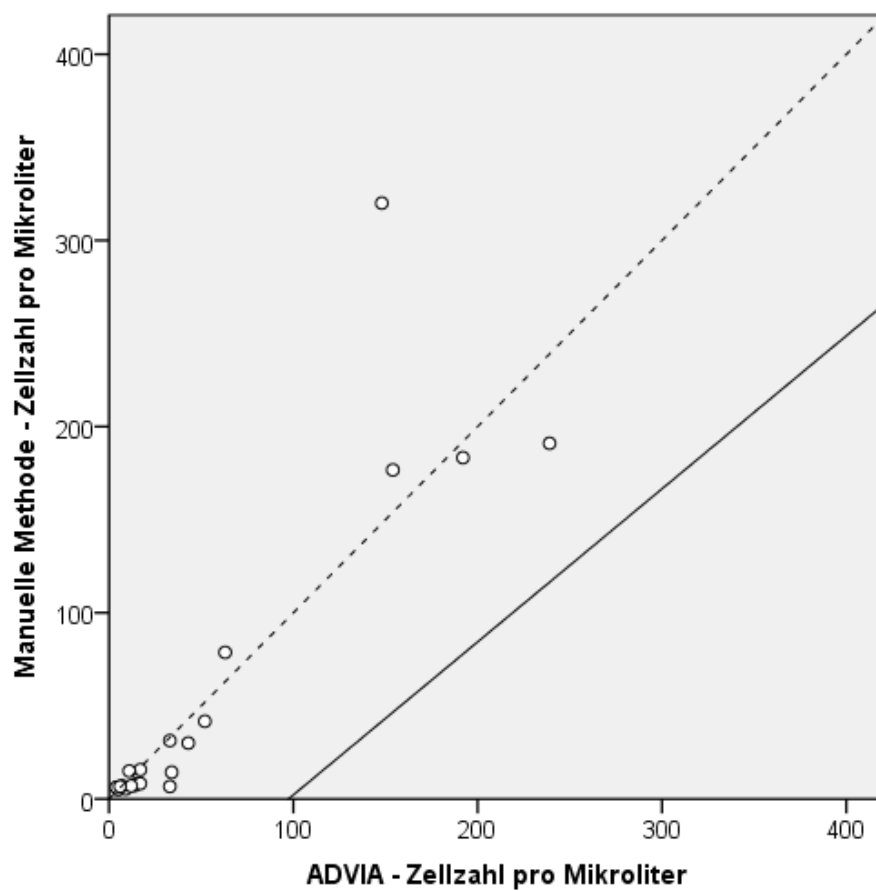
Die mittlere Zellzahl bei den 22 Fällen betrug mittels ADVIA 66,4 Zellen/ μ l, händisch 128,9 Zellen/ μ l. Die Differenz zwischen beiden Methoden war -62,5 Zellen/ μ l. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,822 (Tabelle 7.4.).

Tabelle 7.4. Vergleich der Zellzahlen zwischen der automatischen Methode auf dem ADVIA 2120 und der manuellen Methode in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer für 22 Liquores mit einer Zellzahl > 12/3 (> 4 Zellen/ μ l)

Liquorproben	n=	Mittelwert Zellzahl pro μ l			Korrelation
		ADVIA 2120	Manuelle Methode	Differenz	r
Zellzahl > 12/3	22	66,4	128,9	-62,6	0,822

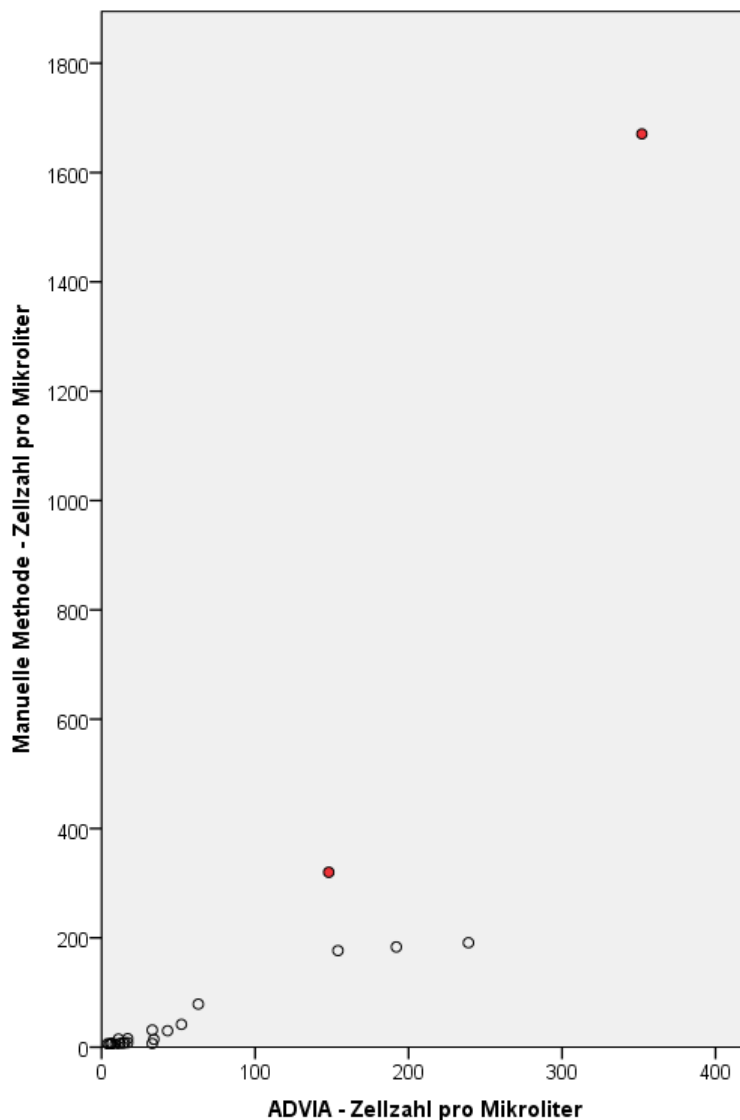
Um die Übereinstimmung der Zellzahlen klarer darzustellen, wurde eine Grafik angefertigt (Abbildung 7.4.).

Abbildung 7.4. Korrelation der Zellzahlen zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer in 22 Liquores mit einer Zellzahl > 12/3 (> 4 Zellen/ μ l)



Ferner wurde ein Scatterplot generiert, in dem zwei Proben als Ausreißer identifiziert wurden (Abbildung 7.5.).

Abbildung 7.5. Scatterplot mit Zellzahl > 12/3 (> 4 Zellen/ μ l) mittels ADVIA 2120 versus manueller Methode (Fuchs-Rosenthal-Zählkammer):



Anmerkung:
Ausreißer rot dargestellt

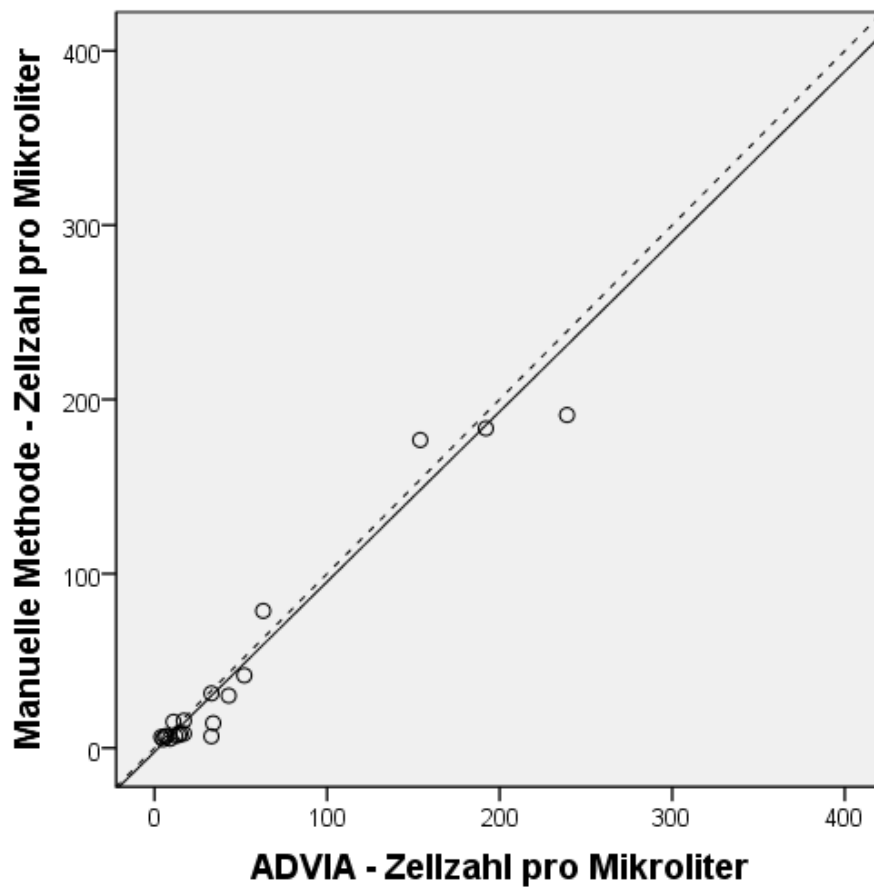
Aufgrund der niedrigen Fallzahl von $n=22$ wirken sich die beiden Ausreißer stark auf die Ergebnisse der Korrelationsanalyse aus. Nach Entfernung der beiden Ausreißer betrug die mittlere Zellzahl mittels ADVIA 48,0 Zellen/ μ l händisch 42,3 Zellen/ μ l. Die Differenz zwischen beiden Methoden war 5,7 Zellen/ μ l. Der Korrelationskoeffizient stieg von 0,822 auf einen Wert von 0,976.

Tabelle 7.5.. Vergleich der Zellzahlen zwischen der automatischen Methode auf dem ADVIA 2120 und der manuellen Zellzahl in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer für 20 Liquores mit einer Zellzahl > 12/3 (> 4 Zellen/ μ l)

Liquorproben	n=	Mittelwert Zellzahl pro μ l			Korrelation
		ADVIA 2120	Manuelle Methode	Differenz	r
Zellzahl > 12/3	20	48,0	42,3	5,7	0,976

Die Übereinstimmung der Zellzahlen wurde wiederum in einer Grafik dargestellt (Abbildung 7.6.).

Abbildung 7.6. Korrelation der Zellzahlen zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer in 20 Liquores mit einer Zellzahl $> 12/3$ (> 4 Zellen/ μl)



Bei Betrachtung der ermittelten Zellzahlen pro Mikroliter zeigt sich somit bei pathologischen Zellzahlen eine exzellente Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des ADVIA 2120 und der manuellen Methode. Insbesondere wurden alle Proben, die mittels manueller Methode als pathologisch ($> 12/3$ Zellen bzw. > 4 Zellen/ μl) klassifiziert wurden, auch bei der automatischen Zellzählung als solche klassifiziert.

7.4. Übereinstimmung der Zelldifferenzierung zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode

Die Übereinstimmung der PMN- und MN-Zellen zwischen der automatischen und der manuellen Methode wurde bei Patienten mit einer Zellzahl $> 12/3$ mittels Kendalls-Tau-b und Spearmans Rho Rangkorrelation analysiert, da die Verteilung der Zellen eine deutliche Schiefelage aufwies (z.B. deutlich rechtsschiefe Lage für MN-Zellen). Da sich die Gesamtzahl der Leukozyten aus der Summe der PMN- und MN-Zellen zusammensetzt, wurden in der statistischen Analyse nur die Prozentanteile der MN-Zellen berücksichtigt. Das Ergebnis für die PMN-Zellen stellt sich dementsprechend analog dar.

Die Rangkorrelationskoeffizienten Kendall-Tau-b und Spearman-Rho wiesen eine signifikante Korrelation zwischen beiden Methoden nach. Der Kendalls-Tau-b Koeffizient erreichte einen Wert von 0,633, Spearmans-Rho zeigte einen Zusammenhang von 0,819 (Tabelle 7.6.).

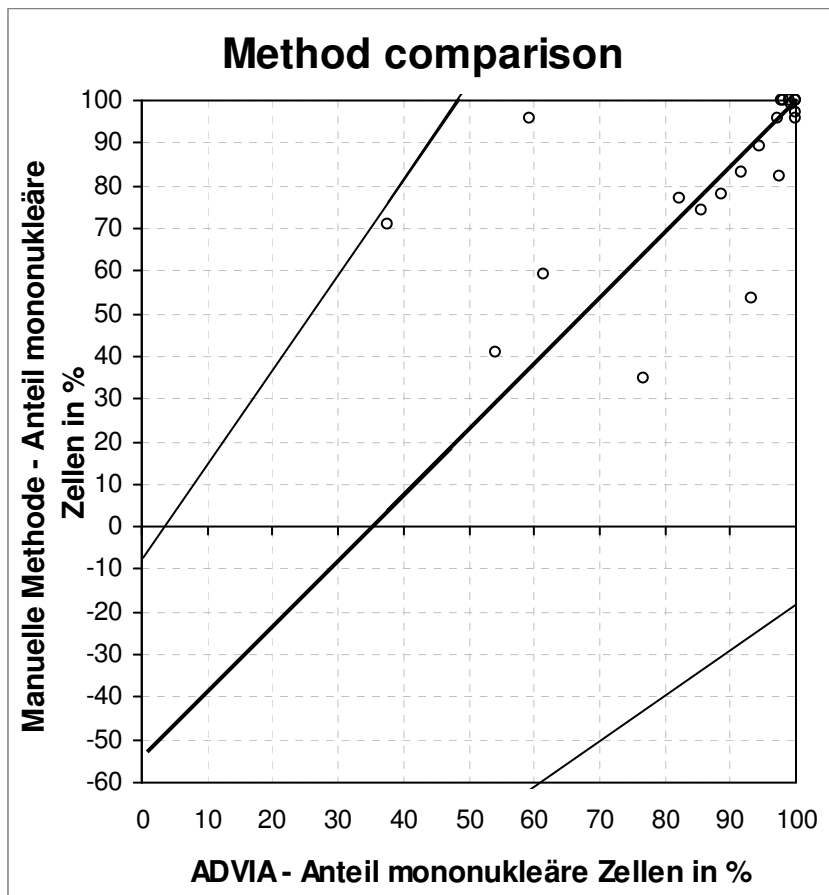
Tabelle 7.6. Ergebnisse der Korrelation der Prozentsätze für mononukleäre Zellen erhoben mittels ADVIA 2120 und manueller Zählung (Zytozentrifugenpräparat) Entfernen: (Fuchs-Rosenthal-Zählkammer)

			Anteil MN-Zellen in % (Zytozentrifugenpräparat)
Kendall-Tau-b	Anteil MN-Zellen in % (ADVIA)	Korrelationskoeffizient	,633**
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	22
Spearman-Rho	Anteil MN-Zellen in % (ADVIA)	Korrelationskoeffizient	,819**
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	22

** . Die Korrelation war auf dem Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

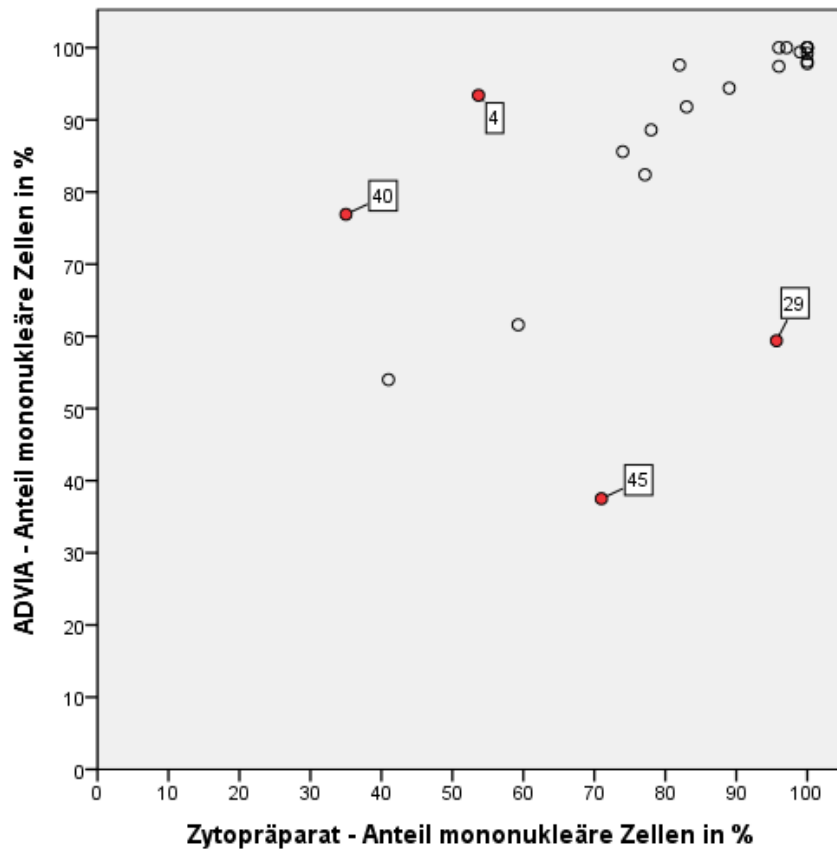
Auch in der Passing-Bablok Regression zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Zählmethoden zur Ermittlung des Anteils an MN-Zellen (Abbildung 7.7.).

Abbildung 7.7. Ergebnisse der Passing-Bablok Regression mit den Prozentsätzen an mononukleären Zellen erhoben mittels ADVIA 2120 und manueller Zählung (Zytozentrifugenpräparat)



Im Scatterplot zeigte sich ebenfalls ein deutlich linearer Zusammenhang der beiden Analyseverfahren. In vier Fällen wichen die Ergebnisse stärker von einander ab (Ausreißer). Zusätzlich zu den beiden Ausreißern, welche bereits bei der Analyse der Drittelzellen auffällig waren, wurden zwei weitere Fälle als Ausreißer identifiziert (Abbildung 7.8.).

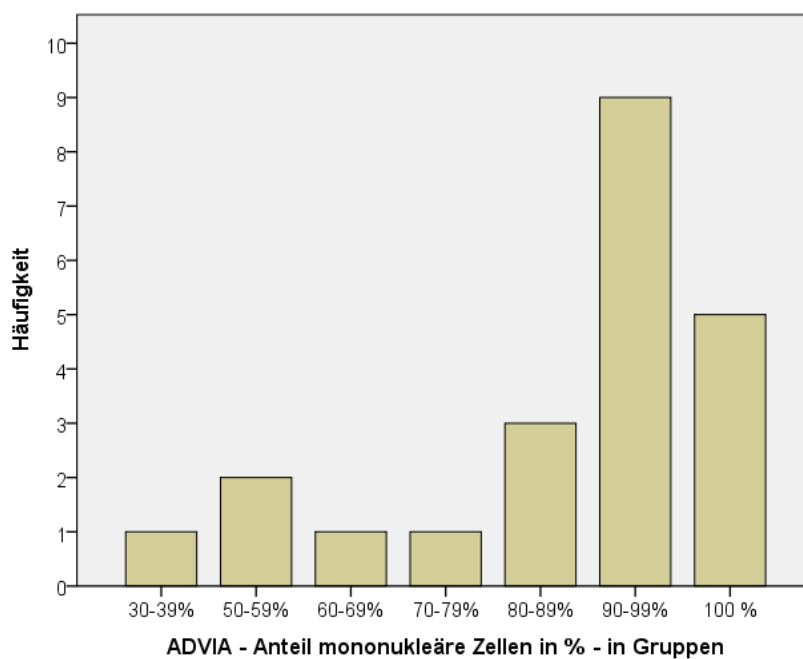
Abbildung 7.8. Scatterplot der Prozentanteile der mononukleären Zellen erhoben mittels ADVIA 2120 und mittels manueller Zählung (Zytozentrifugenpräparat)



Anmerkung:
Ausreißer rot dargestellt

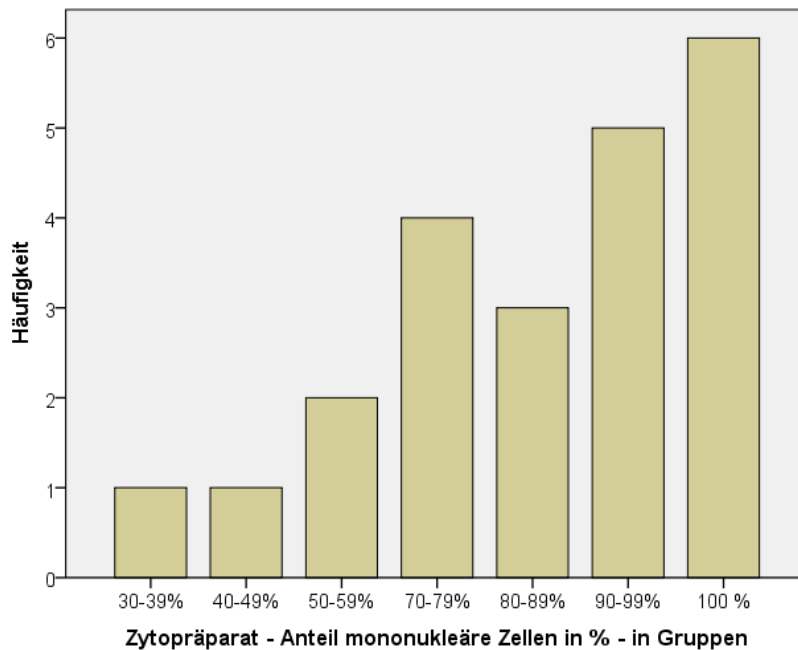
Die gruppierten Prozentsätze an MN-Zellen im Vergleich zwischen ADVIA 2120 und der manuellen Methode sind in Abbildung 7.9. und Abbildung 7.10. dargestellt

Abbildung 7.9. Verteilung der ermittelten Prozentanteile an mononukleären Zellen (ADVIA 2120)



Bei der automatischen Methode (Abbildung 7.9.) war die Häufigkeitsverteilung rechtsschief verschoben. Hier enthielten 14 von insgesamt 22 Proben einen prozentuellen Anteil an MN-Zellen über 90%. In 7 Proben lag der prozentuelle Anteil an MN-Zellen zwischen 50- 89%.

Abbildung 7.10. Verteilung der ermittelten Prozentanteile an mononukleären Zellen (manuelle Zählung mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer)



Bei der manuellen Methode (Abbildung 7.10.) war die Häufigkeitsverteilung der MN-Zellen ebenfalls rechtsschief verschoben. Hier enthielten 11 Proben einen prozentuellen Anteil an MN-Zellen über 90% und 9 Proben einen prozentuellen Anteil an MN-Zellen zwischen 50- 89%.

8. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die manuelle Referenzmethode zur Zellzählung sehr gut mit der automatischen Zellzählung mittels ADVIA 2120 übereinstimmt. Die Korrelationsanalyse erbrachte einen Korrelationskoeffizienten von 0,796 für sämtliche Liquorproben, inklusive blutkontaminierter und alter Liquorproben, sowie Liquores mit einer normalen als auch stark erhöhten Zellzahl. Nach Ausschluss der blutkontaminierten bzw. alten Proben wies der Korrelationskoeffizient einen Wert von 0,884 auf. Bei Liquorproben mit einer Zellzahl $> 12/3$ war die Korrelation mit 0,976 beinahe 1,0 (100%). Ferner fand sich eine sehr gute Übereinstimmung der MN- und PMN-Zellen zwischen beiden Methoden, mit einem Rangkorrelationskoeffizienten von 0,633 mittels Kendall-Tau-b und 0,819 unter Einsatz der Spearmans Rho Methodik.

8.1. Ergebnisse der Zellzahlbestimmung

In sämtlichen konsekutiv eingesandten 74 Liquorproben fand sich eine überraschend hohe Übereinstimmung mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,796, obwohl die Liquorproben auch blutbeigemengt (11 Proben), sowie alte Liquores (3 Proben) umfassten. Ferner waren in dieser gesamten Gruppe an 74 Proben sowohl Liquores mit sehr niedriger, sowie sehr hoher Zellzahl enthalten. Bei sehr niedrigen Zellzahlen ist die Präzision der Messungen, sowohl jene der händischen, als auch der automatischen geringer. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass 50 Liquores eine niedrige Zellzahl von $< 12/3$ aufwiesen ist ein Korrelationskoeffizient von 0,796 höchst zufriedenstellend.

In allen 22 pathologischen Liquorproben (Zellzahl $> 12/3$ bzw. > 4 Zellen/ μl) fand sich mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,822 eine hohe Übereinstimmung zwischen der manuellen Zählung und der Zählung mittels ADVIA 2120. Für die klinische Routinearbeit besonders bedeutsam ist die Tatsache, dass mittels ADVIA 2120 alle 22 Fälle, welche mit der manuellen Referenzmethode als pathologisch (i.e. $> 12/3$ Zellen) klassifiziert wurden, als solche bestätigt wurden. Nur in zwei Fällen (Fall Nummer 4 und 40) zeigten sich Abweichungen. Beim Fall Nummer 4 wurden mittels ADVIA 444/3 Zellen (148 Zellen/ μl), in der manuellen Messung 960/3 Zellen (320 Zellen/ μl) gezählt. In dieser Probe fand sich keine Blutkontamination. Beim Fall Nummer 40 wurde mittels ADVIA 2120 ein Wert von 1056/3 (entsprechend 352 Zellen/ μl), händisch ein Wert von 5012/3 (1671 Zellen/ μl) ermittelt. Das Zellbild zeigt eine leichtgradige Erythrozytenbeimengung mit zahlreichen defekten Zellen, sowie Ependymzellen. Die Diskrepanzen mit höheren Zellzahlen bei

der manuellen Methode kann durch die Unschärfe der manuellen Zellzählung bei hohen Zellzahlen bedingt sein (i.e. hohe Zelldichte in der Zählkammer, Messfehler beim Einsatz verdünnter Proben). Nach Entfernung der beiden Ausreißer betrug die durchschnittliche Zellzahl mittels ADVIA 48,0/ μ l, jene mit der händischen Methode 42,7/ μ l bei einem Korrelationskoeffizient von 0,976. Interessanterweise ist dieser Korrelationskoeffizient beinahe ident mit jenem in der Arbeit von Aune und Kollegen beschriebenen (Korrelationskoeffizient: 0,988) (Aune et al, 2004).

Von den 74 untersuchten Liquorproben zeigten 13 Fälle (17,6%) mittels ADVIA 2120 eine Zellzahl $> 12/3$, während die manuelle Zellzählung Werte $< 12/3$ erbrachte. In 11 dieser 13 Proben war Blut beigemischt, weshalb vermehrt Erythrozyten im Liquor vorhanden waren. Die auf dem ADVIA gemessene Zellzahl lag zwischen 5 - 16 Zellen/ μ l, entsprechend 15/3 - 48/3 Zellen. Da im Liquorkanal des ADVIA 2120 die Erythrozyten nicht lysiert werden, können größere Blutbeimengungen zu falsch hohen Leukozytenwerten führen („Mit zählen“ der Erythrozyten). Eine präzise automatische Bestimmung der Zellzahl im Liquor ist bis zu einer Erythrozytenzahl von $< 1500/\mu$ l möglich, wobei bedacht werden muss, dass die Leukozyten des peripheren Blutes mitgezählt werden und die Ergebnisse somit nicht nur die Leukozytenpopulation des Liquors repräsentieren. Liquorproben mit stärkerer Blutbeimengung (Erythrozyten $> 1500/\mu$ l) müssen verdünnt werden, wobei durch die Verdünnung die Präzision der Messung, sowohl jene der automatischen, als auch jene der manuellen, reduziert wird. Einer falsch hohen Zellzahl bei der automatischen Analyse blutiger Likoeres kann jedoch vorgebeugt werden, in dem die Scattergramme hinsichtlich klarer Abgrenzung der Leukozytenpopulation überprüft wird. Im Falle von Überschneidungen der Leukozyten- und der Erythrozytenpopulation muss die gemessene Leukozytenzahl mit einem entsprechenden Hinweis kommentiert werden.

Zwei der oben erwähnten 13 Proben wiesen eine hohe Anzahl an Zellfragmenten und Kernschatten auf. Hier muss erwähnt werden, dass bei der händischen Zellzählung durch die Färbung die Zellen älterer Liquorproben diese lysieren können und somit nicht mehr zur Zählung zur Verfügung stehen. Bei der automatischen Zählung hingegen werden diese fixiert und (noch) gezählt. Dies kann die Diskrepanz zwischen den beiden Zählmethoden erklären.

Erwähnt werden muss, dass sämtliche Automaten ursprünglich für die Zellzählung im Blut entwickelt wurden. Im Unterschied zur Liquorflüssigkeit kommen im Blut wesentlich mehr Zellen vor. Aus diesem Grund messen Automaten präziser je mehr Zellen im Liquor vorhanden sind, also je „pathologischer“ die Probe ist.

8.2. Ergebnisse der Zelldifferenzierung

In allen 22 Liquorproben mit erhöhter Zellzahl fand sich eine weitgehend große Übereinstimmung zwischen der manuellen und der automatischen Differenzierung der MN- und PMN-Zellen. Die Ergebnisse wurden mittels Kendalls Tau b und Spearmans Rho Korrelation, als auch mittels Passing-Bablok Regression geprüft und die gute Korrelation bestätigt (Korrelationskoeffizienten zwischen 0,633 und 0,819). In vier Fällen wurden Abweichungen beobachtet (Zytopräparat Nummer 4, 29, 40 und 45).

Im Zytozentrifugenpräparat mit der Fallnummer 4 handelte es sich um eine Liquorprobe eines Patienten mit Verdacht auf basale Meningitis, bei dem die manuelle Zellzählung 960/3 Zellen, die automatische 444/3 Zellen erbrachte. Im Zytozentrifugenpräparat fand sich ein dichtes Zellbild welches neben lymphozytären Zellformen (zum Teil mit Aktivierungszeichen), Monozyten und Makrophagen auch zahlreiche neutrophile Granulozyten, sowie Siderophagen enthielt. Ferner fanden sich überproportional viele Zellen mit vakuolisiertem Zytoplasma, sowie Zytoplasma-Ausläufern, somit Zellen, welche bei der Zytozentrifugation zur Destruktion neigen. Die manuelle Differenzierung erbrachte 54% MN- und 46% PMN-Zellen. Die automatische Differenzierung mittels ADVIA 2120 erbrachte 93% MN- und 7% PMN-Zellen. In einer unabhängigen händischen Zählung wurden die Ergebnisse der manuellen Differenzierung bestätigt. Die diskrepanten Ergebnisse betreffend muss erwähnt werden, dass beim ADVIA 2120 die neutrophilen Granulozyten mit zwei unabhängigen Methoden, insbesondere auch der Referenzmethode (Peroxidase-Färbung) gezählt werden, sodass die automatische Zählung der PMN-Zellen als valide einzustufen wäre (i.e. es sind keine falsch negativen Ergebnisse zu erwarten), insbesondere auch, da eine ausreichende Anzahl an Zellen für die Zählung zur Verfügung stand. Eine Erklärung für die Diskrepanz könnte die Zytozentrifugenpräparatherstellung sein, bei der bekannt ist, dass vakuolisierte MN-Zellen oft nicht erhalten bleiben und somit für die Zählung verloren gehen.

Das Zytozentrifugenpräparat mit der Nummer 29 stammte von einem Patienten mit hochmalignem Non Hodgkin-Lymphom, bei dem die händische Zellzählung 16/3, die automatische Zählung 27/3 Zellen ergab. Im Zytozentrifugenpräparat fanden sich überwiegend lymphozytäre, zum Teil granuliert Zellformen, sowie lymphozytäre Zellen mit vakuolisiertem Zytoplasma. Daneben eine Blutbeimengung mit Monozyten und neutrophile Granulozyten. Die händische Differenzierung ergab 96% MN- und 4% PMN-Zellen, während bei der automatischen Zählung 59% MN- und 41% PMN-Zellen und vorlagen. Diese Diskrepanz kann nur durch die Blutkontamination mit der

Anwesenheit von im Zytozentrifugenpräparat an den Rand gedrängten neutrophilen Granulozyten erklärt werden.

Eine weitere Diskrepanz wurde beim Präparat mit der Nummer 40 beobachtet. Der Liquor dieses Patienten mit Verdacht auf Pneumokokken-Meningitis war deutlich trüb und gelb gefärbt. Das weiße Zellbild im Zytopräparat bestand hauptsächlich aus lymphozytären Zellelementen und aus neutrophilen Granulozyten mit Blutbeimengung. Auffallend waren zahlreiche kleine pyknotische Zellen, die morphologisch nicht beurteilt werden konnten. Die manuelle Zellzählung ergab eine Verteilung von 35% MN-Zellen und 65% PMN-Zellen, die automatische eine Verteilung von 77% MN-Zellen und 23% PMN-Zellen. Wegen der zahlreichen im Zytozentrifugenpräparat erkennbaren pyknotischen Zellen, war der Vergleich zwischen manueller und automatischer Differenzierung massiv eingeschränkt.

Im Zytopräparat mit der Nummer 45 handelte es sich um eine rosè gefärbte Liquorprobe mit Verdacht auf Subarachnoidalblutung bei der die manuelle Zellzählung 20/3, die automatische 99/3 Zellen ergab. In der manuellen Differenzierung fanden sich 71% MN-Zellen und 29% PMN-Zellen. Beim Advia 2120 fanden sich in der nativen (unverdünnten) Probe 38% MN-Zellen und 62% PMN-Zellen. Da in dieser Liquorprobe viel Blut enthalten war (Erythrozyten $> 1500/\mu\text{l}$), musste für die Messung der Liquor mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden. In der verdünnten Probe fanden sich im Scattergramm gut abgegrenzte Zellpopulationen mit einer Verteilung von 84% MN- und 16% PMN-Zellen, einem Ergebnis, welches mit der manuellen Differenzierung gut übereinstimmte. Entfernen. Zur Info: du hast die Differenzierung der unverdünnten Probe genommen!

Nach Ausschluss der vier Ausreißer wurde die Korrelation nur geringgradig verbessert. Die Zählung der Anteile an PMN- und MN-Zellen scheint von der Methode abhängig zu sein. Abweichungen sind daher nicht als allein vom vollkommenen Zufall abhängig zu sehen.

8.3. Vor- und Nachteile der manuellen Zellzählung

Die manuelle Zählmethode wird in vielen Laboratorien in der täglichen Praxis eingesetzt, da sie ohne großen finanziellen und logistischen Aufwand jederzeit durchgeführt werden kann. Sie ist jedoch sehr zeitaufwendig und erfordert den Einsatz von erfahrenem Laborpersonals. Bei der Zählung werden nur wenige Mikroliter Liquorflüssigkeit untersucht. Dies kann bei geringer Zellzahl zu falschen Ergebnissen führen. Ein weiterer Nachteil der manuellen Zählung ist die oft erschwerte Differenzierung von Erythrozyten und Leukozyten in der Zählkammer, insbesondere bei nicht frischen Liquorproben. Obwohl bei der Zählung mittels Färbelösungen die Erythrozyten lysiert werden, werden die Erythrozyten oft nur partiell lysiert. Ferner können diese quellen, wodurch die Differenzierung anhand der Zellgröße erschwert wird. Insbesondere ältere Erythrozyten neigen dazu die Farbstoffe aufzunehmen und nicht ihre Eigenfarbe zu zeigen. Somit handelt es sich bei der manuellen Zellzählung um eine wenig standardisierte Methode.

8.4. Vor- und Nachteile der Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten

Die Verwendung von Zentrifugen bei der Herstellung von Zytopräparaten hat den Vorteil, dass die Zelldifferenzierung in jedem Labor durchgeführt werden kann. Weiters können Zytopräparate mit verschiedenen Färbungen (z.B. Eisessig, 0,2%-ige Kristallviolettlösung oder Methylenblau) bearbeitet werden, sodass sämtliche Zellen (nicht nur Leukozyten) differenzierbar werden. Zu den Nachteilen zählen die aufwändige Arbeit und die Tatsache dass während der Präparatherstellung Zellen verloren gehen können, z.B. durch das Filterpapier. Eines der Kernprobleme jedoch stellt die oft stattfindende morphologische Veränderung der Zellen nach dem Zentrifugieren dar. Da das Liquormaterial sehr empfindlich gegenüber der Einwirkung von Licht, Wärme und Sauerstoff ist sind in Zytopräparaten oft nur Zellschatten oder -fragmente erkennbar.

Ein weiteres Problem stellt das menschliche Auge selbst dar. Da bestimmte Zellformen unterschiedlich interpretiert werden können, ist eine Beurteilung der Zellen oft subjektiv (Mahieu, 2004). Dieser „menschliche Faktor“ kann dazu führen, dass vor allem in Fällen mit geringen Zellzahlen große Variabilitäten, also eine mangelhafte Präzision bei der Befundung vorliegt (Kleine, 2010). All diese Nachteile haben Entwicklungen vorangetrieben, die Zelldifferenzierung zu automatisieren (De Smet, 2010).

Die Herstellung von Zytopräparaten und deren Differenzierung ist ferner teuer, da sie lange dauert und speziell ausgebildetes Personal benötigt (Kleine, 2010). Die lange Befunderstellungszeit, die etwa eine Stunde beträgt (Strik, 2005) belastet Budget und Zuweiser. Die deutlich längere Zeitspanne zwischen der Liquorpunktion und der tatsächlichen Diagnose stellt vor allem bei Verdacht auf akute Erkrankung einen schwerwiegenden Nachteil dieser Methode dar.

8.5. Vor- und Nachteile der automatisierten Zellzählung/-differenzierung

Ein Vorteil der automatisierten Zählgeräte gegenüber der manuellen Zählmethode liegt in der Tatsache, dass mit Hilfe eines Automaten wesentlich mehr Zellen standardisiert gezählt werden können. Darüber hinaus erfolgt die Messung rasch und weist eine exzellente Präzision auf. Da die automatisierte Zählung standardisiert ist, ist ein Vergleich zwischen Messungen verschiedener Laboratorien möglich. Weiters ist für die Bedienung des Gerätes kein Personal mit langjähriger Erfahrung notwendig. Desweiteren fällt bei der automatischen Zählung der subjektive Einfluss durch den Zählenden weg. Die Zellzahl mittels Automaten kann jedoch in Einzelfällen durch elektrisches Hintergrundrauschen oder durch Interferenzen (z.B. Blutkontamination) beeinflusst werden (de Graaf, 2011) und somit fälschlicherweise zu hoch ausfallen (Aune, 2004). Ferner können Automaten bei sehr niedriger Zellzahl manchmal nicht präzise messen (Pernè, 2012).

8.6. Ursachen für diskrepante Resultate bei der Zelldifferenzierung

Ein Grund für die Diskrepanz zwischen manueller und automatisierter Messmethode kann die Verteilung der Zellen im Zytopräparat sein. Durch interzelluläre Wechselwirkungen können vor allem in blutreichen Zytopräparaten Areale entstehen, in denen eine bestimmte Zellart vermehrt vorkommt. Im Rahmen der Tagesroutine können solche Stellen übersehen werden bzw. allein ausgewertet werden. Dies führt zur Verzerrung des Zählergebnisses. Im Zytopräparat mit dem Code 2012/30 waren u.a. die MN-Zellen während der Herstellung des Präparates durch die PMN-Zellen und die zahlreichen Erythrozyten stark an den Rand gedrängt. In dieser Probe ergab die manuelle Zählung zunächst 35% MN-Zellen und 65% PMN-Zellen. Dagegen fand sich mittels Advia 2120 eine Zellverteilung zugunsten der PMN-Zellen (77% PMN- und 23% MN-Zellen). Aufgrund dieser Diskrepanz wurde eine erneute, manuelle Differenzierung vorgenommen. Dieses zweite Ergebnis bestätigte die automatischen Messergebnisse.

In diesem Fall wird deutlich, wie sehr die manuelle Methode einerseits von technischen Faktoren (der Herstellung des Präparates) und andererseits von subjektiven Faktoren abhängig ist. Bei der Beurteilung eines Zytopräparates spielen zudem auch weitere Komponenten wie zum Beispiel die Qualität der Färbung, eine Blutbeimengung oder das Vorhandensein von Schmutzpartikel eine wichtige Rolle. Sie alle können das Messergebnis verfälschen.

8.7. Einschränkungen der vorliegenden Arbeit

Da für die statistischen Vergleichsanalysen der MN- bzw. PMN-Zellen nur 22 Fälle zur Verfügung standen wirkten sich Ausreißer bei der Berechnung der statistischen Kennzahlen stärker aus. Schloss man zum Beispiel die vier Ausreißer bei der Zelldifferenzierung aus, stieg die Kennzahl Kendalls-Tau b auf 0,714 an. Die Maßzahl Spearman-Rho hingegen reagierte weniger stark und lag mit 0,844 nur wenig höher als zuvor. Beide Ergebnisse wiesen jedoch statistische Signifikanz auf. Somit wurde bestätigt, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen den MN-Zellen des ADVIA 2120 und der manuellen Methode besteht, ein Zusammenhang, der aber auch bei Weglassen der größten Ausreißer nicht perfekt war. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses muss immer bedacht werden, dass beim Advia 2120 für die Zählung völlig andere Testprinzipien zum Einsatz kommen, als dies für die zeitaufwändige händische Methode der Fall ist. Insbesondere muss die mangelhafte Präzision und Reproduzierbarkeit der manuellen Methode betont werden. Die eingesetzte Methode scheint jedenfalls trotz guter Übereinstimmung einen wesentlichen Einfluss auf den Ergebnisvergleich zu haben. Die Abweichungen sind somit nicht nur auf den statistischen Zufall zurückzuführen.

9. Abschluss und Zusammenfassung

Die oben ausgeführten Nachteile der manuellen Messmethode haben dazu geführt, dass die Liquordiagnostik zunehmend automatisiert wurde. Im Gegensatz zur manuellen Methode erfolgt die Messung auf einem Automaten standardisiert und mit hoher Präzision. Da eine konstante Menge an Liquorflüssigkeit sämtliche in der Probe enthaltenen Zellen den Analysenkanälen zuführt, ermöglicht die automatische Messung eine komplette „vom Auge des Betrachters“ unabhängige Messung und Beurteilung der Zellen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass bei einer Zellzahl $>12/3$ die manuelle mit der automatischen Zellzahlbestimmung in Liquorproben ohne Blutkontamination und Zellresten beinahe 100% übereinstimmt. Bei Proben mit Blutbeimengung oder solchen, welche ältere, vulnerable Zellen enthalten kann der ADVIA 2120 höhere Zellzahlen aufweisen. Bei der Differenzierung zwischen PMN- und MN-Zellen ist die Übereinstimmung gut, wobei in 4 von 22 Fällen diskrepante Resultate vorlagen, welche in drei Fällen durch Blutbeimengung bzw. durch Verdrängung von Zellen im Zytozentrifugenpräparat erklärbar waren. In einem Fall mit diskrepanter Differenzierung der PMN- und MN-Zellen konnte die Diskrepanz durch die Destruktion vakuolisierter Zellen im Zuge der Zytozentrifugation erklärt werden.

Somit lässt sich abschließen, dass wegen der zahlreichen Vorteile einer automatisierten Analytik die Zellzählung und Differenzierung der Zellen mittels ADVIA 2120 für die Routinediagnostik in einem Lehrkrankenhaus geeignet ist. Da jedoch die automatisierte Analyse in Einzelfällen von der händischen Referenzmethode abweichen kann, muss bei jeder automatischen Differenzierung auch ein manuelles Zytopräparat angefertigt und befundet werden. Um Interferenzen bzw. falsch niedrigen Zellzahlen vorzubeugen, sollten die Liquorproben immer rasch, wenn möglich ohne artifizielle Blutbeimengung ins Laboratorium eingesandt werden.

Literaturverzeichnis

- Aulesa C., et al.*; Validation of the Coulter LH750 in a Hospital Reference Laboratory, 2003, Carden Jennings Publishing Co, Laboratory Hematology – Vol. 9: 15-28
- Aune M. W., et al.*; Automated Flow Cytometry Analysis of Blood Cells in Cerebrospinal Fluid, 2004, American Journal of Clinical Pathology – Vol. 121: 690-700
- Bähr M., Frotscher M.; Duus'* Neurologisch-topische Diagnostik, 2003, 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Deutschland
- Benninghoff A., Drenckhahn D.*; Anatomie, Band 2, 2004, 16. Auflage, Elsevier Urban & Fischer, München
- Böcker W., Denk H., Heitz P.U.*; Pathologie, 2001, 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München
- Boer K., et al.*; Evaluation of the XE-5000 for the Automated Analysis of Blood cells in Cerebrospinal Fluid, 2009, Elsevier Inc., Clinical Biochemistry – Vol. 42: 684-691
- Bortz J.*; Statistik, 2005, 6. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg
- Briggs C.*; Quality Counts: New Parameter in Blood Cell Counting, 2009, Blackwell Publishing Ltd, International Journal of Laboratory Hematology – Vol. 31: 277-297
- Bucher O., Wartenberg H.*; Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 1997, 12. Auflage, Verlag Hans Huber, Bern
- De Graaf M. T., et al.*; Flow Cytometric Characterization of Cerebrospinal Fluid Cells, 2011, Clinical Cytometry – Vol. 80B: 271-281
- De Smet D., et al.*; Use of the Cell-Dyn Sapphir Hematology Analyzer for Automated Counting of Blood Cells in Body Fluids, 2010, American Journal of clinical Pathology – Vol. 133: 291-299
- Dörner K.*; Taschenlehrbuch - Klinische Chemie und Hämatologie, 2009, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Deutschland
- Fanghänel J., Pera F., Anderhuber F., Nitsch R.*; Waldeyer Anatomie des Menschen, 2009, 18. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin
- Firbas W., Gruber H., Mayr R.*; Neuroanatomie, 1995, 2. Auflage, Verlag Wilhelm Maudrich, Wien
- Glaser L., et al.*; The Clinical Reliability of Automated Cerebrospinal Fluid Cell Counts on the Beckman-Coulter LH750 and Iris iQ200, 2009, American Journal of clinical Pathology – Vol. 131: 58-63
- Hallbach J.*; Klinische Chemie und Hämatologie, 2011, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Deutschland
- Hoffmann J.J.M.L., Janssen W.C.M.*; Automated Counting of Cells in Cerebrospinal Fluid Using the CellDyn-4000 Haematology Analyser, 2002, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Vol. 40(11): 1168-1173
- Inoue H.*; Overview of Automated Hematology Analyzer XE-2100, 1999, Systex Journal International – Vol. 1: 58-64
- Kleine T. O., et al.*; Evaluation of Cell Counting and Leukocyte Differentiation in Cerebrospinal Fluid Controls Using Hematology Analyzers by the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2010, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine – Vol. 6: 839-848

- Kosanke W.*; Liquor-Methode am ADVIA 2120i, 2120, 120 - Hämatologische Fortbildung, 2010, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Wien
- Lehner J., et al.*; Automation in Hematology, 2007, Transfusion Medicine and Hemotherapy – Vol. 34: 328-339
- Mahieu S., et al.*; Evaluation of ADVIA 120 CSF assay (Bayer) vs. Chamber Counting of cerebrospinal fluid specimens, 2004, Clinical Laboratory Hematology – Vol. 26: 195-199
- Nguyen D., Diamond L. W., Braylan R. C.*; Flow Cytometry in Hematopathology – A Visual Approach to Data Analysis and Interpretation, 2003, 1. Auflage, Humana Press Inc., New Jersey, USA
- Passing H.*; A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods, 1983, Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry – Vol. 21: 709-720
- Perné A., et al.*; Performance Evaluation of the Sysmex XE-5000 Hematology Analyzer for White Blood Cell Analysis in Cerebrospinal Fluid, 2012, Arch Pathol Lab Med – Vol. 136: 194-198
- Rudolf M., Kuhlisch W.*; Biostatistik: Eine Einführung für Biowissenschaftler, 2008, 1. Auflage, Pearson Studium
- Rhyner M. N.*; The Coulter Principle for Analysis of Subvisible Particles in Protein Formulations, 2011, American Association of Pharmaceutical Scientists Journal – Vol. 13: 54-58
- Sandhaus L. M., et al.*; Automated Cerebrospinal Fluid Cell Counts Using the Sysmex XE-5000, 2010, American Journal of clinical Pathology – Vol. 134: 734-738
- Shelat S. G., et al.*; differences in Detecting Blasts Between Advia 2120 and Beckman-Coulter LH750 Hematology Analyzer, 2010, Blackwell Publishing Ltd, International Journal of Laboratory Hematology – Vol. 32: 113-116
- Strik H., et al.*; Automated Cerebrospinal Fluid Cytology: Limitations and Reasonable Applications, 2005, Analytical and Quantitative Cytology and Histology – Vol. 27: 167-173
- Van Acker J. T., et al.*; Automated Flow Cytometric Analysis of Cerebrospinal Fluid, 2001, Clinical Chemistry: 556-560
- Wachtler F.*; Histologie – Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 2005, 7. Auflage, Facultas Universitätsverlag, Wien
- Wildemann B., Oschmann P., Reiber H.*; Neurologische Labordiagnostik, 2006, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Deutschland
- Zettl U. K., Lehmitz R., Mix E.*; Klinische Labordiagnostik, 2005, 2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin
- Ziebig R., et al.*; Leukocyte Counts in Cerebrospinal Fluid with the Automated Hematology Analyzer CellDyn 3500 and the Urine Flow Cytometer UF-100, 2000, Clinical Chemistry – Vol. 46: 242-247
- Zimmermann M., et al.*; Automated vs. Manual Cerebrospinal Fluid Cell Count: A Work and Cost Analysis Comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal Manual Counting Chamber, 2011, Blackwell Publishing Ltd, International Journal of Laboratory Hematology – Vol. 33: 629-637
- www.beckmancoulter.com
- www.celeromics.com, Celeromics, Grenoble (France), Research and Development office Valencia Technology Park (Spain), Produzent von automatisierten Systemen für Zellzählung

www.sysmex.de, Liquor: ein Material mit besonderen Ansprüchen, Sysmex Xtra 2/2009, Sysmex Deutschland GmbH, Bornbarch 1, 22848 Norderstedt

www.zaehlkammer.de, LO – Laboroptik GmbH, Industriestraße 16, 61381, Friedrichsdorf, Deutschland

http://www.med4you.at/laborbefunde/lbef_zellzahl_liquor.htm, Hübl W., Zellzahl in der Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit (=Liquor cerebrospinalis) - Übersicht

DANKSAGUNG

Für die Unterstützung bei meiner Diplomarbeit möchte ich folgenden Personen und Institutionen herzlich danken:

Meiner Betreuerin Prim. Univ. Doz. Dr. Manuela Födinger, die mich mit viel Einsatz und Begeisterung unterstützt hat.

Dem gesamten Team der biomedizinischen Analytikerinnen des Bereiches Hämatologie und im besonderen Herrn Mag. Dr. Robert Fritsche-Polanz für die Unterstützung bei der Erfassung und Befundung von Liquorproben.

Ich möchte Herrn Prim. Univ. Prof. Dr. Wolfgang Grisold und dem Team der neurologischen Ambulanz danken. Hier besonders Frau MMag. Dr. Elisabeth Hofstätter und Frau Dr. Sabine Urbanits, MSc. für die Bereitstellung der Zytozentrifugationspräparate und für die Unterstützung bei der Zellzählung.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prim. Univ. Prof. Dr. Martin Klimpfinger und seinem Team für die Unterstützung beim Fotografieren der Zytopräparate bedanken.

Meiner Ehefrau, die immer für mich da war und an mich in schwierigen Stunden geglaubt hat. Meiner Schwester, die für mich immer ein offenes Ohr gefunden hat.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön gehört an dieser Stelle meinen Eltern. Vieles wäre ohne ihre Hilfe und ununterbrochene Unterstützung nicht möglich gewesen.

ANHANG

ABSTRACT

In der vorliegenden Arbeit wurde eine manuelle Referenzmethode für die Zählung und Differenzierung der Leukozyten in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) mit einer automatisierten Methode verglichen. Insgesamt wurden 74 Liquorproben untersucht. Die manuelle Zellzählung wurde in der Fuchs-Rosenthal Zählkammer durchgeführt. Die manuelle Differenzierung der Leukozyten in mononukleäre (MN) und polymorphkernige (PMN) Zellen erfolgte anhand von Zytozentrifugenpräparaten bei Liquorproben mit einer Zellzahl $> 12/3$ (> 4 Zellen/ μl). Für die automatisierte Zellzählung/Zelldifferenzierung wurde der Hämatologie-Automaten ADVIA 2120 eingesetzt. Unter 74 Liquorproben fanden sich 11 blutige und 3 überalterte Liquores. Bei 22 Proben fand sich in der händischen Zellzählung eine Zellzahl $> 12/3$. Die manuelle und automatisierte Zellzählung in allen 74 Liquorproben zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,796$. Nach Ausschluss blutiger/alter Liquorproben betrug die mittlere Zellzahl mit der manuellen Methode 20,4 Zellen/ μl , jene mit dem Automaten 20,9 Zellen/ μl bei einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,884$. Die manuelle und automatische Differenzierung der Zellen zeigte eine gute Korrelation mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,633 und 0,819. In vier Fällen wurden Abweichungen bei der Differenzierung beobachtet. Diese Abweichungen waren vor allem durch Blutbeimengungen, durch die unregelmäßige Verteilung von Zellen im Zytozentrifugenpräparat sowie durch morphologische Veränderungen der Zellen im Zuge der manuellen Präparatherstellung verursacht. Die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen der manuellen und der automatisierten Methode ermöglicht es, die Zellzählung und die Zelldifferenzierung in der CSF zu automatisieren, mit dem Vorteil rascher präzisere Ergebnisse zu übermitteln. Aus jeder Liquorprobe muss jedoch auch ein manuelles Zytozentrifugenpräparat angefertigt werden, da in Einzelfällen die automatische von der manuellen Differenzierung divergieren kann.

Abstract

In the present study we compared a manual reference-method for counting and differentiating white blood cells (WBC) in cerebrospinal fluid (CSF) with an automated method. A total of 74 CSF samples were investigated. Manual cell counting was performed in a Fuchs-Rosenthal counting chamber. Manual differentiation of leucocytes into mononuclear (MN) and polymorphonuclear cells (PMN) was accomplished using cytopsin preparations of CSF samples with a manual cell count above $12/3$ (> 4 cells/ μl). For automated cell counting/cell differentiation the hematology analyzer ADVIA 2120 was used. Among 74 CSF samples 11 samples contained bloody and 3 samples represented older material. In 22 samples manual cell counting revealed a cell count above $12/3$. Manual and automated cell counting showed very good agreement with a correlation coefficient $r = 0,796$. Following exclusion of blood/old CSF samples the mean manual cell count was 20,4 cells/ μl and the mean automated cell count was 20,9 cells/ μl with a correlation coefficient of $r = 0,884$. The manual and automated differentiation of cells showed a good correlation with correlation coefficients ranging between 0,633 and 0,819. In four cases discrepant results were obtained by differentiation. These discrepancies were mainly due to blood, inhomogeneous spreading of cells on cytopsin, or morphologic alteration of cells during cytopsin preparation. The high concordance of the results obtained by the manual and the automated method enables automation of cell counting/cell differentiation in CSF samples with the advantage of a quicker provision of precise results. Cytopsin preparations are mandatory for each CSF sample because manual and automated differentiation may show discrepancies.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Eran Margan
Adresse: Satzingerweg 10/5/12
A-1210; Wien
Geburtsdatum: 27.05.1974
Geburtsort: Ramat-Gan; Israel
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: verheiratet
Kinder: Tochter Liara, geboren 12.10.2012

Schulbildung:

1986-1989 Hauptschule in Herzlia (Israel)
1989-1990 Gymnasium in Herzlia (Israel)
1990-1995 Realistischer Schulzweig des BORG III, Kundmannngasse in Wien 1030
Abschluss der Matura 1995

Höhere Bildung:

1995/96 – 2007 Studium der Medizin der Universität Wien:
1. Studienabschnitt: Abschluss im Juni 2001
2. Studienabschnittes: 2001 - 2007

Seit 2007 Biologiestudium an der Universität Wien, Department Anthropologie