

Aus dem
Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. P. Wernet

**Einfluß automatisierter Zählmethoden
auf die Charakterisierung von Nabel-
schnurbluttransplantaten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Johannes Fischer

2001

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gez.:

Univ.- Prof. Dr. med Dieter Häussinger
Dekan

Referent: Prof Dr. med Peter Wernet

Korreferent: Univ.-Prof Dr. med U. Göbel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Cord Blood Transplantation	8
1.2	Zellzahl	9
1.3	Zellzahlbestimmungsmethoden bei Neugeborenen	10
1.4	Zählverfahren	10
1.4.1	Impedanzmessung	10
1.4.2	Optische Messung	11
1.5	Analyse von Neugeborenem- und Nabelschnurblut	11
1.6	Zielsetzung	12
2	Methodik	14
2.1	Gewinnung der Nabelschnurblutzellen	14
2.2	Volumenreduktion und Kryokonservierung	14
2.3	Kryokonservierung als Vollblut	15
2.4	Probengewinnung	15
2.5	Zahl der Zellzählungen	16
2.6	Zellzählverfahren	16
2.6.1	Abott Cell Dyn CD 3500	16
2.6.2	Zählung kernhaltiger Zellen mittels rein impedanzbasiertem Partikelzähler	18
2.6.3	Manuelle Zählung der kernhaltigen Zellen mittels Kammerzählung	20
2.6.4	Manuelle Differentialblutbilderstellung	20
2.7	Statistik	20
3	Ergebnisse	22
3.1	Untersuchungsmaterial	22
3.2	Manuelle Differenzierung	23
3.2.1	Vollblut	23
3.2.2	Volumenreduzierte Präparate	23
3.2.3	Einfluss der Volumenreduktion auf die manuell ermittelten Differentialblutbildparameter	24
3.3	Leukozytenzählung und Differenzierung mittels Coulter ACT	26
3.3.1	Proben vor Volumenreduktion	26
3.3.2	Volumenreduzierte Präparate	27
3.3.2.1	Einfluß der Vorverdünnung	27
3.3.2.2	Einfluss der Volumenreduktion auf die maschinell ermittelten relativen Differentialblutbildparameter bei Messung mit Coulter ACT	29
3.4	Differenzierung Cell Dyn 3500	30
3.4.1	Werte vor Volumenreduktion	30
3.4.2	Volumenreduzierte Präparate	32
3.4.2.1	Einfluss der Probenvorbereitung auf das Meßergebnis	32
3.4.2.2	Einfluss der Volumenreduktion auf die maschinell ermittelten Differentialblutbildparameter	42

3.5	Vergleich der manuellen Differenzierung mit der maschinellen Differenzierung mittels CD3500	45
3.5.1	Differenzierung aus nicht volumenreduziertem Nabelschnurblut	45
3.5.2	Volumenreduzierte Nabelschnurblutpräparate	49
3.6	Vergleich der maschinellen Differenzierung mittels Coulter ACT und Cell Dyn 3500..	52
3.7	Manuelle Leukozytenzählung.....	54
3.8	Einfluß des Geburtsweges auf die Zusammensetzung des Nabelschnurblutes.....	56
3.9	Einfluß des Geschlechtes auf die Zusammensetzung des Nabelschnurblutes	58
3.10	Zellzahlbestimmung aus kryokonservierten Proben.....	60
3.11	Wiederfindungsrate der einzelnen Blutbestandteile nach Volumenreduktion.....	64
4	<i>Diskussion</i>.....	69
4.1	Impedanzmessung.....	70
4.2	Optische Messung.....	71
4.3	Vergleich Optische - und Impedanz – basierte Messung am Abott Cell Dyn 3500	71
4.4	Messbereiche.....	73
4.5	Messung aufgetauter Proben mittels Cell Dyn 3500.....	75
4.6	Differenzierung.....	76
4.7	Einfluss des Geburtsmodus auf Leukozyten und Normoblastenkonzentration	79
4.8	Änderung der Zusammensetzung von Nabelschnurblutpräparaten durch Volumenreduktion	81
4.8.1	Methoden der Volumenreduktion	81
4.8.2	Anreicherung von Normoblasten durch Dichtegradientenzentrifugation	82
4.8.3	Anreicherung der kernhaltigen Erythrozyten durch Volumenreduktion in Nabelschnurblutpräparaten.....	82
4.8.4	Änderung der Zusammensetzung der Leukozyten in Nabelschnurblutpräparaten durch Volumenreduktion	83
5	<i>Zusammenfassung</i>	84
6	<i>Literatur</i>.....	86
7	<i>Lebenslauf</i>	94
	<i>Abstract „Einfluß automatisierter Zählmethoden auf die Charakterisierung von Nabelschnurbluttransplantaten“</i>	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Optischer Kanal des Abott Cell Dyn 3500: durchflusszytometrische Leukozytenzählung und –Differenzierung	17
Abbildung 2-2 Impedanzgesteuerte Leukozytenzählung (Coulter ACT, Cell Dyn 3500 Impedanzkanal)	19
Abbildung 3-1 Veränderung des relativen mononukleären - und Neutrophilen- Anteiles durch Hespan® Volumenreduktion, ermittelt durch manuelle Differenzierung (n=128)	25
Abbildung 3-2 Absoluter und relativer Anstieg der Normoblastenkonzentration je 100 WBC durch Volumenreduktion (manuelle Differenzierung, n=128)	26
Abbildung 3-3 Korrelation zwischen nukleären Zellen (NC) und Leukozyten (WBC) in nicht volumenreduziertem Cord Blood (n=2214)	32
Abbildung 3-4 Median der Übereinstimmung zwischen unverdünnter und verdünnter Probe bei der Plättchenmessung	39
Abbildung 3-5 Bereich der Übereinstimmung zwischen Bestimmung der Leukozytenkonzentration aus unverdünnter und verdünnter Probe (n = 1001) nach Volumenreduktion	41
Abbildung 3-6 NRBC vor und nach Volumenreduktion (n=1464)	44
Abbildung 3-7 Relativer (Vielfacher) Anstieg der absoluten NRBC Konzentration durch Hespan® Volumenreduktion (n=1464)	44
Abbildung 3-8 Korrelation zwischen NC bestimmt aus manuellen Differentialblutbild und optischer Leukozytenzählung (CD3500) sowie NC aus Impedanzmessung (CD3500)	48
Abbildung 3-9 Vergleich der WBC und MNC Zählung durch Coulter ACT und Abott Cell Dyn 3500 zur CB Qualitätskontrolle	54
Abbildung 3-10 Korrelation zwischen manuell und mittels Cell Dyn 3500 ermittelter Leukozytenkonzentration aus nicht volumenreduzierten Präparaten.	56
Abbildung 3-11 Streulichtdiagramme von frischem und aufgetautem Nabelschnurblut (Abott Cell Dyn 3500)	61
Abbildung 3-12 Korrelation zwischen Zellzahl im Kryooliqout und Zellzahl vor Zugabe des Kryoprotektanz aus <u>nicht</u> volumenreduzierten Präparaten (n=187)	62
Abbildung 3-13 Korrelation zwischen Zellzahl im Kryooliqout und Zellzahl vor Zugabe des Kryoprotektanz in volumenreduzierten Präparaten (n=33)	62
Abbildung 3-14 Wiederfindungsrate für WBC, MNC und NRBC nach Hespan® Volumenreduktion (n=1464).	66
Abbildung 3-15 Verteilung der Wiederfindungsrate durch Volumenreduktion (n=1464)	67
Abbildung 3-16 Wiederfindungsrate der WBC in Abhängigkeit von der Erfahrung des Präparationsteams	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1 Zahl der Bestimmungen Nukleärer Zell- (Nucleated Cell (NC)) und Leukozyten (White Blood Cell (WBC)) Konzentrationen in plazentarem Nabelschnurblut vor und nach Hespan® Volumenreduktion	22
Tabelle 3-2 Ergebnisse der manuelle Differenzierung von Cord Blood vor der Weiterverarbeitung (n=137)	23
Tabelle 3-3 Ergebnisse der manuelle Differenzierung von Cord Blood nach Hespan®-Volumenreduktion (n=130)	24
Tabelle 3-4 Absolute Differenz der prozentualen Zellkonzentration vor und nach Hespan® Volumenreduktion von Neutrophilen, mononukleären Zellen und Normoblasten (manuelle Differenzierung, n=130)	25
Tabelle 3-5 Leukozytenkonzentration im Cord Blood vor Volumenreduktion bei Bestimmung mittels Coulter ACT (n=77)	26
Tabelle 3-6 Leukozytenzahl (WBC) und –Differenzierung (MNC), Erythrozytenzahl (RBC) und Hämoglobinbestimmung (Hb) mittels Coulter ACT aus unverdünnten und verdünnten gemessenen Proben nach Volumenreduktion (n=77)	29
Tabelle 3-7 Veränderung der relativen mononukleären Zellkonzentration durch Hespan® - Volumenreduktion bei Messung mittels Coulter ACT (n=72)	30
Tabelle 3-8 Relativer Anstieg der absoluten Zellkonzentrationen durch Hespan® - Volumenreduktion bei Messung mittels Coulter ACT (n=72)	30
Tabelle 3-9 Ermittlung von Blutbild und Differentialblutbildparameter aus Nabelschnurblutpräparaten vor Volumenreduktion durch Cell Dyn 3500 (n=2214)	31
Tabelle 3-10 Blutbild und Differentialblutbild nach Volumenreduktion, mittels Abott Cell Dyn 3500 aus unverdünnter Probe gemessen (n=1651)	33
Tabelle 3-11 Blutbild und Differentialblutbild nach Volumenreduktion, mittels Abott Cell Dyn 3500 aus 1:2 verdünnter Probe gemessen (n=1142)	33
Tabelle 3-12 Einfluß der Verdünnung auf die Differenzierung von Mononukleären Zellen und Granulozyten nach Volumenreduktion bei Messung durch Cell Dyn 3500 (n=1079)	34
Tabelle 3-13 Einfluß der Verdünnung auf die Differenzierung von Lymphozyten und Monozyten nach Volumenreduktion bei Messung durch Cell Dyn 3500 (n=1079)	35
Tabelle 3-14 Abhängigkeit der Abweichung durch Verdünnung von der Zellkonzentration für nukleäre und weiße Zellen sowie Plättchen (n=963)	38
Tabelle 3-15 Abhängigkeit der Abweichung durch Verdünnung von der Zellkonzentration für das rote Blutbild (n=963)	38
Tabelle 3-16 Abhängigkeit des Differentialblutbildes (DiffBB) durch Verdünnung von der Zellkonzentration	39
Tabelle 3-17 Relation bzw. Vielfache der Veränderung der Blutbildparameter (Absolutkonzentrationen) durch Volumenreduktion (n=1001)	42
Tabelle 3-18 Relation bzw. Vielfache der Veränderung der Blutbildparameter (Relative Konzentrationen) durch Volumenreduktion (n=963)	43
Tabelle 3-19 Manuelle Differenzierung der in den Vergleich maschinelle vs. elektronische Differenzierung eingegangenen Proben (n=127)	46
Tabelle 3-20 Maschinelle Differenzierung (CD3500) der in den Vergleich maschinelle vs. elektronische Differenzierung eingegangenen Proben (n=127)	46
Tabelle 3-21 Differenz zwischen manueller [%] und maschineller (Cell Dyn 3500) [%] Differenzierung (n=127)	47
Tabelle 3-22 Verhältnis (Ratio) und Korrelationen zwischen manuell und maschinell (Cell Dyn 3500) erhobenen Differentialblutparametern (n=127)	47
Tabelle 3-23 Ergebnisse manueller Differenzierung von volumenreduzierten Nabelschnurblutpräparaten (n=130)	50
Tabelle 3-24 Ergebnisse der maschinellen Differenzierung von volumenreduzierten Nabelschnurblutpräparaten mittels Abott Cell Dyn 3500 (n=130)	50
Tabelle 3-25 Korrelationen zwischen manueller und elektronischer Differenzierung mittels Cell Dyn 3500 von volumenreduzierten Nabelschnurblutpräparaten (n=130)	51
Tabelle 3-26 Absolute und relative Abweichungen zwischen Impedanzmessung Cell Dyn 3500 und Impedanzmessung Coulter ACT (n=77).	53
Tabelle 3-27 Vergleich der Differenzierung Coulter ACT und Cell Dyn 3500 (n=77)	53
Tabelle 3-28 Vergleich der Kammerzählung mit Abott CD3500 aus nicht volumenreduzierten Proben (n=37)	55
Tabelle 3-29 Vergleich Kammerzählung mit Abott CD3500 aus nicht volumenreduzierten aufgetauten Proben (n=11)	55

<i>Tabelle 3-30 vor Volumenreduktion: Einfluss des Geburtsverhaltens auf die Zusammensetzung des CB</i>	57
<i>Tabelle 3-31 Einfluss Geschlecht des Kindes auf CB</i>	58
<i>Tabelle 3-32 Einfluß des Geschlechtes des Spenders auf den Zellgehalt in volumenreduzierten CB</i>	59
<i>Tabelle 3-33 Gesamtzahl kernhaltiger Erythrozyten (NRBC)) vor Aufarbeitung in Abhängigkeit vom Geschlecht und Entbindungsart [10^8/Transplantat]</i>	60
<i>Tabelle 3-34 Gesamtzahl kernhaltiger Erythrozyten (NRBC) im volumenreduzierten Präparat in Abhängigkeit vom Geschlecht des Kindes und der Entbindungsart [10^8/Transplantat]</i>	60
<i>Tabelle 3-35 Differenz und Verhältnis der Messung aus Qualitätskontrolle vor Kryokonservierung und zugehörigem aufgetauten Kryooliquout bei nicht volumenreduziert kryokonserviertem Nabelschnurblut (n=187)</i>	63
<i>Tabelle 3-36 Differenz und Verhältnis der Messung aus Qualitätskontrolle vor Kryokonservierung und zugehörigem aufgetauten Kryooliquout bei volumenreduziertem Nabelschnurblut (n=33)</i>	63
<i>Tabelle 3-37 Zellgehalte vor Volumenreduktion je Präparat, bestimmt mittels Cell Dyn 3500 (n=2176)</i>	65
<i>Tabelle 3-38 Zellgehalte nach Volumenreduktion je Präparat, bestimmt durch Cell Dyn 3500 (n=1464)</i>	65
<i>Tabelle 3-39 Wiederfindungsrate (Recovery) der Zellen nach Volumenreduktion (n=1464)</i>	66

1 Einleitung

1.1 *Cord Blood Transplantation*

Die Transplantation hämatopoetischer Vorläufer- und Stammzellen aus Nabelschnurblut kann die Funktion von Knochenmark sowohl in verwandten wie unverwandten Empfängern rekonstituieren (Gluckman, et al. 1989; Kurtzberg, et al. 1996). Patienten ohne passenden verwandten Knochenmarkspender bietet die Transplantation von Nabelschnurblut zahlreiche Vorteile. So ist Nabelschnurblut leichter zu gewinnen als Knochenmark oder periphere Stammzellen, läßt sich einfacher rekrutieren; die Gewinnung von plazentarem Nabelschnurblut ist risikolos für die Gebärende und den neugeborenen Spender, die Wahrscheinlichkeit der Übertragung klinisch bedeutsamer Erkrankungen wie Zytomegalie- oder Epstein-Barr-Viruserkrankungen ist geringer als bei Verwendung von hämatopoetischen Stammzellen Erwachsener und die Wahrscheinlichkeit einer schweren Transplantat - gegen - Wirt Erkrankung (Graft versus Host Disease, GVHD) ist ebenso vermindert verglichen mit einer unverwandten Knochenmarktransplantation. Das reduzierte GVHD - Risiko erlaubt es, Nabelschnurblut mit wesentlich geringerer HLA Übereinstimmung als bei der Knochenmarktransplantation üblich zu verwenden. Gerade Empfänger mit seltenem HLA Muster profitieren davon, daß ihnen CB Transplantate zur Verfügung stehen. Wachsende klinische Erfahrung und anhaltende Erfolge der Nabelschnurbluttransplantationen gehen Hand in Hand mit einer ständig steigenden Zahl zur Verfügung stehender gut charakterisierter und kryokonservierter allogener Nabelschnurbluttransplantate.

Das steigende Interesse an der Nabelschnurbluttransplantation ihrerseits wiederum steigert den Qualitätsanspruch an die kryokonservierten Transplantate und deren Charakterisierung einerseits, sowie einen schonenden Umgang mit den zur Verfügung stehenden materiellen Ressourcen für die Herstellung und Lagerung der kryokonservierten Transplantate andererseits. Um die Lagerung zu vereinfachen, werden die Transplantate zunehmend vor Kryokonservierung volumenreduziert (Rubinstein et al. 1995; Kögler et al. 1998; Rubinstein et al. 1998). Hierbei kommen überwiegend Sedimentationstechniken zum Einsatz, welche ermöglichen sollen, weitgehend alle Leukozyten des gewonnenen primären plazentaren Nabelschnurblutes auch als Transplantat zu kryokonservieren.

Unabhängig von einer Volumenreduktion jedoch ist ein wesentliches Qualitätsmerkmal der Transplantate die tatsächlich zur Verfügung stehende transplantierbare Leukozytenzahl, die transplantierbare Zellmenge (Graft Cell Dose).

1.2 Zellzahl

Bis 1998 wurden weltweit mehr als 600 Nabelschnurbluttransplantationen durchgeführt. Breit angelegte retrospektive Analysen dieser Transplantationen konnten nachweisen, daß die Zahl der infundierten nukleären Zellen je Kilogramm Körpergewicht der wesentliche Faktor für den Zeitpunkt des Anwachsens bzw. des Anstieges der Neutrophilen und der Plättchen im peripheren Blut nach Transplantation ist.

Der Leukozytengehalt des Transplantates beeinflusst somit primär die Geschwindigkeit und den Gesamterfolg des Engraftments. Folglich wird sekundär durch einen hohen Leukozytengehalt über ein schnelles Engraftment die Wahrscheinlichkeit für transplantationsassoziierte Ereignisse gemindert und das Ereignis -freie Überleben gesteigert, vor allem bei Patienten, die dem Kleinkindalter entwachsen sind. Für die Transplantation sind daher diejenigen Nabelschnurbluttransplantate zu bevorzugen, die einen hohen Leukozytengehalt aufweisen. Daher müssen Nabelschnurblutbanken besonderes Augenmerk auf die richtige Bestimmung der weißen Blutzellzahl (Leukozytenzahl) lenken. Jedoch ist die Bestimmung der Leukozytenzahl bisher noch nicht standardisiert. Eine Ursache hat die fehlende Standardisierung in der schwierigeren Bestimmung der Blutbildparameter aus Blutproben Neugeborener im Vergleich zur Messung der Proben von Erwachsenen. Die Interpretation der Ergebnisse automatisierter Leukozytenzahlbestimmung ist erschwert durch die deutlichen Änderungen während der ersten Stunden des Lebens. Mehrere Faktoren erschweren bei und nach der automatisierten Blutbilderstellung aus neonatalen Proben die Messung und Interpretation der Ergebnisse: die Proben weisen hohe Zellzahlen und eine hohe Viskosität auf, Blutproben von Neugeborenen können rote Blutkörperchen enthalten, welche eine höhere osmotische Resistenz aufweisen als normale Erythrozyten und das Blut Neugeborener weist oft eine hohe Zahl von Normoblasten auf.

So wird durch die erhöhte Viskosität im Nabelschnurblut und im Blut des Neugeborenen die Messung erschwert, die lyseresistenten Erythrozyten und insbesondere die kernhaltigen Erythrozyten beeinflussen die ermittelte Leukozytenzahl.

Im plazentaren Nabelschnurblut enthalten nur die Leukozyten hämatopoetische Vorläuferzellen, die zum Transplantationserfolg beitragen können, nicht jedoch die genannten lyseresistenten Erythrozyten oder die kernhaltigen roten Blutkörperchen.

1.3 Zellzahlbestimmungsmethoden bei Neugeborenen

Alle elektronischen Blutpartikelzähler müssen die Erythrozyten lysieren, um ihren Einfluß auf die Leukozytenzählung und Differenzierung auszuschließen. Die Anwesenheit lyseresistenter Erythrozyten beeinflusst die durch die Messung erhobenen Leukozytenparameter. Die einfachste Methode, den Einfluß dieser Erythrozyten auf die Leukozytenzählung zu eliminieren, ist es, entweder ein aggressiveres Lyseagens zu verwenden oder die Erythrozytenlysezeit zu verlängern. Beide Möglichkeiten werden in semiautomatischen Blutzellzählern verwendet, bei denen einzelne manuelle Schritte variiert werden können. Bei voll automatisierten Systemen gibt es normalerweise keine Möglichkeit, eine korrekte Zellzahl und ein Differentialblutbild aus Proben zu erstellen, welche diese lyseresistenten Erythrozyten enthalten.

Noch schwieriger ist es für voll automatisierte elektronische Blutpartikelzähler, kernhaltige Erythrozyten von Leukozyten zu unterscheiden, abhängig vom benutzten Zählverfahren des Analysegerätes.

1.4 Zählverfahren

Die derzeit gängigen elektronischen Blutpartikelzähler benutzen zwei unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der Leukozytenzahl: einerseits Impedanz basierte Methoden, andererseits optische Meßmethoden. Einige wenige Blutzellzähler benutzen auch Kombinationen dieser Methoden.

1.4.1 Impedanzmessung

Die Impedanzmessung beruht auf einer Widerstandsmessung (Coulter Prinzip). Zwischen zwei Platten wird eine elektrische Spannung erzeugt, beide Platten befinden sich im Flüssigkeitsstrom, der die zu messende aufbereitete Probe enthält. In einer der beiden Platten befindet sich eine Öffnung, durch die der Flüssigkeitsstrom tritt. Tritt nun ein korpuskuläres Teilchen durch die Öffnung, ändert sich der Widerstand und damit die anliegende Spannung auf der Lochplatte. Das Ausmaß der Spannungsänderung ist abhängig von der Größe des Körperchens: je größer das gemessene Teilchen ist, desto größer ist die Impedanzänderung. Zur

Messung von Leukozyten werden die Erythrozyten mit einem Detergenz lysiert. Gleichzeitig wird durch das Detergenz den nukleären Zellen das Zytoplasma entzogen. Die nur noch von der Zellmembran umgebenden Kerne werden als Leukozyt gemessen und können, je nach Kerngröße als Lymphozyten -, Monozyten – oder Granulozyten- ähnlich charakterisiert werden. Kernhaltige Erythrozyten werden als Lymphozyten - ähnliche Leukozyten analysiert, während gegen eine osmotische Lyse- resistente Erythrozyten durch das Detergenz lysiert werden können und die Leukozytenzählung nicht beeinflussen.

1.4.2 Optische Messung

Optische Meßmethoden beruhen überwiegend auf einem durchflußzytometrischen Prinzip. Meist nach hydrodynamischer Fokussierung werden die Zellen aufgrund ihrer Lichtbrechungseigenschaften charakterisiert, welche – ähnlich der durchflußzytometrischen Analyse - über die Größe, die Granularität und weitere Zellparameter wie Komplexität des Kernes Auskunft geben. Um Leukozyten zählen und analysieren zu können, müssen die Erythrozyten lysiert werden, ohne daß die Leukozyten wesentlich in ihren Lichtstreu - Eigenschaften beeinflußt werden. Hierzu wird eine osmotische Lyse eingesetzt. Die Leukozyten werden nun durch ihre Lichtstreu - Eigenschaften charakterisiert und von Nicht - Leukozyten unterschieden. Lyseresistente Erythrozyten können das Meßergebnis verfälschen, da sie ähnliche Lichtstreu - Eigenschaften aufweisen wie Lymphozyten. Die Quantifizierung und Differenzierung erfolgt durch geeignete Software, welche die Signale der verschiedenen Streulicht aufnehmenden Photoverstärker analysieren.

Einige Geräte benutzen zusätzlich Färbungen, um die Leukozyten zu charakterisieren und weiter zu differenzieren. Diese Messung der gefärbten Zellen erfolgt entweder direkt oder nachgeschaltet, je nachdem ob die Leukozytenzahl primär über eine Impedanzmessung oder durch optische Messung bestimmt worden ist.

1.5 Analyse von Neugeborenem- und Nabelschnurblut

Die Arbeiten von Oski und Naiman waren lange die Grundlage für verwendete Normalwerte des Neugeborenen oder Nabelschnurblut (Oski und Naimann 1966; Oski und Naiman 1982). Die meisten ihrer Daten beruhten auf manuellen Messungen. Automatisierte Zytometer wurden vorwiegend zur Zählung von Proben von Erwachsenen entwickelt, und sie funktionieren nicht zufriedenstellend bei perinatalen Blutproben (Catherine et al. 1987). Grund hierfür sind

die schon erwähnten Probleme durch die teilweise hohe Viskosität und Zellkonzentration in perinatalen Blutproben (Johannessen et al. 1990), die häufig hohe Zahl von Normoblasten (Oski und Naimann 1966), sowie die teilweise anzutreffenden neonatalen osmotisch resistenteren Erythrozyten (Serrani et al. 1989). Als weiteres Problem kommt das nur geringe für die Analyse zur Verfügung stehende Probenvolumen bei neonatalen Blutproben hinzu.

Obwohl in den letzten Jahren deutliche Fortschritte bei der automatischen Blutzellzählung erreicht worden sind (Gulati et al. 1992), und diese Weiterentwicklungen zu einer erhöhten Reabilität einiger automatischer Blutzellzähler bei Proben von Neugeborenen führten (Dörner et al. 1995), ist die Problematik der Messung neonataler Blutproben erst in wenigen Arbeiten berücksichtigt worden (Dörner et al. 1995; Walka et al. 1998). Aufgrund manueller Auswertungen finden sich, wenn nur kleine Proben plazentaren Nabelschnurblutes gewonnen werden, $8,6 \pm 10,3$ kernhaltige Erythrozyten je 100 Leukozyten (Hanion-Lundberg et al. 1997). Jedoch lassen sich bei gesunden Neugeborenen in bis zu 1% der Fälle mehr als 100 Normoblasten je 100 Leukozyten nachweisen (Hanion-Lundberg et al. 1997).

Nicht untersucht ist bisher die Zahl nukleärer roter Blutkörperchen bei Gewinnung größerer Volumen plazentarer Nabelschnurblutproben, wie das durch die Gewinnung von Cord Blood Transplantaten der Fall ist. Ebenso ist nicht untersucht, in wie weit die Volumenreduktion einen Einfluß auf die Zusammensetzung der Leukozyten in Cord Blood Transplantaten hat.

Da die Normoblasten nicht zur transplantierbaren Zellmenge gezählt werden können, die infundierte Leukozytenzahl aber entscheidend für den Erfolg der Nabelschnurbluttransplantation ist, ist die Bestimmung von deren Gehalt in Nabelschnurblutpräparaten von entscheidender Bedeutung für die Auswahl der Transplantate.

1.6 Zielsetzung

Da Zytometer die Zellzahl unterschiedlich bestimmen, ist ein Vergleich der Reabilität der Aussage durch verschiedene Messverfahren essentiell. Es gibt eine Reihe von Publikationen über die Messung von Erwachsenen Blut, (Bentley et al. 1993), aber nur wenige über perinatale Proben (Dörner et al. 1995), und zum Zeitpunkt des Beginns dieser prospektiven Verlaufsuntersuchung keine über plazentares Nabelschnurblut. So ist es unklar, welchen Einfluß verschiedene automatisierte Zellzählmethoden auf die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung in Nabelschnurbluttransplantaten haben.

Desweiteren ist unklar, inwieweit eine Volumenreduktion die Zusammensetzung der kernhaltigen Zellen im Nabelschnurblut beeinflusst.

In dieser prospektiven Studie wurden daher mittels verschiedener automatisierter Meßmethoden bei über 2000 Cord Blood Transplantaten das komplette Blutbild mit verschiedenen Zellzahlmessmethoden erstellt, gleichzeitig bei über 1400 daraus gewonnenen volumenreduzierten Stammzellkonzentraten ebenso die Blutbildparameter bestimmt. Bei einigen der kryokonservierten Stammzellpräparate wurde aus einem Kryoaliqout ebenso die Blutbildparameter bestimmt.

Zusätzlich erfolgte eine Validierung der maschinellen Differenzierung durch das Blutbildmessgerät durch manuelle Differenzierung.

Besonderes Augenmerk wurde auf die Zahl der nukleären roten Blutkörperchen in den entsprechenden Präparaten gelegt.

2 Methodik

2.1 Gewinnung der Nabelschnurblutzellen.

Von April 1997 bis Juli 1999 wurden 2192 und zwischen November und Dezember 1999 im Rahmen weiterer Zellzählgerätevalidierungen 179 plazentare Nabelschnurblut - Transplantate an der NETCORD Bank Düsseldorf gesammelt, analysiert und kryokonserviert. Jedes Transplantat wurde innerhalb von 36 Stunden nach der Geburt prozessiert, kryokonserviert und anschließend im flüssigen Stickstoff gelagert. Innerhalb dieser 36h erfolgten auch die primären Qualitätskontrollen, wie z.B. die Bestimmung der Zellzahlen.

Die Nabelschnurblutzellen wurden durch Punktion der Nabelschnurvene entweder mit der Plazenta ex utero nach Sectio oder mit der Plazenta in utero nach vaginaler Geburt, nachdem die Nabelschnur abgeklemmt worden ist, gewonnen (Kögler et al. 1996).

Als Antikoagulanzen wurde ACDA benutzt. Die Sammlung erfolgte in einen MSE 2204D 300 ml Beutel, in denen 21 ml ACDA vorgelegt war (Macopharm, Deutschland). Zusätzlich konnte aus einem zusätzlichen Reservoir ACDA zugeben werden, um die Entnahmeleitung spülen zu können. Die Entnahme erfolgte unter sterilen Kautelen. Bei Entnahme ex utero wurde die Plazenta in einem Trichter überführt, die Nabelschnur durch die Öffnung des Trichters geführt. Danach erfolgte die Punktion der Nabelschnurvene.

2.2 Volumenreduktion und Kryokonservierung

1446 der bis Juli 1999 gewonnenen 2192 Transplantaten und alle 179 im November und Dezember 1999 untersuchten Transplantate wurden vor dem Einfrieren volumenreduziert. Die Volumenreduktion wurde gemäß eines Protokolls von P. Rubinstein et al. durchgeführt (Rubinstein et al. 1995), mit der Modifikation, daß zu geeigneten Zeitpunkten eine Reihe von Aliquots für Qualitätskontrolle und Rückstellproben gewonnen wurden (Kögler et al. 1998). Die Anreicherung basiert auf dem Prinzip der Gewinnung eines leukozytenreichen Überstandes in einem ersten Zentrifugationsschritt, welcher durch einen zweiten Zentrifugationsschritt eingeengt wird.

Vor dem ersten Zentrifugationsschritt wird zur Unterstützung der Erythrozytensedimentation Hydroxyethylstärke (Hetastarch/ 6% Hespan®, Fresenius, FRG) dem Präparat zugegeben.

Hiermit wird eine Rouleauxformierung der Erythrozyten erreicht. Nach fünf - minütiger Zentrifugation mit 400 g bei 10°C (Auslauf mit leichter Bremse) kann der leukozytenreiche Überstand abgenommen werden, welcher die einzufrierenden Leukozyten enthält. Dieser Überstand wird durch eine zweite Zentrifugation weiter eingeeengt, so daß das Endpräparat entweder mit 21ml, 24ml oder 2x 21ml Volumen eingefroren werden kann. Nach Abnahme der für die Qualitätskontrolle notwendigen entsprechenden Aliquots (Kögler et al. 1998) erfolgt die Kryokonservierung zusammen mit Kryoaliquots unter kontrollierten Einfrierbedingungen (1-2°K/min) nach Zugabe von DMSO (Sigma – Aldrich bzw. Wak Chemie Medical GmbH, Deutschland) und Dextran (Thomaedex 40%, Delta Pharma GmbH. FRG) in einer Endkonzentration von 10% DMSO, 6% Dextran in Cryocyte Einfrierbeutel (50 mL, Artikel Nr. 4R9951, Fa. Baxter. Deutschland).

2.3 Kryokonservierung als Vollblut

728 der untersuchten 2192 Nabelschnurblutpräparate wurden unsepariert als Vollblut eingefroren. Hierzu wurden nach Abnahme der entsprechenden für die Qualitätskontrolle vorgesehenen Aliquots die Präparate mit einer Endkonzentration von RPMI 1640 39 Volumenprozent (Vol%) (ICN Biomedicals, Deutschland), DMSO 10 Vol% (Wak Chemie Medical GmbH, Deutschland) und 1%vol Humanalbumin 20% (Reg.Nr. 822, Fa. Centeon, Deutschland) in Cryocyte Einfrierbeutel 100 mL (Artikel Nr. 4R9955 , Fa. Baxter, Deutschland) kontrolliert zusammen mit Kryoaliquots eingefroren (-1 bis -2K°/min) und in flüssigem Stickstoff gelagert (Kögler et al. 1996).

2.4 Probengewinnung

Zur Zellzählung wurde aus allen zur Kryokonservierung vorgesehenen Transplantaten eine Probe vor allen weiteren Verarbeitungsschritten in ein Eppendorfhütchen entnommen. Aus den volumenreduzierten Präparaten wurde unmittelbar vor der Zugabe des Kryoprotektanz eine Probe entnommen und 1:1 verdünnt mit PBS (139 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mMNa₂HPO₄x 7H₂O, 1,48 mM KH₂PO₄).

Kryoaliquots wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut. Nach dem Flüssigwerden wurden diese Proben auf Eis gelagert und unmittelbar die Zellzahl bestimmt.

2.5 Zahl der Zellzählungen

Bei allen zuvor beschriebenen CB-Einheiten wurde innerhalb von 36h nach der Geburt die Zellzahl mittels eines CD3500 vor der weiteren Verarbeitung bestimmt. Zusätzlich wurde aus allen volumenreduzierten CB- Einheiten die Zellzahl unmittelbar vor der Zugabe des Kryoprotektanz bestimmt.

Bei 33 der Einheiten, welche als Vollblut eingefroren worden waren, wurde vor Zugabe des Kryoprotektanz die Zahl kernhaltiger Zellen manuell bestimmt.

Bei 77 Einheiten, welche nach Volumenreduktion kryokonserviert wurden, wurden alle Zählungen, die mit dem CD3500 durchgeführt wurden, zusätzlich mit einem Coulter ACT wiederholt.

Zur Qualitätskontrolle des Einfriervorganges wurde aus aufgetauten Kryoaliquots, welche zusammen mit den Ausgangspräparaten eingefroren wurden, die Zellzahl, die Vitalität und die Kolonien bildende Zellzahl bestimmt. Hiervon wurde in der vorliegenden Arbeit das Augenmerk auf die Zellzahl gelenkt..

Hierzu wurden von 187 als Vollblut eingefrorenen Transplantaten und aus 33 volumenreduzierten Transplantaten die Zellzahl aus Kryoaliquots, welche gleichzeitig mit den Transplantaten im gleichen Einfriervorgang eingefroren wurden, bestimmt.

Zusätzlich wurden 11 dieser Präparate in der Kammer gezählt.

Bei 130 Volumenreduzierten Präparaten wurde zusätzlich zur elektronischen Differenzierung manuell das Differentialblutbild aus dem Ausgangsmaterial und dem volumenreduzierten Präparat aus der 1:2 Verdünnung bestimmt, aus 7 Präparaten nur vor Volumenreduktion.

2.6 Zellzählverfahren

2.6.1 Abott Cell Dyn CD 3500

Alle Proben wurden mittels eines Cell Dyn 3500 ® (Abott Diagnostics, Wiesbaden - Delkheim) gemessen.

Der Cell Dyn 3500 mißt die Leukozytenkonzentration mittels zweier voneinander unabhängigen Verfahren, eine optische - und eine Impedanzmessung. Beide Verfahren bzw. Kanäle arbeiten mit unterschiedlichen Erythrozytenlysereagenzien. Daher geben diese beiden Kanäle

auch unterschiedliche Werte für Proben mit nukleären Zellen bzw. mit Lyse-resistenten Erythrozyten.

Das Zählgerät wurde über einen 10h Plan betrieben. Benutzte Softwareversionen waren 1.35 und 1.4.

Der Cell Dyn 3500 führt im optischen Kanal, welcher eine hydrodynamische Fokussierung beinhaltet eine Laserstreulicht geführte Zählung und Differenzierung der Leukozyten durch (White blood cell Optical Count, WOC). Die in Suspension befindlichen Zellen werden über die Öffnung einer Kapillare innerhalb eines Mantelstromes einzeln an einem laseroptischen System vorbeigeführt. Wenn eine Zelle das laseroptische System durchtritt, wird je nach Beschaffenheit der Zelle Licht reflektiert, abgelenkt oder gestreut. Die generierten Lichtimpulse werden photometrisch in Stromimpulse umgewandelt. In fünf Richtungen wird das Streu-, Ablenk- und Reflektionslicht von jeder das Laseroptische System passierende Zelle erfasst. Aufgrund der hydrodynamischen Fokussierung können alle Streulichtparameter gleichzeitig von jeder einzelnen Zelle bestimmt und damit jede einzelne Zelle charakterisiert werden. Die Häufigkeit dieser Impulse ist abhängig von der Zellzahl.

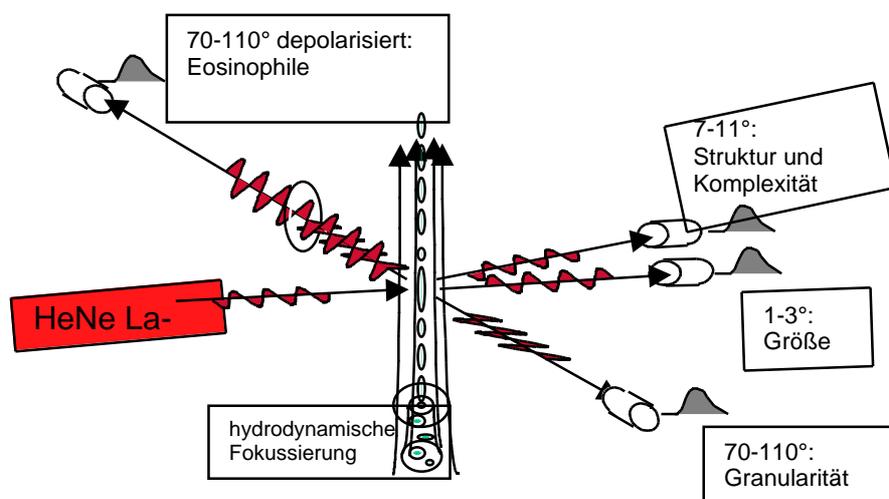


Abbildung 2-1 Optischer Kanal des Abbott Cell Dyn 3500: durchflusszytometrische Leukozytenzählung und -Differenzierung

Nach hypotoner Erythrozytenlyse und hydrodynamischer Fokussierung erfolgt die Charakterisierung und Quantifizierung der Leukozyten aufgrund ihrer Streulichteigenschaften. Die Zählung im optischen Kanal wird als **White Blood Cell Optical Count (WOC)** bezeichnet.

Gleichzeitig beinhaltet das Cell Dyn 3500 einen Impedanzkanal zur Leukozytenzahlbestimmung, welcher als Bestätigungskanal benutzt wird für die optische Messung (**W**hite blood cell **I**mpedance **C**ount, WIC). Die Funktion des Impedanzkanals wird im folgenden Kapitel beschrieben (siehe Kapitel 2.6.2). Das im Impedanzkanal verwendete Lyseereagenz basiert auf Detergentien und ist aggressiver gegenüber Erythrozyten als das im optischen Kanal verwendete, welches eine hypotone Erythrozytenlyse durchführt und eher leukoprotektiv ist. Nicht lysierte Erythrozyten führen zu höheren Werten im optischen Kanal aufgrund ihrer lymphozytenähnlichen Lichtstreuungseigenschaften. Kernhaltige als WBC gezählte Erythrozyten führen im Impedanzkanal zu höheren Werten als im optischen Kanal, da sie dort als kleine Kerne durch dynamische Schwellenwertsetzung sicher von den Leukozyten getrennt werden können. Unterschiedlichen Ergebnissen der beiden Zählungen werden vom Gerät als Alarm erkannt. Neben dem Standardverfahren „normal mode“ bietet das Gerät ein Verfahren, welches die Lysezeit im optischen Kanal um 15s verlängert („extended lysis“ bzw. „resistant RBC“), in welchem die resistenten Erythrozyten lysiert werden können, ohne daß die Leukozytenzahl wesentlich beeinflusst wird (Dörner et al. 1995). Durch die verlängerte Lyse zerfallenden Leukozyten werden durch Unterschiede zwischen der Zählrate am Anfang und am Ende der Messung erkannt.

Tägliche interne Qualitätskontrolle wurde gemäß den Herstelleranweisungen und den Richtlinien der Bundesärztekammer durchgeführt.

Proben wurden akzeptiert, wenn folgende Bedingungen erfüllt waren: WIC größer gleich WOC, konstante Zählrate, komplette Aspiration.

Mittels der Impedanzmethode werden Erythrozyten gezählt und deren Volumen bestimmt, die Hämoglobinkonzentration mittels Zyanfärbung, Thrombozyten ebenfalls mittels Impedanzmessung.

2.6.2 Zählung kernhaltiger Zellen mittels rein impedanzbasiertem Partikelzähler

Die Zahl kernhaltiger Zellen wurde mit einem rein impedanzbasierten Partikelzähler Coulter ACT (Beckmann/ Coulter Diagnostika, Krefeld/ Lausanne Schweiz) bestimmt.

Bevor die Leukozyten gezählt werden, wird die Probe mit einem Detergenz lysiert. Dies führt einerseits zur Lyse aller Erythrozyten, andererseits zu einem Entzug des Plasmaanteils der kernhaltigen Zellen. Während der Leukozytenmessung werden in einer Impedanzkammer die

Kerne mit umgebender Zellmembran gezählt und ihr Volumen bestimmt. In der Impedanzkammer werden die zu zählenden Partikel in Suspension über eine Öffnung einer Kapillare, an deren beiden Seiten Anode und Kathode gelegen sind, angesaugt. Ein elektrischer Strom ist angelegt. Wenn ein Partikel durch die Kapillare fließt, resultiert ein augenblicklicher Abfall der Leitfähigkeit mit konsekutivem Auftreten eines Spannungspeaks, da der zelluläre Partikel ein schlechterer Leiter als die umgebende Verdünnungslösung ist. Die Größe des Spannungspeakes ist abhängig von der Zellgröße und Zellform, die Häufigkeit seines Auftretens von der Zellzahl. Aufgrund des Kernvolumens wird das Differentialblutbild bestimmt: Zellen mit niedrigem Kernvolumen werden als lymphozytäre Zellen gezählt, Zellen mit relativ zu den anderen Zellpopulationen mittlerem Kerngehalt als monozytäre Zellen und Zellen mit hohem Kernvolumen als granulozytäre Zellen. Das Gerät weist insbesondere eine hohe Verarbeitungsgeschwindigkeit auf und ist als sehr wartungsarmes Gerät konstruiert.

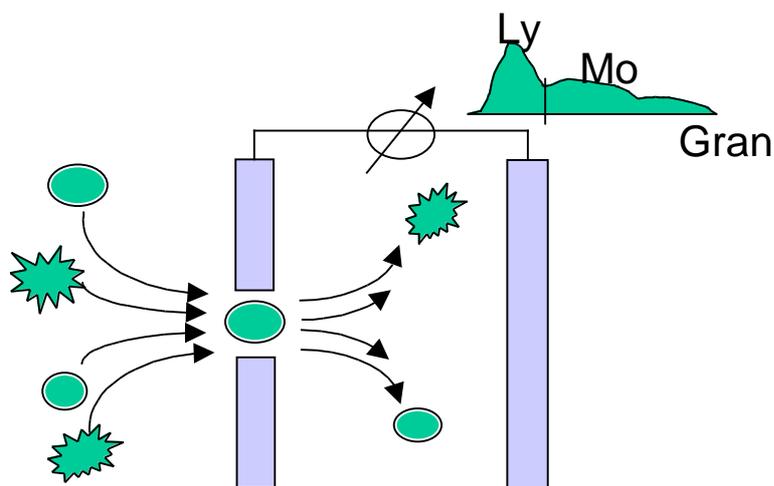


Abbildung 2-2 Impedanzgesteuerte Leukozytenzählung (Coulter ACT, Cell Dyn 3500 Impedanzkanal)

Nach Erythrozytenlyse und Zytoplasmadepletion der Leukozyten fließen die Zellen durch eine Lochplatte zwischen zwei unter Spannung stehenden Elektroden. Durch den Durchfluß der Zellen ergibt sich eine Impedanzänderung, welche proportional zur Größe der Zelle ist.

Erythrozyten werden mittels der Impedanzmethode gezählt und deren Volumen bestimmt, Hämoglobinkonzentration mit Zyanfärbung, Thrombozyten ebenfalls mittels Impedanzmessung.

2.6.3 Manuelle Zählung der kernhaltigen Zellen mittels Kammerzählung

Nach Erythrozytenlyse mit 3%iger Essigsäure für 5 min wurden die verbleibenden Kerne mit Krystallviolett (TÜRKS Lösung) gefärbt. 10 µl der Blutprobe wurden mit 190 µl Türckschen Lösung versetzt und in eine Neubauerkammer gebracht. Nach Sedimentation in einer feuchten Kammer wurden 4 Großquadrate unter 25 facher Vergrößerung ausgezählt.

2.6.4 Manuelle Differentialblutbilderstellung

Aus den zur Zellzählung vorgesehenen Vollblut- und volumenreduzierten Proben wurden Ausstriche angefertigt und luftgetrocknet. Die Färbung erfolgte mit Eosin - Methylenblaufärbung nach Wright. Anschließend erfolgte eine mikroskopische Differenzierung (unter Ölimersion) von 100 Leukozyten gemäß Internationalem Standard (NCCLS 1992).

2.7 Statistik

Wenn nicht anders angegeben, wurde das Wahrscheinlichkeitsniveau auf der Basis einer zweiseitigen Fragestellung untersucht. Als signifikant wurde ein Unterschied dann eingestuft, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ war. Nicht signifikant wird im Text als n.s. abgekürzt.

Intraindividuelle Veränderungen wurden mittels des paarigen Student t-Test auf ihr Wahrscheinlichkeitsniveau hin untersucht.

Differenzen zwischen Meßmethoden bzw. Untersuchungsgruppen wurden bei normalverteilten Proben mittels t-Test bzw. mittels paarigen t-Test bei verknüpften Proben (z.B. vor/ nach Volumenkonzentration) bestimmt. Je nach Varianzen wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen bei Verwendung des unpaarigen Student t-Test mit der Annahme gleicher bzw. ungleicher Varianzen geprüft. Bei normalverteilten Proben erfolgte zur Charakterisierung der Gruppenkenngröße bzw. der Messwerte die Angabe des Mittelwertes mit zugehöriger Standardabweichung. Bei nicht normalverteilten Stichproben wurden zur Prüfung von Unterschieden entweder die Meßdaten in eine Normalverteilung überführt und mittels t-Test untersucht bzw. der Mann-Whitney U Test angewendet. Bei nicht normalverteilten Meßdaten bzw. Kenngrößen erfolgte zur Charakterisierung der Gruppenmerkmale, wenn nicht anders angegeben die Angabe des Medians mit dem unteren Quantil 15,865% und dem oberen Quantil

84,135%, welche bei Normalverteilung dem Wert von Mittelwert – Standardabweichung bzw. Mittelwert + Standardabweichung entsprechen.

Ob ein Regressionskoeffizient von 0 deutlich verschieden ist, wurde über den F-Test auf den Regressionskoeffizienten geprüft. Dabei stellt bei Regressionen die Irrtumswahrscheinlichkeit $p_{\text{einseitiger t-Test auf X}}$ die Wahrscheinlichkeit dar, mit der der untersuchte Parameter x überhaupt als Prognoseparameter verwendet werden kann. p einseitiger t-Test a. r gibt die Wahrscheinlichkeit des zugehörigen Regressionskoeffizienten r der Gleichung $y = a x + b$ wieder.

Zum Vergleich von zwei unterschiedlichen Meßmethoden, bei denen nicht der wahre Wert im vornherein bekannt ist, wurde die Übereinstimmung bzw. Nichtübereinstimmung oder der Grad des Unterschiedes bestimmt (Bland und Altman 1986). Diese Methode entscheidet nicht, welche der beiden zu vergleichenden Methoden präziser ist, jedoch gibt sie an mit welchem Unterschied bzw. Differenz beide Meßmethoden untereinander austauschbar sind.

Für jeden Parameter wurde die Regression zwischen den beiden jeweils zu vergleichenden Methoden erhoben. Wenn sie signifikant ist (s.o.), wird der Mittelwert aus beiden Bestimmungen unterschiedlicher Methode und die Differenz aus den beiden gewonnenen Parametern für jede Probe ermittelt. Der Median der Differenzen ergibt dann den Maßstab für den Unterschied zwischen den beiden Bestimmungsmethoden. Bei normalverteiltem Ausgangsmaterial wird der Mittelwert benutzt. Der Vertrauensbereich beider Methoden wird bestimmt als der Bereich, in dem 95% der Differenzen zu liegen kommen (Bland und Altman 1986). Je kleiner der Vertrauensbereich ist, um so besser ist die Übereinstimmung der verschiedenen Bestimmungsmethoden. Das 95% Konfidenzintervall für den Median berechnet sich als $X(h) \leq \text{Median} \leq (X_{n-h+1})$ mit $h = (n - t(n)^{0.5})/2$ und $h =$ Rangnummer, $n =$ Fallzahl sowie $t =$ Quantil der t Verteilung. Wenn das Konfidenzintervall für den Median der Abweichung null beinhaltet, ist ein systematischer Fehler zwischen den Analysemethoden unwahrscheinlich.

Signifikanzniveaus wurden mit GBSTAT für PowerMac Vers. 6.5 (Dynamic Microsystems, Inc, Silver Spring, MD, USA) bzw. STAT VIEW für PowerMac Vers 5.01 8SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungsmaterial

Ziel dieser Untersuchung ist es, einerseits den Gehalt und Verteilung kernhaltiger Zellen in für Transplantationszwecke gewonnenen Nabelschnurblut vor und nach Weiterverarbeitung wie Volumenreduktion und Kryokonservierung zu bestimmen, andererseits die grundsätzlich unterschiedlichen Methoden zur Zellzahlbestimmung zu evaluieren.

Gleichzeitig soll diese Untersuchung ermöglichen, Normwerte für Leukozyten, kernhaltige Erythrozyten und andere korpuskuläre Bestandteile im Nabelschnurblut zu bestimmen. Hierzu wurden insgesamt 2371 zur Weiterverarbeitung vorgesehene Nabelschnurblutpräparate auf ihre jeweiligen Zellgehalte untersucht. Von diesen Präparaten wurden 1643 volumenreduziert, die restlichen als Vollblut kryokonserviert. Die Präparate wurden zwischen Januar 1997 und Dezember 1999 gewonnen.

	Unprozessiert	Volumenreduziert
WBC (optische Messung) [G/l]	10,9 ±3,6	35,1 ±16,0
MNC [G/l]	4,4 ±1,4	13,7 ±5,8
NC (Impedanzmessung) [G/l]	12,5 ±4,1	41,7 ±19,0
n	2371	1643
Volumen vor Volumenreduktion (inklusive ACDA) [ml]	98,3 ±21,23	97,67 ±21,18
Volumen nach Volumenreduktion [ml]		21; 24; 2 x 21
Zahl der Kryokonservate je verarbeiteter Einheit	1,71 ±0,78	1,69 ±0,78
Männliche Spender	1285	868
Weibliche Spender	1086	775
Gewinnung nach vaginaler Geburt	2208	1535
Gewinnung nach Kaiserschnitt	163	108

Tabelle 3-1 Zahl der Bestimmungen Nukleärer Zell- (Nucleated Cell (NC)) und Leukozyten (White Blood Cell (WBC)) Konzentrationen in plazentarem Nabelschnurblut vor und nach Hespan® Volumenreduktion

Alle aufgeführten Zellzählungen wurden mittels eines Cell Dyn 3500 durchgeführt. Die WBC wurden nach verlängerter Erythrozytenlysezeit durch optische Messung identifiziert, die NC wurden durch das Ergebnis der Impedanzmessung quantifiziert.

728 der untersuchten 2371 CB Einheiten wurden ohne weitere Volumenreduktion kryokonserviert (Volumen vor Zugabe des Kryoprotektanz 91,1 ± 21,3ml; gelagert in 1,71 ± 0,78 Kryokonservaten).

3.2 Manuelle Differenzierung

3.2.1 Vollblut

Vor Volumenreduktion finden sich mittels manueller Differenzierung bei 137 ausgezählten Differentialblutbildern im Mittel 0,4% Myeloblasten; 0,3% Promyelozyten; 0,5% Myelozyten; 2,8% Metamyelozyten; 4,6% Stabkernige; 46,8% Segmentkernige; insgesamt $55,3 \pm 9,54\%$ Neutrophile; 2,3% Eosinophile; 0,5% Basophile; $3,2 \pm 2,23\%$ Monozyten; 1,8% atypische Lymphozyten; 1,7% Lymphozyten als Reizform; 38,4% typische Lymphozyten; insgesamt $39 \pm 9,61\%$ Lymphozyten; $7,3 \pm 8,15\%$ Erythro-/ Normoblasten auf 100 Leukozyten. Eine Zusammenfassung findet sich in folgender Tabelle.

	Neutrophile [%]	Eosinophile [%]	Basophile [%]	Mononukleäre Zellen [%]	Normoblasten je 100 Leukozyten
Mittelwert \pm SD	55,3 \pm 9,54	2,31 \pm 2,13	0,49 \pm 0,76	41,8 \pm 9,28	7,25 \pm 8,15
Quantil 2,5%	46	0	0	32	2
Median	56	2	0	41	5
Quantil 97,5%	65	4	1	51	11,6

Tabelle 3-2 Ergebnisse der manuelle Differenzierung von Cord Blood vor der Weiterverarbeitung (n=137)

Die relativen Konzentrationen für Segmentkernige und Mononukleäre Zellen sind normalverteilt, die relative Konzentration von Normoblasten (NRBC) modal.

3.2.2 Volumenreduzierte Präparate

Nach Volumenreduktion finden sich mittels manueller Differenzierung bei 130 auszählbaren Differentialblutbildern im Mittel 0,7% Myeloblasten; 0,4% Promyelozyten; 0,8% Myelozyten; 3% Metamyelozyten; 4,6% Stabkernige; 52,3% Segmentkernige; insgesamt $60,1 \pm 14,6\%$ Neutrophile; 2,7% Eosinophile; 0,5% Basophile; $3,3 \pm 2,3\%$ Monozyten; 0,7% atypische Lymphozyten; 1,1% Lymphozyten als Reizform; 32,5% typische Lymphozyten; insgesamt $33,6 \pm 14,4\%$ Lymphozyten; $15,4 \pm 16,9\%$ Erythro-/ Normoblasten auf 100 Leukozyten. 7 Differentialbutbilder waren aufgrund von Färbemängeln nicht auswertbar. Eine Zusammenfassung findet sich in folgender Tabelle 3-3.

	Neutrophile [%]	Eosinophile [%]	Basophile [%]	Mononukleäre Zellen [%]	Normoblasten je 100 Leukozyten
Mittelwert ± SD	60,1±14,6	2,73±2,55	0,49±1,05	36,7±14,3	15,4±16,9
Quantil 2,5%	46	1	0	24	3
Median	61	2	0	36	9
Quantil 97,5%	73	5	1	49,1	29,7

Tabelle 3-3 Ergebnisse der manuelle Differenzierung von Cord Blood nach Hespan®-Volumenreduktion (n=130)

Die relativen Konzentrationen für Segmentkernige und Mononukleäre Zellen sind normalverteilt, die relative Konzentration der Normoblasten modal.

3.2.3 Einfluss der Volumenreduktion auf die manuell ermittelten Differentialblutbildparameter

Werden die Werte von 130 Präparationen vor und nach Hespan® Volumenreduktion verglichen, wird durch die Volumenreduktion die relative Konzentration von Normoblasten ($p \ll 0,0001$) und Neutrophilen ($p=0,0009$) gesteigert, von Lymphozyten ($p=0,0001$) und Eosinophilen ($p=0,024$) gesenkt. Nicht signifikant verändert werden die Konzentrationen von Monozyten und Basophilen.

Im einzelnen findet sich nach Hespan® Volumenreduktion im Präparat im Vergleich zum Wert vor der Prozedur im Median

- eine deutliche Anreicherung der Normoblasten von 5 auf 9 je 100 WBC um das 1,77 Fache (Bereich 0 bis 40 Fache; siehe Tabelle 3-4). Insbesondere bei niedrigen Ausgangskonzentrationen an Normoblasten findet sich ein deutlicherer Anstieg im volumenreduzierten Präparat als bei hohen Normoblasten - Ausgangskonzentrationen. In 4/5 aller Präparationen erfolgt eine Anreicherung der relativen NRBC Konzentration.
- eine Anreicherung des Neutrophilenanteils mit einem Anstieg von 56% auf 61% um das 1,10 Fache (Bereich 0,1 bis 1,85 Fache), insbesondere bei niedrigeren Ausgangskonzentrationen (siehe Abbildung 3-1).
- Eine Verminderung des mononukleären Zellanteils auf das 0,88 Fache (Bereich 0,15 bis 3,59 Fach) mit keiner deutlichen Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration der mononukleären Zellen. Größten Anteil an der Verminderung der Mononukleärenfraktion haben

die Lymphozyten mit einer Verminderung ihres Anteils auf das 0,84 Fache, wobei bei 30% aller Präparationen der Lymphozytenanteil steigt.

	Anstieg der Neutrophilen	Anstieg der mononukleären Zellen	Anstieg der Normoblasten je 100 Leukozyten	relativer Normoblastenanstieg
Mittelwert ± SD	4,50±14,95	-4,83±15,07	6,86±10,17	2,56±3,90
Bereich	-66,23 bis 40	-41 bis 64,26	-7 bis 61	0 bis 40
Quantil 15,8%	-8	-17,86	-0,43	0,84
Median	5	-5	4	1,77
Quantil 84,1%	18	6,93	16,70	3,64

Tabelle 3-4 Absolute Differenz der prozentualen Zellkonzentration vor und nach Hespan® Volumenreduktion von Neutrophilen, mononukleären Zellen und Normoblasten (manuelle Differenzierung, n=130)

Die Änderungen der relativen Konzentrationen sind signifikant. Die ermittelten Werte ergeben sich unter Berücksichtigung der einzelnen jeweiligen Anstiege.

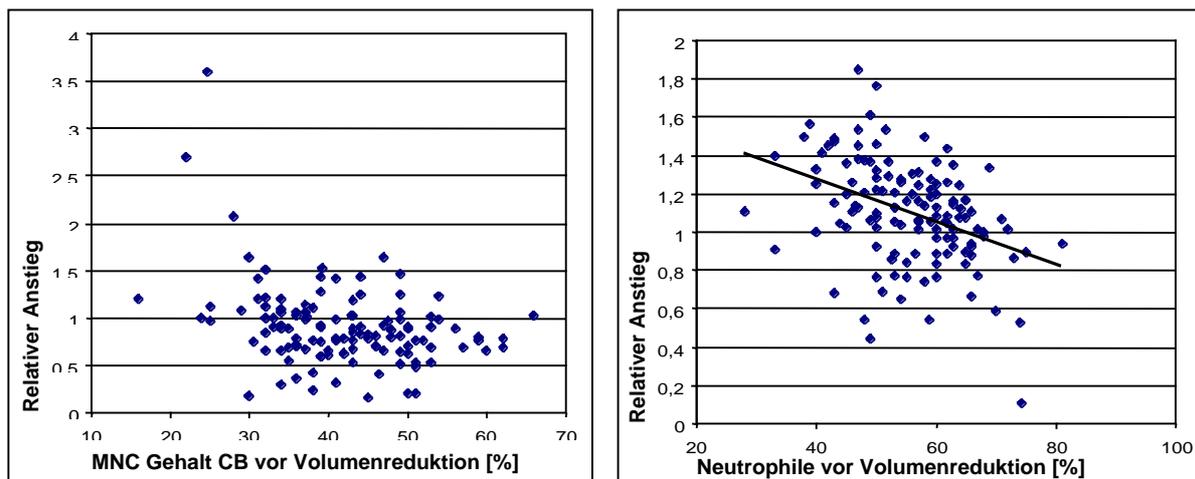


Abbildung 3-1 Veränderung des relativen mononukleären - und Neutrophilen- Anteiles durch Hespan® Volumenreduktion, ermittelt durch manuelle Differenzierung (n=128)

Zur Auswertung kamen nur diejenigen Proben, bei denen sowohl vor als auch nach Volumenreduktion das manuelle Differentialblutbild bestimmt worden war. Der relative Anstieg errechnet sich aus Mononukleären- bzw. Neutrophilengehalt [%] vor Volumenreduktion/ Gehalt nach Volumenreduktion. Diese Relation korreliert bei den Neutrophilen signifikant negativ mit dem Anteil an Neutrophilen vor Volumenreduktion.

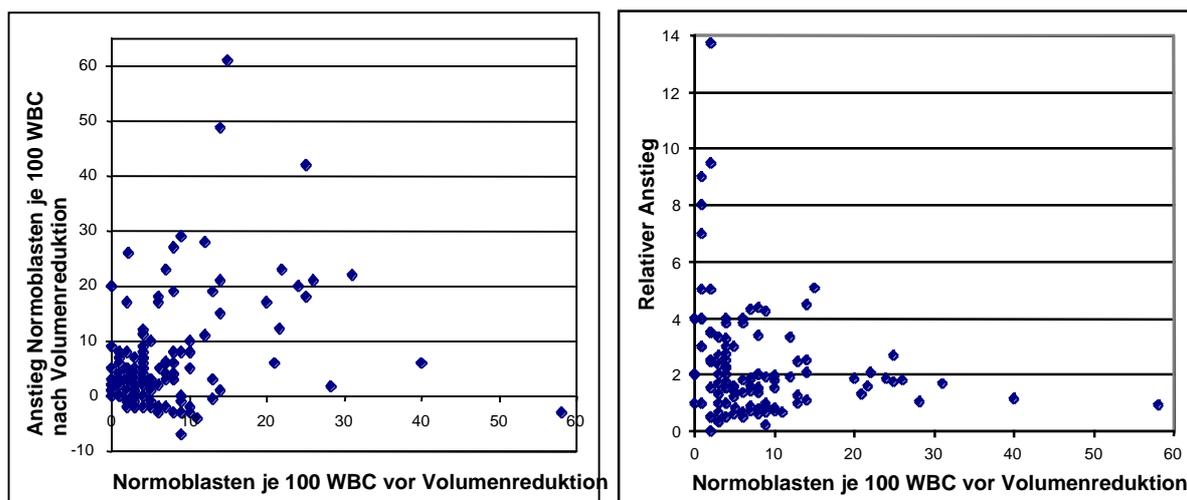


Abbildung 3-2 Absoluter und relativer Anstieg der Normoblastenkonzentration je 100 WBC durch Volumenreduktion (manuelle Differenzierung, n=128)

Zur Auswertung kamen nur diejenigen Proben, bei denen sowohl vor als auch nach Volumenreduktion das manuelle Differentialblutbild bestimmt worden war. Der relative Anstieg errechnet sich aus Normoblasten je 100 WBC vor Volumenreduktion/ Gehalt nach Volumenreduktion. Bei niedrigen Ausgangskonzentrationen an NRBC fällt der Anstieg durch Volumenreduktion deutlicher aus als bei hohen Ausgangskonzentrationen. In 4/5 aller Präparationen kam es zur Anreicherung der NRBC Zahl je 100WBC durch die Volumenreduktion.

3.3 Leukozytenzählung und Differenzierung mittels Coulter ACT

3.3.1 Proben vor Volumenreduktion

Aus 77 Vollblutproben vor Volumenreduktion wurde die Leukozytenkonzentration mittels Coulter ACT bestimmt. Vor Volumenreduktion lassen sich durch Messung am Coulter ACT $52,2 \pm 8,5\%$ Neutrophile und $47,8 \pm 8,5\%$ Mononukleäre Zellen im Nabelschnurblut bestimmen. In folgender Tabelle finden sich die ermittelten absoluten Zellkonzentrationen :

	Leukozyten [G/l]	Granulozyten [%]	Mononukleäre Zellen [%]	Hämoglobin [g/dl]	Erythrozyten [T/l]
Mittelwert \pm SD	12,1 \pm 3,5	52,2 \pm 8,5	47,8 \pm 8,5	12,6 \pm 1,4	3,47
unteres Quantil	8,64	45,1	39,4	11,5	3,09
Median	11,6	53,5	46,5	12,7	3,46
oberes Quantil	15,4	60,6	54,9	14	3,89
Bereich	5,15 – 24,5	1,85 - 15,84	2,86 – 11,4	7,7 – 15,7	2,15 – 4,28

Tabelle 3-5 Leukozytenkonzentration im Cord Blood vor Volumenreduktion bei Bestimmung mittels Coulter ACT (n=77)

3.3.2 Volumenreduzierte Präparate

3.3.2.1 *Einfluß der Vorverdünnung*

Aus denselben 77 Präparaten, aus denen die Leukozytenkonzentration im Vollblut bestimmt worden war, wurden nach Volumenreduktion vor Zugabe des Kryoprotektanz jeweils aus einem Aliquot von 300 µl unverdünnt und 1:2 mit PBS verdünnt die Leukozytenkonzentrationen mittels Coulter ACT bestimmt.

Hierbei zeigte sich, daß die Verdünnung einen signifikanten Einfluß auf die gemessene absolute Leukozytenzahl, auf die gemessene absolut Zahl mononukleärer Zellen und die relative mononukleäre Konzentration hatte (p jeweils $< 0,0001$), ebenso wie auf den Hämoglobingehalt sowie die gemessene Erythrozytenkonzentration. Um Einflüsse der Konzentration auf die Abweichung zwischen unverdünnter und verdünnter Probe nachzuweisen, wurden die Korrelationen zwischen dem Mittelwert aus unverdünnter und verdünnter Probe sowie der Ratio aus Meßergebnis unverdünnter /verdünnte Probe gebildet.

Im einzelnen fand sich im unverdünnten Aliquot im Vergleich zur Verdünnung:

- $95,5 \pm 3,8\%$ der Leukozyten. Insbesondere bei höheren Leukozytenkonzentrationen wurden höhere relative Abweichungen festgestellt als bei niedrigen Leukozytenzahlen ($p \leq 0,05$ für lineare Regression; $r_{lin} = -0,22$)
- $89,2 \pm 7,2\%$ der mononukleären Zellen. Tendenziell waren höhere Konzentrationen an Mononukleären mit einer höheren relativen Abweichung assoziiert ($p \leq 0,065$ für lineare Regression; $r_{lin} = -0,21$)
- $93,3 \pm 7,2\%$ des relativen mononukleären Gehaltes, unabhängig von der relativen Konzentration der mononukleären Zellen in der unverdünnten Probe.
- $9,3 \pm 11,2\%$ höheren relativen Anteil an Neutrophilen nach Verdünnung als vor Verdünnung, gegenläufig zu der Veränderung der Zahl bzw. Konzentration der gemessenen mononukleären Zellen, mit größerer Abweichung bei niedrigen relativen Konzentrationen der Neutrophilen und geringeren bei hohen Konzentrationen ($r_{lin} = -0,492544$; $p \leq 0,0001$).
- $5,0 \pm 12,4\%$ höhere absolute Neutrophilenzahl mit größerer relativer Abweichung bei niedrigeren als bei hohen Konzentrationen der Neutrophilen ($r_{lin} = -0,269$; $p < 0,017$).

- $94,6 \pm 3,3\%$ des gemessenen Hämoglobingehaltes, unabhängig vom Ausgangshämoglobinwert,
- $94,3 \pm 4,3\%$ der Erythrozytenzahl, unabhängig von der Ausgangserythrozytenzahl.

Obwohl das Hämoglobin und die Erythrozytenzahl in unterschiedlichen Kanälen gemessen werden, besteht kein Unterschied in dem Ausmaß der Mindermessung nach Verdünnung ($p \geq 0,4$). Die relativen Abweichungen durch Verdünnung korrelieren linear miteinander ($y = 0,9964x$, $r = + 0,618$; $p < 0,0001$).

Jedoch besteht ein deutlicher Unterschied zwischen dem Einfluss der Verdünnung auf die Hämoglobinbestimmung und die leukozytären Messungen (für Leukozyten $p < 0,001$; MNC $< 0,0001$).

Ebenfalls deutlich unterschiedlich wirkt sich die Verdünnung auf die impedanzbasierte Erythrozytenzahlbestimmung und die ebenfalls impedanzbasierte WBC Zählung aus (Ery zu WBC $p=0,003$; zu MNC $< 0,0001$).

Zusammenfassend ist der relative Fehler für die Erythrozytenbestimmung (Zahl und Hämoglobinkonzentration) konstant. Der absolute Unterschied nimmt mit zunehmender Konzentration zu. Währenddessen ist der relative Fehler für die leukozytären Bestimmungen abhängig von der Zellkonzentration und steigt mit zunehmender Konzentration an.

Der lineare Bereich der Leukozytenbestimmung des ACT ist daher eher in niedrigeren Konzentrationen zu finden, als durch Volumenreduktion im Präparat erreicht werden. Daher finden in den folgenden Vergleichen von Messungen aus volumenreduzierten Präparaten, wenn nicht anders angegeben, die Werte aus der 1:2 verdünnten Probe Verwendung.

	Unverdünnt					Verdünnung 1:2				
	WBC [G/l]	MNC [%]	Neutro- phile [%]	Hb [g/dl]	RBC [T/l]	WBC [G/l]	MNC [%]	Neutro- phile [%]	Hb [g/dl]	RBC [T/l]
Mittelwert ±SD	34,5 ±14,6	49,3 ±9,1	50,7 ±9,1	12,2 ±3,2	31,8 ±9,8	36,3 ±15,8	53,1 ±10,3	46,9 ±10,3	12,9 ±3,3	33,8 ±10,3
unteres Quantil	20,0	41,4	38,8	9,4	22,8	20,5	43,7	34,8	10,2	24,0
Median	32,9	47,7	52,3	11,7	29,4	35,0	51,6	48,4	12,4	30,6
oberes Quantil	44,6	61,2	58,6	15,0	42,7	46,6	65,2	56,3	15,8	45,1
Bereich	12,4 -85,2	27,7 -69,2	30,8 -72,3	7,4 -22,8	14,3 -63,5	12,4 -91,0	30,0 -78,7	21,3 -70,0	7,8 -23,4	15,6 -65,0

Tabelle 3-6 Leukozytenzahl (WBC) und –Differenzierung (MNC), Erythrozytenzahl (RBC) und Hämoglobinbestimmung (Hb) mittels Coulter ACT aus unverdünnten und verdünnten gemessenen Proben nach Volumenreduktion (n=77)

Gefundene Unterschiede sind signifikant. Der relative Fehler für die Erythrozytenbestimmung (Zahl und Hämoglobinkonzentration) ist konstant (relativer Fehler = unverdünnt/ 1:2 verdünnt). Der absolute Unterschied nimmt mit zunehmender Konzentration zu. Währenddessen ist der relative Fehler für die leukozytären Bestimmungen abhängig von der Zellkonzentration und steigt mit zunehmender Konzentration an (siehe Text).

3.3.2.2 Einfluss der Volumenreduktion auf die maschinell ermittelten relativen Differentialblutbildparameter bei Messung mit Coulter ACT

Je nachdem, ob die Ausgangsmessungen aus dem CB vor Volumenreduktion mit der verdünnten oder der unverdünnten Probe nach Volumenreduktion verglichen wurden, ergaben sich unterschiedliche Veränderungen des Differentialblutbildes. Wurde mit der Messung der unverdünnten Probe verglichen, ergaben sich nur leichte Änderungen durch Volumenreduktion in der Zusammensetzung der Leukozyten: Der Prozentsatz stieg um 0,55% an MNC im Präparat ($p < 0,02$). Bei Vergleich mit der Messung aus der Verdünnung trat ein deutlicher Unterschied zu tage mit 4,3% bzw. dem 1,08 Fachen der Eingangskonzentration an mononukleären Zellen nach Volumenreduktion ($p < 0,0001$).

Kein wesentlicher Zusammenhang bestand zwischen relativer Eingangskonzentration und Änderung der Konzentration an Mononukleären Zellen durch die Volumenreduktion.

Es war ein Trend zu geringerem Anstieg der Konzentration an mononukleären Zellen bei höheren mononukleären Zellausgangskonzentrationen zu finden.

Keine Korrelation bestand zwischen Ausgangs Hb und Hb nach Volumenreduktion und zwischen Erythrozytenkonzentration vor und nach Prozessierung.

	Probe nach Vol.red. unverdünnt		Probe nach Vol.red. 1:2 verdünnt	
	Differenz aus MNC [%] vor Vol.red. – MNC [%] n. Vol.red.	Ratio MNC [%] aus vor Vol.red./ n. Vol.red.	Differenz aus MNC [%] vor Vol.red. – MNC [%] n. Vol.red.	Ratio MNC [%] aus vor Vol.red./ n. Vol.red.
Mittelwert ± SD	-1,54 ± 5,53	1,04 ± 0,12	-5,33 ± 6,57	1,12 ± 0,14
untere Quantil	-7,36	0,94	-11,83	0,98
Median	-0,56	1,01	-4,33	1,08
obere Quantil	3,22	1,15	0,96	1,26
Bereich	-17,67 - 10,65	0,799 - 1,402	-25,68 - 5,209	0,9 - 1,485

Tabelle 3-7 Veränderung der relativen mononukleären Zellkonzentration durch Hespan® - Volumenreduktion bei Messung mittels Coulter ACT (n=72)

Der Unterschied zwischen der unverdünnten Probe und der 1:2 Verdünnung ist signifikant.

	Messung n. Volumenreduktion unverdünnt				Messung nach Volumenreduktion 1:2 verdünnt			
Ratio vor Vol.red./ n. Vol red.	WBC	MNC	Hb	RBC	WBC	MNC	Hb	RBC
Mittelwert ± SD	2,87 ±0,84	3,72 ±1,13	0,98 ±0,28	0,93 ±0,30	3,01 ±0,90	4,20 ±1,38	1,03 ±0,29	0,98 ±0,31
unteres Quantil	2,00	2,60	0,68	0,65	2,08	2,98	0,72	0,70
Median	2,84	3,50	0,94	0,86	3,04	3,81	0,97	0,93
oberes Quantil	3,80	4,70	1,21	1,18	3,88	5,30	1,31	1,26
Bereich	1,29 - 5,10	1,93 - 7,08	0,49 - 1,82	0,34 - 1,84	1,31 - 5,58	2,07 - 8,58	0,53 - 1,83	0,37 - 1,80

Tabelle 3-8 Relativer Anstieg der absoluten Zellkonzentrationen durch Hespan® - Volumenreduktion bei Messung mittels Coulter ACT (n=72)

Der Unterschied zwischen der unverdünnten Probe und der 1:2 Verdünnung ist signifikant.

3.4 Differenzierung Cell Dyn 3500

3.4.1 Werte vor Volumenreduktion

Aus 2371 Vollblutproben vor Volumenreduktion wurden die Leukozytenkonzentrationen mittels Cell Dyn 3500 bestimmt. In folgender Tabelle finden sich die ermittelten Konzentrationen aller 2214 auswertbaren Messungen:

	WIC [G/l]	WOC [G/l]	Neutro- phile [%]	Lympho- zyten [%]	Mono- zyten [%]	MNC [%]	Eosino- phile[%]	Basophile [%]	Ery [T/l]	Hb [g/dl]	Hkt [%]	Plt [G/l]	NRBC/ 100 WBC
Mittelwert ± SD	12,4 ±4,0	10,6 ±3,2	53,2 ±9,2	34,0 ±9,1	8,4 ±3,2	42,4 ±8,4	3,4 ±2,1	0,9 ±1,2	3,46 ±0,49	12,5 ±1,8	37,4 ±5,4	221 ±47	17,3 ±15,9
Unteres Quantil	8,8	7,8	45,0	25,9	5,2	34,8	1,6	0,0	3,09	11,2	33,5	180	8,7
Median	<u>11,8</u>	<u>10,2</u>	<u>53,9</u>	<u>33,1</u>	<u>8,7</u>	<u>41,7</u>	<u>3,0</u>	<u>0,9</u>	<u>3,47</u>	<u>12,5</u>	<u>37,6</u>	<u>221</u>	<u>14,5</u>
Oberes Quantil	15,8	13,6	61,4	41,8	11,2	50	5,2	1,5	3,87	13,8	41,8	264	24,7
Bereich	1,3 - 55,7	1,9 - 29,1	4,0 - 90,0	12,5 - 86,2	0,0 - 52,2	6,7 -92,0	0,0 - 22,0	0,0 - 23,8	0,12 - 5,21	0,6 - 48,4	12,2 - 55,3	9 - 400	0 - 312,0

Tabelle 3-9 Ermittlung von Blutbild und Differentialblutbildparameter aus Nabelschnurblutpräparaten vor Volumenreduktion durch Cell Dyn 3500 (n=2214)

WIC bezeichnet Zählung nukleärer Zellen im Impedanzkanal (White blood cell Impedance Count), WOC die Leukozytenzählung im optischen Kanal (White blood cell Optical Count). Berücksichtigt wurden nur die Ergebnisse, bei denen alle aufgeführten Parameter ermittelt wurden. Alle Proben wurden im sogenannten „Extended Lysis“ Modus gemessen, d.h. es wurde für die Messung im optischen Kanal (WOC) eine verlängerte Lysezeit benutzt. NRBC je 100 WBC wurden wie folgt berechnet: $100 \times ((WIC-WOC)/WOC)$.

Die im Impedanzkanal ermittelte nukleäre Zellkonzentration korreliert mit der im optischen Kanal ermittelten WBC- Konzentration. Bei hohen nukleären Zellkonzentrationen werden im Verhältnis weniger Leukozyten im optischen Kanal gemessen als bei niedrigen Konzentrationen. In einem am besten passenden Regressionsmodell („best fit“) korrelieren die beiden Werte am besten in einer potentiellen Weise ($r^2=0,8451$; $p < 0,000001$), wobei das Regressionsmodell neben dem potentiellen einen polynomischen, logarithmischen, exponentiellen und linearen Algorithmus verwendet. Wird die Differenz zwischen der WIC und WOC Messung als Maßstab für die Normoblastenkonzentration angesehen, besteht ein positiver signifikanter Zusammenhang zwischen der nukleären Zellkonzentration (WIC) und der Normoblastenkonzentration. Gerade Nabelschnurblute mit hohen Zellgehalten weisen daher auch eher hohe Normoblastenkonzentrationen auf.

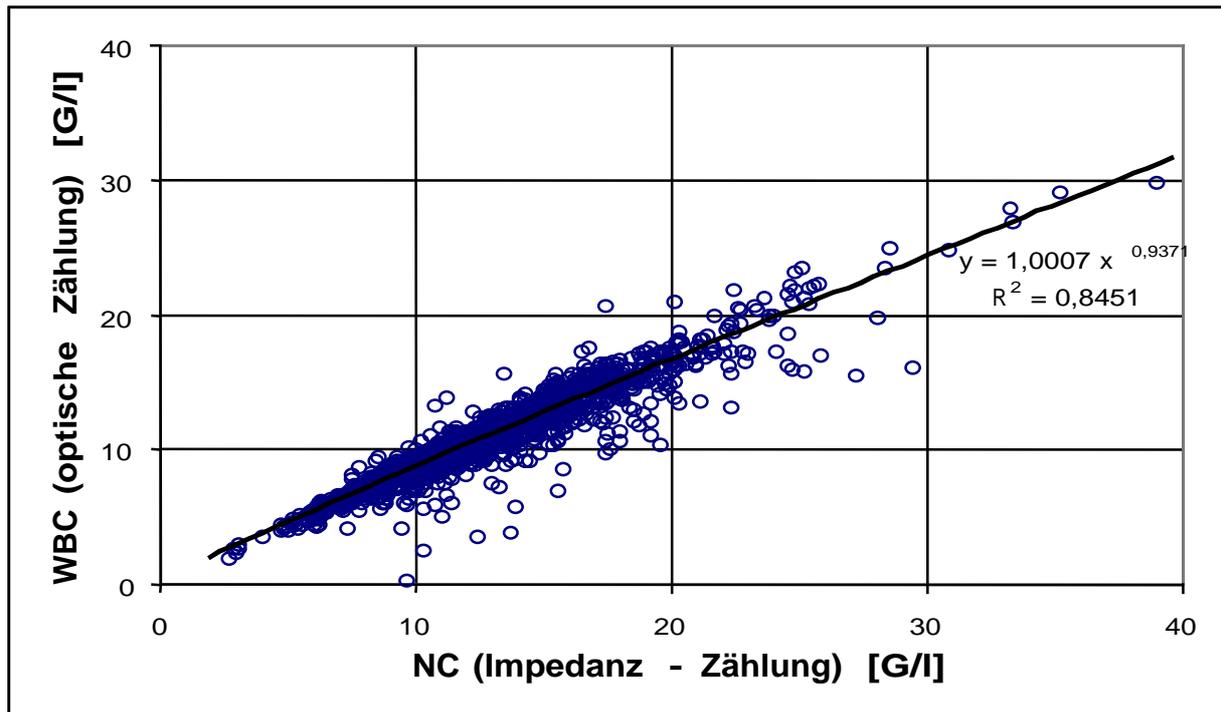


Abbildung 3-3 Korrelation zwischen nukleären Zellen (NC) und Leukozyten (WBC) in nicht volumenreduziertem Cord Blood (n=2214)

Die Zählungen wurden mittels eines Cell Dyn 3500 durchgeführt, wobei das Ergebnis der Impedanzmessung (WIC) mit der NC Konzentration, das Ergebnis der optischen Messung (WOC) mit der WBC Konzentration gleichgesetzt wurde. Die WBC Zahl korreliert unter Annahme eines „best fit“ Regressionsmodelles potentiell und liegt deutlich unterhalb der Winkelhalbierenden. So findet sich in Proben mit hohem NC Konzentrationen ein höherer Anteil an Zellen (z.B. NRBC, avitale Zellen), welche im WOC nicht erfasst werden.

3.4.2 Volumenreduzierte Präparate

3.4.2.1 Einfluss der Probenvorbereitung auf das Meßergebnis

Nach Volumenreduktion ändern sich aufgrund der Zugabe von Hesperan®, Verdünnung des Antikoagulanz und des Anstieges der Zellkonzentration die rheologischen Parameter der zu untersuchenden Probe. Daher wurden alle Blutbildparameter aus volumenreduzierten Proben sowohl unverdünnt als auch 1:2 verdünnt bestimmt. Für die vergleichenden Analysen wurden nur die Messungen herangezogen, bei denen alle bestimmten Werte vorlagen. Zum Vergleich wurden die absoluten Konzentrationen entsprechend dem Verdünnungsfaktor vor der Analyse mit zwei multipliziert. Die ermittelten Werte finden sich in Tabelle 3-10 und Tabelle 3-11.

	WIC [G/l]	WOC [G/l]	Neu- tro- phile [%]	Lympho- zyten [%]	Mon- ozyten [%]	MNC [%]	Eosino- phi- le[%]	Baso- phi- le[%]	Ery [T/l]	Hb [g/dl]	Hkt [%]	Plt [G/l]	NRBC/ 100 WBC
Mittel- wert ± SD	40,7 ±17,4	33,9 ±14,8	55,2 ±9,1	32,7 ±8,8	7,9 ±3,8	40,9 ±8,1	3,3 ±2,0	0,8 ±1,2	3,42 ±1,05	12,5 ±3,6	37,2 ±11,4	418 ±249	21,3 ±12,0
Unteres Quantil	24,6	20,1	47,4	24,2	4,8	33,0	1,5	0,0	2,38	9,0	26,0	251	12,1
Median	38,0	31,5	56,2	32,1	7,9	40,4	2,9	0,8	3,32	12,3	36,3	342	18,9
Oberes Quantil	56,5	46,9	63,5	40,6	10,8	48,6	5,0	1,4	4,53	16,3	49,2	571	29,6
Bereich	5,6 -137	5,2 -117	1,7 -85,4	10,1 -93,5	0,1 -78,4	10,4 -75,4	0,0 -23,5	0,0 -23,5	0,05 -7,03	0,7 -23,8	6,3 -73,1	12 -2323	0,0 -143,7

Tabelle 3-10 Blutbild und Differentialblutbild nach Volumenreduktion, mittels Abott Cell Dyn 3500 aus unverdünnter Probe gemessen (n=1651)

WIC bezeichnet Zählung nukleärer Zellen im Impedanzkanal (White blood cell Impedance Count), WOC die Leukozytenzählung im optischen Kanal (White blood cell Optical Count). Berücksichtigt wurden nur die Ergebnisse, bei denen alle aufgeführten Parameter ermittelt wurden. Alle Proben wurden im sogenannte „Extended Lysis“ Modus gemessen, d.h. es wurde für die Messung im optischen Kanal (WOC) eine verlängerte Lysezeit benutzt. NRBC je 100 WBC wurde wie folgt berechnet: $100 \times ((WIC-WOC)/WOC)$.

	WIC [G/l]	WOC [G/l]	Neu- tro- phile [%]	Lympho- zyten [%]	Mon- ozyten [%]	MNC [%]	Eosino- phi- le[%]	Basop h. [%]	Ery [T/l]	Hb [g/dl]	Hkt [%]	Plt [G/l]	NRBC/ 100 WBC
Mittel- wert± SD	43,5 ±20,7	36,7 ±17,3	55,4 ±9,1	31,7 ±8,7	9,0 ±4,7	40,6 ±8,1	3,2 ±2,0	0,8 ±1,1	3,77 ±1,04	14,1 ±3,6	40,9 ±11,1	498 ±318	19,6 ±11,1
Unteres Quantil	25,2	21,2	47,3	23,5	5,8	32,6	1,4	0,0	2,76	10,6	30,0	276	10,8
Median	40,0	33,5	56,0	31,5	8,7	40,3	2,8	0,8	3,64	13,6	39,4	384	17,4
Oberes Quantil o.	60,4	52,0	64,1	40,2	11,6	48,2	4,9	1,5	4,90	18,0	52,8	780	27,3
Bereich	1,0 -212	5,6 -142	7,0 -83,5	0,0 -69,2	0,0 -64,6	12,6 -81,5	0,0 -23,8	0,0 -17,8	0,40 -7,32	1,4 -24,6	13,6 -72,6	74 2774	0,7 -123,5

Tabelle 3-11 Blutbild und Differentialblutbild nach Volumenreduktion, mittels Abott Cell Dyn 3500 aus 1:2 verdünnter Probe gemessen (n=1142)

WIC bezeichnet Zählung nukleärer Zellen im Impedanzkanal (White blood cell Impedance Count), WOC die Leukozytenzählung im optischen Kanal (White blood cell Optical Count). Berücksichtigt wurden nur die Ergebnisse, bei denen alle aufgeführten Parameter ermittelt wurden. Alle Proben wurden im sogenannte „Extended Lysis“ Modus gemessen, d.h. es wurde für die Messung im optischen Kanal (WOC) eine verlängerte Lysezeit benutzt.

Für die Differenzierung von Neutrophilen, Mononukleären, Eosinophilen und Basophilen ergab die Messung aus der unverdünnten Probe keinen wesentlichen Unterschied zur Messung aus der verdünnten Probe. Wird nach (Bland und Altman 1986) die Differenz und das Ver-

hältnis der Ergebnisse der unverdünnten sowie verdünnten Probe bestimmt, liegt der Median der Abweichung für die genannten Differentialblutbildparameter nahe bei 0 mit einer negativen unteren Grenze des Vertrauensbereiches und einer positiven oberen Grenze des Vertrauensbereiches. Somit kann von einer guten Übereinstimmung der relativen Bestimmung der Differentialblutbildparameter ausgegangen werden.

CD3.5k	MNC			Neutrophile			Eosinophile			Basophile		
	Mittelwert [%]	unv.-1:2 [%]	Ratio unv.[%]/1:2 [%]	Mittelwert [%]	unv.-1:2 [%]	Ratio unv.[%]/1:2 [%]	Mittelwert [%]	unv.-1:2 [%]	Ratio unv.[%]/1:2 [%]	Mittelwert [%]	unv.-1:2 [%]	Ratio unv.[%]/1:2 [%]
Mittelwert ± SD	40,8 ± 8,0	0,3 ± 2,6	1,012 ± 0,085	55,2 ± 8,6	-0,4 ± 2,7	0,995 ± 0,059	3,2 ± 2,0	0,04 ± 0,5	1,034 ± 0,263	0,79 ± 0,93	-0,01 ± 1,17	1,098 ± 0,902
Unteres Quantil	33,0	-1,1	0,973	47,4	-1,6	0,970	1,5	-0,4	0,856	0,00	-0,54	0,732
Median	40,3	0,4	1,009	55,8	-0,3	0,994	2,8	0,0	1,016	0,72	0,00	1,048
Oberes Quantil	48,2	1,7	1,044	63,7	1,0	1,018	4,9	0,5	1,184	1,42	0,36	1,374
p unv. vs. 1:2			0,175			0,177			0,332			0,176

Tabelle 3-12 Einfluß der Verdünnung auf die Differenzierung von Mononukleären Zellen und Granulozyten nach Volumenreduktion bei Messung durch Cell Dyn 3500 (n=1079)

Für die aufgeführten Gruppen findet sich eine gute Übereinstimmung zwischen der Differenzierung aus der unverdünnten und der verdünnten Probe. Der Median liegt nahe 0 und der Vertrauensbereich (unteres und oberes Quantil) überschreitet 0 bzw. 1 bei der Ratio.

Die Verdünnung zeigte einen signifikanten Einfluß auf die Bestimmung der relativen Konzentration der Lymphozyten und der Monozyten. Hierbei verhielt sich der Einfluß auf die relative Konzentration der Lymphozyten bzw. Monozyten gegensinnig, in der verdünnten Probe wird:

- eine niedrigere relative Lymphozytenkonzentration gemessen, wobei bei hohen relativen Lymphozytenkonzentrationen die relative Abweichung (Ratio unverdünnt zu verdünnt) niedriger ist als bei niedrigen Lymphozytenkonzentrationen ($p_{lin} \leq 0,0002$)
- eine niedrigere Monozytenkonzentration festgestellt, wobei bei höheren relativen Monozytenkonzentrationen die relative Abweichung niedriger ist als bei niedrigen Monozytenkonzentrationen ($p_{lin} \leq 0,005$)

Nur für Normoblasten (Nucleated Red Blood Cells, NRBC), Lymphozyten und Monozyten ist die Abhängigkeit der Abweichung zwischen unverdünnter und 1:2 verdünnter Probe von der

bestehenden Konzentration signifikant. Monozyten und Lymphozyten verhalten sich gegenläufig: je höher die Konzentration, desto niedriger die relative Abweichung. Bei Normoblasten ist bei niedrigen relativen Konzentrationen die relative Abweichung größer als bei hohen Konzentrationen. Insgesamt gleichen sich die Differenzen in den relativen Lymphozyten und Monozytenkonzentrationen aus, so daß die Bestimmung des Prozentsatzes mononukleärer Zellen nicht durch die Verdünnung beeinflusst wird ($p=0,175$).

	Lymphozyten			Monozyten		
	Mittelwert [%]	unv.-1:2 [%]	Ratio unv.[%]/1:2[%]	Mittelwert [%]	unv.-1:2 [%]	Ratio unv.[%]/1:2[%]
Mittelwert \pm SD	32,5% \pm 8,3%	1,4% \pm 3,6%	1,059 \pm 0,212	8,3% \pm 3,2%	-1,0% \pm 1,8%	0,901 \pm 0,248
Quantil u	24,2%	-0,6%	0,981	5,4%	-2,2%	0,721
Median	32,1%	1,2%	1,037	8,2%	-0,8%	0,905
Quantil o.	40,5%	3,3%	1,110	10,8%	0,2%	1,025
p unv. vs. 1:2			0,0004			<0,0001

Tabelle 3-13 Einfluß der Verdünnung auf die Differenzierung von Lymphozyten und Monozyten nach Volumenreduktion bei Messung durch Cell Dyn 3500 (n=1079)

Aufgeführt sind die Mittelwerte (Mediane) der elektronischen Differenzierung aus der unverdünnten und der 1:2 verdünnten Probe nach Volumenreduktion. Insgesamt gleichen sich die Differenzen in den relativen Lymphozyten und Monozytenkonzentrationen aus, so daß die Bestimmung des Prozentsatzes mononukleärer Zellen nicht durch die Verdünnung beeinflusst wird ($p=0,175$).

Anders als das unauffällige Ergebnis der Differenzierung zeigt die Analyse der absoluten Zellkonzentrationen einen deutlichen Einfluss durch die Verdünnung: in der verdünnten Probe werden 8% mehr Leukozyten im optischen Kanal gezählt als in der unverdünnten ($p < 0,00007$). Das Ausmaß des Unterschiedes ist absolut und relativ abhängig von der Leukozytenkonzentration: bei hohen Leukozytenkonzentrationen ist die Abweichung größer als bei geringeren Konzentrationen ($p_{\text{lin}} < 0,000001$).

In den Impedanzkanälen findet sich ebenfalls ein Einfluss der Verdünnung auf die ermittelte Konzentrationen. In der verdünnten Probe werden/wird ein:

- 5% mehr nukleäre Zellen gemessen, wobei bei hohen nukleären Zellkonzentrationen nach Verdünnung eine größere Abweichung erhoben wird als bei kleineren Konzentrationen ($p_{\text{lin}} < 0,000001$) (siehe Abbildung 3-5)

- 7% mehr Plättchen bestimmt, wobei Proben mit hohen Plättchenkonzentrationen nach Verdünnung eine größere Abweichung aufweisen als Proben mit niedriger Konzentration ($p_{lin} < 0,000001$) (siehe Abbildung 3-4)
- 8% mehr Erythrozyten (RBC) nachgewiesen, wobei bei niedrigen Erythrozytenkonzentrationen eine höhere Abweichung der Messung aus der verdünnten Probe besteht als bei hohen Erythrozytenkonzentrationen ($p_{log} < 0,001$)
- 1% niedrigeres mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen (MCV) festgestellt, wobei die Abweichung unabhängig vom eingehenden korpuskulären Volumen ist.
- 7% geringerer Hämatokrit erhoben, was dem errechneten Fehler aus MCV und RBC entspricht. Hierbei führen nur niedrige Hämatokritwerte zu größeren Unterschieden, bei hohen Hämatokritwerten finden sich nur geringere Abweichungen.

Im Zyan –Hämoglobinkanal zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Einfluß der Verdünnung auf die bestimmte Konzentration. In den verdünnten Proben wird:

- 9% weniger Hämoglobin bestimmt, wobei die Höhe der Hämoglobinkonzentration keinen Einfluss auf den Unterschied zwischen unverdünnter und verdünnter Probe hat.

Wird die Übereinstimmung gemäß (Bland und Altman 1986) zwischen unverdünnter und verdünnter Probe festgestellt und werden die Daten in die Bereiche Quantil $< 0,159$ (entspricht bei Normalverteilung $< \text{Mittelwert} - 1x \text{SD}$); Quantil $0,159$ bis $0,841$ (entspricht $\text{Mittelwert} \pm 1x \text{SD}$) und Quantil $> 0,841$ (entspricht $> \text{Mittelwert} + 1x \text{SD}$) aufgeteilt, so finden sich für Leukozyten, bestimmt im optischen Kanal durch die Verdünnung:

- im Bereich von $6,5$ bis $22,3$ WBC G/l eine mediane Abweichung von $0,8$ G/l mit einem Konfidenzintervall des Medians der Abweichung von $0,5$ bis $0,9$ mit einem Vertrauensbereich der Abweichung von $-1,04$ bis $3,12$; entsprechend einer medianen Mehrmessung in der verdünnten Probe von $3,9\%$, Konfidenzintervall $3,0$ bis $4,5\%$ ($n=204$).
- im Bereich von $22,4$ bis $44,9$ WBC G/l eine mediane Abweichung von $2,6$ G/l mit einem Konfidenzintervall des Medians der Abweichung von $2,4$ bis $2,8$ mit einem Vertrauensbereich der Abweichung von $-15,9$ bis $19,6$ G/l; entsprechend einer medianen Mehrmessung in der verdünnten Probe von $8,5\%$, Konfidenzintervall $7,8$ bis $8,9\%$ ($n=555$).

- im Bereich von 45,1 bis 129 WBC G/l eine mediane Abweichung von 5,6 G/l mit einem Konfidenzintervall des Medians der Abweichung von – 5,21 bis – 6,19 mit einem Vertrauensbereich der Abweichung von –15,9 bis 19,6 ; entsprechend einer medianen Mehrmessung in der verdünnten Probe von 10,7%, Konfidenzintervall des Medians 9,4 bis 11,5% (n=204).

Für niedrigere Werte ergibt sich also eine geringere Abweichung als für hohe WBC Konzentrationen, dies gilt sowohl für die absolute Differenz als auch die relative Abweichung, die durch die Verdünnung verursacht wird. Bei einem Verdünnungsfehler wäre hingegen die relative Abweichung konstant. Somit ist für volumenreduzierte Nabelschnurblutpräparate die Linearität der WBC Messung bei Bestimmung im optischen Kanal für hohe Konzentrationen nicht gegeben.

Die entsprechenden Ergebnisse für die Bestimmung der nukleären Zellkonzentration, der Thrombozyten -, Erythrozyten - und Hämoglobinkonzentration, des Hämatokrits, des mittleren korpuskulären Volumens finden sich in Tabelle 3-14 und Tabelle 3-15. Für die Plättchen finden sich in Abbildung 3-4 die Konfidenzintervalle der Abweichung für unterschiedliche Konzentrationsbereiche.

		Nukleäre Zellen (WIC)			Leukozyten (WOC)			Thrombozyten		
Bereich [G/l]		7,9 - 27	27,05 - 53,5	53,55 - 173	6,5 - 22,3	22,4 - 44,9	45,05 - 129	84,0 - 289,5	290,5 - 633,5	635,0- 2548,5
Absoluter Fehler [G/l] durch Mehrmessung nach Verdünnung	Untere Übereinstimmung	-2	-24,1	-14,1	-1,04	-15,9	-10,4	-45,9	-192	-83
	Unteres KI des Medians	0,50	1,90	4,31	0,90	2,40	5,21	1,00	12,93	60,10
	Median	0,80	2,10	5,10	1,10	2,60	5,60	4,00	15,00	67,00
	oberes KI	0,90	2,30	5,79	1,20	2,80	6,19	8,91	18,00	74,91
	obere Übereinstimmung	3,215	27,4	78	3,12	19,6	26	58,9	156	736
Relativer Fehler (Mehrmessung) nach Verdünnung	Unteres KI des Medians	3,0%	5,3%	7,0%	6,0%	7,8%	9,4%	0,2%	3,3%	7,0%
	Median	3,9%	5,7%	7,9%	6,7%	8,5%	10,7%	1,9%	3,9%	7,7%
	Oberes KI des Medians	4,5%	6,2%	9,0%	7,2%	8,9%	11,5%	3,7%	4,6%	8,6%

Tabelle 3-14 Abhängigkeit der Abweichung durch Verdünnung von der Zellkonzentration für nukleäre und weiße Zellen sowie Plättchen (n=963)

Der Bereich bezieht sich auf den Mittelwert aus unverdünnter und verdünnter Probe. Der absolute Fehler berechnet sich als Δ aus unverdünnter- verdünnter Probe, der relative Fehler als Prozentsatz aus der Ratio (1- unverdünnt/verdünnt). Liegt der Median nahe bei 0 bzw. überschreitet das Konfidenzintervall des Medians 0 kann von Übereinstimmung ausgegangen werden. Sowohl für Nukleäre Zellen (WIC) als auch für Leukozyten (WOC) und Plättchen besteht eine signifikante Abhängigkeit der Abweichung zwischen unverdünnter und 1:2 verdünnter Probe von der bestehenden Konzentration: je höher die Konzentration, desto größer die Abweichung (relativ und absolut).

		Erythrozyten [T/l]			Hb [g/dl]			Hämatokrit [%]			MCV [fl]		
Bereich		1,17 - 2,81	2,81 - 4,45	4,46 - 7,07	5,3 - 10,7	10,7 - 16,4	16,4 - 23,7	12,8 - 30,6	30,7 - 48,2	48,3 - 71,1	9,04 - 10,56	10,56 - 11,17	11,17 - 12,26
Absoluter Fehler in der jeweiligen Einheit durch Mehrmessung nach Verdünnung	Untere Übereinstimmung	-0,11	-1,46	-0,66	-0,21	-4,40	-1,50	-0,36	-14,6	-12,2	-0,20	-1,19	-0,28
	Unteres KI des Medians	0,18	0,24	0,33	0,70	1,10	1,50	1,70	2,30	3,40	-0,08	-0,07	-0,09
	Median	0,19	0,25	0,36	0,75	1,10	1,60	1,90	2,40	3,70	-0,07	-0,06	-0,08
	oberes KI	0,20	0,27	0,39	0,80	1,20	1,60	2,00	2,61	4,00	-0,06	-0,06	-0,07
	obere Übereinstimmung	0,4	2,3	1,1	2,2	6,8	3,5	4,9	25,2	11,5	0,1	0,9	0,1
Relativer Fehler (Mehrmessung) nach Verdünnung	Unteres KI des Medians	8,0%	7,1%	6,7%	7,9%	8,7%	8,1%	7,3%	6,4%	6,3%	-0,8%	-0,6%	-0,8%
	Median	8,5%	7,7%	7,3%	9,0%	9,0%	8,8%	7,7%	6,9%	6,9%	-0,7%	-0,6%	-0,7%
	Oberes KI des Medians	9,4%	8,2%	8,0%	9,7%	9,5%	9,4%	8,3%	7,3%	7,6%	-0,6%	-0,5%	-0,6%

Tabelle 3-15 Abhängigkeit der Abweichung durch Verdünnung von der Zellkonzentration für das rote Blutbild (n=963)

Sowohl für Erythrozyten als auch für das Hämoglobin besteht eine signifikante Abhängigkeit der Abweichung zwischen unverdünnter und 1:2 verdünnter Probe von der bestehenden Konzentration: je höher die Konzentration, desto niedriger die relative Abweichung. (Zur Berechnung des Bereiches und der Abweichung siehe Legende Tabelle 3-15)

		Neutrophile [%]			Lymphozyten [%]			Monozyten [%]			NRBC je 100 WBC		
	Bereich	13,5	48,5	61,7	0	25,8	38,5	0,2	5,9	10,3	5,0	13,7	26,8
		-48,5	-61,7	-84,4	-25,7	-38,5	-66,8	-5,9	-10,3	-60,4	-13,7	-26,8	-
													133,6
Absoluter Fehler in der jeweiligen Einheit durch Mehrmessung nach Verdünnung	Untere Übereinstimmung	-3,6	-18,4	-18,2	-8,2	-26,8	-17,7	-0,9	-5,3	-10,8	-13,5	-26,4	-63,8
	Unteres KI des Medians	0,2	0,1	0,0	-1,3	-1,3	-1,7	0,7	0,7	0,6	-11,7	-19,3	-34,9
	Median	0,4	0,3	0,3	-1,1	-1,2	-1,4	0,8	0,9	0,7	-11,4	-18,8	-33,1
	oberes KI des Medians	0,2	0,1	0,0	-1,3	-1,3	-1,7	0,7	0,7	0,6	-11,0	-18,4	-31,7
	obere Übereinstimmung	7,5	15,6	19,5	4,0	13,9	19,7	4,7	9,8	7,8	-6,4	-13,9	-27,1
Relativer Fehler (Mehrmessung) nach Verdünnung [%]	Unteres KI des Medians	0,4	0,3	0,0	-5,8	-4,0	-3,8	15,8	9,4	4,8	-24,3	-16,8	-12,1
	Median	0,9	0,5	0,4	-5,0	-3,6	-3,1	19,7	11,1	6,3	-20,7	-15,1	-9,9
	Oberes KI des Medians	1,7	0,8	0,8	-3,4	-3,2	-2,6	25,2	12,6	7,4	-15,5	-13,1	-7,8

Tabelle 3-16 Abhängigkeit des Differentialblutbildes (DiffBB) durch Verdünnung von der Zellkonzentration

Für keine der gezeigten relativen Konzentrationen ergibt sich ein Unterschied zwischen der unverdünnten und der verdünnten Probe (963 verwertbare DiffBB aus 1079 Proben).

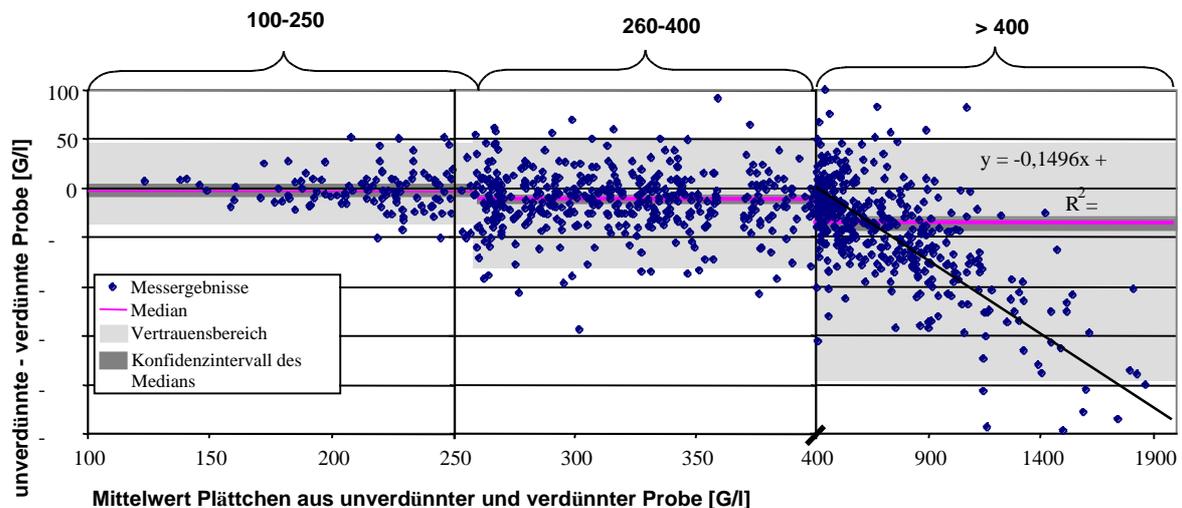


Abbildung 3-4 Median der Übereinstimmung zwischen unverdünnter und verdünnter Probe bei der Plättchenmessung

Der Grad der Übereinstimmung wurde nach (Bland und Altman 1986) bestimmt. Gezeigt sind die Vertrauensbereiche der Übereinstimmung, der Median der Übereinstimmung und das Konfidenzintervall der Übereinstimmung für die Bereiche 100-260, 260 bis 400 und größer 400 G/l Plt. In den Bereichen bis 400 Plt wird eine gute Übereinstimmung zwischen unverdünnter und verdünnter Probe gefunden, insbesondere für 100-250 G/l Plt überschreitet das Konfidenzintervall des Medians den 0 Wert als Hinweis für eine besonders gute Übereinstimmung.

Um zu prüfen bei welchen Konzentrationen die größten Übereinstimmungsgrade herrschen, wurden 1079 Werte gerundet und die so ermittelten Klassen auf die Abweichung des absoluten und des relativen Fehlers geprüft. Gerundet wurden die nukleären Zellen (WIC) auf 10 G/l, Leukozyten (WOC) auf 10 G/l, Plättchen auf 100 G/l, Erythrozyten auf 0,5 T/l, MCV auf 0,2 fl, Hb auf 1g/dl. Nach der Methode von (Bland und Altman 1986) ist dann von Übereinstimmung zweier Methoden auszugehen, wenn das Konfidenzintervall des Medians des absoluten Fehlers 0 überschreitet bzw. das des Medians des relativen Fehlers 1.

Es zeigten sich nach der obigen Klassenbildung insbesondere Übereinstimmung bei den

- Kernhaltigen Zellen (WIC) für die Bereiche $5 \leq \text{WIC} < 60$ (siehe Abbildung 3-5)
- Leukozyten (WOC) für die Bereiche $5 \leq \text{WOC} < 15 \text{ G/l}$ und $25 \leq \text{WOC} < 35 \text{ G/l}$ (siehe Abbildung 3-5)
- Plättchen (Plt) für den Bereich von $50 \leq \text{Plt} < 550 \text{ G/l}$ sowie $650 \leq \text{Plt} < 750 \text{ G/l}$ (siehe auch Abbildung 3-4)
- Erythrozyten (RBC) für die Bereiche $1,75 \leq \text{RBC} < 2,25 \text{ T/l}$ und $2,75 \leq \text{RBC} < 3,75 \text{ T/l}$
- Mittleres korpuskuläres Erythrozytenvolumen (MCV) für die Bereiche $10,3 \leq \text{MCV} < 11,1 \text{ fl}$.
- Hämoglobin (Hb) für die Bereiche $5,5 \leq \text{Hb} < 6,5 \text{ g/dl}$, $9,5 \leq \text{Hb} < 11,5 \text{ g/dl}$ sowie $22,5 \leq \text{Hb} \leq 23,5 \text{ g/dl}$.

In physiologischen Bereichen zeigt sich für die meisten der untersuchten Parameter somit eine ausreichende Übereinstimmung zwischen unverdünnter und verdünnter Probe.

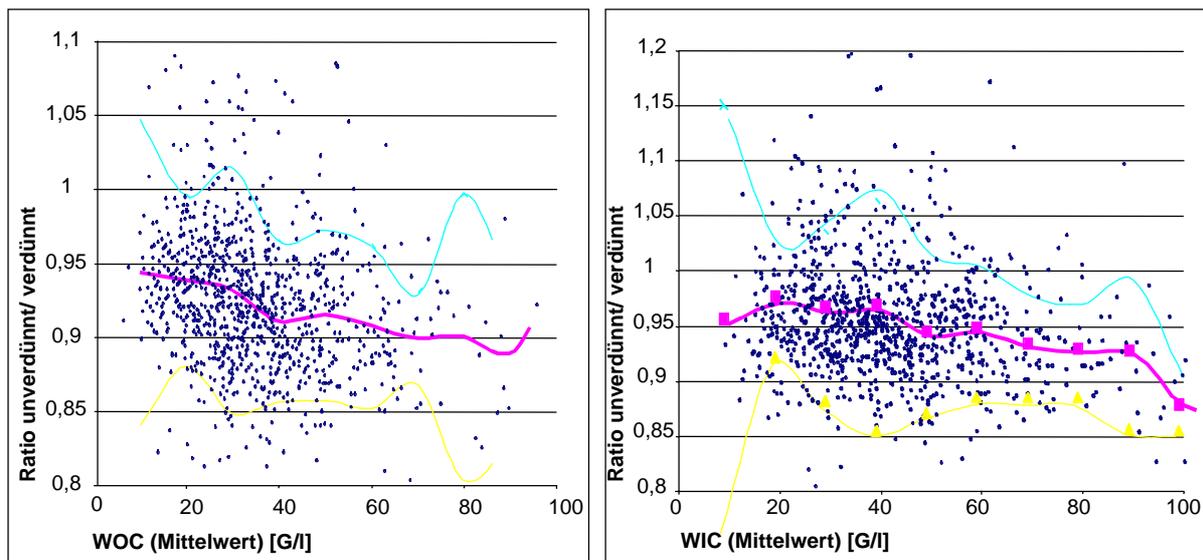


Abbildung 3-5 Bereich der Übereinstimmung zwischen Bestimmung der Leukozytenkonzentration aus unverdünnter und verdünnter Probe (n = 1001) nach Volumenreduktion

Aufgezeichnet ist die Ratio (unverdünnt/ verdünnt 1:2) gegen den Mittelwert aus beiden Messungen, wobei – die untere Grenze des Vertrauensbereiches, – den Median und – die obere Grenze des Vertrauensbereiches der Abweichung angibt. Überschneidet der Vertrauensbereich 1, ist von einer hinreichenden Übereinstimmung auszugehen (siehe Text). Gewonnen wurden die Mediane und die Grenzen über Klassenbildung in 10G/l Schritten.

Zusammenfassend zeigen sich für Erythrozytenkonzentration einerseits und Leukozyten- (WOC) und Plättchenkonzentration sowie die nukleäre Zellkonzentration (WIC) andererseits gegensinnige Zusammenhänge. Bei hohen Erythrozytenkonzentrationen sind die Abweichungen zwischen den beiden Messungen geringer als bei niedrigen Erythrozytenkonzentrationen, bei hohen Leukozytenkonzentrationen hingegen sind die Abweichungen erheblich größer als bei niedrigen Leukozytenkonzentrationen. Weitgehend unabhängig von der Konzentration tritt der Unterschied zwischen unverdünnter und verdünnter Probe für die Messung des MCV, für die Messung des Hb sowie der relativen Konzentrationen von Mononukleären und Neutrophilen Zellen auf. Bei beiden werden in der Verdünnung höhere Werte gemessen als in der unverdünnten Probe. Somit haben bei Messung aus mittels Hespan® volumenreduzierten Nabelschnurblutpräparaten die Leukozytenkanäle des Cell Dyn 3500 eher im niedrigeren Bereich ihren linearen Meßbereich, während die Erythrozytenzahlbestimmung eher im oberen Bereich linear verläuft. Da die Leukozytenzahl für die Qualitätskontrolle von CB- Transplan-

taten die entscheidende Rolle einnimmt, werden für die folgenden Vergleiche die 1:2 Verdünnungen aus den volumenreduzierten Präparaten verwendet, wenn nicht anders angegeben.

3.4.2.2 Einfluss der Volumenreduktion auf die maschinell ermittelten Differentialblutbildparameter

Durch Volumenreduktion kommt es, wie zu erwarten, zu einem Anstieg bzw. einer Veränderung der verschiedenen Blutbildparameter. So ändert sich signifikant durch Volumenreduktion die Konzentration von nukleären Zellen, Leukozyten, kernhaltigen Erythrozyten, Erythrozyten und Plättchen sowie der Hämoglobingehalt.

Durch Volumenreduktion nimmt im Median der

- nukleäre Zellkonzentration (WIC) um das 3,4 Fache zu,
- die Leukozytenkonzentration (WOC) um das 3,3 Fache zu, wobei die Neutrophilen um das 3,2 Fache, die Lymphozyten um das 3,2 Fache, die Monozyten um das 3,3 Fache, die Eosinophilen um das 3,2 Fache und die Basophilen um das 3 Fache zunehmen,
- die Kernhaltigen Erythrozytenkonzentration (NRBC) um das 39 Fache,
- die Erythrozytenkonzentration (Ery) um das 1,09 Fache,
- der Hämatokrit (Hkt) um das 1,05 Fache,
- die Plättchenkonzentration (Plt) um das 1,69 Fache zu,

wobei das Volumen auf 26,3 % des Ausgangsvolumens eingeeengt wurde.

Am ausgeprägtesten ist die Veränderung bzw. der Anstieg der Normoblastenkonzentration.

	WIC	WOC	NRBC	Ery	Hb	Hkt	Plt
Mittelwert	3,45	3,42	45,98	1,13	1,14	1,08	2,37
± SD	± 1,10	± 1,13	± 49,89	± 1,19	± 0,58	± 0,32	± 2,36
unteres Quantil	2,17	2,17	20,69	0,77	0,82	0,78	1,3
Median	3,43	3,37	38,8	1,05	1,09	1,05	1,69
oberes Quantil	4,51	4,48	63,62	1,40	1,42	1,40	3,51
Bereich	0,61	0,80	0,83	0,01	0,03	0,28	0,03
	- 6,94	- 9,51	- 968,8	- 32,33	- 15,00	- 2,41	- 41,64

Tabelle 3-17 Relation bzw. Vielfache der Veränderung der Blutbildparameter (Absolutkonzentrationen) durch Volumenreduktion (n=1001)

Eingegangen in den Vergleich bzw. die Ratio - Bildung sind nur diejenigen Präparationen, von denen vor und nach Volumenreduktion das komplette Blutbild vorlag.

Doch auch die relative Konzentration bzw. die anteilmäßige Zusammensetzung der Leukozyten verändert sich durch die Volumenreduktion:

- der Anteil der Neutrophilen nimmt im Median um das 1,04 Fache zu
 - der Anteil der Lymphozyten vermindert sich um das 0,92 Fache
 - der Anteil der Monozyten steigert sich um das 1,07 Fache,
 - der Anteil der Eosinophilen und Basophilen vermindert sich um das 0,95 bzw. 0,97 fache.
- Am ausgeprägtesten ist die Änderung des Anteiles bei den kernhaltigen Erythrozyten je 100 Leukozyten, sie nehmen im Median das 1,09 Fache zu.

	NRBC je 100 WBC	Neutrophile	Lymphozyten	Monozyten	Eosinophile	Basophile
Mittelwert	1,27	1,05	0,93	1,22	0,97	1,03
± SD	± 1,07	± 0,11	± 0,17	± 0,79	± 0,26	± 0,46
unteres Quantil	0,79	1,00	0,82	0,88	0,76	0,64
Median	1,09	1,04	0,92	1,07	0,95	0,97
oberes Quantil	1,62	1,10	1,03	1,45	1,16	1,34
Bereich	0,03 -17,40	0,18 -2,28	0,18 -3,97	0,08 -14,18	0,17 -2,81	0,27 -5,57

Tabelle 3-18 Relation bzw. Vielfache der Veränderung der Blutbildparameter (Relative Konzentrationen) durch Volumenreduktion (n=963)

Eingegangen in den Vergleich bzw. die Ratio - Bildung sind nur diejenigen Präparationen, von denen vor und nach Volumenreduktion alle in der Tabelle aufgeführten Parameter des Blutbildes vorlagen.

Die Volumenreduktion führt also zu einem leichten Anstieg der mittleren relativen mononukleären Konzentration (Differenz aus der relativen Konzentration vor u. nach Volumenreduktion) um 1,9% sowie zu einem korrespondierenden leichten Abfall der relativen Granulozyten Konzentration um 1,9% ($p < 0,0001$), zu einem deutlichen Anstieg der relativen NRBC Konzentration von im Mittel um 4%.

Kein Zusammenhang besteht zwischen der Zahl der nukleären Zellen (WIC) oder der Zahl der Leukozyten (WOC) und dem Gehalt an mononukleären Zellen.

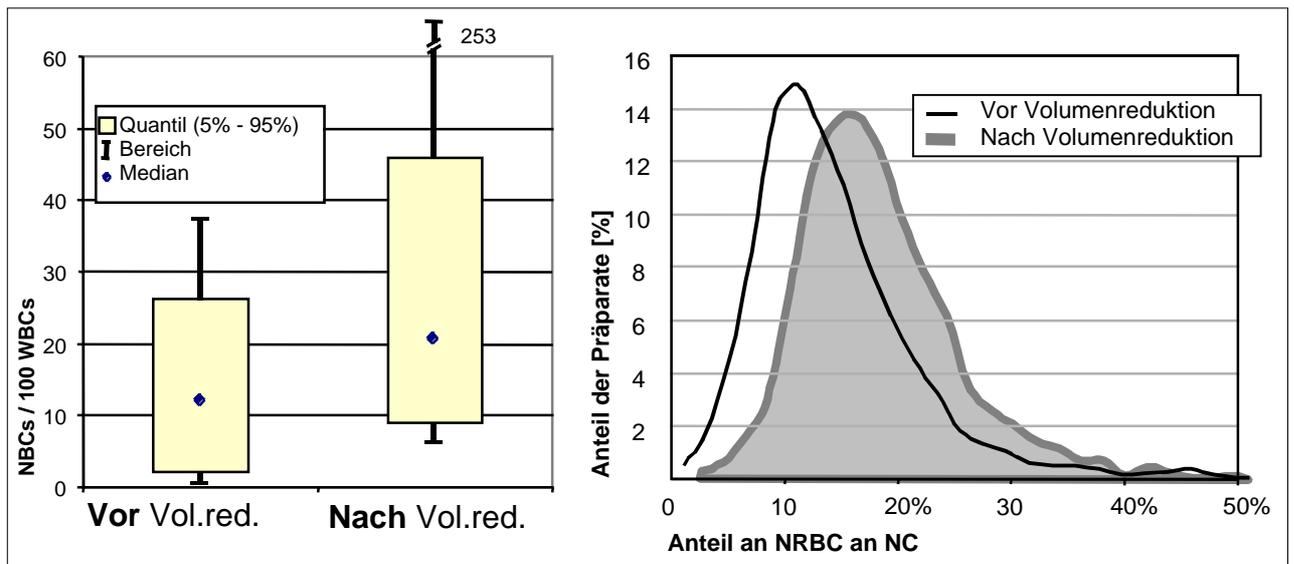


Abbildung 3-6 NRBC vor und nach Volumenreduktion (n=1464)

NRBC wurden als Δ WIC - WOC mittels Cell Dyn 3500 bestimmt.. NRBC je 100 WBC ergibt sich aus $100 \times (\text{WIC}/\text{WOC}-1)$, Anteil an NRBC je NC ergibt sich aus $1-\text{WOC}/\text{WIC}$. In volumenreduzierten Präparaten finden sich deutlich mehr Normoblasten je WBC (links) bzw. nehmen die Normoblasten einen deutlich höheren Anteil an den kernhaltigen Zellen ein als vor Volumenreduktion. In der rechten Abbildung wurden Klassen zu 2% gebildet und aus den erhaltenen Anteilen der jeweiligen Klassen das Diagramm gebildet (siehe auch Abbildung 3-7).

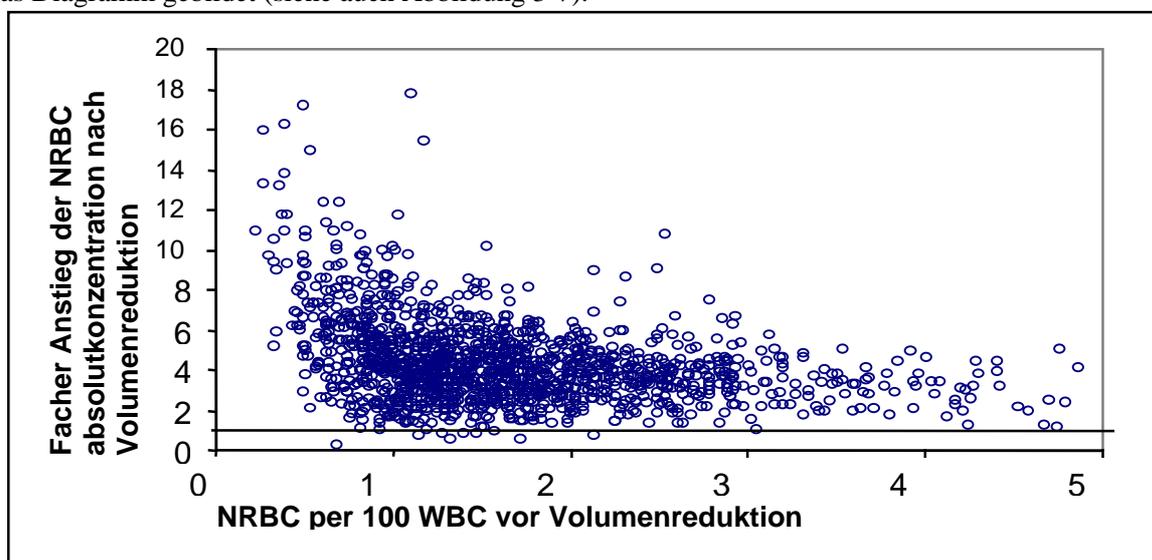


Abbildung 3-7 Relativer (Vielfacher) Anstieg der absoluten NRBC Konzentration durch Hespan® Volumenreduktion (n=1464)

Der relative Anstieg der NRBC Konzentration wurde aus $\text{NRBC vor Volumenreduktion} / \text{NRBC nach Volumenreduktion}$ berechnet. Bis auf 12 Präparaten kam es in allen zu einem Anstieg der NRBC Konzentration, insbesondere bei Präparaten mit einer niedrigen relativen NRBC- Ausgangskonzentration

3.5 Vergleich der manuellen Differenzierung mit der maschinellen Differenzierung mittels CD3500

Für den Vergleich wurden nur Ergebnisse derjenigen Präparate benutzt, von denen jeweils sowohl das manuelle als auch das maschinelle Differentialblutbild vorlagen.

Gemäß (Dörner et al. 1995) wurden als Normoblasten Zellen in der maschinellen Differenzierung des CD3500 angesehen, welche im Impedanzkanal (WIC) gezählt wurden, aber nicht im optischen Kanal (WOC) des Gerätes. Die Zahl der Normoblasten je 100 Leukozyten berechnet sich dann als $(WIC/WOC-1)*100$.

3.5.1 Differenzierung aus nicht volumenreduziertem Nabelschnurblut

Die manuell ermittelten Werte korrelieren mit den maschinell erhobenen Werten linear mit $x =$ manuell und $Y =$ maschinell ermitteltem Anteil für

- Granulozyten mit $y=0,922x$, $r_{\text{linear}} = 0,440$; $p \geq 0,002$
- Mononukleäre Zellen mit $y=1,006x$, $r_{\text{linear}} = 0,444$; $p \geq 0,0001$
- Basophile und Eosinophile mit $y=1,009x$, $r_{\text{linear}} = 0,351$; $p \geq 0,0003$

Werden die relativen Zusammensetzungen bzw. Anteile der manuellen und der maschinellen Differenzierung miteinander verglichen, ergibt sich jedoch, daß signifikant

- manuell ein höherer Anteil an Granulozyten gemessen wird als durch maschinelle Differenzierung,
- manuell ein niedrigerer Anteil an mononukleären Zellen bestimmt wird,
- manuell ein niedrigerer Anteil an Normoblasten gezählt wird.

Wird aus der optischen Zählung (WOC) unter Berücksichtigung der manuell ermittelten Normoblastenzahl (NRBC) je 100 WBC die nukleäre Zellzahl ermittelt, so zeigt sich, daß im Impedanzkanal (WIC) im Median 8% mehr Zellen gezählt als errechnet werden.

Die weitere Analyse zeigt, daß maschinell im Median das 0,94 Fache des Anteiles an Neutrophilen, das 1,04 Fache des Anteiles an Mononukleären, das 1,8 Fache des Anteiles an Eosino-

philen und Basophilen und das 2,54 Fache des Normoblastenanteiles der manuellen Differenzierung ermittelt wurde. In Tabelle 3-22 ist die gegensinnige Korrelation eingetragen.

Wird aus der im optischen Kanal ermittelten Leukozytenzahl durch den Steigungsfaktor aus der linearen Korrelation aus manuell und maschinell ermitteltem Anteil der Granulozyten, der Mononukleären und der Eosinophilen/Basophilen sowie der Normoblastenzahl je 100 WBC der nukleäre Zellgehalt (NC aus WOC) ermittelt, erhält man im Median das 0,97 Fache des Wertes aus der Impedanz (WIC) Bestimmung. Die NC aus WOC berechnen sich wie folgt: $(WOC / (MNC_{\text{manuell}} [\%] \times MNC_{\text{Steigung}}) + (Granulozyten_{\text{manuell}} [\%] \times Granulozyten_{\text{Steigung}}) + ((Eosinophile + Basophile_{\text{manuell}}) [\%] \times Eosinophilen - Basophilen_{\text{Steigung}})) \times (1 + NRBC_{\text{manuell}} \text{ je WBC})$. Diese Größe (NC aus WOC) unterscheidet sich nicht mehr von der im Impedanzkanal bestimmten Konzentration (WIC) ($p \leq 0,287$, siehe Tabelle 3-18, Abbildung 3-8). Wird nun die Korrelation zwischen der Impedanzmessung (WIC) und der optischen Zählung (WOC) gebildet, unterscheidet diese sich nicht von der Korrelation der um die manuelle Differenzierung korrigierten aus dem WOC berechneten nukleären Zellzählung und der optischen Zellzählung (siehe Abbildung 3-8).

	Neutrophile	Mononukleäre	Eosinophile u. Basophile	Normoblasten je 100 WBC
Mittelwert ± SD	55,3 ± 9,5	41,8 ± 9,3	2,8 ± 2,3	7,2 ± 8,2
Quantil 15,865%	46	32	1	2
Median	56	41	2	5
Quantil 84,135%	65	51	5	12
Bereich	28 - 81	16 - 66	0 - 11	0 - 58

Tabelle 3-19 Manuelle Differenzierung der in den Vergleich maschinelle vs. elektronische Differenzierung eingegangenen Proben (n=127)

	Neutrophile	Mononukleäre	Eosinophile u. Basophile	Normoblasten je 100 WBC
Mittelwert±SD	52,10±6,82	43,47±6,51	4,59±1,92	16,09±9,84
Minimum	28	29,4	1,2	3,09
Quantil 15,865 %	44,88	37,1	2,7	8,82
Median	52,85	42,8	4	13,83
Quantil 84,135%	58,77	49,38	6,86	22,53
Maximum	67,2	67,3	10,7	72,48

Tabelle 3-20 Maschinelle Differenzierung (CD3500) der in den Vergleich maschinelle vs. elektronische Differenzierung eingegangenen Proben (n=127)

	Neutrophile	Mono-nukleäre	Eosinophile u. Basophile	Normoblasten je 100 WBC
Untere Vertrauensbereichsgrenze	-16,1	-20,13	-6,11	+1,51
Unteres Konfidenzintervall des Medians	1,66	-3,19	-2,17	-7,53
Median	3,4	-1,9	-1,8	-8,28
Oberes Konfidenzintervall des Medians	5	-0,26	-1,35	-9,25
Obere Vertrauensbereichsgrenze	22,14	17,55	3,18	-25,59

Tabelle 3-21 Differenz zwischen manueller [%] und maschineller (Cell Dyn 3500) [%] Differenzierung (n=127)

Es werden manuell mehr Neutrophile und etwas weniger Mononukleäre gezählt. Am auffälligsten ist die Mehrbestimmung der NRBC durch den Cell Dyn 3500.

	Ratio NRBC	Ratio Neutrophile	Ratio Mononukleäre	Ratio Eosinoph. u. Basoph.	Ratio WIC/ NC aus WOC	WIC [G/l]	NC aus WOC [G/l]
Mittelwert ± SD	0,429 ± 0,306	1,074 ± 0,177	0,969 ± 0,208	0,677 ± 0,501	1,04 ± 0,06	12,88 ± 3,73	12,49 ± 3,54
Quantil 15,865 %	0,141	0,929	0,800	0,244	0,96	9,44	9,17
Median	0,368	1,066	0,957	0,556	1,03	12,55	12,26
Quantil 84,135 %	0,718	1,232	1,144	1,131	1,08	16,10	15,76
Bereich	0 - 1,556	0,670 - 1,620	0,421 - 1,690	0 - 2,564	0,86 - 1,30	5,60 - 25,70	6,26 - 24,11
p Unterschied	0,00004	<0,00001	0,03329	<0,00001	0,28747*		
Steigung	0,882	0,922	1,006	1,090	0,960*		
Konstante	9,634	0	0	0	0*		
	0,051	0,015	0,017	0,039	0,019*		
p Korrelation manuell vs. maschinell	<0,00001	0,00186	0,00001	0,00031	<0,00001*		

Tabelle 3-22 Verhältnis (Ratio) und Korrelationen zwischen manuell und maschinell (Cell Dyn 3500) erhobenen Differentialblutparametern (n=127)

Es ist jeweils die Ratio aus manueller/maschineller Differenzierung angegeben. WIC bezeichnet Impedanzmessung, WOC optische Messung im CD 3500. NC aus WOC berechnet sich aus $(WOC / ((MNC \text{ manuell} \times MNC \text{ Steigung}) + (Granulozyten \text{ manuell} \times Granulozyten \text{ Steigung}) + ((Eosinophile + Basophile \text{ manuell}) \times Eosinophilen - Basophilen \text{ Steigung}))) \times (1 + NRBC \text{ manuell je WBC})$. Die Steigungen berechnen sich aus den linearen Korrelationen zwischen den einzelnen Gruppen wie MNC, Neutrophile und Eosinophile/ Basophile.

* Korrelation zwischen WIC und NC aus WOC (siehe auch Abbildung 3-8).

Zusammenfassend kommen im Impedanzkanal (WIC) wesentlich mehr Zellen zur Zählung als im optischen Kanal (WOC) (13,8%). Der Unterschied läßt sich einerseits durch im Median 5 Normoblasten je 100 im optischen Kanal gezählter Zellen sowie durch die durch verlängerte

Erythrozytenlysezeit zugrunde gegangenen Neutrophilen (6%) erklären. Wird aus den Steigungskoeffizienten der Regressionen die kernhaltige Zellzahl aus der optischen Messung berechnet, weist die Impedanzmessung einen im Median 3% höhere Konzentration als der berechnete Wert auf, ohne daß der Unterschied signifikant ist. Die fehlenden 3% Zellen zwischen errechnetem NC aus WOC und der im WIC Kanal bestimmten nukleären Zellkonzentration setzt sich aus avitalen Zellen aller leukozytären Zellgruppen zusammen. Die Relation bzw. Korrelation zwischen WOC/WIC und WOC/NC aus WOC unterscheidet sich ebenfalls nicht. Daher kann die optische Messung als Maßstab für die viable Leukozytenkonzentration ohne NRBC, die Impedanzmessung als Maßstab für die Kernhaltige Zellmenge angesehen werden, die Differenz aus beiden korreliert linear mit der manuell ermittelten Konzentration der Normoblasten.

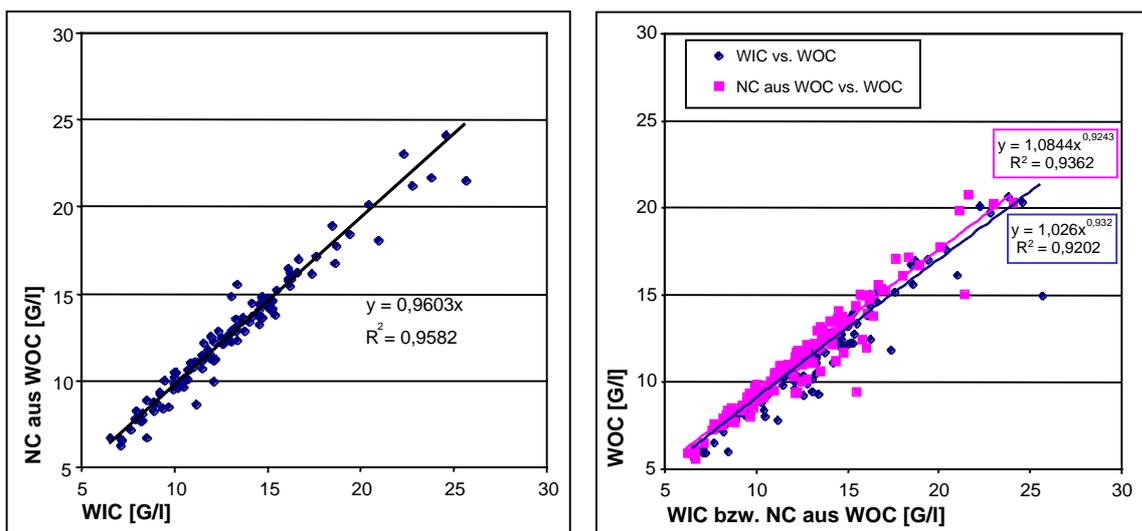


Abbildung 3-8 Korrelation zwischen NC bestimmt aus manuellen Differentialblutbild und optischer Leukozytenzählung (CD3500) sowie NC aus Impedanzmessung (CD3500)

NC aus WOC berechnet sich aus dem manuellen Blutbild, der optischen Messung am Cell Dyn 3500 und den Korrelationen zwischen manueller und maschineller Differenzierung der einzelnen Differentialblutbildparameter (siehe Legende Tabelle 3-22). Die Korrelationen zwischen WIC vs. WOC und NC aus WOC vs. WOC unterscheiden sich nicht, sie sind beide potentiell („best fit“), hingegen sind sie beide signifikant verschieden von der linearen Korrelation WIC/ NC WOC.

3.5.2 Volumenreduzierte Nabelschnurblutpräparate

Die elektronische Differenzierung der unverdünnten Messung des volumenreduzierten Präparates unterschied sich nicht von der Messung der 1:2 verdünnten Probe. Zudem konnte durch die Verwendung der 1:2 verdünnten Probe die Bestimmung der Leukozytenkonzentration im linearen Bereich des Cell Dyn 3500 erfolgen. Daher wurden die manuellen Differentialblutbilder auch aus der 1:2 Verdünnung angefertigt und mit der elektronischen Differenzierung aus dieser Probe verglichen.

Die manuell ermittelten Differentialblutbildparameter aus Proben der volumenreduzierten Präparate korrelieren mit den maschinell erhobenen Werten linear mit $x =$ manuell und $Y =$ maschinell ermitteltem Anteil für

- Neutrophilen mit $y = 0,857$, $r_{\text{linear}} = 0,296$; $p \geq 0,0011$
- Mononukleäre Zellen mit $y = 0,997x$, $r_{\text{linear}} = 0,327$; $p \leq 0,0003$
- Basophile und Eosinophile mit $y=0,873$, $r_{\text{linear}} = 0,306$; $p \leq 0,0007$
- Normoblasten mit $y=0,736x$; $r_{\text{linear}} = 0,615$; $p \leq 0,000001$

Werden die relativen Zusammensetzungen bzw. Anteile der manuellen und der maschinellen Differenzierung miteinander verglichen, ergibt sich jedoch, daß signifikant

- manuell ein höherer Anteil an Granulozyten gemessen wird als durch maschinelle Differenzierung bestimmt ($p \leq 0,000005$)
- manuell ein niedrigerer Anteil an mononukleären Zellen bestimmt wird ($p \leq 0,0006$)

Der Unterschied in der aus manuellen und maschinellen Zählung ermittelten Normoblastenkonzentration je 100 Leukozyten unterscheidet sich nicht ($p=0,13$).

Wird aus der optischen Zählung unter Berücksichtigung der manuell ermittelten NRBC je 100 WBC die nukleäre Zellzahl ermittelt ($NC \text{ aus } WOC = WOC \times (1 + (\text{Normoblasten je } 100WBC/100))$), zeigt sich keine Differenz zu den im Impedanzkanal ermittelten Werten (WIC) ($p=0,193$). Die aus der optischen Zählung und der manuellen Differenzierung gewonnenen nukleären Zellkonzentrationen ($NC \text{ aus } WOC, y$) korrelieren mit der in der Impedanzmessung ermittelten Werten (WIC, x) linear:

$$y = 0,995x - 0,39; r_{\text{linear}} = 0,966; p < 0,0000001.$$

	Neutrophile	Mononukleäre	Eosinophile und Basophile	Normoblasten je 100 WBC
Mittelwert ± SD	60,1 ± 14,6	36,7 ± 14,3	3,2 ± 2,8	14,8 ± 15,9
unteres Quantil	46	24	1	3
Median	61	36	2	9
oberes Quantil	73	49	6	29
Bereich	8 - 92	7 - 89	0 - 14	0 - 79

Tabelle 3-23 Ergebnisse manueller Differenzierung von volumenreduzierten Nabelschnurblutpräparaten (n=130)

Aufgeführt sind nur die Ergebnisse derjenigen Proben, von denen das komplette maschinelle sowie das komplette manuelle Differentialblutbild vorlag.

	Neutrophile	Mononukleäre	Eosinophile und Basophile	Normoblasten je 100 WBC
Mittelwert ± SD	53,8 ± 7,7	41,1 ± 7,4	4,5 ± 1,8	16,6 ± 9,2
unteres Quantil	46,2	34,9	2,9	9,3
Median	54,9	40,6	4,1	14,6
oberes Quantil	60,4	47,1	6,4	21,4
Bereich	25,5 - 67,7	15,3 - 63,9	1,3 - 10,0	3,3 - 55,6

Tabelle 3-24 Ergebnisse der maschinellen Differenzierung von volumenreduzierten Nabelschnurblutpräparaten mittels Abott Cell Dyn 3500 (n=130)

Aufgeführt sind nur die Ergebnisse derjenigen Proben, von denen das komplette maschinelle sowie das komplette manuelle Differentialblutbild vorlag.

	Ratio Neutrophile	Ratio Mononukleäre	Ratio Eosinophile u. Basophile	Ratio Normoblasten	WIC [G/l]	WOC [G/l]	NC aus WOC [G/l] **
Mittelwert	1,132	0,903	0,892	0,869	53,4	46,0	53,8
± SD	± 0,295	± 0,350	± 0,802	± 0,709	± 19,7	± 17,0	± 20,7
unteres Quantil	0,905	0,612	0,298	0,273	35,0	30,6	32,9
Median	1,128	0,873	0,674	0,680	50,0	44,2	50,7
oberes Quantil	1,379	1,167	1,494	1,496	74,4	62,6	78,2
Bereich	0,155 -2,392	0,159 - 2,092	0,154 - 5,455	0 - 3,938	13,4 -124,4	11,4 - 110,4	12,3 - 131,4
p Unterschied	0,00001	0,000549	0,000007	0,128509		< 0,000001*	0,193260**
Steigung ± Standardfehler der Steigung	1,105 ± 0,024	0,882 ± 0,030	0,690 ± 0,052	0,736 ± 0,047		0,860 ± 0,006*	0,995 ± 0,008**
Konstante	0	0	0	0		0*	-0,3914**
r _{lin}	0,296	0,326	0,306	0,615		0,979*	0,966**
p Regression	0,00115	0,00031	0,00074	<0,000001		< 0,000001*	< 0,000001**

Tabelle 3-25 Korrelationen zwischen manueller und elektronischer Differenzierung mittels Cell Dyn 3500 von volumenreduzierten Nabelschnurblutpräparaten (n=130)

Die Ratio berechnet sich aus manueller / maschineller Differenzierung. Der Anteil, der maschinell gegenüber manueller Zählung zu wenig an Neutrophilen bestimmt wird, wird an Mononukleären Zellen zuviel bestimmt. NC aus WOC errechnet sich aus $WOC * (NRBC \text{ je } 100 \text{ WBC}/100+1)$

* Korrelation und Unterschied zu WIC

** Korrelation und Unterschied zu WIC

Zusammenfassend entsprechen die in der Impedanzmessung gezählten den kernhaltigen Zellen, die in der optischen Messung gezählten Zellen den Leukozyten. Die Differenz aus beiden Messungen entspricht manuell ermittelten Konzentration der NRBC, es findet sich kein signifikanter Unterschied in der manuell und maschinell bestimmten NRBC Konzentration. Deutliche Unterschiede finden sich zwischen der manuellen und maschinellen Differenzierung von Neutrophilen und mononukleären Zellen. Werden manuelle und maschinelle Zählung miteinander verglichen, findet sich der Anteil, der maschinell gegenüber manueller Zählung zu wenig an Neutrophilen bestimmt wird, an mononukleären Zellen zuviel bestimmt.

3.6 Vergleich der maschinellen Differenzierung mittels Coulter ACT und Cell Dyn 3500

Berücksichtigt in dieser Analyse sind nur diejenigen Proben, bei denen sowohl mittels Abott Cell Dyn 3500 als auch durch Coulter ACT das komplette Blutbild bestimmt wurde.

Deutliche Unterschiede ergeben sich für die Differenzierung der beiden Geräte:

Mittels Impedanz - gesteuerter Differenzierung werden sowohl vor als auch nach Volumenreduktion signifikant mehr mononukleäre Zellen im Ausgangspräparat ermittelt als mittels optischer Differenzierung durch CD3500 . Bei der Messung vor Volumenreduktion finden sich durch Coulter ACT im Median 10% mehr mononukleäre Zellen als durch optische Differenzierung, in volumenreduzierten Präparaten bei Vergleich der unverdünnten Proben 18% und bei Vergleich der 1:2 verdünnten Proben 26% mehr Mononukleäre als durch Differenzierung durch Abott CD3500. Normoblasten werden als solche im ACT nicht erkannt.

Die nukleäre Zellzahlbestimmung durch den Coulter ACT (ACT) korreliert sehr gut mit der entsprechenden Impedanzählung des Abott Cell Dyn 3500 (WIC). So findet sich für Nabelschnurblut

- vor Volumenreduktion ACT= 0,972 WIC mit $r^2 = 0,9311$
- nach Volumenreduktion aus der unverdünnten Probe ACT= 1,028 WIC, $r^2 = 0,9897$
- nach Volumenreduktion aus der 1:2 verdünnten Probe ACT= 0,966 WIC, $r^2 = 0,9926$

Im Vollblut werden somit durch Coulter ACT (ACT)weniger Zellen gezählt als im Impedanzkanal (WIC) des Abott Cell Dyn 3500 ($p = 0,003$). Hingegen ist der Unterschied zwischen der ACT- und der WIC –Bestimmung aus Hespan® - volumenreduzierten Präparaten nicht signifikant. Die Differenzen, Relationen, deren Median und Vertrauensbereiche des Medians finden sich in Tabelle 3-26.

	vor Volumenreduktion		nach Volumenreduktion			
	Δ WIC- ACT [G/l]	Ratio WIC/ACT	Δ WIC- ACT [G/l]	Ratio WIC/ACT	Δ WIC- ACT [G/l]	Ratio WIC/ACT
Verdünnung	unverdünnt		unverdünnt		1:2 verdünnt	
Minimum	-3,2	0,7	-6,3	0,8	-5,5	0,8
unterer Grenze Vertr.B.	-0,41	0,969	-2,91	0,933	-2,66	0,940
unteres KI d. Medians	0,15	1,012	-0,18	0,996	0,08	1,003
Median	0,3	1,020	0,0	1,0	0,31	1,020
oberes KI d. Medians	0,36	1,034	0,48	1,014	0,71	1,023
obere Grenze Vertr.B.	1,43	1,101	2,18	1,062	2,16	1,066
Maximum	1,8	1,1	5,5	1,2	2,6	1,1
p WIC vs. ACT	0,003		0,929		0,103	

Tabelle 3-26 Absolute und relative Abweichungen zwischen Impedanzmessung Cell Dyn 3500 und Impedanzmessung Coulter ACT (n=77).

WIC bedeutet Impedanzmessung Cell Dyn 3500, ACT Leukozytenbestimmung im Coulter ACT, Vertr.B. Vertrauensbereich, KI Konfidenzintervall. Unterschiede sind nur vor Volumenreduktion signifikant.

Verdünnung	Vor Volumenreduktion		Nach Volumenreduktion			
	1:1		1:1		1:2	
	Δ MNC _{ACT} [%]- MNC _{CD3500} [%]	Ratio MNC _{ACT} [%] / MNC _{CD3500} [%]	Δ MNC _{ACT} [%]- MNC _{CD3500} [%]	Ratio MNC _{ACT} [%] / MNC _{CD3500} [%]	Δ MNC _{ACT} [%]- MNC _{CD3500} [%]	Ratio MNC _{ACT} [%] / MNC _{CD3500} [%]
Mittelwert ± SD	4,804 ± 2,987	1,116 ± 0,076	7,458 ± 4,373	1,191 ± 0,128	11,214 ± 5,815	1,279 ± 0,161
unteres Quantil	1,721	1,049	3,972	1,086	5,451	1,129
Median	4,426	1,100	6,863	1,179	10,086	1,258
oberes Quantil	7,807	1,195	12,168	1,273	18,584	1,417
Bereich	-1,772 - 15,39	0,950 - 1,317	-2,659 - 22,3295	0,931 - 1,688	-1,41 - 24	0,963 - 1,737

Tabelle 3-27 Vergleich der Differenzierung Coulter ACT und Cell Dyn 3500 (n=77)

Aufgrund der fehlenden Erkennung von Normoblasten werden diese als Lymphozyten im Coulter ACT differenziert. Insbesondere bei der für die Messung der volumenreduzierten notwendigen 1:2 Vorverdünnung (siehe Kapitel 3.3.2.1) tritt daher eine große Abweichung zwischen den manuell bestätigten Werten des Cell Dyn 3500 und des Coulter ACT auf.

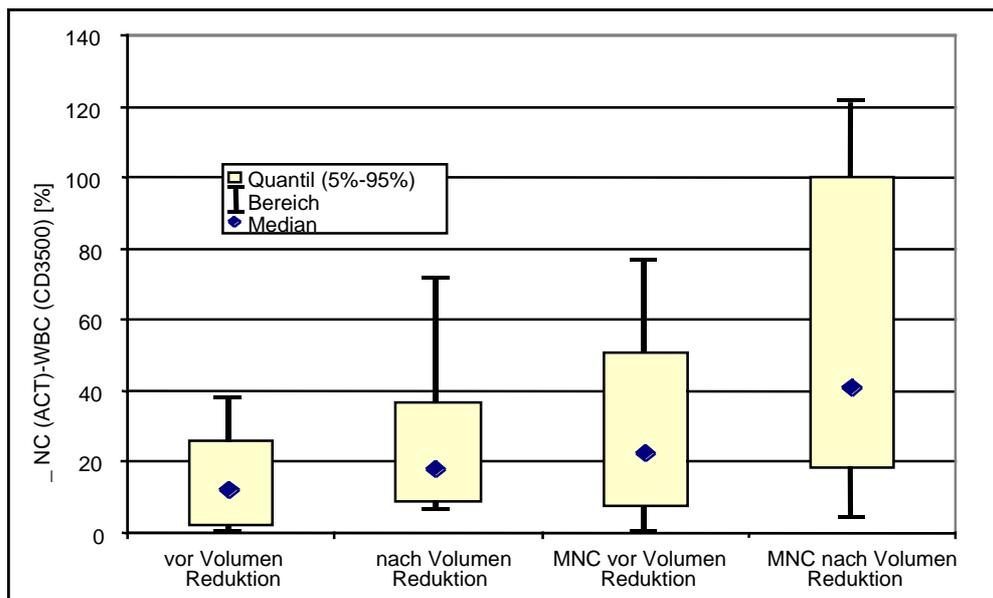


Abbildung 3-9 Vergleich der WBC und MNC Zählung durch Coulter ACT und Abott Cell Dyn 3500 zur CB Qualitätskontrolle

Aufgezeichnet sind die Differenzen zwischen den Ergebnissen aus der Leukozytenzahlbestimmung mittels Coulter ACT und Cell Dyn 3500 vor und nach Volumenkonzentration. Die Differenzen beziehen sich auf die Ergebnisse der Zählung mit Abott CD 3500 (n=77).

3.7 Manuelle Leukozytenzählung

Bei 37 ausgezählten Proben aus nicht volumenreduzierten Nabelschnurblutpräparaten fanden sich im Median 10,9 G/l nukleäre Zellen (mit einem der Standardabweichung entsprechenden Konfidenzintervall von 7,9 bis 14,8; Bereich 4,6 bis 31). Die mittels Kammerzählung bestimmte Konzentration (NC) korreliert linear mit der durch Impedanzmessung (WIC) bestimmten nukleären Zellkonzentration (Median 10,2, KI Bereich 8,32-14,3; Gesamtbereich 6,78-32,6), mit $NC = 1,009WIC$; $r^2=0,8389$. Mit der optischen Messung (WOC) des Cell Dyn 3500 korreliert die Zellzahlbestimmung mittels Kammer im Rahmen eines „best fit“ Modells potentiell $NC = 3,2371 WOC^{0,4978}$ ($r^2 = 0,6023$) wie auch die Impedanz- und optische Messung untereinander. Es werden mittels Kammerzählung und Impedanzmessung deutlich mehr Zellen als weiße Blutzellen gezählt als mittels optischer Messung. Insbesondere bei höheren Zellkonzentrationen ist diese Abweichung größer.

Mittels Kammerzählung werden also die gleichen Zellen (alle kernhaltigen Zellen) gezählt, wie mit der Impedanzmessung erfasst werden.

	NC Kammer [G/l]	WIC [G/l]	WOC [G/l]
Mittelwert ± SD	11,5 ± 4,7	11,8 ± 4,6	10,9 ± 2,6
u Quantil	7,9	8,3	8,4
Median	10,9	10,2	10,2
o Quantil	14,8	14,3	13,5
Bereich	4,6 - 31	6,78 - 32,6	6,78 - 16,9

Tabelle 3-28 Vergleich der Kammerzählung mit Abbott CD3500 aus nicht volumenreduzierten Proben (n=37)

Bei 11 aufgetauten Vollblutproben zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen der Kammerzählung (NC) und dem WIC Wert, ebenso zwischen der Kammerzählung und dem WOC Wert ($WIC=1,125 \times NC$, $r^2=0,936$; $WOC=1,002 \times NC$ $r^2=0,998$). Die Unterschiede in der Korrelation zwischen NC und WOC vor und nach Kryokonservierung weisen darauf hin, daß durch das Einfrieren / Auftauen Zellen zerstört werden, welche im frischen Präparat zur Differenz zwischen WIC und WOC beitragen (siehe Abbildung 3-10).

	NC Kammer [G/l]	WIC [G/l]	WOC [G/l]
Mittelwert ± SD	5,6 ± 1,8	6,3 ± 2,0	5,6 ± 1,8
u Quantil	3,9	4,3	3,8
Median	5,6	6,8	5,7
o Quantil	7,4	7,8	7,4
Bereich	3,2 - 8,6	3,3 - 10,2	3,2 - 8,6

Tabelle 3-29 Vergleich Kammerzählung mit Abbott CD3500 aus nicht volumenreduzierten aufgetauten Proben (n=11)

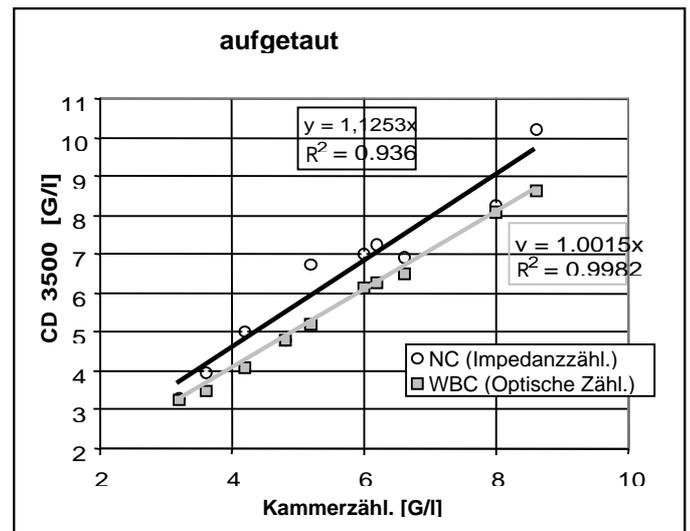
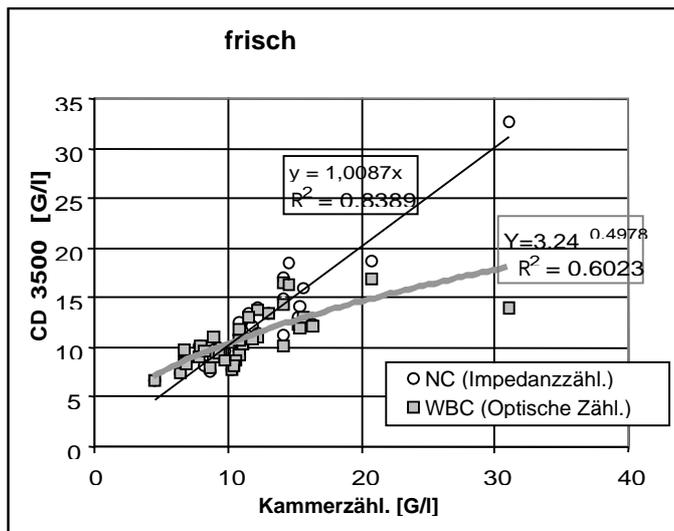


Abbildung 3-10 Korrelation zwischen manuell und mittels Cell Dyn 3500 ermittelter Leukozytenkonzentration aus nicht volumenreduzierten Präparaten.

Der NC (Impedanzzählung) korreliert linear mit den Ergebnissen der Kammerzählung in frischen und aufgetauten Präparaten, während der WBC (optische Zellzählung) mit dem NC in frischen Präparaten potentiell, in aufgetauten Präparaten linear korreliert.

3.8 Einfluß des Geburtsweges auf die Zusammensetzung des Nabelschnurblutes

Der Geburtsvorgang hat auf folgende Parameter einen Einfluss:

Das nach Sectio gewonnene Volumen unterscheidet sich nicht von dem nach vaginaler Geburt ($97 \pm 21,6$ vs. $98,3 \pm 22,2$ ml), werden alle Präparate betrachtet (siehe Tabelle).

Jedoch wird seit Anhebung der Volumenmindestgrenze des zu verarbeitenden Präparates auf mindestens 80ml ab 21.07.1998, bei 974 nach vaginaler Entbindung gewonnener Präparate ein niedrigeres Volumen gefunden als bei 92 nach sectio gewonnener Präparate. Alle diese 1066 Präparate wurden volumenreduziert. Nach Sectio fand sich zudem eine höhere relative Lymphozyten- und Eosinophilen - Konzentration als nach vaginaler Entbindung.

CB nach Sectio wiesen eine niedrigere Konzentration an nukleären Zellen, an Leukozyten, an Neutrophilen (relative und Zellkonzentration), Monozyten, (relative und Zellkonzentration), Lymphozyten Zellkonzentration Eosinophilen (gesamt Zellkonzentration) und Basophilen Gesamtzellkonzentration sowie weniger Leukozyten und Mononukleäre Zellen insgesamt auf. Keinen Einfluß hat der Geburtsmodus auf Hämoglobingehalt, den Hämatokrit, die Erythrozytenzahl sowie den Anteil an Eosinophilen bzw. Basophilen.

	Vaginal			Sectio			p
	Mittelwert	±	SD	Mittelwert	±	SD	
Volumen [ml]	97,93	±	19,31	104,36	±	22,43	0,00309
Alter der Mutter [y]	30,64	±	5,14	32,17	±	3,66	0,01113
WIC [G/l]	12,80	±	3,92	10,11	±	2,61	0,00000
WOC [G/l]	10,82	±	3,10	8,86	±	2,41	0,00000
NRBC VB [G/l]	1,99	±	1,45	1,28	±	0,56	0,00001
NRBC je 100 WBC	18,5	±	12,1	14,8	±	7,1	0,00543
Neutrophile [%]	53,3	±	8,7	51,5	±	9,7	0,03528
Lymphozyten [%]	34,2	±	8,3	37,1	±	9,3	0,00064
Monozyten [%]	8,3	±	3,4	6,9	±	3,3	0,00005
Eosinophile [%]	3,3	±	2,1	3,8	±	2,4	0,04016
Basophile [%]	0,9	±	1,0	0,8	±	0,9	0,26070
Ery [T/l]	3,53	±	0,42	3,52	±	0,37	0,92062
Hb [g/dl]	12,7	±	1,4	12,6	±	1,2	0,59908
Hkt [%]	38,3	±	4,6	38,0	±	3,9	0,67383
Plt [G/l]	224,9	±	41,7	209,7	±	43,9	0,00081
Neu [G/l]	5,87	±	2,23	4,68	±	1,90	0,00000
Ly [G/l]	3,61	±	1,09	3,17	±	0,84	0,00071
Mo [G/l]	0,89	±	0,44	0,62	±	0,34	0,00000
Eo [G/l]	0,35	±	0,22	0,32	±	0,20	0,16535
Baso [G/l]	0,09	±	0,11	0,07	±	0,08	0,01435
NRBC [10 ⁸ /Präparat]	1,97	±	1,65	1,32	±	0,86	0,00021
WBC [10 ⁸ /Präparat]	10,69	±	4,09	9,31	±	3,52	0,00175
MNC [10 ⁸ /Präparat]	4,43	±	1,60	4,00	±	1,41	0,01326

Tabelle 3-30 vor Volumenreduktion: Einfluss des Geburtsverhaltens auf die Zusammensetzung des CB

Die Werte beziehen sich auf die Präparate, die ein Mindestvolumen von 80ml vor der Weiterverarbeitung aufwiesen (974 Präparate nach vaginaler Entbindung, 92 nach Sectio). Signifikante Unterschiede (und höhere Werte) sind fett gedruckt, ebenfalls die Signifikanzniveaus des Unterschiedes

Die Mütter, bei denen einen Kaiserschnitt erfolgte, sind älter als die Mütter, die das Kind vaginal gebären.

Das Ergebnis aus den Präparaten vor Weiterverarbeitung setzt sich in den entsprechenden volumenreduzierten Präparaten fort. Auch hier finden sich mehr kernhaltige Zellen, mehr Leukozyten, eine höhere relative Konzentration an Monozyten sowie eine niedrigere relative

Konzentration an Lymphozyten, insgesamt mehr mononukleäre Zellen, mehr Leukozyten und mehr kernhaltige Erythrozyten je Präparat.

3.9 Einfluß des Geschlechtes auf die Zusammensetzung des Nabelschnurblutes

Nabelschnurblutpräparate von weiblichen Kindern zeigen eine geringere relative Lymphozytenkonzentration und Konzentration der Eosinophilen (relativ und insgesamt) auf. Sie weisen eine höhere nukleäre Zellkonzentration, höhere Leukozytenkonzentration sowie Gehalt, höheren Gehalt an Neutrophilen und eine höhere Monozytenkonzentration als CB von männlichen Spendern auf.

	weiblich			männlich			
	Mittel	± SD	Median	Mittel	± SD	Median	p
Volumen [ml]	30,6	± 5,0	31,1	30,4	± 5,2	30,8	0,74250
Alter der Mutter [y]	97,8	± 20,0	94,0	98,2	± 21,4	94,0	0,52397
WIC [G/l]	12,8	± 4,2	12,2	12,1	± 3,7	11,6	0,00039
WOC [G/l]	10,9	± 3,3	10,5	10,3	± 3,0	9,9	0,00003
NRBC VB [G/l]	1,9	± 1,7	1,6	1,8	± 1,4	1,5	0,32398
NRBC je 100 WBC	17,5	± 16,0	14,3	18,4	± 17,9	14,9	0,47513
Neutrophile [%]	54,4	± 9,3	55,2	52,4	± 11,0	52,7	< 0,00001
Lymphozyten [%]	33,2	± 9,2	32,1	35,1	± 11,3	34,1	0,00012
Monozyten [%]	8,4	± 3,4	8,6	8,8	± 9,1	8,8	0,95171
Eosinophile [%]	3,0	± 1,8	2,7	4,2	± 9,1	3,3	< 0,00001
Basophile [%]	0,9	± 1,2	0,9	1,4	± 9,0	1,0	0,27908
Ery [T/l]	3,42	± 0,48	3,43	3,50	± 0,46	3,51	0,00003
Hb [g/dl]	12,4	± 1,9	12,4	12,6	± 1,5	12,6	0,00405
Hkt [%]	37,1	± 5,3	37,3	37,8	± 5,2	38,0	0,00164
Plt [G/l]	223,0	± 48,1	224,0	219,2	± 45,6	217,5	0,10580
Neu [G/l]	6,08	± 2,36	5,70	5,48	± 2,11	5,24	< 0,00001
Ly [G/l]	3,51	± 1,10	3,36	3,50	± 1,05	3,40	0,90973
Mo [G/l]	0,93	± 0,47	0,90	0,87	± 0,41	0,80	0,00307
Eo [G/l]	0,33	± 0,20	0,30	0,39	± 0,25	0,30	< 0,00001
Baso [G/l]	0,10	± 0,11	0,10	0,10	± 0,14	0,10	0,92511
NRBC [10 ⁸ /Präparat]	1,83	± 1,74	1,44	1,81	± 1,58	1,41	0,73950
WBC [10 ⁸ /Präparat]	10,81	± 4,29	10,02	10,24	± 4,05	9,55	0,00364
MNC [10 ⁸ /Präparat]	4,37	± 1,64	4,09	4,32	± 1,63	4,04	0,58268

Tabelle 3-31 Einfluss Geschlecht des Kindes auf CB

Signifikante Unterschiede (und höhere Werte) sind fett gedruckt, ebenfalls die Signifikanzniveaus des Unterschiedes

Nach Volumenreduktion weisen Präparate von männlichen Spendern eine höhere relative NRBC Konzentration, sowie eine höhere relative Lymphozyten - und Eosinophilen - Konzentration auf. Die Präparate von weiblichen Spendern weisen eine höhere Neutrophilenkonzentration sowie eine höhere Gesamtleukozytenzahl auf.

	weiblich			männlich			p
	Mittel	±SD	Median	Mittel ±	SD	Median	
WIC [G/l]	43,95	±20,92	39,8	42,80 ±	20,95	40,0	0,4514
WOC [G/l]	37,62	±17,92	34,0	35,88 ±	16,90	33,3	0,1405
NRBC VB [G/l]	6,89	±4,51	6,0	7,16 ±	5,74	6,0	0,3750
NRBC je 100 WBC	17,7	±13,4	16,7	21,3 ±	26,9	17,7	0,0234
Neutrophile [%]	56,8	±9,5	57,2	54,7 ±	13,1	54,8	< 0,0001
Lymphozyten [%]	30,3	±9,1	30,1	33,1 ±	13,9	32,5	0,0003
Monozyten [%]	9,1	±3,8	8,9	9,8 ±	12,9	8,6	0,9059
Eosinophile [%]	2,9	±1,8	2,6	4,2 ±	12,2	3,0	0,0001
Basophile [%]	0,8	±1,4	0,8	1,6 ±	12,3	0,8	0,7137
Ery [T/l]	3,74	±1,15	3,62	3,81 ±	1,12	3,66	0,2274
Hb [g/dl]	14,1	±3,9	13,6	14,3 ±	3,6	13,8	0,2906
Hkt [%]	40,5	±12,5	39,4	40,9 ±	11,8	39,7	0,5069
Plt [G/l]	505,7	±340,8	388,0	489,9 ±	323,1	382,0	0,5055
NRBC [10 ⁸ /Präparat]	1,68	±1,59	1,52	1,76 ±	1,41	1,51	0,4016
WBC [10 ⁸ /Präparat]	9,78	±3,92	9,16	9,11 ±	3,73	8,45	0,0087
MNC [10 ⁸ /Präparat]	3,72	±1,34	3,50	3,68 ±	1,35	3,46	0,7028

Tabelle 3-32 Einfluß des Geschlechtes des Spenders auf den Zellgehalt in volumenreduzierten CB

Signifikante Unterschiede (und höhere Werte) sind fett gedruckt, ebenfalls die Signifikanzniveaus des Unterschiedes

Zusammenfassend hat der Entbindungsmodus Einfluß auf die NRBC Konzentration, während diese unabhängig vom Geschlecht des Kindes ist. Der Einfluss des Geburtsmodus schlägt sich ebenso noch im volumenreduzierten Präparat nieder.

	weiblich	männlich	insgesamt
Vaginale Entbindung	1,89±1,23	1,90±1,47	1,88±1,34
Kaiserschnitt	1,22±0,52	1,31±0,66	1,26±0,58
insgesamt	1,83±1,12	1,86±1,43	1,84±1,31

Tabelle 3-33 Gesamtzahl kernhaltiger Erythrozyten (NRBC)) vor Aufarbeitung in Abhängigkeit vom Geschlecht und Entbindungsart [10^8 /Transplantat]

NRBC wurden als Differenz aus WBC und NC Zählung ermittelt. Nach vaginaler Geburt findet sich eine deutlich höhere NRBC Konzentration als nach Kaiserschnitt. Der Unterschied zwischen vaginaler Entbindung und Kaiserschnitt ist signifikant.

	Weiblich	Männlich	insgesamt
Vaginale Entbindung	1,87±1,25	1,85±1,33	1,85±1,29
Kaiserschnitt	1,25±0,51	1,42±0,74	1,33±1,33
insgesamt	1,82±1,21	1,81±1,29	1,81±1,25

Tabelle 3-34 Gesamtzahl kernhaltiger Erythrozyten (NRBC) im volumenreduzierten Präparat in Abhängigkeit vom Geschlecht des Kindes und der Entbindungsart [10^8 /Transplantat]

NRBC wurden als Differenz aus WBC und NC Zählung ermittelt. Nach Hespan® Volumenreduktion finden sich nach vaginaler Geburt deutlich mehr NRBC insgesamt als nach Kaiserschnitt. Der Unterschied zwischen vaginaler Entbindung und Kaiserschnitt ist signifikant.

3.10 Zellzahlbestimmung aus kryokonservierten Proben

Von 187 unsepariert und 33 volumenreduzierten Präparaten wurde die Zellzahl mit dem Abbot Cell Dyn 3500 sowohl aus dem Präparat vor der Kryokonservierung als auch aus einem Kryoaliquot nach Kryokonservierung ermittelt. In den Vergleich gingen nur diejenigen Präparationen ein, bei denen innerhalb von 10' nach Auftauen aus dem Kryoaliquot die Zellzahl bestimmt wurde.

In allen Messungen zeigte sich, daß die optische Differenzierung der aufgetauten Proben nicht mehr möglich war. Insgesamt nahmen die Zellen im optischen Kanal deutlich an Größe ab, insbesondere Granulozyten. Ein Teil dieser Granulozyten ist aber noch nicht soweit degeneriert, daß sie unter den Größenschwellenwert fallen und werden fälschlicherweise als Lymphozyten differenziert (siehe Abbildung 3-11, Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13)

Die aus den Kryoaliquouts bestimmten Zellzahlen (WIC aufg. bzw. WOC aufg.) korrelieren mit der aus der optischen Messung bestimmten Zellzahl (WOC) in folgender Weise

- in unseparierten Präparaten WIC aufg. = 1,061 x WOC, $r^2 = 0,7613$. Der Unterschied zwischen WIC aufg. und WOC ist nicht signifikant, es werden im Median 0,6 G/l mehr Zellen mittels WIC aufg. als mit WOC gemessen.
- in volumenreduzierten Präparaten WIC aufg. = 1,014 x WOC, $r^2 = 0,8343$. Der Unterschied zwischen WIC aufg. und WOC ist nicht signifikant, es werden im Median 0,47 G/l mehr Zellen mittels WIC aufg. als mit WOC gemessen.

Die Korrelationen zwischen WOC aufg. und WOC sowie die weiteren Werten der Korrelationen WIC aufg. WOC wie Median der Abweichung, Konfidenzintervall des Medians, Vertrauensbereich finden sich in Tabelle 3-35 und Tabelle 3-36.

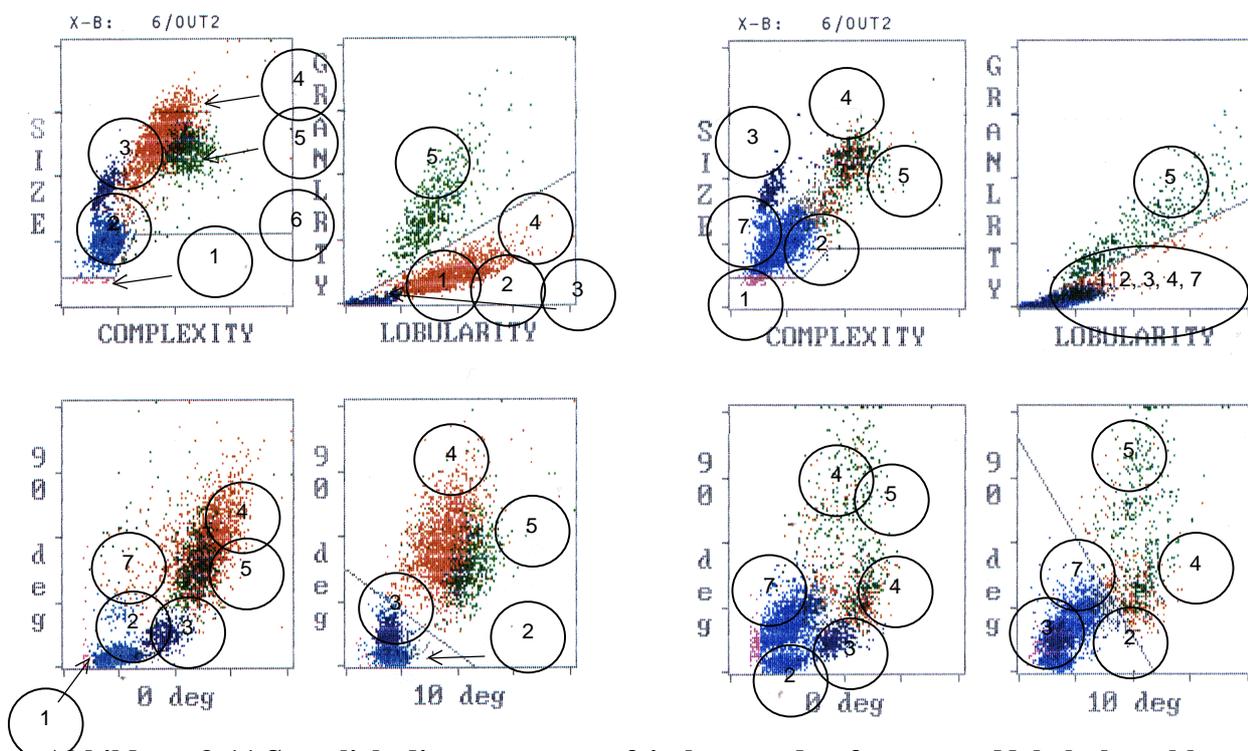


Abbildung 3-11 Streulichtdiagramme von frischem und aufgetautem Nabelschnurblut (Abbott Cell Dyn 3500)

Links findet sich ein Scattergram einer Probe vor Kryokonservierung, rechts aus dem gleichen Präparat das Scattergram eines aufgetauten Kryoaliqots. Es bedeutet 1: NRBC, 2: Lymphozyten, 3: Monozyten, 4: Neutrophile, 5: Eosinophile, 6: Basophile und Blasten, 7: tote Zellen. Die toten Zellen werden vom Gerät als Lymphozyten differenziert. Daher ist die optische Zellbestimmung aus aufgetautem Material nicht verlässlich.

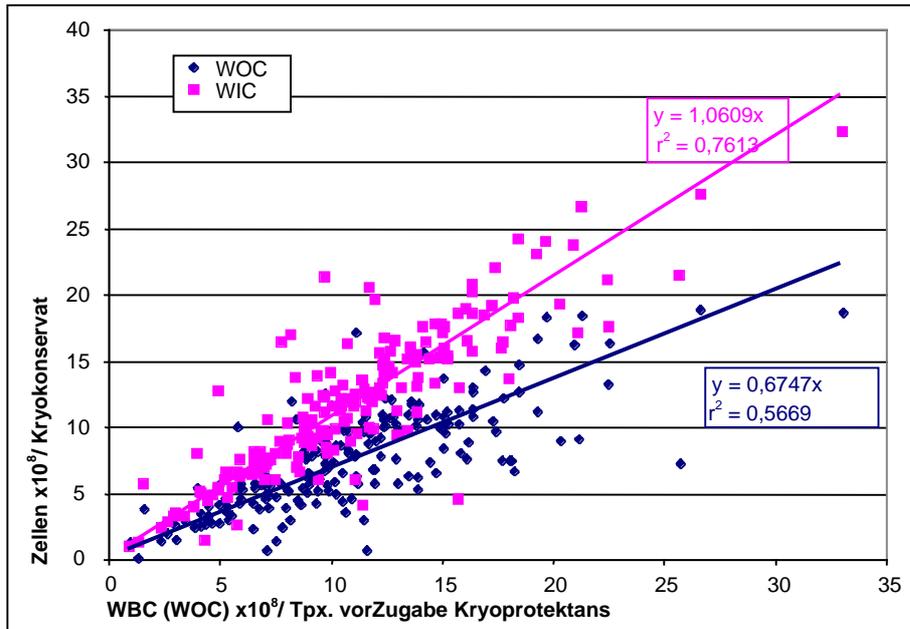


Abbildung 3-12 Korrelation zwischen Zellzahl im Kryoaliquot und Zellzahl vor Zugabe des Kryoprotektanz aus nicht volumenreduzierten Präparaten (n=187)

Es bedeuten WIC: Impedanzmessung, WOC: optische Messung. Tpx.: Transplantat. Die Impedanzmessung aus einem Kryoaliquot bietet eine sehr gute Übereinstimmung mit der Leukozytenbestimmung durch optische Messung aus dem Präparat vor Weiterverarbeitung (Steigung ≈ 1)

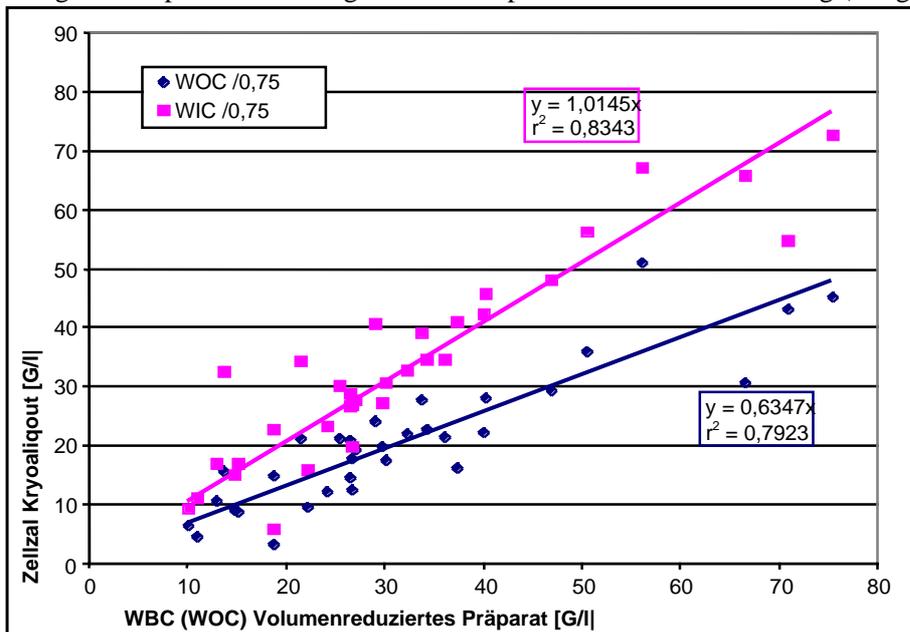


Abbildung 3-13 Korrelation zwischen Zellzahl im Kryoaliquot und Zellzahl vor Zugabe des Kryoprotektanz in volumenreduzierten Präparaten (n=33)

Es bedeuten WIC: Impedanzmessung, WOC: optische Messung. Tpx.: Transplantat. Die Impedanzmessung aus einem Kryoaliquot bietet eine sehr gute Übereinstimmung mit der Leukozytenbestimmung durch optische Messung aus dem Präparat vor Weiterverarbeitung (Steigung ≈ 1).

	Δ WIC aufg.- WOC [G/l]	Ratio WIC aufg. /WOC	Δ WOC aufg. -WOC [G/l]	Ratio WOC aufg. /WOC
Mittelwert \pm SD	0,88 \pm 2,69	1,106 \pm 0,324	-3,38 \pm 3,25	0,719 \pm 0,264
Minimum	-11,14	0,294	-18,52	0,062
Quantil 2,5%	-4,26	0,608	-11,10	0,274
unteres KI Median	0,42	1,057	-3,27	0,674
Median	0,60	1,077	-2,76	0,716
oberes KI Median	0,92	1,112	-2,31	0,749
Quantil 97,5%	7,68	2,027	2,14	1,317
Maximum	11,63	3,520	6,05	2,320
p aufg/frisch		0,111		< 0,00001

Tabelle 3-35 Differenz und Verhältnis der Messung aus Qualitätskontrolle vor Kryokonservierung und zugehörigem aufgetauten Kryoaliquot bei nicht volumenreduziert kryokonserviertem Nabelschnurblut (n=187)

Es bedeuten WIC aufg. bzw. WOC aufg. Impedanz- bzw. optische Messung am Cell Dyn 3500 aus aufgetautem Kryoaliquot, WOC Messung am CD3500 vor Kryokonservierung. Das Quantil 2,5% bis 97,5% gibt den Vertrauensbereich (Übereinstimmung) der Messung aus dem aufg. Aliquot und der Qualitätskontrolle vor Zugabe des Kryoprotektans, KI das Konfidenzintervall an. Für WIC aufg. vs. WOC findet sich nur eine geringe Abweichung von 7% (entsprechend 0,6 G/l WBC).

	Δ WIC aufg.- WOC [G/l]	Ratio WIC aufg. /WOC	Δ WOC aufg. -WOC [G/l]	Ratio WOC aufg. /WOC
Mittelwert	0,47 \pm 1,29	1,018 \pm 1,070	-10,53 \pm 11,39	0,627 \pm 0,649
Minimum	-16,33	0,305	-35,93	0,170
Quantil 2,5%	-13,72	0,628	-31,45	0,364
unteres KI Median	0,09	1,004	-12,75	0,583
Median	0,47	1,018	-10,53	0,627
oberes KI Median	3,62	1,109	-5,92	0,711
Quantil 97,5%	14,15	1,757	0,07	1,012
Maximum	18,73	2,357	1,67	1,121
p aufg/frisch		0,276		< 0,00001

Tabelle 3-36 Differenz und Verhältnis der Messung aus Qualitätskontrolle vor Kryokonservierung und zugehörigem aufgetauten Kryoaliquot bei volumenreduziertem Nabelschnurblut (n=33)

Zur Erklärung der Abkürzungen sei auf Legende der Tabelle 3-35 verwiesen. Für WIC aufg. vs. WOC findet sich nur eine geringe mittlere Abweichung von 7% (entsprechend 0,6 G/l WBC).

Es findet sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der Impedanzmessung aus den aufgetauten Kryoaliquots und den optischen Zellzahlmeßergebnissen der Qualitätskontrolle vor

Kryokonservierung. Die mediane Abweichung dieser beiden Messungen beträgt für unsepariert kryokonservierte Präparate 7% (Konfidenzintervall des Medians 5% bis 11%), für volumenreduzierte Präparate sogar nur 1,8% (Konfidenzintervall 0,4% bis 10,9%). Die Impedanzmessung aus dem Kryoaliquot kann daher als Maßstab für die Zellzahl im Transplantat (Graft Cell Dose) gelten. Zudem ist der Unterschied zwischen der Impedanzmessung aus dem Kryoaliquot und der optischen Messung vor Kryokonservierung erheblich geringer als die Zahl der maschinell bestimmten kernhaltigen Erythrozyten und entspricht der Größenordnung, die als Mindermessung durch verlängerte Erythrozytenlyse im WOC festgestellt wurde (siehe Vergleich manuelle vs. maschinelle Differenzierung, Kapitel 3.5.1, Seite 45 ff). Dies legt nahe, daß die kernhaltigen Erythrozyten nach dem Auftauen nicht mehr mittels Impedanzmessung erfasst werden. Die Korrelationen aus nicht volumenreduzierten Präparaten und volumenreduzierten Präparaten zwischen Zellzahl vor und nach dem Einfrieren unterscheiden sich nicht. Daraus ist zu schließen, daß durch die im Vergleich zu unseparierten CB höhere Zellzahl in volumenreduzierten Präparaten kein zusätzlicher Verlust durch die Kryokonservierung entsteht.

3.11 Wiederfindungsrate der einzelnen Blutbestandteile nach Volumenreduktion

Im Mittel finden sich $10,53 \pm 4,22 \times 10^8$ Leukozyten in den Nabelschnurblutpräparaten vor Volumenreduktion. Nach Volumenreduktion finden sich noch $9,43 \pm 3,82 \times 10^8$ Leukozyten in den Präparaten. Fast alle NRBC, die sich vor Volumenreduktion im Präparat befinden ($1,82 \pm 1,65 \times 10^8$), finden sich auch in den volumenreduzierten Präparaten ($1,81 \pm 1,25 \times 10^8$). Weitere Zellgehalte und deren Verteilung finden sich in Tabelle 3-37 und Tabelle 3-38.

	WBC [10^8]	MNC [10^8]	NRBC [10^8]	Hb [g]	Plt [10^8]
Mittelwert \pm SD	10,53 \pm 4,22	4,35 \pm 1,65	1,82 \pm 1,63	1239 \pm 349	219 \pm 69
Minimum	0,99	0,53	0,00	133	14
unteres Quantil	6,80	2,87	0,77	937	158
Median	9,74	4,07	1,45	1173	210
oberes Quantil	14,23	5,84	2,72	1554	280
Maximum	38,12	13,15	31,37	3775	605

Tabelle 3-37 Zellgehalte vor Volumenreduktion je Präparat, bestimmt mittels Cell Dyn 3500 (n=2176)

Die Zahl der WBC wurde durch die Konzentration der im optischen Kanal bestimmten Leukozyten berechnet, in die Zahl der NRBC geht die Differenz aus Impedanzmessung und WOC als Normoblastenkonzentration ein.

	WBC [10^8]	MNC [10^8]	NRBC [10^8]	Hb [g]	Plt [10^8]
Mittelwert \pm SD	9,43 \pm 3,82	3,70 \pm 1,34	1,81 \pm 1,25	379 \pm 119	138 \pm 106
Minimum	2,35	0,36	0,04	17	1
unteres Quantil	5,99	2,50	0,84	276	71
Median	8,74	3,49	1,54	356	96
oberes Quantil	12,69	4,94	2,69	490	214
Maximum	29,82	12,10	14,70	1117	792

Tabelle 3-38 Zellgehalte nach Volumenreduktion je Präparat, bestimmt durch Cell Dyn 3500 (n=1464)

Die Zahl der WBC wurde durch die Konzentration der im optischen Kanal bestimmten Leukozyten berechnet, in die Zahl der NRBC geht die Differenz aus Impedanzmessung und WOC als Normoblastenkonzentration ein.

Die Verteilungen der Wiederfindungsraten sind für die kernhaltigen Blutkörperchen modal verteilt (siehe Abbildung 3-15). So finden sich (Modalwert) 92% der WBC wieder im volumenreduzierten Präparat, 88% der mononukleären Zellen, 28,9% des Hämoglobins und 42,4% der Plättchen. Von den NRBC finden sich 96,7% im Endprodukt wieder.

	Recovery WBC	Recovery MNC	Recovery Hb	Recovery Plt	Recovery NRBC
Unteres Quantil	82,7%	77,1%	20,5%	32,3%	70,5%
Median	90,7%	85,8%	29,4%	42,5%	96,7%
Oberes Quantil	96,7%	93,3%	41,3%	58,8%	100%
Modalwert	92,0%	88,0%	31,0%	42,0%	98%

Tabelle 3-39 Wiederfindungsrate (Recovery) der Zellen nach Volumenreduktion (n=1464)

WBC= Leukozyten, MNC= mononukleäre Zellen, Hb = Hämoglobin, Plt = Plättchen, NRBC= nukleäre rote Zellen. Am höchsten ist die Wiederfindungsrate der NRBC.

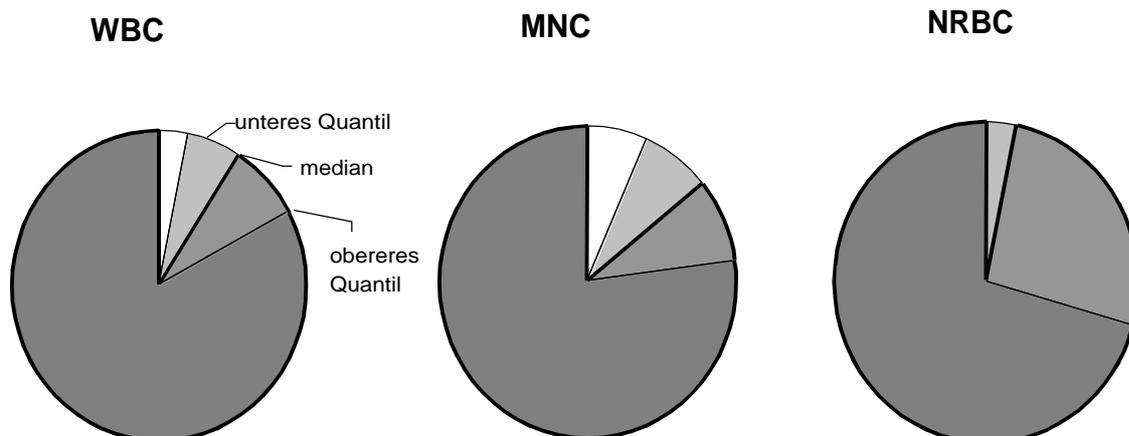


Abbildung 3-14 Wiederfindungsrate für WBC, MNC und NRBC nach Hespan® Volumenreduktion (n=1464).

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen Ausgangsleukozytenkonzentration (WOC) und dem Recovery der Leukozyten, Normoblasten, Hämoglobins und Plättchen.

Es besteht kein Zusammenhang für Leukozyten und mononukleäre Zellen zwischen Ausgangskonzentrationen und Wiederfindungsrate im volumenreduzierten Präparaten.

Bei hohem Hämatokrit, Plättchenkonzentration steigt die Wiederfindungsrate von Erythrozyten bzw. Plättchen im volumenreduzierten Präparat an.

Bei hohen Konzentrationen an Normoblasten im Ausgangspräparat ist die Wiederfindungsrate im Endpräparat etwas niedriger als bei Präparaten mit niedrigem Normoblastengehalt.

Es besteht ein negativer Zusammenhang für das Recovery mononukleärer Zellen und Volumen des Transplantates: bei größeren CB Ausgangspräparaten werden weniger mononukleäre Zellen im Endpräparat wiedergefunden als bei kleineren Präparaten.

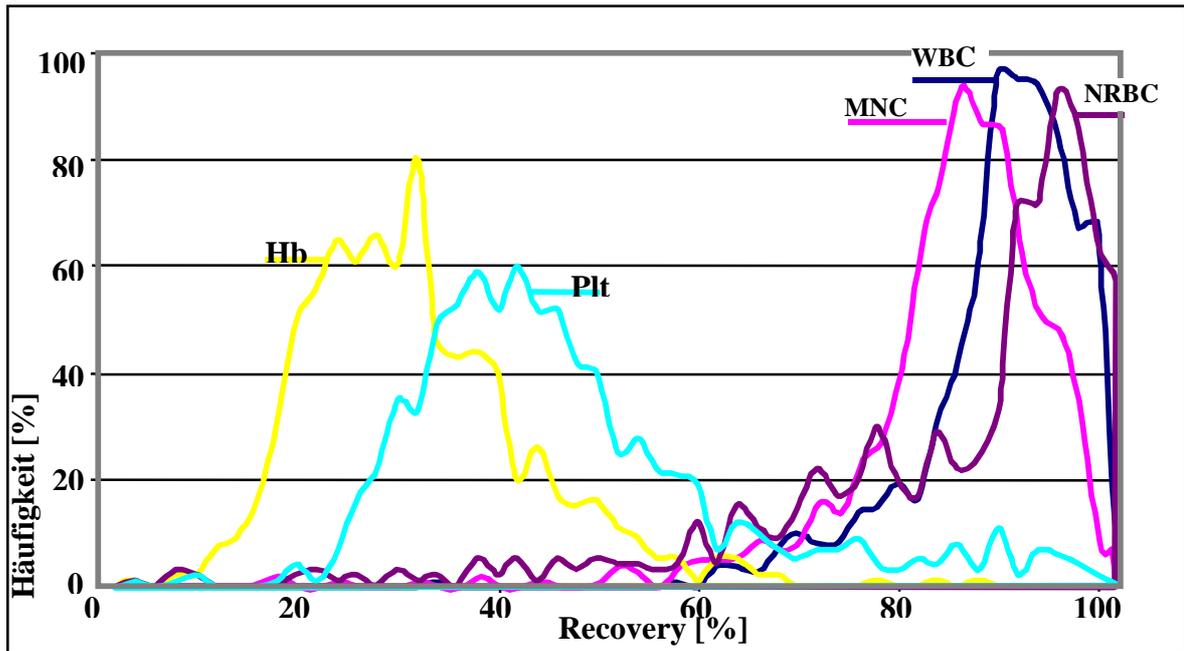


Abbildung 3-15 Verteilung der Wiederfindungsrate durch Volumenreduktion (n=1464)

Die Verteilungskurve wurde durch Zählung der Häufigkeiten von in 2% Schritten gebildeten Klassen ermittelt. Zur besseren Übersicht wurden die Punkte miteinander verbunden. NRBC weisen höchste Wiederfindungsrate nach Volumenreduktion auf.

Es besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der CB ID Nummer und der Wiederfindungsrate von Leukozyten. Da die CB ID Nummer fortlaufend vergeben wird, spiegelt sie die zunehmende Erfahrung bei der Volumenreduktion wieder. So finden sich in den ersten 200 Präparationen eine Wiederfindungsrate von 88%, in den letzten 200 Präparationen eine Wiederfindungsrate von Leukozyten von 93%.

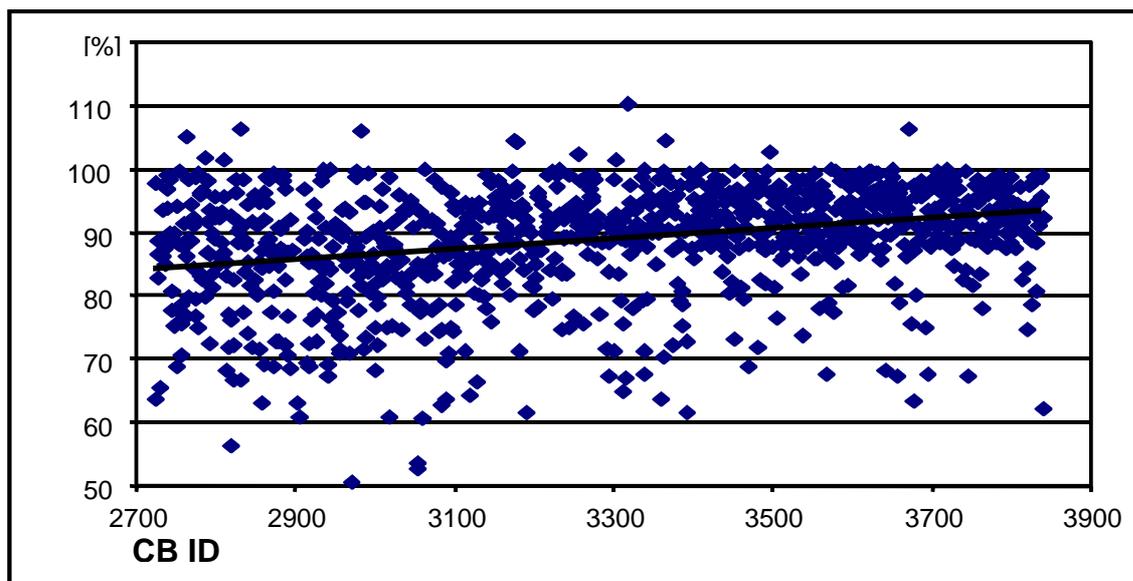


Abbildung 3-16 Wiederfindungsrate der WBC in Abhängigkeit von der Erfahrung des Präparationsteams

Da die CB ID Nummer fortlaufend vergeben wird, spiegelt eine höhere CB ID Nummer die zunehmende Erfahrung bei der Volumenreduktion wieder. Der Zusammenhang ist signifikant ($p < 0,001$)

4 Diskussion

Für alle Bereiche der Hämatologie ist es notwendig, die Leistungsfähigkeit und Grenzen eines mechanisierten Untersuchungsverfahrens im direkten Vergleich mit der entsprechenden Referenzmethode zu verstehen und zu validieren.

Seit dem ersten Bericht einer erfolgreichen verwandten allogenen Nabelschnurblut (Cord Blood) Transplantation bei einem an Fanconi - Anämie erkrankten Kind (Gluckman et al. 1989), gab und gibt es nur wenige Bereiche in der Hämatologie, welche in einem ähnlich neuen Gebiet so viele Erfolge verzeichnen können (Rubinstein et al. 1998).

Unverwandt und verwandt kann Cord Blood erfolgreich transplantiert werden (Broxmeyer et al. 1989; Wagner et al. 1995; Gluckman et al. 1998; Rubinstein et al. 1998). Dabei ist der Zellgehalt des Transplantates ein entscheidender Parameter für den Erfolg der Transplantation (Gluckman et al. 1997; González-Barca et al. 1997; Rubinstein et al. 1998).

Gerade für diese kritische Größe wie die Zellzahl gibt es im Rahmen der Cord Blood Transplantatherstellung noch keine Standards.

Bisherige Standard- oder Normwerte für Nabelschnurblut bzw. Neugeborenenblut beruhen zumeist auf manuellen Bestimmungen, insbesondere die des Differentialblutbildes (Manroe et al. 1979; NCCLS 1992).

Die Bestimmung des Leukozytenvolumens war die erste Möglichkeit Leukozyten automatisch zu differenzieren (England et al. 1975; England und Bain 1976). Dies führte zur Entwicklung von Standards, an denen sich die Geräte messen mußten und immer noch müssen (Koepke und Ross 1985; NCCLS 1992). Aber erst die Entwicklung moderner Geräte ermöglichte eine Einsparung der manuellen Differenzierung (Krause 1990; Hyun et al. 1991; Gulati et al. 1992). Doch trotz Einführung neuerer Normwerte bei Neugeborenen für Gruppen wie zu klein, zu leicht oder abhängig vom Gestationsalter sind die manuell erhobenen Differentialblutbildparameter (Oski und Naimann 1966; Manroe et al. 1979; Weinberg et al. 1983; Werman und Brown 1986) bei septischen Neugeborenen klinisch bedeutsamer als neuere elektronisch erhobene Grenzen (Engle et al. 1997), welche meist mittels Impedanz- basierter Geräte erstellt werden.

Grundsätzlich bestehen zur Zeit zwei Meßmethoden: Impedanzmessung und optische Messung. Die gelieferte Genauigkeit der WBC Zählung eines jeden Gerätes hängt jedoch von den

Einschränkungen der angewandten Zähltechnik und den Grenzen der Leistungsfähigkeit der Technologie ab.

4.1 Impedanzmessung

Die Impedanzmethode ist mit hoher Konstanz durchführbar. Ihr Wert wird jedoch durch eine geringe Genauigkeit in niedrigen und hohen Bereichen vermindert (Petit et al. 1995).

Partikel wie Plättchenaggregate, Normoblasten, Fibringerinnsel und Ähnliches führen bei der Impedanzmessung zu falsch positiv hohen Leukozytenwerten (Henderson und Wood 1986). Eine exakte Bestimmung der Leukozytenzahl bei Proben mit kernhaltigen roten Blutkörperchen ist nicht möglich (Catherine et al. 1987; Tsuji et al. 1999). Ältere Geräte, wie z.B. Coulter VCS oder Technicon H*1, welche Impedanz und optische Methoden miteinander kombinieren, überschätzen die Lymphozytenzahl gerade beim hypoxischen Neugeborenen (Johannessen et al. 1990). Nukleäre rote Blutzellen, deren Zahl mit zunehmender Hypoxie im fetalen Kreislauf ansteigt, werden dann als Lymphozyten gezählt (Thilaganathan et al. 1994a). Werden hingegen Blutproben von Erwachsenen untersucht, zeigen Impedanz – basierte Geräte wie der Coulter STKS eine hervorragende Korrelation zwischen manuellem und elektronischem Differentialblutbild. Bei normalem Differentialblutbild können durch interne logische Verknüpfungen NRBC mit einer Sensitivität von 67,3% erkannt werden, bei 11,7% falsch positiven Ergebnissen. Die Zahl der NRBC kann jedoch nicht ermittelt werden (Cornbleet et al. 1993).

Auch in der Qualitätskontrolle von Nabelschnurblutpräparaten werden die Normoblasten als Leukozyten im Impedanzkanal erfasst (Fournier et al. 1996; Hübl et al. 1998).

In den vorliegenden Untersuchungen korreliert die nukleäre Zellzahlbestimmung durch den Coulter ACT (ACT) sehr gut linear mit der entsprechenden Impedanzzählung des Abbott Cell Dyn 3500 (WIC), während die optische Zählung des Cell Dyn 3500 immer geringere Konzentrationen als ACT oder WIC ergibt. Im Vollblut werden durch Coulter ACT (ACT) etwas weniger Zellen gezählt als im Impedanzkanal (WIC) des Abbott Cell Dyn 3500, hingegen findet sich kein Unterschied zwischen der ACT- und der WIC –Bestimmung aus Hespan® - volumenreduzierten Präparaten. In diesen Präparaten mit hohen Leukozytenkonzentrationen ist die Bestimmung der nukleären Zellkonzentration durch den Impedanz -basierten Coulter ACT zudem abhängig davon, ob die Probe vorverdünnt wurde oder nicht, da in der Verdünnung

mehr Leukozyten, mononukleäre Zellen und Erythrozyten gemessen werden als in der unverdünnten Probe. Insbesondere für hohe Leukozytenwerte wird die Relation zwischen dem Ergebnis der unverdünnten und der verdünnten Probe größer als bei niedrigen Konzentrationen, ein Hinweis auf die fehlende Linearität im hohen Meßbereich, denn bei einem Verdünnungsfehler müsste die Ratio über den gesamten Konzentrationsbereich konstant bleiben. Die erhöhte Viskosität durch Volumenreduktion und über physiologischen Konzentrationen liegende Zellzahlen führen zu diesen Unterschieden, für korrekte nukleäre Zellmessungen mittels Impedanzmethode aus volumenreduzierten Präparaten muß daher eine Vorverdünnung erfolgen.

Die Impedanzkanäle, in denen die Normoblasten als Kernhaltige Zellen mit erfasst werden (s.u.), unterscheiden sich aber von Gerät zu Gerät nicht wesentlich und sind damit Gerätehersteller unabhängig.

4.2 Optische Messung

Die optische Leukozytenzählung in niedrigen und hohen Bereichen liefert zwar eine hohe Genauigkeit in niedrigen und hohen Bereichen und bessere Möglichkeiten der Leukozytendifferenzierung, doch ergeben sich Probleme bei Proben mit lyse - resistenten Erythrozyten und fragilen Leukozyten (Dörner et al. 1995; Stamminger et al. 1998; Walka et al. 1998).

4.3 Vergleich Optische - und Impedanz – basierte Messung am Abott Cell Dyn 3500

Der Cell Dyn 3500 führt zwei Zählmethoden gleichzeitig durch, Impedanz und optische, Laser - gestützte Zellzählung. Im Falle unterschiedlicher Ergebnisse empfiehlt das Gerät, eine zweite Zählung durchzuführen mit verlängerter Erythrozytenlysezeit. Dieses Vorgehen erbringt korrekte Ergebnisse für die WBC Zahl bei Neugeborenen (Dörner et al. 1995). Der Cell Dyn 3500 kann sowohl über eine verlängerte Erythrozytenlysezeit lyseresistente Erythrozyten eliminieren als auch über die Differenz der optischen und Impedanz – basierten Zellzählung Normoblasten erkennen und somit die größten Probleme der Leukozytenzahlbestimmung aus Neugeborenenblut lösen (Dörner et al. 1995; Walka et al. 1998). Werden Impedanzmessung und optische Messung an den hier untersuchten Proben verglichen, welche alle mit verlängerter Lysezeit gemessen wurden, zeigt sich, daß am Cell Dyn 3500 die optische Messung

(WOC) immer einen niedrigeren Wert erbringt als die Impedanzmessung (WIC). Die Differenz ist abhängig von der Leukozytenkonzentration: bei hohen nukleären Zellkonzentrationen (WIC) werden im Verhältnis weniger Leukozyten im optischen Kanal gemessen als bei niedrigen Konzentrationen. In einem am besten passenden Regressionsmodell („best fit“) korrelieren die beiden Werte am besten in einer potentiellen Weise ($r^2=0,8451$; $p < 0,000001$), wobei das Regressionsmodell neben dem potentiellen einen polynomischen, logarithmischen, exponentiellen und linearen Algorithmus verwendet. Wird die Differenz zwischen der WIC und WOC Messung als Maßstab für die Normoblastenkonzentration angesehen, besteht ein positiver signifikanter Zusammenhang zwischen der nukleären Zellkonzentration (WIC) und der Normoblastenkonzentration. Gerade Nabelschnurblute mit hohen Zellgehalten weisen daher auch hohe Normoblastenkonzentrationen auf. Gleiche Zusammenhänge zeigen sich beim Vergleich der manuellen Bestimmung der kernhaltigen Zellen (NC) durch Kammerzählung mit der WIC und WOC Wert Bestimmung des Cell Dyn 3500: mittels Kammerzählung werden die gleichen Zellen (alle kernhaltigen Zellen) gezählt, die mit der Impedanzmessung erfasst werden.

Bei nicht volumenreduziertem Cord Blood kommen im Impedanzkanal Kanal (WIC) wesentlich mehr Zellen zur Zählung als im optischen Kanal (WOC) (13,8%). Der Unterschied läßt sich einerseits durch im Median 5 Normoblasten je 100 im optischen Kanal gezählten Zellen sowie durch die durch verlängerte Erythrozytenlysezeit zugrunde gegangenen Neutrophilen (6%) erklären. Wird aus den Steigungskoeffizienten der Regressionen zwischen manueller und maschineller Differenzierung die kernhaltige Zellzahl aus der optischen Messung berechnet (NC aus WOC), weist die Impedanzmessung eine im Median 3% höhere Konzentration als der berechnete Wert auf, ohne daß der Unterschied signifikant ist. Die fehlenden 3% zwischen NC aus WOC und WIC Kanal setzen sich aus avitalen Zellen aller leukozytären Zellgruppen oder aus Partikeln wie Plättchenaggregate und Fibringerinnsel zusammen, welche zu falsch positiv hohen Leukozytenwerten der Impedanzmessung führen (Henderson und Wood 1986).

Die Relation bzw. Korrelation zwischen WOC/WIC und WOC/(NC aus WOC) unterscheidet sich ebenfalls nicht. Daher kann die optische Messung als Maßstab für die viable Leukozytenkonzentration ohne NRBC, die Impedanzmessung als Maßstab für die kernhaltige Zell-

menge angesehen werden, die Differenz aus beiden korreliert linear mit der manuell ermittelten Konzentration der Normoblasten.

In volumenreduzierten Präparaten entsprechen die in der Impedanzmessung gezählten Ereignisse den kernhaltigen Zellen, die in der optischen Messung gezählten Ereignisse den Leukozyten. Die Differenz aus beiden entspricht der manuell ermittelten Konzentration an Normoblasten, es findet sich kein signifikanter Unterschied in der manuell und maschinell bestimmten NRBC Konzentration. Die Differenz, die sich in der Analyse der nicht volumenreduzierten Präparate aus avitalen Zellen und Fibrin/ Plättchenpartikel ergeben hat, ist durch die mit der Volumenreduktion verbundenen Wasch- / Zentrifugationsschritte eliminiert worden.

4.4 Messbereiche

Die Zusammensetzung von Nabelschnurblutproben, welche aus der Plazenta gewonnen werden, sind abhängig von der fetalen Hämatopoese und den Geburtsbedingungen. Sie unterscheiden sich von der Zusammensetzung des Blutes im späteren Leben durch einen höheren Normoblastengehalt, größere mechanische Fragilität der Leukozyten und Lyseresistenz der Erythrozyten (Oski und Naimann 1966; Oski und Naiman 1982).

Die gängigen Blutzellzähler sind auf Erwachsenenblut eingestellt, dort liefern sie auch hervorragende Ergebnisse (Barnard et al. 1989; Korninger et al. 1998).

Eine veränderte Blutrheologie, insbesondere erhöhte Viskosität und Adhäsivität beeinflussen die Messergebnisse von Blutzellzählgeräten ungünstig (Linderkamp 1987). Nach Volumenreduktion ändern sich aufgrund der Zugabe von Hesperan®, Verdünnung des Antikoagulanz und des Anstieges der Zellkonzentration die rheologischen Parameter der zu untersuchenden Probe.

Daher wurde zur Beurteilung des gültigen linearen Bereiches anhand 1079 volumenreduzierten Transplantaten unverdünnt und 1:2 verdünnt alle Blutbildparameter bestimmt.

Verändert sich abhängig von der Ausgangskonzentration die Nichtübereinstimmung der Konzentrationen, ohne daß sich der relative Fehler ändert, handelt es sich bei dem Unterschied zwischen verdünnten und unverdünnten Proben um ein Verdünnungsproblem. Ändert sich hingegen der relative Fehler (Ratio) abhängig von der Konzentration, wird der lineare Bereich des Messgerätes überschritten .

Bekannt ist die Linearität des Cell Dyn 3500 im niedrigen Leukozytenkonzentrationsbereich (Burchert-Graeve und Kock 1996; Müller et al. 1997). Bekannt ist auch die Linearität bei Messung von Cord Blood oder Neugeborenenblut: in einer Studie, welche den Cell Dyn 3500 mit H*3 Bayer Technikon bei der Untersuchung von Neugeborenenblut vergleicht, findet sich zwar eine gute Übereinstimmung des WBC Gehaltes, aber der Vertrauensbereich der Übereinstimmung beträgt -2 bis $+1,6$ G/l WBC, welches als resultierende Differenz von bis zu $3,6$ G/l bei einem mittleren WBC Konzentration von $11,8$ G/l den Autoren recht groß erscheint (Walka et al. 1998). Die Linearität der Bestimmungen in dieser Studie war aber unabhängig von den Konzentrationen.

Unbekannt ist jedoch der lineare Bereich für mittlere bis hohe Leukozytenkonzentrationen bei Proben mit erhöhter Viskosität, wie sie bei der Messung von Blutproben aus volumenreduzierten Cord Blood Transplantaten anfallen.

In der verdünnten Probe werden im Cell Dyn 3500 8% mehr Leukozyten im optischen Kanal gezählt als aus der unverdünnten Probe ($p < 0,00007$). Für niedrigere Werte ergibt sich eine geringere Abweichung als für hohe WBC Konzentrationen, sowohl für die absolute Differenz als auch für die relative Abweichung. Somit ist für volumenreduzierte Nabelschnurblutpräparate die Linearität der WBC Messung bei Bestimmung im optischen Kanal nicht für hohe Konzentrationen gegeben. Auch im Impedanzkanal zur Messung des WIC und der Plättchen findet sich der beschriebene Zusammenhang.

Übereinstimmung zwischen unverdünnten und verdünnten Proben und damit Linearität nach (Bland und Altman 1986) findet sich bei der Qualitätskontrolle von volumenreduziertem Nabelschnurblut bei Kernhaltigen Zellen (WIC) für die Bereiche $5 \leq \text{WIC} < 60$ G/l, bei Leukozyten (WOC) für die Bereiche $5 \leq \text{WOC} < 15$ G/l und $25 \leq \text{WOC} < 35$ G/l, bei Plättchen (Plt) für den Bereich von $50 \leq \text{Plt} < 550$ G/l sowie $650 \leq \text{Plt} < 750$ G/l, bei Erythrozyten (RBC) für die Bereiche $1,75 \leq \text{RBC} < 2,25$ T/l und $2,75 \leq \text{RBC} < 3,75$ T/l, beim mittleren korpuskulären Erythrozytenvolumen (MCV) für die Bereiche $10,3 \leq \text{MCV} < 11,1$ fl, beim Hämoglobin (Hb) für die Bereiche $5,5 \leq \text{Hb} < 6,5$ g/dl, $9,5 \leq \text{Hb} < 11,5$ g/dl sowie $22,5 \leq \text{Hb} \leq 23,5$ g/dl.

In physiologischen Bereichen zeigt sich somit für die untersuchten Parameter eine ausreichende Übereinstimmung zwischen unverdünnter und verdünnter Probe.

Bei hohen Erythrozytenkonzentrationen sind die Abweichungen zwischen den beiden Messungen geringer als bei niedrigen Erythrozytenkonzentrationen, bei hohen Leukozytenkon-

zentrationen hingegen sind die Abweichungen erheblich größer als bei niedrigen Leukozytenkonzentrationen. Unabhängig von der Konzentration tritt der Unterschied zwischen unverdünnter und verdünnter Probe für die Messung des MCV, für die Messung des Hb sowie der relativen Konzentrationen von mononukleären und neutrophilen Zellen auf. Somit haben bei Messung aus mittels Hespan® volumenreduziertem Nabelschnurblutpräparaten die Leukozytenkanäle des Cell Dyn 3500 eher im niedrigeren Bereich ihren linearen Meßbereich, während die Erythrozytenzahlbestimmung bei hohen Konzentrationen linear verläuft.

Auch andere Systeme mit optischer Messung nach hydrodynamischer Fokussierung (Sysmex NE-8000) weisen eine gute Linearität auf, bei niedrigen bzw. hohen Zellkonzentration verschlechtert sich das Ergebnis. Jedoch ist der Linearitätsbereich größer als bei vorwiegend Impedanz - basierten Systemen (Coulter STKR) (Laharrague et al. 1992)

Für die Messung von Proben aus volumenreduzierten Cord Blood Transplantaten ist aufgrund der dann besseren Linearität des Messbereiches eine Vorverdünnung der Probe zur Senkung der Viskosität zu empfehlen.

4.5 Messung aufgetauter Proben mittels Cell Dyn 3500

Eine optische Differenzierung aufgetauter Proben war nicht mehr möglich. Insgesamt nahmen die Zellen im optischen Kanal deutlich an Größe ab, insbesondere die Granulozyten. Ein Teil dieser Granulozyten ist aber noch nicht soweit degeneriert, daß sie unter den Größenschwellenwert fallen und werden fälschlicherweise als Lymphozyten differenziert.

Es findet sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen der Impedanzmessung aus den aufgetauten Kryoaliquots und den optischen Zellzahlmessergebnissen der Qualitätskontrolle vor Kryokonservierung. Die mediane Abweichung dieser beiden Messungen beträgt für unsepariert kryokonservierte Präparate 7% (Konfidenzintervall des Medians 5% bis 11%), für volumenreduzierte Präparate sogar nur 1,8% (Konfidenzintervall 0,4% bis 10,9%). Die Impedanzmessung aus dem Kryoaliquot kann daher als Maßstab für die Zellzahl im Transplantat (Graft Cell Dose) gelten. Durch die im Vergleich zu unsepariertem Cord Blood höhere Zellzahl in volumenreduzierten Präparaten entsteht kein zusätzlicher Verlust durch die Kryokonservierung, der Unterschied ist kleiner als beim Vergleich der Proben aus unsepariert kryokonservierten Präparaten. Zudem ist der Unterschied zwischen der Impedanzmessung aus dem Kryoaliquot und der optischen Messung vor Kryokonservierung erheblich geringer als

die Zahl der maschinell bestimmten kernhaltigen Erythrozyten und entspricht der Größenordnung, die als Mindermessung durch verlängerte Erythrozytenlyse im WOC festgestellt wurde. Kernhaltigen Erythrozyten werden somit nach dem Auftauen nicht mehr mittels Impedanzmessung erfasst. Werden daher vor Transplantation von der Cord Blood Bank Graft Cell Dosen angegeben, die die kernhaltige Erythrozyten mit enthalten, findet sich diese Zahl beim Auftauen des Transplantates nicht mehr.

4.6 Differenzierung

Manuelle Differenzierungen sind von der Verfügbarkeit erfahrener Morphologen (Zytologen) abhängig (Dutcher 1985), insbesondere bei Proben von Neugeborenen (Lane et al. 1988). Verlässliche automatische Differenzierung würde dieses Problem lösen. Gerade in der Neonatologie kann die Automatisierung der Leukozytenzählung den Aussagewert des Blutbildes durch Standardisierung erhöhen (Bentley 1990; Charache et al. 1992).

Lyseresistente Erythrozyten, insbesondere bei Neugeborenenblut oder bei Sichelzellanämie können erheblich die Güte eines automatisierten Differentialblutbildes und die Bestimmung der Leukozytenzahl beeinflussen (Joyner und Brooks 1995).

Standard der Differenzierung ist aber nach wie vor die manuelle Auszählung (Oski und Naiman 1966; Oski und Naiman 1982; Weinberg et al. 1983; NCCLS 1992)

Daher wurden die maschinell erhobenen Differentialblutbildparameter mit den elektronisch erzeugten verglichen.

Die manuell aus unsepariertem Cord Blood ermittelten Werte (x) korrelieren mit den maschinell mittels Cell Dyn 3500 erhobenen Werten (y) linear für Gruppe der Granulozyten mit $y = 0,922x$ ($p \geq 0,002$), für die Gruppe der mononukleären Zellen mit $y = 1,006x$ ($p \geq 0,0001$), für die Gruppe der Basophilen und Eosinophilen mit $y = 1,009x$ ($p \geq 0,0003$) und für die Normoblasten mit $y = 0,882x + 9,634$ ($p \leq 0,00001$).

Werden die relativen Zusammensetzungen bzw. Anteile der manuellen und der maschinellen Differenzierung miteinander verglichen, ergibt sich jedoch, daß manuell ein höherer Anteil an Granulozyten gemessen wird als durch maschinelle Differenzierung, aber manuell ein niedrigerer Anteil an mononukleären Zellen und an Normoblasten bestimmt wird.

In allen Nabelschnurblutpräparaten, in denen manuell bzw. maschinell Normoblasten nachgewiesen werden konnten, fanden sich NRBCs entsprechend in der anderen (elektronischen

bzw. manuellen) Differenzierung. Wird aus der optischen Zählung (WOC) unter Berücksichtigung der manuell ermittelten Normoblastenzahl (NRBC) je 100 WBC die nukleäre Zellzahl ermittelt, so zeigt sich, daß im Impedanzkanal (WIC) im Median 8% mehr Zellen ermittelt als errechnet werden. Diese 8% setzten sich einerseits aus alten Granulozyten zusammen, die durch die verlängerte Lysezeit im optischen Kanal zerstört wurden, andererseits aus Zelltrümmern, Fibringerinnseln und Plättchenaggregaten (s.o.) (Henderson und Wood 1986).

Erschwerend für die Differenzierung der unseparierten Proben ist deren Alter und Lagerung. Einerseits sind die Nabelschnurblutpräparate zum Zeitpunkt der Zellmessung bis zu 36 h alt. Andererseits müssen sie bei 20°C gelagert werden, um Verluste bei den hämatopoetischen Progenitoren zu vermeiden (Campos et al. 1995). Zur Messung am Cell Dyn 3500 jedoch bleiben die Differentialbutbildparameter bis zu 24h und die Globalparameter bis zu 48h nach Gewinnung der Probe nur dann stabil, wenn sie bei 4°C gelagert werden, bei Lagerung bei 20°C verkürzt sich diese Dauer (al-Ismaïl et al. 1995).

Im paarigen Vergleich differenziert Coulter ACT deutlich mehr mononukleäre Zellen als der Cell Dyn 3500, ähnlich einem Vergleich des vorwiegend Impedanz- basierten Coulter VCS gegenüber dem vorwiegend auf optischen Messungen basierendem Technikon H*1 (Johannessen et al. 1990). Gegenüber der manuellen Differenzierung überschätzt Coulter VCS den Anteil an Lymphozyten im Neugeborenenblut, H*1 und VCS erkennen nur schwer NRBCs (Johannessen et al. 1990).

Im Routinebetrieb weist bei Messung von Neugeborenenblut der Cell Dyn 3500 je nach Untersucher eine Sensitivität von 83,6% und Spezifität von 88,9% (Chow und Leung 1996), eine Sensitivität 47,7% und Spezifität von 80,6% (Joyner und Brooks 1995) oder eine Sensitivität 43% und Spezifität von 94% für eine NRBC Warnung auf (Fournier et al. 1996), während bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Blutproben Normoblasten, welche bei der manuellen Differenzierung gefunden wurden, auch mittels des Cell Dyn 3500 nachweisbar waren.

Coulter STKS bietet bei normalen Blutproben zwar eine gute Korrelation mit durchflußzytometrischer und manueller Monozytenzählung (Hübl et al. 1995a), jedoch gegenüber NRBCs nur eine Sensitivität von 37% bei einer Spezifität von 88% (Fournier et al. 1996).

Der Cell Dyn 3500 weist zwar eine geringere Präzision als Coulter STKS gegenüber der Monozytendifferenzierung auf, aber STKS überschätzt die Zahl der Mononukleären gegenüber der manuellen Differenzierung auf 400 WBC (Hübl et al. 1995b). Wird der Cell Dyn 3500 mit

Blutproben von maximal 24h alten Neugeborenen mit dem Coulter STKS verglichen, zeigt sich, daß der STKS in 14% kein Differentialbutbild liefern konnte, hingegen der Cell Dyn 3500 immer, daß der Cell Dyn eine niedrigere Varianz in der Bestimmung von Neutrophilen, und Lymphozyten aufwies und daß der Cell Dyn eine höhere Spezifität und Sensitivität beim Erkennen von NRBC und von Blasten aufweist. Die Autoren kommen zu dem Schluss, daß der CD3500 bei schwierigen Blutproben dem STKS deutlich überlegen sei (Fournier et al. 1996).

Der Coulter VCS, der Impedanz – basierte Volumenmessung mit der elektrischen Leitfähigkeit und dem Streulicht kombiniert, zeigt zufriedenstellende Korrelationen für Neutrophile, Monozyten, Eosinophile, zeigt jedoch eine hohe falsch negative (12,2%) bzw. falsch positive Rate (13,4%) für abnorme Zellen wie Normoblasten (Barnard et al. 1989).

Wird aus der optischen Zählung unter Berücksichtigung der manuell ermittelten NRBC je 100 WBC die nukleäre Zellzahl ermittelt NC aus WOC, zeigt sich keine Differenz zu den im Impedanzkanal ermittelten Werten (WIC) ($p=0,193$). Die aus der optischen Zählung und der manuellen Differenzierung gewonnen nukleären Zellkonzentrationen (NC aus WOC, y) korrelieren mit der in der Impedanzmessung ermittelten Werten (WIC, x) linear: $y = 0,995x - 0,39$; $r_{\text{linear}} = 0,966$; $p < 0,0000001$).

Die Zellkonzentration und Viskosität der Probe hatte auf die automatisierte Differenzierung der kernhaltigen Zellen einen unterschiedlichen Einfluß:

In volumenreduzierten Cord Blood Präparaten ergab die maschinelle Differenzierung von Neutrophilen, Mononukleären, Eosinophilen und Basophilen mittels Cell Dyn 3500 eine gute Übereinstimmung zwischen der unverdünnten und der verdünnten Probe.

Bei Normoblasten hingegen finden sich im Vergleich der verdünnten und unverdünnten Messungen relative Abweichungen, die bei niedrigen relativen Konzentrationen größer sind als bei hohen Konzentrationen, erklärlich aus der Berechnung der NRBC Konzentration aus den WIC und WOC Werten. Im Coulter ACT werden deutlich mehr Mononukleäre Zellen ermittelt als im Cell Dyn 3500 und insgesamt die Gesamtzahl der WBC um im Median 22%, die Gesamtzahl der MNC je Transplantat um 43% überschätzt. Insbesondere für die Analyse und Differenzierung von volumenreduzierten Transplantaten ist eine Impedanzmessmethode ungeeignet.

4.7 Einfluss des Geburtsmodus auf Leukozyten und Normoblastenkonzentration

Bei Cord Blood Präparaten, die nach vaginaler Entbindung gewonnen wurden, fand sich ein höherer Anteil an Neutrophilen, an Monozyten, an kernhaltigen Erythrozyten als bei Präparaten, die ex utero nach Kaiserschnitt gewonnen wurden. Dieser Unterschied setzt sich fort bis in die volumenreduzierten Präparate, bei denen die Gesamtzahl der genannten Zellgruppen im Transplantat im Vergleich zu nach Sectio gewonnenen Präparaten erhöht ist.

Beim 4h alten Kindern ist die Neutrophilenkonzentration positiv mit der Länge der 1. und 2. Phase der Geburt assoziiert (Schelonka et al. 1994). Bis 12h nach der Geburt ist die Konzentration von Granulozyten und Leukozyten nach vaginaler Entbindung höher als bei Kindern nach Sectio (Chirico et al. 1999).

Bei langer zweiter Phase der Geburt kommt es zu einer Granulozytose und damit zu einer Leukozytenkonzentrationserhöhung im Cord Blood (Lim et al. 1994). Chronische Belastung führt hingegen zu einer Erhöhung der Normoblastenzahl im Cord Blood, Neugeborene mit schlechten zirkulatorischen Verhältnissen in der pränatalen Periode und/ oder einer metabolischen Azidose weisen nach der Geburt erhöhte NRBC – Spiegel auf (Baschat et al. 1999). Bei normaler Geburt ist die Erythroblastose umgekehrt zum Nabelschnur pH korreliert, wohingegen die Leukozytose mit der Dauer der Geburt zusammenhängt. Leukozytose und die manchmal damit verbundene erhöhte Ausschüttung von Vorläuferzellen (Nikischin et al. 1997) ist somit eine unspezifische Antwort des Feten auf die Belastungen während der zweiten Phase der Geburt (Lim et al. 1994; Thilaganathan et al. 1994a), während die Erythroblastose eine fetale Hypoxie reflektiert (Thilaganathan et al. 1994a; Thilaganathan et al. 1994b). Die höheren Leukozytenzahlen in Transplantaten, die nach vaginaler Entbindung gewonnen worden sind, sind daher durch die erhöhte perinatale Anstrengung im Vergleich zum Kaiserschnitt bedingt.

Wenn aber die Leukozytenzahl im Cord Blood der Marker für eine akute Belastung des Feten/ Neugeborenen ist, ist damit noch nicht die höhere Normoblastenkonzentration im eigenen Untersuchungsgut nach vaginaler Entbindung erklärt.

Die bei für das entsprechende Gestationsalter zu kleinen Kindern beobachtete Erhöhung des NRBC Spiegels, insbesondere bei fetaler Hypoxie wird mit einer Widerstandserhöhung der Plazenta begründet, z.B. durch thrombotische Ereignissen (Bernstein et al. 1997). Die

Erythroblastenzahl im arteriellen CB liegt nach Notfall - Sectio höher als bei elektiver Sectio. Auch bei Kindern nach normaler Geburt ist der Erythroblastengehalt niedriger als bei Kindern nach Notfall - Sectio. (Thilaganathan et al. 1994a; Thilaganathan et al. 1994b). Die zu einer Notfallkaiserschnitt führende Durchblutungsunterbrechung führt zu einer Hypoxie auf der fetalen Seite der Plazenta, was zu einer vermehrten Ausschwemmung der Normoblasten führt, ebenso wie die postpartale Entleerung der Plazenta durch die Sammlung des Nabelschnurblutpräparates.

Der Mittelwert der bestimmten Normoblastenkonzentration aus den Nabelschnurbluttransplantaten ($7,25 \pm 8,15$ NRBC je 100 WBC) entspricht den nach vaginaler Geburt im venösen Cord Blood bei Risikokindern gefundenen Werten ($8,55 \pm 10,27$ NRBC je 100 WBC, (Hanion-Lundberg et al. 1997)), ist jedoch höher als der von Neugeborenen mit einem normalen Gestationsalter von 261 - 289d ($3,7$ NRBC je 100 WBC (Axt et al. 1999) bzw. $6,1$ NRBC je 100 WBC (Mukiibi et al. 1995)). Auch übertragene Neugeborene weisen noch einen niedrigeren NRBC Spiegel auf als die untersuchten Nabelschnurblutproben ($6,5$ NRBC je 100 WBC (Axt et al. 1999)).

Andere Autoren finden deutlich geringere Normoblastenkonzentration in Normalkollektiven ($3,4$ NRBC je 100 WBC). Neurologisch beeinflusste Neugeborene jedoch weisen deutlich erhöhte NRBC Spiegel auf ($30,3$ NRBC je 100 WBC). Dabei ist die Höhe des NRBC Spiegels mit dem Ausmaß der Minderdurchblutung der Plazenta korreliert: Kinder mit Decelerationen im CTG des Dritten Grades (DIP III) weisen im Cord Blood NRBC Konzentrationen von im Mittel $48,6$ NRBC je 100 WBC auf, Kinder mit geringerem DIP (I u. II) hingegen nur $11,4$ bzw. $12,6$ NRBC je 100 WBC (Korst et al. 1996).

Das Geschlecht des Kindes hat keinen Einfluss auf die Normoblastenzahl im Nabelschnurblut, jedoch weisen Präparate von männlichen Spendern einen 4% niedrigeren Leukozytengehalt auf als Präparate von Mädchen.

4.8 Änderung der Zusammensetzung von Nabelschnurblutpräparaten durch Volumenreduktion

4.8.1 Methoden der Volumenreduktion

Eine Volumenreduktion des Nabelschnurblutes ist durch verschiedene Verfahren möglich. Ziel einer Methode zur Volumeneinengung von Nabelschnurtransplantaten muß es sein, möglichst wenig hämatopoetische Vorläuferzellen durch die Manipulation zu verlieren. Unabhängig vom eingesetzten Verfahren ist immer ein Zentrifugationsschritt notwendig. Für die Präparation von volumenreduzierten Nabelschnurblutpräparaten sind insbesondere Ficoll - gestützte Verfahren ungeeignet (Broxmeyer et al. 1989). So führen die Ficoll - gestützten Verfahren bei Proben mit hohem Normoblastenanteil zu einer zu geringen Ausbeute an hämatopoetischen Progenitoren, sowohl bei Knochenmark (Jin et al. 1987) als auch bei Nabelschnurblut als Transplantatquelle (Broxmeyer et al. 1989). Dies gilt umso mehr, wenn die Probe nicht unmittelbar frisch aufgearbeitet werden kann. Zwar sind die Progenitoren bei Raumtemperatur im Cord Blood bis zu 72h stabil (Broxmeyer et al. 1989; Campos et al. 1995), jedoch ist dann ihre Aufarbeitung durch reine Dichtegradienten nicht mit zufriedenstellendem Erfolg möglich (Broxmeyer et al. 1989; Campos et al. 1995). Zellaufarbeitungen mit erythrozytären Sedimentationsverstärkern führen zu einem erheblich besseren Erfolg in der Volumeneinengung (Rubinstein et al. 1995; Denning-Kendall et al. 1996; Adorno et al. 1998; Kögler et al. 1998). Reine Sedimentation durch Stärkelösung mit anschließender Gewinnung des leukozytenreichen Überstandes ohne Zentrifugation jedoch liefert nicht ausreichend stabile Ergebnisse (Isoyama et al. 1996). Die in Düsseldorf eingesetzte Methode beruht auf einer Sedimentations – und Zentrifugationstechnik, welche sich unterstützend zur Sedimentation eine Geldrollenbildung von Erythrozyten durch eine hochmolekulare Stärkelösung zu nutze macht. Bisher nicht untersucht war der Einfluss dieser Dichte- abhängigen Anreicherungsverfahren auf die Zusammensetzung des angereicherten Materials, in Hinblick auf kernhaltige erythrozytäre Zellen oder auf die automatisierte Bestimmung der einzelnen Leukozytären Zellgruppen (Differentialblutbild).

4.8.2 Anreicherung von Normoblasten durch Dichtegradientenzentrifugation

Bekannt ist, daß aus mütterlichem Blut fetale erythrozytäre Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen werden können (de Graaf et al. 1999; Hahn et al. 1999). Normalerweise sind diese sehr selten; 3,9 je 10^7 im ersten Trimenon bis zu 112 per 10^7 unmittelbar vor der Geburt (Li und Xia 1998). Durch Dichtegradientenzentrifugation können die kernhaltigen Erythrozyten jedoch um den Faktor 1000 angereichert werden (Andrews et al. 1995). Bei Verwendung eines isoosmolaren und neutralen Dichtegradienten finden sich die fetalen kernhaltigen Erythrozyten bei einer Dichte von 1,062g/ml und 1,078 g/ml (Sitar et al. 1999). Im sauren Milieu finden sie sich vor allem im Gradienten geringerer Dichte.

Durch die notwendige Antikoagulierung durch Zitronensäure wird der pH Wert etwas in das Saure im Nabelschnurblutpräparat verschoben. Somit liegen die fetalen NRBC in den Dichtebereichen, die zur Dichte - abhängigen Anreicherung von Leukozyten verwendet werden können.

4.8.3 Anreicherung der kernhaltigen Erythrozyten durch Volumenreduktion in Nabelschnurblutpräparaten

Bei fast allen in dieser prospektiven Verlaufsstudie untersuchten Transplantaten fand sich eine Anreicherung der Normoblastenzahl durch Volumenreduktion. Wird mittels manueller Differenzierung die relative Normoblastenkonzentration ermittelt, reichert sich diese im Median um das 1,77 -fache an. Bei einem 3,37 - fachen medianen Anstieg der Leukozytenkonzentration durch die Volumenreduktion steigt somit unter Berücksichtigung der manuellen und der optischen Zählung die Normoblastenzahl je ml um fast das 6 -fache an. In 80% aller Präparationen steigt der relative Normoblastengehalt an, in fast allen Präparationen (1452 von 1464) die Normoblastenzahl je ml. Diese dramatische Erhöhung der Normoblastenkonzentration wird bei Verwendung von rein Impedanz - basierten Zellzählern nicht entdeckt, da diese keine Normoblasten von Leukozyten bzw. von Lymphozyten unterscheiden können (Johannessen et al. 1990). Wird daher in volumenreduzierten Präparaten die Graft Cell Dose ausschließlich mittels Impedanz - basierter Zellzähler bestimmt, wird diese Zelldosis überschätzt.

Da sich fast alle Normoblasten (97%) des Ausgangspräparates im volumenreduzierten Präparat wiederfinden, kann auch bei niedriger Ausgangskonzentration an Normoblasten eine erhebliche Anreicherung im volumenreduzierten Präparat stattfinden. Gerade bei niedrigen

Normoblastenkonzentrationen wird die relative Normoblastenkonzentration stark angereichert (bis 40 -fach). Wichtig ist daher, bei der automatisierten Qualitätskontrolle von Nabelschnurbluttransplantaten Geräte zu verwenden, welche die kernhaltigen Erythrozyten sicher erkennen, um falsch hohe Angaben für die Leukozytenkonzentration auszuschließen.

4.8.4 Änderung der Zusammensetzung der Leukozyten in Nabelschnurblutpräparaten durch Volumenreduktion

Nicht nur die Normoblastenkonzentration ändert sich durch die Hespan® Volumenreduktion. Der Anteil an Neutrophilen wird gesteigert, der von Lymphozyten und Eosinophilen gesenkt. Keiner wesentlichen Änderung unterliegen hingegen die relativen Konzentrationen von Monozyten und Basophilen.

Die Wiederfindungsrate der Cord Blood Bestandteile nach Volumenreduktion der hiesigen Transplantate (Kögler et al. 1996; Kögler et al. 1998) liegt für die meisten Präparate für die Normoblasten bei 98%, für die Leukozyten bei 92%, für die Monozyten bei 88%, für die Plättchen bei 42% und für das Hämoglobin bei 30% PLT,42 Hb30 (Modalwerte, n=1464). Es besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der CB ID Nummer und der Wiederfindungsrate von Leukozyten. Da die CB ID Nummer fortlaufend vergeben wird, spiegelt sie die zunehmende Erfahrung bei der Volumenreduktion wieder. So finden sich in den ersten 200 Präparationen eine Wiederfindungsrate von 88%, in den letzten 200 Präparationen eine Wiederfindungsrate von Leukozyten von 94%.

Andere Autoren geben ähnliche Recovery – Werte an, ohne bei zentrifugationsbasierten Eingangsmethoden auf die Methode der Zellzahlbestimmung bzw. den Gehalt an Normoblasten im volumenreduzierten Präparat näher einzugehen (Lazzari et al. 1996; Ademokun et al. 1997; Armitage et al. 1999a; Armitage et al. 1999b).

5 Zusammenfassung

Die Transplantation hämatopoetischer Vorläufer- und Stammzellen aus Nabelschnurblut kann die Funktion von Knochenmark sowohl in verwandten wie unverwandten Empfängern rekonstituieren. Wachsende klinische Erfahrung und anhaltende Erfolge der Nabelschnurbluttransplantationen gehen Hand in Hand mit einer ständig steigenden Zahl von zur Verfügung stehenden gut charakterisierten und kryokonservierten allogenen Nabelschnurbluttransplantaten. Um die Lagerung zu vereinfachen, werden die Transplantate zunehmend vor Kryokonservierung volumenreduziert. Unabhängig von einer Volumenreduktion jedoch ist ein wesentliches Qualitätsmerkmal der Transplantate die tatsächlich zur Verfügung stehende transplantierbare Leukozytenzahl, die transplantierbare Zellmenge (Graft Cell Dose).

Grundsätzlich bestehen zur Zeit zwei automatisierte Meßmethoden zur Leukozytenzahlbestimmung: Impedanzmessung und optische Messung. Mehrere Faktoren erschweren bei und nach der automatisierten Blutbilderstellung aus neonatalen Proben wie Cord Blood die Messung und Interpretation der Leukozytenzahlen: die Proben weisen hohe Zellzahlen und eine hohe Viskosität auf, Blutproben von Neugeborenen können rote Blutkörperchen enthalten, welche eine höhere osmotische Resistenz aufweisen als normale Erythrozyten und das Blut Neugeborener weist oft eine hohe Zahl von Normoblasten auf.

Bei Impedanz- basierten Geräten können kernhaltige Erythrozyten (NRBC) von Leukozyten nicht unterschieden werden, bei Geräten basierend auf einer optischen Messung besteht zu meist keine Möglichkeit, eine korrekte Zellzahl und ein Differentialblutbild aus Proben zu erstellen, welche lyseresistenten Erythrozyten enthalten.

Im Rahmen dieser prospektiven Verlaufsuntersuchung wurde die Wertigkeit verschiedener Meßverfahren auf die Leukozytenzahlbestimmung im Cord Blood untersucht.

Von April 1997 bis Juli 1999 wurden 2192 und zwischen November und Dezember 1999 179 plazentare Nabelschnurblut Transplantate an der NETCORD Bank Düsseldorf gesammelt, analysiert und kryokonserviert. 1625 der gewonnenen Transplantate wurden vor dem Einfrieren Volumen reduziert, basierend auf einer Zentrifugationsmethode mit zusätzlicher Erythrozytensedimentation durch Hydroxyethylstärke. Alle Proben wurden durch verschiedene Methoden auf ihren Zellgehalt und ihre Zusammensetzung untersucht mittels Abott, Cell Dyn 3500. Dieses Gerät bestimmt und differenziert Leukozyten sowohl über einen optischen Kanal (WOC) als auch einen Impedanzkanal (WIC). Ein Teil der Präparate wurde zusätzlich mittels eines rein Impedanz- basierten Gerätes überprüft (Coulter ACT), bei einem weiteren Teil der Präparate erfolgte eine zusätzliche manuelle Kammerzählung oder ein manuelles Differentialblutbild.

Die Impedanzkanäle, in denen die Normoblasten als kernhaltige Zellen mit erfasst werden, unterscheiden sich von Gerät zu Gerät nicht wesentlich und zeigten eine gute Übereinstimmung zur manuellen Kammerzählung. Werden Impedanzmessung und optische Messung miteinander verglichen, zeigt sich, daß die optische Messung (WOC) immer einen niedrigeren Wert erbringt als die Impedanzmessung (WIC). Die Differenz ist abhängig von der Leukozytenkonzentration: bei hohen nukleären Zellkonzentrationen (WIC) werden im Verhältnis weniger Leukozyten im optischen Kanal gemessen als bei niedrigen Konzentrationen. Die Differenz zwischen der WIC und WOC Messung korreliert linear mit der manuell ermittelten Konzentration der Normoblasten.

Ein positiver signifikanter Zusammenhang besteht zwischen der nukleären Zellkonzentration (WIC) und der Normoblastenkonzentration - gerade Nabelschnurblute mit hohen Zellgehalten

weisen hohe Normoblastenkonzentrationen auf. Die optische Messung entspricht der viablen Leukozytenkonzentration ohne NRBC, die Impedanzmessung kann als Maßstab für die kernhaltige Zellmenge angesehen werden, die Differenz aus beiden korreliert linear mit der manuell ermittelten Konzentration der Normoblasten.

Insbesondere in den volumenreduzierten Präparaten findet sich kein Unterschied in der manuell und maschinell bestimmten NRBC Konzentration.

Die Präparate nach Volumenreduktion weisen eine erhöhte Viskosität auf. Durch Vergleich von unverdünnten und verdünnten Proben ließ sich nachweisen, daß die Leukozytenkanäle des Cell Dyn 3500 und des Coulter ACT im niedrigeren Bereich ihren linearen Meßbereich aufweisen, während die Erythrozytenzahlbestimmung eher bei hohen Konzentrationen linear verläuft.

In physiologischen Bereichen zeigte sich für die untersuchten Parameter aber eine ausreichende Übereinstimmung zwischen unverdünnter und verdünnter Probe.

Da die Leukozytenzahl transplantationsentscheidend ist, muß zur Qualitätskontrolle aus Hespan® volumenreduzierten Präparaten eine Vorverdünnung der Probe (1:2) erfolgen, um innerhalb des linearen Bereiches der Blutzellzähler zählen zu können.

Insbesondere in unseparierten Cord Blood Präparaten ergab die maschinelle Differenzierung mittels Cell Dyn 3500 eine gute Übereinstimmung des Neutrophilen- und Mononukleärenanteils zur manuellen Differenzierung

Im Coulter ACT werden hingegen deutlich mehr mononukleäre Zellen ermittelt als im Cell Dyn 3500 und insgesamt die Gesamtzahl der WBC um im Median 22%, die Gesamtzahl der MNC je Transplantat um 43% überschätzt. NRBCs werden ebenso nicht erkannt. Insbesondere für die Analyse von volumenreduzierten Transplantaten ist daher eine Impedanzmessmethode ungeeignet.

Wird mittels manueller Differenzierung die relative Normoblastenkonzentration ermittelt, reichert sich diese im Median um das 1,77 - fache an. Bei einem 3,37 - fachen medianen Anstieg der Leukozytenkonzentration durch die Volumenreduktion steigt somit unter Berücksichtigung der manuellen und der optischen Zählung die Normoblastenzahl je ml um fast das 6 - fache an. In 80% aller Präparationen erhöht sich der relative Normoblastengehalt durch Volumenreduktion, in fast allen Präparationen (1452 von 1464) die Normoblastenzahl je ml. Diese dramatische Erhöhung der Normoblastenkonzentration wird bei Verwendung von rein Impedanz- basierten Zellzählern nicht entdeckt, da diese nicht Normoblasten von Leukozyten bzw. von Lymphozyten unterscheiden können

Die Wiederfindungsrate der Cord Blood Bestandteile nach Volumenreduktion liegt für Normoblasten bei 98%, für Leukozyten bei 92%, für Monozyten bei 88%, für Plättchen bei 42% und für das Hämoglobin bei 30% (Modalwerte, n=1464).

Einfluss auf die Zusammensetzung der Cord Blood Präparate hatte aber auch der Geburtsmodus: nach vaginaler Entbindung gewonnene Präparate wiesen einen höheren Anteil an Neutrophilen, an Monozyten, an kernhaltigen Erythrozyten als nach Kaiserschnitt gewonnene auf. Kernhaltige Erythrozyten werden nach dem Auftauen nicht mehr mittels Impedanzmessung erfasst. Werden daher vor Transplantation von der Cord Blood Bank Graft Cell Dosen angegeben, die die kernhaltigen Erythrozyten mit enthalten, finden sich diese Zahl beim Auftauen des Transplantates nicht mehr.

6 Literatur

- Ademokun, J. A., Chapman, C., Dunn, J., Lander, D., Mair, K., Proctor, S. J. und Dickinson, A. M. (1997). "Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking." Bone Marrow Transplantation **19**(10): 1023-8.
- Adorno, G., Bruno, A., Caravita, T., Venditti, A., Ballatore, G., Santinelli, S., Postorino, M., Monaco, I., Piazza, A., Calugi, A., Araco, P., Tribalto, M. und Amadori, S. (1998). "Red blood cell depletion of cord blood using hydroxyethylstarch double sedimentation: analysis of 40 cases." Clinical And Laboratory Haematology **20**(6): 341-3.
- al-Ismail, S. A., Bond, K., Carter, A. B., Grant, D., Machin, S. J., Patterson, K. G., Pearman, K. J., Pollard, Y. C. und Popeck, M. (1995). "Two-centre evaluation of the Abbott CD3500 blood counter." Clin Lab Haematol **17**(1): 11-21.
- Andrews, K., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M. A. und Rubinsztein, D. C. (1995). "Enrichment of fetal nucleated cells from maternal blood: model test system using cord blood." Prenatal Diagnosis **15**(10): 913-9.
- Armitage, S., Fehily, D., Dickinson, A., Chapman, C., Navarrete, C. und Contreras, M. (1999a). "Cord blood banking: volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system." Bone Marrow Transplantation **23**(5): 505-9.
- Armitage, S., Warwick, R., Fehily, D., Navarrete, C. und Contreras, M. (1999b). "Cord blood banking in London: the first 1000 collections." Bone Marrow Transplantation **24**(2): 139-45.
- Axt, R., Ertan, K., Hendrik, J., Wrobel, M., Mink, D. und Schmidt, W. (1999). "Nucleated red blood cells in cord blood of singleton term and post-term neonates." J Perinat Med **27**(5): 376-81.
- Barnard, D. F., Barnard, S. A., Carter, A. B., Patterson, K. G., Yardumian, A. und Machin, S. J. (1989). "An evaluation of the Coulter VCS differential counter." Clinical And Laboratory Haematology **11**(3): 255-66.
- Baschat, A. A., Gembruch, U., Reiss, I., Gortner, L., Harman, C. R. und Weiner, C. P. (1999). "Neonatal nucleated red blood cell counts in growth-restricted fetuses: relationship to arterial and venous Doppler studies." American Journal Of Obstetrics And Gynecology **181**(1): 190-5.

- Bentley, S. A. (1990). "Quality control and the differential leukocyte count." Clinical And Laboratory Haematology **12 Suppl 1**: 101-9.
- Bentley, S. A., Johnson, A. und Bishop, C. A. (1993). "A paralell evaluation of four automa-
ted haematology analyzers." Am J Clin Pathol **100**: 626-632.
- Bernstein, P. S., Minior, V. K. und Divon, M. Y. (1997). "Neonatal nucleated red blood cell
counts in small-for-gestational age fetuses with abnormal umbilical artery Doppler studies."
American Journal Of Obstetrics And Gynecology **177**(5): 1079-84.
- Bland, M. J. und Altman, D. G. (1986). "Statistical methods for assesing agreement between
two methods of clinical measurement." Lancet **I**: 307 - 310.
- Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Army, M.,
Thomas, L. und Boyse, E. A. (1989). "Human umbilical cord blood as a potential source of
transplantable hematopoietic stem/progenitor cells." Proceedings Of The National Academy
Of Sciences Of The United States Of America **86**(10): 3828-32.
- Burchert-Graeve, M. und Kock, R. (1996). "Automated leucocyte differentials in 292 patients
with leucopenia: an evaluation of the Abbott CELL-DYN 3500 (CD3500) haematology ana-
lyser." Clinical And Laboratory Haematology **18**(4): 253-9.
- Campos, L., Roubi, N. und Guyotat, D. (1995). "Definition of optimal conditions for collec-
tion and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells." Cryobiology **32**(6): 511-5.
- Catherine, N., Contie, G., Sergant, P. und Tchernia, G. (1987). "Etude des performances des
deux automates hématologiques en néo-natalogie." Nouv Rev Fr Hématol **29**: 333-337.
- Charache, S., Nelson, L., Saw, D., Keyser, E. und Wingfield, S. (1992). "Accuracy and utility
of differential white blood cell count in the neonatal intensive care unit." American Journal Of
Clinical Pathology **97**(3): 338-44.
- Chirico, G., Gasparoni, A., Ciardelli, L., Martinotti, L. und Rondini, G. (1999). "Leukocyte
counts in relation to the method of delivery during the first five days of life." Biol-Neonate
75(5): 294-9.
- Chow, E. Y. und Leung, K. K. (1996). "Evaluating the CELL-DYN 3500 haematology analy-
ser in an acute general hospital." Clin Lab Haematol **18**(3): 187-93.
- Cornbleet, P. J., Myrick, D. und Levy, R. (1993). "Evaluation of the Coulter STKS five-part
differential [see comments]." American Journal Of Clinical Pathology **99**(1): 72-81.

de Graaf, I. M., Jakobs, M. E., Leschot, N. J., Ravkin, I., Goldbard, S. und Hoovers, J. M. (1999). "Enrichment, identification and analysis of fetal cells from maternal blood: evaluation of a prenatal diagnosis system." Prenatal Diagnosis **19**(7): 648-52.

Denning-Kendall, P., Donaldson, C., Nicol, A., Bradley, B. und Hows, J. (1996). "Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking." Experimental Hematology **24**(12): 1394-401.

Dörner, K., Schulze, S., Reinhardt, M., Seeger, H. und Van Hove, L. (1995). "Improved automated leucocyte counting and differential in newborns achieved by the haematology analyser CELL-DYN 3500 [see comments]." Clin-Lab-Haematol **17**(1): 23-30.

Dutcher, T. F. (1985). "Automated differentials: a strategy." Blood Cells **11**(1): 49-59.

England, J. M. und Bain, B. J. (1976). "Total and differential leucocyte count." British Journal Of Haematology **33**(1): 1-7.

England, J. M., Hewer, M. G., Bashford, C. C., Hughes-Jones, N. C. und Down, M. C. (1975). "Simple method for automating the differential leucocyte-count." Lancet **1**(7905): 492-3.

Engle, W. D., Rosenfeld, C. R., Mouzinho, A., Risser, R. C., Zeray, F. und Sanchez, P. J. (1997). "Circulating neutrophils in septic preterm neonates: comparison of two reference ranges." Pediatrics **99**(3): E10.

Fournier, M., Gireau, A., Chretien, M. C., Ghevaert, C., Boniface, B., Goudemand, J. und Cosson, A. (1996). "Laboratory evaluation of the Abbott Cell DYN 3500 5-part differential." American Journal Of Clinical Pathology **105**(3): 286-92.

Gluckman, E., Broxmeyer, H. E., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J. und Boyse, E. A. (1989). "Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling." N Engl J Med **321**: 1174-1178.

Gluckman, E., Rocha, V. und Chastang, C. (1998). "Cord blood banking and transplant in Europe. Eurocord." Bone Marrow Transplantation **22 Suppl 1**: S68-74.

Gluckman, E., Vanderson, R., Boyer-Chammard, A., Locatelli, F., Arcese, W., Pasquini, R., Ortega, J., Souillet, G., Ferreira, E., Laporete, J.-P., Fernandez, M. und Chastang, C. (1997). "Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Trans-

plant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group.” New England Journal Of Medicine **337**(6): 373-81.

González-Barca, E., Querol, S., Grañena, A., Sarra, J., Sirchia, G. und García, J. (1997). “Umbilical cord blood transplantation from unrelated donors in an adult weighing 90 kilograms. Role of immunosuppression in engraftment.” Bone Marrow Transplantation **20**(4): 333-6.

Gulati, G. L., Bong, H. H. und Ashton, J. K. (1992). “Advances of the past decade in automated hematology.” Am J Clin Pathol **98** (suppl1): 11-16.

Hahn, S., Kiefer, V., Brombacher, V., Troeger, C. und Holzgreve, W. (1999). “Fetal cells in maternal blood. An update from Basel.” Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **85**(1): 101-4.

Hanion-Lundberg, K. M., Kirby, R. S., Gandhi, S. und Broekhuizen, F. F. (1997). “Nucleated red blood cells in cord blood of singleton term neonates.” American Journal Of Obstetrics And Gynecology **176**(6): 1149-54; discussion 1154-6.

Henderson, S. J. und Wood, J. K. (1986). “Factors producing error in the total leucocyte count as measured on the Coulter Counter S Plus IVD.” Clinical And Laboratory Haematology **8**(4): 341-6.

Hübl, W., Andert, S., Erath, A., Lapin, A. und Bayer, P. M. (1995a). “Peripheral blood monocyte counting: towards a new reference method.” European Journal Of Clinical Chemistry And Clinical Biochemistry **33**(11): 839-45.

Hübl, W., Hauptlorenz, S., Tlustos, L., Jilch, R., Fischer, M. und Bayer, P. M. (1995b). “Precision and accuracy of monocyte counting. Comparison of two hematology analyzers, the manual differential and flow cytometry.” Am J Clin Pathol **103**(2): 167-70.

Hübl, W., Iturraspe, J., Martinez, G. A., Hutcheson, C. E., Roberts, C. G., Fisk, D. D., Sugrue, M. W., Wingard, J. R. und Braylan, R. C. (1998). “Measurement of absolute concentration and viability of CD34+ cells in cord blood and cord blood products using fluorescent beads and cyanine nucleic acid dyes.” Cytometry **34**(3): 121-7.

Hyun, B. H., Gulati, G. L. und Ashton, J. K. (1991). “Differential leukocyte count: manual or automated, what should it be?” Yonsei Medical Journal **32**(4): 283-91.

Isoyama, K., Yamada, K., Hirota, Y., Ishikawa, K., Imai, M. und Notake, Y. (1996). “Study of the collection and separation of umbilical cord blood for use in hematopoietic progenitor cell transplantation.” International Journal Of Hematology **63**(2): 95-102.

- Jin, N. R., Hill, R., Segal, G., Still, B., Petersen, F. B., Amos, D., Buckner, C. D., Clift, R., Bensinger, W., Martin, P. und al, e. (1987). "Preparation of red-blood-cell-depleted marrow for ABO-incompatible marrow transplantation by density-gradient separation using the IBM 2991 blood cell processor." Experimental Hematology **15**(1): 93-8.
- Johannessen, B., Ommundsen, T., Minde, T. E., Haneberg, B. und Sandberg, S. (1990). "Automated differential leukocyte counts in newborn infants. Comparison of Coulter VCS and Technicon H1 with manual counts." Eur J Haematol Suppl **53**: 41-4.
- Joyner, R. E. und Brooks, M. J. (1995). "Evaluation of the automated leucocyte count and differential from the Cell-Dyn 3500 in sickle cell disease." Clinical And Laboratory Haematology **17**(4): 329-33.
- Koepke, J. A. und Ross, D. W. (1985). "White blood cell differential: a call for standards." Blood Cells **11**(1): 1-9.
- Kögler, G., Callejas, J., Hakenberg, P., Enczmann, J., Adams, O., Däubener, W., Krempe, C., Göbel, U., Somville, T. und Wernet, P. (1996). "Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues." Journal Of Hematotherapy **5**(2): 105-16.
- Kögler, G., Sarnowski, A. und Wernet, P. (1998). "Volume reduction of cord blood by Heta-starch for long-term stem cell banking." Bone Marrow Transplant **22**(1): S14-5.
- Korninger, L., Mustafa, G. und Schwarzinger, I. (1998). "The Haematology Analyser SF-3000: performance of the automated white blood cell differential count in comparison to the Haematology Analyser NE-1500." Clinical And Laboratory Haematology **20**(2): 81-6.
- Korst, L. M., Phelan, J. P., Ahn, M. O. und Martin, G. I. (1996). "Nucleated red blood cells: an update on the marker for fetal asphyxia." American Journal Of Obstetrics And Gynecology **175**(4 Pt 1): 843-6.
- Krause, J. R. (1990). "Automated differentials in the hematology laboratory." American Journal Of Clinical Pathology **93**(4 Suppl 1): S11-6.
- Laharrague, P. F., Fillola, G. und Corberand, J. X. (1992). "Evaluation of a new haematology analyser for whole blood count and full differential (NE-8000)." Nouvelle Revue Francaise D Hematologie **34**(4): 303-7.
- Lane, P. A., Galili, U., Iarocci, T. A., Shew, R. L. und Mentzer, W. C. (1988). "Cellular dehydration and immunoglobulin binding in senescent neonatal erythrocytes." Pediatric Research **23**(3): 288-92.

- Lazzari, L., Corsini, C., Curioni, C., Lecchi, L., Scalamogna, M., Rebulli, P. und Sirchia, G. (1996). "The Milan Cord Blood Bank and the Italian Cord Blood Network." Journal Of Hematotherapy **5**(2): 117-22.
- Li, Z. und Xia, T. (1998). "[The detection and isolation of fetal nucleated erythrocytes from maternal blood using flow cytometry]." Chung Hua I Hsueh I Chuan Hsueh Tsa Chih **15**(2): 111-4.
- Lim, F. T., van Winsen, L., Willemze, R., Kanhai, H. H. und Falkenburg, J. H. (1994). "Influence of delivery on numbers of leukocytes, leukocyte subpopulations, and hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood." Blood Cells **20**(2-3): 547-58.
- Linderkamp, O. (1987). "Blood rheology in the newborn infant." Baillieres Clinical Haematology **1**(3): 801-25.
- Manroe, B. L., Rosenfeld, C. R., Weinberg, A. G. und Browne, R. (1979). "The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells." J of Pediatrics **95**: 89-98.
- Mukiibi, J. M., Nkrumah, F. K., Kaur, M., Pollard, R., Akino, V. und Nhembe, M. (1995). "Neonatal haematology in Zimbabwe. II: The red cell and white cell parameters." Cent-Afr-J-Med **41**(3): 76-82.
- Müller, T. H., Doscher, A., Schunter, F. und Scott, C. S. (1997). "Manual and automated methods for the determination of leukocyte counts at extreme low levels: comparative evaluation of the Nageotte chamber and the Abbott Cell Dyn 3500 analyser." Transfus Sci **18**(4): 505-15.
- NCCLS (1992). Reference Leukocyte Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard, NCCLS Protocol H20A. Wayne, PA USA, NCCLS940.
- Nikischin, W., Peter, M. und Oldigs, H. D. (1997). "The influence of mode of delivery on hematologic values in the umbilical vein." Gynecol Obstet Invest **43**(2): 104-7.
- Oski, F. A. und Naiman, J. L. (1982). Hematologic problems in the Newborn. Philadelphia, Saunders.
- Oski, F. A. und Naimann, L. J. (1966). Normal blood values in the newborn period. Hematologic problems in the newborn. Philadelphia, USA, W.B: Saunders: 11-21.

- Petit, M. C., Fournier, M. und Boniface, B. (1995). "The Abbott Cell Dyn 3500 and the Coulter STKS: automated enumeration and differentiation of leukocytes in an HIV positive population." Laboratory Hematol **1**: 135-142.
- Rubinstein, P., Carrier, C., Scaradavou, A., Kurtzberg, J., Adamson, J., Migliaccio, A. R., Berkowitz, R. L., Cabbad, M., Dobrila, N. L., Taylor, P. E., Rosenfield, R. E. und Stevens, C. E. (1998). "Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors [see comments]." N-Engl-J-Med **339**(22): 1565-77.
- Rubinstein, P., Dobrila, L., Rosenfield, R. E., Adamson, J. W., Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Taylor, P. E. und Stevens, C. E. (1995). "Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution." Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A **92**(22): 10119-22.
- Schelonka, R. L., Yoder, B. A., desJardins, S. E., Hall, R. B. und Butler, J. (1994). "Peripheral leukocyte count and leukocyte indexes in healthy newborn term infants [see comments]." J-Pediatr **125**(4): 603-6.
- Serrani, R. E., Alonso, D. und Corchs, J. L. (1989). "States of stability/lysis in human fetal and adults red blood cells." Archives Internationales De Physiologie Et De Biochimie **97**(3): 309-16.
- Sitar, G., Garagna, S., Zuccotti, M., Falcinelli, C., Montanari, L., Alfei, A., Ippoliti, G., Redi, C. A., Moratti, R., Ascari, E. und Forabosco, A. (1999). "Fetal erythroblast isolation up to purity from cord blood and their culture in vitro." Cytometry **35**(4): 337-45.
- Stamminger, G., Köppel, C., Schaub, A., Gärtner, I., Tonndorf, C., Meyer, K., Elix, P., Lang, B. und Beier, L. (1998). "Performance of the SE-9000 automated haematology analyser in a laboratory serving a haematological oncology unit." Clinical And Laboratory Haematology **20**(3): 143-9.
- Thilaganathan, B., Athanasiou, S., Ozmen, S., Creighton, S., Watson, N. R. und Nicolaides, K. H. (1994a). "Umbilical cord blood erythroblast count as an index of intrauterine hypoxia." Arch-Dis-Child-Fetal-Neonatal-Ed **70**(3): F192-4.
- Thilaganathan, B., Meher Homji, N. und Nicolaides, K. H. (1994b). "Labor: an immunologically beneficial process for the neonate [see comments]." Am-J-Obstet-Gynecol **171**(5): 1271-2.

Tsuji, T., Sakata, T., Hamaguchi, Y., Wang, F. und Houwen, B. (1999). "New rapid flow cytometric method for the enumeration of nucleated red blood cells." Cytometry **37**(4): 291-301.

Wagner, J. E., Kernan, N. A., Steinbuch, M., Broxmeyer, H. E. und Gluckman, E. (1995). "Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease." Lancet **346**: 214-219.

Walka, M. M., Sonntag, J., Kage, A., Dudenhausen, J. W. und Obladen, M. (1998). "Complete blood counts from umbilical cords of healthy term newborns by two automated cytometers." Acta Haematol **100**(4): 167-73.

Weinberg, A. G., Rosenfeld, C. R., Manroe, B. L. und Browne, R. (1983). "Neonatal blood cell count in health and disease. II. Values for lymphocytes, monocytes and eosinophils." Journal fo Pediatrics **106**: 462.

Werman, H. A. und Brown, C. G. (1986). "White blood cell count and differential count." Emergency Medicine Clinics Of North America **4**(1): 41-58.

7 Lebenslauf

20.03.2000

Name: Johannes Christian Fischer

Privatadresse Stahlstr. 7, 40699 Erkrath

Dienstanschrift Universitätsklinik Düsseldorf, Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Moorenstr. 5 Geb. 14.80, Postfach 101007, 40001 Düsseldorf

Geburtsdatum: 03. Juli 1964

Familienstand: verheiratet mit Barbara Scheibe, Ärztin. Drei Kinder.

Berufsausbildung/ Berufstätigkeit:

1984-1991 Studium der Humanmedizin in Freiburg, Tübingen und Bonn

31.05.1991 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

06/1991-12/1992 Arzt im Praktikum an der Med. Univ. Klinik Bonn: Schwerpunkt Hämatologie Onkologie (1 Jahr); Internistische Intensivmedizin (1/2 Jahr)

01/1993-06/1995 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universität Bonn. Schwerpunkte Immunhämatologie und Gerinnungsphysiologie. Aufbau und Leitung der präparativen Stammzellapherese und Kryokonservierungseinheit. Von 1993 bis 1995 verantwortliche (Mobilisierungs)-Planung, Stammzellapherese und Retransplantation aller Erwachsenen Patienten der Medizinischen Klinik, allgemeine Innere Medizin und der medizinischen Poliklinik in Bonn. Enge Kooperation mit der Hämatologie/Onkologie Kinderklinik Bonn.

Seit 1994 Mitgründung Arbeitsgemeinschaft Durchflußzytometrie der DGTI Ausrichtung nationaler und internationaler Ringversuche zur CD34 pos Zellzahlbestimmungen.

seit 07/1995 Wissenschaftlicher Angestellter (Oberassistent) am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ, ehemals Knochenmarkspenderzentrale) der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Dort Leitung und Ausbau der Aphereseeinheit, Durchflußzytometrie, Kontrolleiter. Stellvertretende ärztliche Leitung des ITZ.

(Johannes Fischer)

Abstract: Einfluß automatisierter Zählmethoden auf die Charakterisierung von Nabelschnurbluttransplantaten

Die Transplantation hämatopoetischer Vorläufer- und Stammzellen aus Nabelschnurblut kann die Funktion von Knochenmark sowohl in verwandten wie unverwandten Empfängern rekonstituieren. Wachsende klinische Erfahrung und anhaltende Erfolge der Nabel-schnurbluttransplantationen gehen Hand in Hand mit einer ständig steigenden Zahl von zur Verfügung stehenden gut charakterisierten und kryokonservierten allogenen Nabel-schnurbluttransplantaten. Ein wesentliches Qualitätsmerkmal der Transplantate ist die tatsächlich zur Verfügung stehende transplantierbare Leukozytenzahl (Graft Cell Dose). Mehrere Faktoren erschweren bei neonatalen Proben wie Cord Blood die automatisierte Messung und Interpretation der Leukozytenzahlen: die Proben weisen hohe Zellzahlen und eine hohe Viskosität auf, Blutproben von Neugeborenen enthalten rote Blutkörperchen, welche eine höhere osmotische Resistenz aufweisen als normale Erythrozyten und das Blut Neugeborener weist eine hohe Zahl von kernhaltige Erythrozyten (NRBC) auf.

Grundsätzlich bestehen zur Zeit zwei automatisierte Meßmethoden zur Leukozytenzahl-bestimmung: Impedanzmessung und durchflußzytometrische optische Messung. Bei Impedanz- basierten Geräten können NRBC von Leukozyten nicht unterschieden werden, bei Geräten basierend auf einer optischen Messung erschweren lyseresistenten Erythrozyten die Messung.

Im Rahmen dieser prospektiven Verlaufsuntersuchung wurde die Wertigkeit verschiedener Meßverfahren auf die Leukozytenzahlbestimmung und Differenzierung im Cord Blood prospektiv zwischen April 1997 bis Dezember 1999 an 2317 plazentaren Nabelschnurblut Transplantaten der NETCORD Bank Düsseldorf untersucht. Von den 2317 Transplantaten wurden 1625 vor dem Einfrieren durch eine Zentrifugationsmethode mit zusätzlicher Erythrozytensedimentation durch Hydroxyethylstärke Volumen- reduziert.

Werden Impedanzmessung und optische Messung miteinander verglichen, zeigt sich, daß die optische Messung (WOC) immer einen niedrigeren Wert erbringt als die Impedanzmessung (WIC). Die optische Messung entspricht der viablen Leukozytenkonzentration ohne NRBC, die Impedanzmessung kann als Maßstab für die kernhaltige Zellmenge (inklusive NRBC) angesehen werden, die Differenz aus beiden korreliert linear mit der manuell ermittelten Konzentration der Normoblasten und stimmt mit dieser gut überein. Insbesondere Nabelschnurblute mit hohen Zellgehalten weisen hohe Normoblastenkonzentrationen auf.

die maschinelle Differenzierung durch optische Zellzählmethoden (Cell Dyn 3500) ergab eine gute Übereinstimmung des Neutrophilen- und Mononukleärenanteils zur manuellen Differenzierung. Durch rein Impedanz- basierte Zählverfahren werden hingegen deutlich mehr mononukleäre Zellen ermittelt, die Gesamtzahl der WBC um im Median 22%, die Gesamtzahl der MNC je Transplantat um 43% überschätzt. NRBCs werden nicht erkannt. Insbesondere für die Analyse von volumenreduzierten Transplantaten ist daher eine Impedanzmessmethode ungeeignet.

Wird mittels manueller Differenzierung die relative Normoblastenkonzentration ermittelt, reichert sich diese im Median um das 1,77 - fache an. Bei einem 3,37 - fachen medianen Anstieg der Leukozytenkonzentration durch die Volumenreduktion steigt somit unter Berücksichtigung der manuellen und der optischen Zählung die Normoblastenzahl je ml um fast das 6 - fache an. In 80% aller Präparationen erhöht sich der relative Normoblastengehalt durch Volumenreduktion, in 99,2% der Präparationen die absolute NRBC Konzentration. Diese dramatische Erhöhung der Normoblastenkonzentration wird bei Verwendung von rein Impedanz- basierten Zellzählern nicht entdeckt, da diese nicht Normoblasten von Leukozyten bzw. von Lymphozyten unterscheiden können. Die Wiederfindungsrate der Cord Blood Bestandteile nach Volumenreduktion liegt für Normoblasten bei 98%, für Leukozyten bei 92%, für Monozyten bei 88%, für Plättchen bei 42% und für das Hämoglobin bei 30% (Modalwerte).

Kernhaltige Erythrozyten wurden nach dem Auftauen eines Aliquots der jeweiligen Transplantate nicht mehr mittels Impedanzmessung erfasst. Werden daher vor Transplantation von der Cord Blood Bank Graft Cell Dosen angegeben, die die kernhaltigen Erythrozyten mit enthalten, finden sich diese Zahl beim Auftauen des Transplantates nicht mehr und tragen nicht zum Transplantationserfolg bei. Als kritische Größe für die Graft Cell Dose ist daher die Leukozytenzahl ohne NRBC zu sehen.