

RBC Disease Manager



Management von Anomalien der RBC-Indizes im Zusammenhang mit RBC-Erkrankungen

Einleitung

Erkrankungen der roten Blutkörperchen betreffen sowohl Kinder als auch Erwachsene und erfordern zumeist sofortige Aufmerksamkeit, um Symptome zu lindern. Diese Krankheiten können entweder erblich sein, wenn ein oder beide Elternteile ein defektes Gen an ihre Nachkommen weitergeben, oder vorübergehend, wenn die Symptome im Laufe des Lebens erworben werden, aber mit der entsprechenden Behandlung rückgängig gemacht werden können. Hinter hereditären RBC-Erkrankungen liegen Defekte im Hämoglobin oder der Zellmembran, die die beiden Hauptstrukturbestandteile eines roten Blutkörperchens sind, oder enzymatische Defekte im Erythrozytenstoffwechsel. Fortschrittliche Hämatologiesysteme ermöglichen es, solche Krankheiten durch die Interpretation bewährter und neuer Parameter sowie intelligenter Algorithmen zu vermuten.

Hämoglobinopathien

Hämoglobin

Ein rotes Blutkörperchen besteht hauptsächlich aus Hämoglobin und Wasser. Ein Hämoglobinmolekül besteht immer aus vier Globinketten, zu denen jeweils die Hämgruppe gehört, ein zyklisches Porphyrin mit abgestimmtem Fe^{2+} , das Sauerstoff bindet und

transportiert (siehe Abbildung 1). Es gibt eine Vielzahl verschiedener Globinketten und verschiedene Arten von Hämoglobinmolekülen, die mit verschiedenen Globinkettensamensetzungen aufgebaut werden. Der häufigste Hämoglobintyp bei gesunden Erwachsenen ist HbA_0 (97,5% der Gesamtmoleküle) aus zwei α -Globin- und zwei β -Globinketten ($\alpha_2\beta_2$). Die restlichen 2,5% bestehen aus HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$), während HbF , das fetale Hämoglobin ($\alpha_2\gamma_2$), das Hauptmolekül während der Schwangerschaft ist [1].

Was charakterisiert Hämoglobinopathien?

Hämoglobinopathien sind eine große Gruppe genetischer Störungen, die quantitative oder qualitative Störungen in der Produktion der Hämoglobinketten beschreiben (siehe Abbildung 1). Qualitative Störungen in der Hämoglobinproduktion können zu Hämoglobinvarianten führen, wovon bis heute mehr als 1.000 Hämoglobinvarianten identifiziert wurden. Sie werden durch Mutationen in bestimmten Genen verursacht [1]. Die meisten Varianten haben keine klinischen Folgen für den Träger, aber einige sind instabil und können zu hämolytischer Anämie führen. Träger instabiler Hämoglobine sind selten und werden oft nicht diagnostiziert.

Quantitative Störungen der Hämoglobinsynthese führen häufig zu Thalassämien. Bei dieser Gruppe von Blutkrankheiten ist die Synthese der α - oder β -Kette auf genetischer Ebene beeinflusst. Beta-Thalassämie ist die häufigste Form, die ausschließlich die

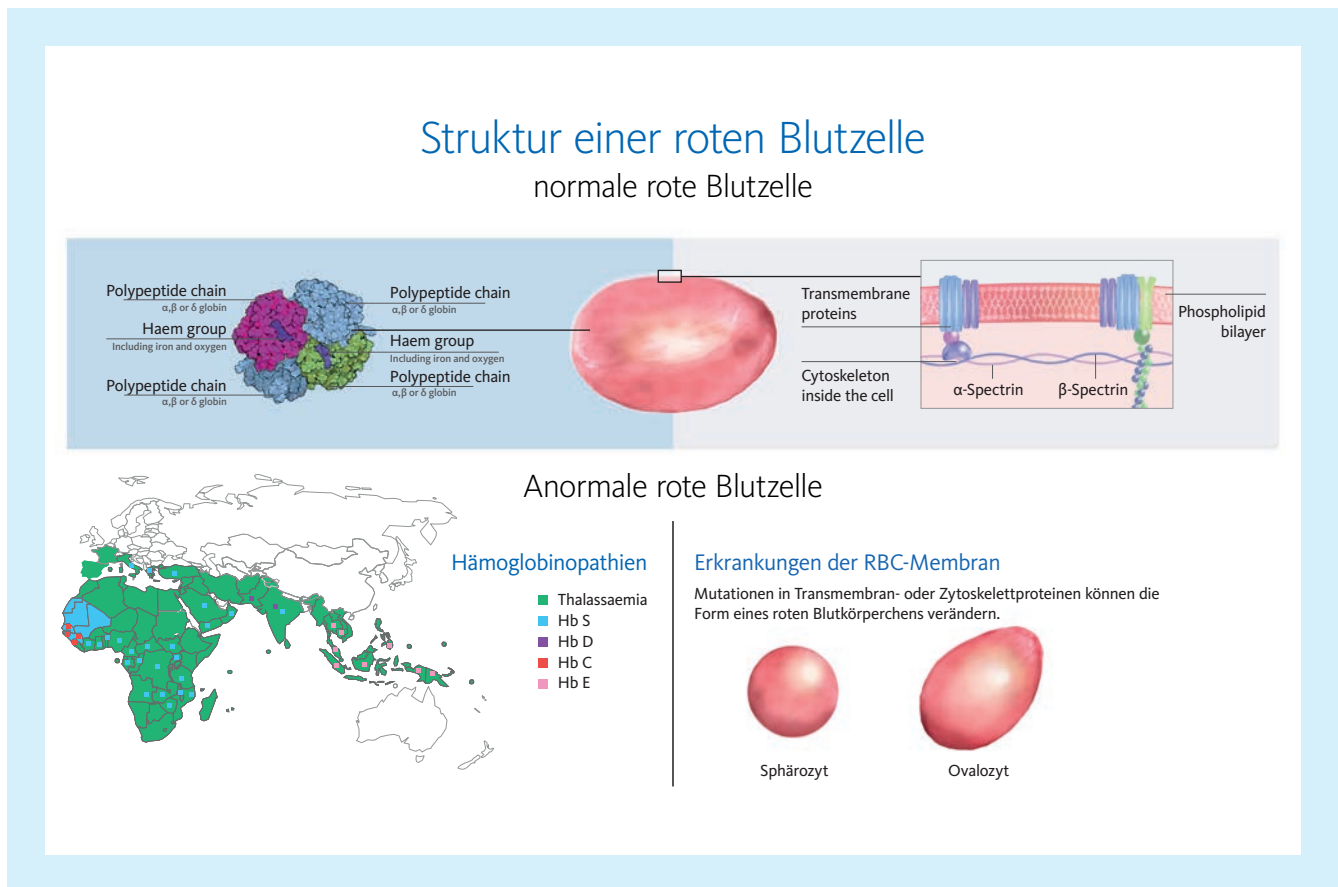


Abb. 1 Struktur eines roten Blutkörperchens. Ein gesundes rotes Blutkörperchen erhält seine unverwechselbare Form (oben Mitte) durch die einzigartige Zusammensetzung seiner Membran (oben rechts). Es kann mit Hilfe von Hämoglobinmolekülen (oben links) Sauerstoff transportieren. Erythrozytenerkrankungen können von Anomalien im Hämoglobin (unten links) oder in der Struktur der Zellmembran (unten rechts) verursacht sein.

β-Kette des Hämoglobins betrifft, die reduziert sein kann oder fehlt. Die drei Hauptformen der Beta-Thalassämien sind Thalassaemia major, Thalassaemia intermedia und Thalassaemia minor [2].

Verdacht auf instabile Hämoglobinvarianten

Mehrere Fallstudien haben das Auftreten und die anschließende Diagnose instabiler Hämoglobinvarianten aus peripherem Blut mit den automatisierten Hämatologiesystemen von Sysmex beschrieben [3–7]. Laut diesen Fallstudien verhalten sich instabile Hämoglobinvarianten während der Lyse von roten Blutkörperchen, einem wichtigen Schritt bei der Messung weißer Blutkörperchen, nicht wie ihre stabilen Gegenstücke.

Proben mit instabilen Hämoglobinvarianten zeigten ungewöhnliche Fluoreszenzsignale im Messkanal der Leukozyten und verhinderten eine korrekte Differenzierung dieser Zellen. Die Autoren und Autorinnen stellten die Hypothese auf, dass die freigesetzten instabilen Hämoglobinvarianten mit dem Fluoreszenzmarker, der für die Differenzierung der weißen Blutkörperchen verwendet wird, interferieren und so die korrekte Trennung der Subpopulationen stört [4, 5]. Der ausgelöste Warnhinweis könnte in Verbindung mit den beschriebenen abnormalen Scattergrammen bei einer

hämolytischen Anämie zu weiteren Tests führen, wie z. B. einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Analyse (HPLC) der Hämoglobinzusammensetzung und/oder genetischer Sequenzierung.

Identifizierung von Thalassämie

Eine Indikation für eine Thalassämie lässt sich aus mehreren diagnostischen Tests mit unterschiedlichen Technologien ableiten. In den Ergebnissen des kleinen Blutbilds lassen sich häufig erste Indizien einer unentdeckten Thalassämie finden.

Danise *et al.* nutzten die Anzahl der kernhaltigen roten Blutkörperchen (NRBC), um Thalassämien effektiv von anderen erblichen Erythrozytenerkrankungen zu unterscheiden. In einer Studienkohorte von Patienten und Patientinnen mit Thalassämia major, Thalassaemia intermedia und hereditärer Sphärozytose erwies sich das Vorhandensein von NRBC im peripheren Blut als klarer Indikator für Thalassämie, wobei 100 % der Thalassämia major- und 87 % der Thalassämia intermedia-Fälle korrekt identifiziert wurden, während Menschen mit hereditärer Sphärozytose keine NRBC aufwiesen [8].

Eine große Forschungsanstrengung konzentrierte sich auf die Unterscheidung von Beta-Thalassämie und Eisenmangelanämie (IDA), zwei Erkrankungen mit unterschiedlichen Ätiologien. Jedoch teilen sich beide Erkrankungen das Vorhandensein mikrozytärer roter Blutkörperchen und erschweren somit die Unterscheidung. IDA ist eine erworbene Erkrankung, bei der wenig Eisen für die Hämoglobinsynthese vorhanden ist. Urrechaga *et al.* verglichen die Blutprofile von Personen mit Beta-Thalassämie und Personen mit IDA und identifizierten die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Beta-Thalassämie-Träger und -Trägerinnen hatten eine erhöhte Anzahl roter Blutkörperchen, ein verringertes mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), einen hohen Prozentsatz an mikrozytären roten Blutkörperchen (MicroR), sowie eine mäßig erhöhte unreife Retikulozytenfraktion (IRF). Menschen mit IDA hingegen hatten ein erhöhtes Vorhandensein von hypochromen roten Blutkörperchen (HYPO-He) und eine erhöhte Verteilungsbreite der roten Blutkörperchen (RDW-CV), ein Parameter, der auf eine Anisozytose hinweist [9].

Ebenso entwickelten mehrere Gruppen auf den Blutprofilen basierende Algorithmen, um zwischen Beta-Thalassämie und IDA zu unterscheiden, die alle mit der gemeinsamen Voraussetzung des Vorhandenseins mikrozytärer roter Blutkörperchen (MCV < 85 fL oder MCV < 80 fL) beginnen. Schoorl *et al.* entwickelten beispielsweise sechs Algorithmen zur Unterscheidung der beiden Bedingungen, wobei sie eine Sensitivität von 79 % für Beta-Thalassämie und eine Sensitivität von 74 % für IDA erreichten [10]. Weitere Details zum letzten Fall finden Sie im Whitepaper *'Advanced RBC parameters in the differential diagnosis and management of anaemia'* [11]. Darüber hinaus validierten Urrechaga *et al.* anhand einer Kohorte von 2.664 Patienten und Patientinnen mit mikrozytärer Anämie die Leistung von über 20 verschiedenen diskriminierenden Algorithmen. Basierend auf den diagnostischen Bedürfnissen gab es Algorithmen, die besser funktionierten, um die Zustände zu identifizieren oder auszuschließen [12]. Die weitere Abgrenzung von Beta-Thalassämien von anderen Erkrankungen mit abnormalen RBC-Indizes, nicht nur mit IDA, wird im Kapitel RBC Disease Manager beschrieben.

Moderne automatisierte HPLC-Analysatoren (high performance liquid chromatography/Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) können in den Labor-Workflow integriert werden und liefern wertvolle Informationen für die Identifizierung von Thalassämien, wie der Tosoh HLC-723G11-Analysator, der mit einem speziellen Beta-Thalassämie-Modus (Beta-Thal) ausgestattet ist. Im Beta-Thal-Modus trennt und quantifiziert der Analysator HbA₂ und HbF, die beide bei Erkrankten mit Beta-Thalassämie signifikant erhöht sind [13].

Im Labor kann die sorgsame Beurteilung von RBC-Warnhinweisen der Hämatologiesysteme dabei unterstützen unerwartete RBC-Erkrankungen zu identifizieren und für die betroffene Person von großem Nutzen sein.

RBC-Einschlüsse

Obwohl sie selbst keine Erythrozytenerkrankung darstellen, wurden Erythrozyteneinschlüsse im Zusammenhang mit Anämien oder Thalassämien beschrieben und könnten als zusätzliche Indikation für diese Erkrankungen dienen. Einschlüsse sind ein häufiges Phänomen, insbesondere Pappenheim- und Howell-Jolly-Körperchen. Pappenheim-Körperchen sind nach dem entdeckenden Arzt – Alwin M. Pappenheimer – benannt und beschreiben RBC-Einschlusskörper, die aus Eisen in Form von Ferritin im Zytosol bestehen [14]. Bei gesteigerter Erythropoese (z. B. verursacht durch hämolytische Anämie) oder gestörter Hämoglobinproduktion (z. B. Thalassämie) kann das Vorhandensein von roten Blutkörperchen mit Pappenheim-Körperchen erhöht sein [15]. Howell-Jolly-Körperchen hingegen sind DNA-Einschlüsse. Diese RBC-Einschlüsse können aus einer pathologischen Fragmentierung des Erythroblastenkerns oder des verbleibenden Chromosomenmaterials nach der Mitose während der Erythropoese stammen. Der verbleibende DNA-Gehalt in der Zelle kann die Retikulozytenzählung stören und zu einer Pseudo-Retikulozytose führen [16].

Darüber hinaus sind diese Arten von Einschlüssen bei Personen vorhanden, die sich einer Splenektomie unterzogen haben, da die Milz normalerweise betroffene rote Blutkörperchen filtert und die Einschlüsse entfernt, ohne die Zellen zu zerstören – ein Prozess, der als „Pitting“ (Entkernen) bezeichnet wird [14]. Auch Einschlüsse wie Heinz-Körper (denaturierte Hämoglobin-Aggregate) oder basophile Tüpfelung (Aggregate von Ribosomen oder Fragmente von ribosomaler RNA) können gefunden werden.

DNA-Einschlüsse wie Howell-Jolly-Körperchen werden im Fluoreszenz-Retikulozytenkanal (RET) der Analysatoren miterfasst, wo Retikulozyten nach DNA/RNA-Markierung gemessen werden. Daraus resultierende Anomalien in Scattergrammen und Zählwerten triggern Hinweise und ermöglichen weiterführende Untersuchungen durchzuführen, z. B. eine mikroskopische oder automatische digitale Bilduntersuchung eines Blutausstrichs [16].



Links: Pappenheim-Körperchen. Quelle: Copyright Universitätsklinikum Aachen AÖR, Klinik für Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie und Stammzelltransplantationen, Medizinische Klinik IV, Uniklinikum RWTH Aachen. Rechts: Howell-Jolly-Körperchen. Quelle: Sheikh Khalifa Medical City, Hämatologie-Sektion, Abu Dhabi, VAE

Erkrankungen der Erythrozytenmembran

Physiologie der Membran der roten Blutkörperchen

Reife rote Blutkörperchen, die im peripheren Blut zirkulieren, haben die charakteristische Form einer bikonkaven Scheibe, die in der Mitte komprimiert aussieht, und am Rand dicker erscheint (siehe Abbildung 1). Diese Form, zusammen mit dem Fehlen eines Kerns, ermöglicht es den Zellen, mehr Sauerstoffmoleküle im Vergleich zu einer kugelförmigen Zelle des gleichen Volumens (erhöhtes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen) zu tragen. Sie können dadurch ihre Form so verändern, dass sie durch Kapillaren navigieren, die kleiner als ihr Durchmesser sind [17].

Die Membran der roten Blutkörperchen besteht, wie bei praktisch allen menschlichen Zellen, aus einer Lipiddoppelschicht, in die Transmembranproteine eingebettet sind, die den Austausch von Ionen und die freie Bewegung von Wassermolekülen erleichtern. Spezifisch für rote Blutkörperchen ist ein Netzwerk von Zytoskelettproteinen, hauptsächlich Spektrinen und Aktinen, in Proteinkomplexen verankert, die die Transmembranproteine umfassen und ein Skelettnetz bilden, das die zytoplasmatische Seite der Membrandoppelschicht laminiert.

Diese Doppelstruktur, bestehend aus der Lipiddoppelschicht mit ihren Proteinen und dem Skelettnetz, verleiht den roten Blutkörperchen die Form-, Integritäts- und Verformbarkeitseigenschaften, damit sie 120 Tage im peripheren Blut zirkulieren und überleben können (siehe Abbildung 1) [18].

Was charakterisiert RBC-Membranerkrankungen?

Jede Anomalie in den Transmembran- oder Zytoskelettproteinen führt zu einer Abweichung der bikonkaven Scheibenform, die die physiologischen Eigenschaften der Zellen verändert und zu einer verminderten Motilität und Lebenszeit führt. Mehrere solcher Erythrozyten-Membranerkrankungen waren in den letzten Jahrzehnten Gegenstand umfangreicher Forschung, da schnellere und einfachere Nachweistests erforderlich sind.

Die hereditäre Sphärozytose ist eine vererbte Membrandisposition roter Blutkörperchen, die durch das Vorhandensein von kugelförmigen roten Blutkörperchen gekennzeichnet ist, die ihre zentrale Konkavität verloren haben (siehe Abbildung 1). Die Krankheit entsteht durch Defekte in Membranproteinen, die zur Entkopplung des Skelettnetzes von der Lipiddoppelschicht führen und die Physiologie der Zellen verändern. Sphärozyten verlieren ihre Verformbarkeit und werden eingeschlossen, wenn das Blut in der Milz gefiltert wird. Die erhöhte Funktion der Milz zur Entfernung der Sphärozyten führt zu einer Vergrößerung des Organs (Spleno-megalie), einer der typischen klinischen Zustände der Krankheit, zusammen mit Gelbsucht und Anämie. Da einige Sphärozyten der Milz entweichen können und wieder in den Kreislauf eintreten, ist es möglich sie mit Labortests zu identifizieren [19].

Die Zerstörung von roten Blutkörperchen in der Milz wird durch eine höhere Produktion und Freisetzung von Retikulozyten aus dem Knochenmark kompensiert. Retikulozyten von Patienten und Patientinnen mit hereditärer Sphärozytose zeigen einen geringen Anteil sehr unreifer Retikulozyten (IRF niedrig), vermutlich weil der Farbstoff aufgrund der veränderten Membranstruktur weniger gut in die Zellen eindringen kann. Dies unterscheidet die hereditäre Sphärozytose von anderen Erkrankungen wie z. B. hämolytische Anämie und Eisenmangel, bei denen zumeist eine höhere Anzahl unreifer Retikulozyten gefunden wird.

Ähnlich wie die hereditäre Sphärozytose ist auch die südostasiatische Ovalozytose eine erbliche Membranerkrankung der roten Blutkörperchen, die auf eine Mutation im Band-3-Transmembranprotein zurückzuführen ist, die zusammen mit strukturellen Anomalien eine Fehlregulation des Ionenaustauschs verursacht. Die roten Blutkörperchen erhalten somit eine ausgeprägte ovale Form, die die Verformbarkeit beeinflusst (siehe Abbildung 1). Personen mit dieser Krankheit zeigen normalerweise keine schweren klinischen Symptome, dennoch können Anzeichen leichter Hämolyse und Gelbsucht vorkommen [20].

Eine weitere wichtige Erkrankung mit der Notwendigkeit einer schnellen Diagnostik ist die Sichelzellerkrankung (sickle cell disease, SCD). Obwohl es durch eine Mutation im β -Globin-Ketten-Gen von Hämoglobin A verursacht wird, die zur Erzeugung von Hämoglobin-HbS führt, wurde die Sichelzellerkrankung aufgrund der charakteristischen Sichelform, die die roten Blutkörperchen unter niedrigen Sauerstoffgehaltsbedingungen annehmen, mit anderen Membranerkrankungen der roten Blutkörperchen in Verbindung gebracht. Diese Sichelform kann ischämische Episoden verursachen, da die roten Blutkörperchen den Blutfluss in den Kapillaren blockieren. Ein weiterer wichtiger Faktor in der Pathophysiologie der Erkrankung ist die sehr kurze Lebensdauer eines sichelnden roten Blutkörperchens von bis zu 20 Tagen, was zu einer hohen Hämolyse-rate beiträgt, die das Knochenmark nicht kompensieren kann [21].

Algorithmus für hereditäre Sphärozytose

Mit dem Fortschritt in der Technologie von Hämatologiesystemen und der Fähigkeit, Retikulozyten und ihre verschiedenen Fraktionen zu messen, wurde die Retikulozytose als zusätzliches klinisches und diagnostisches Merkmal dieser Krankheit eingeführt. Die ersten Forscher, die diese Merkmale nutzten, waren Mullier *et al.* in ihrem Diagnosewerkzeug für das Screening der hereditären Sphärozytose basierend auf Blutbildergebnissen. In ihrer Kohorte hatten alle 45 Patienten und Patientinnen mit bestätigter Erkrankung eine Retikulozytenzahl (RET) $\geq 80.000/\mu\text{L}$ und ein Verhältnis Retikulozyten zu Fraktion unreifer Retikulozyten (RET/IRF) von mehr als 7,7. Diese Werte dienten als Voraussetzung, um erbliche Sphärozytosefälle mit einer Sensitivität von 100 % zu screenen, um sie von hämolytischen Störungen, Eisenmangel, gesunden Kontrollen und anderen Routineproben zu unterscheiden. Träger- oder milde Fälle waren gekennzeichnet durch Hämoglobinspiegel (HGB) von mehr als 12,0 g/dl (7,4 mmol/L) und RET/IRF ≥ 19 .

Die weitere Schwere der Erkrankung wurde unter Verwendung neuerer Blutbild-Parameter abgeleitet. Schwerere Fälle sind gekennzeichnet durch die Freisetzung von Mikropartikeln, Teilen der Membran, die sich aufgrund der Entkopplung vom Skelettnetz von den roten Blutkörperchen gelöst haben, was sich in einer Erhöhung des Parameters MicroR widerspiegelt. Darüber hinaus kann die Hypochromie der roten Blutkörperchen mit dem HYPO-He beurteilt werden. Diese beiden Parameter zusammen ermöglichten die Identifizierung mittelschwerer oder schwerer Fälle: Patienten und Patientinnen mit $\text{MicroR} \geq 3,5\%$ und $\text{MicroR}/\text{HYPO-He} \geq 2,5$ (für HGB zwischen 8,0 und 12,0 g/dl, 5,0 und 7,4 mmol/L) oder $\text{MicroR}/\text{HYPO-He} \geq 2,0$ (für HGB < 8,0 g/dl, 5,0 mmol/L) [22].

Dieser Algorithmus zur Identifizierung der hereditären Sphärozytose, der die CBC-Ergebnisse eines Hämatologiesystems von Sysmex verwendet, wurde in die Leitlinien für die Labordiagnostik von Erythrozyten-Membranerkrankungen des International Council for Standardization in Haematology (ICSH) aus dem Jahr 2015 integriert. Die Leitlinien erkennen die gute Leistung des Algorithmus an und besagen, dass ein positives Ergebnis des Algorithmus in Verbindung mit einem Bestätigungstest in Fällen verwendet werden sollte, in denen keine Familienanamnese der hereditären Sphärozytose dokumentiert ist [23].

Nach der Veröffentlichung von Mullier et al. validierten mehrere andere Gruppen den Algorithmus und passten die Cut-offs an, um die einzelnen Patienten- und Patientinnenkohorten besser widerzuspiegeln. Persijn et al., die in einem Universitätskrankenhaus arbeiteten, befassten sich mit schwereren Pathologien und splenektomierten Patienten und Patientinnen.

Es wurde festgestellt, dass die Splenektomie, ein übliches chirurgisches Verfahren bei Patienten und Patientinnen mit hereditärer Sphärozytose, die Retikulozytenspiegel im peripheren Blut senkt. Eine Kompensation aus dem Knochenmark ist nicht mehr erforderlich, da die Spiegel der roten Blutkörperchen und des Hämoglobins wieder auf physiologische Werte zurückkehren. Da das Ziel darin bestand, nur unbekannte Patienten und Patientinnen zu identifizieren, konnte die Gruppe die anfängliche Schwelle der RET auf 100.000/ μL erhöhen und die Grenze für MicroR für schwere Fälle auf 2,6% senken. Diese Schwellenwerte erreichten eine Sensitivität von 100% [24].

In ähnlicher Weise bestätigten Sottiaux et al., dass der Algorithmus für splenektomierte Patienten und Patientinnen nicht gut geeignet ist, obwohl sie die von Mullier et al. vorgeschlagene anfängliche RET-Schwelle beibehielten und den RET/IRF-Cut-off für Träger- und Trägerinnen und milde Fälle auf 14 senkten, wodurch eine Sensitivität von 94% erreicht wurde [25]. Schließlich konnten Bobeé et al. mit den gleichen Blutparametern alle Fälle von hereditärer Sphärozytose, sowie alle Patienten und Patientinnen mit Pyruvatkinase-Mangel, einem enzymatischen Mangel der roten Blutkörperchen, identifizieren. Für die hereditäre Sphärozytose wurden folgende Kriterien eingeführt: $\text{RET} \geq 80.000/\mu\text{L}$, $\text{RET}/\text{IRF} > 9,1$ und $\text{MicroR} > 2,2\%$ für HGB < 12,0 g/dl (7,4 mmol/L) oder $\text{MicroR}/\text{HYPO-He} \geq 3,5$ für HGB > 12,0 g/dl (7,4 mmol/L). Ähnlich verhält es sich bei Pyruvatkinase-Mangel: $\text{RET} > 150.000/\mu\text{L}$, $\text{RET}/\text{IRF} > 9,5$, $\text{MicroR} < 5,5\%$ und $\text{MicroR}/\text{HYPO-He} < 6,0$ [26]. Die Cut-offs für die im Algorithmus enthaltenen Parameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 Übersicht der Cut-off-Werte für das Screening und die Identifizierung der hereditären Sphärozytose.

	Mullier et al.	Persijn et al.	Sottiaux et al.	Bobeé et al.
HS Erkrankte				
■ Nummer	n = 45	n = 20	n = 27	n = 47
HS Erkrankte				
■ RET#	$\geq 80.000/\mu\text{L}$	$\geq 100.000/\mu\text{L}$	$\geq 80.000/\mu\text{L}$	$\geq 80.000/\mu\text{L}$
■ RET/IRF	> 7,7	> 7,7	> 7,7	> 9,1
Schwere				
Träger and milde Form				
■ RET/IRF	≥ 19	≥ 19	≥ 14	> 9,1
Moderate und schwere Form				
■ MicroR	$\geq 3,5\%$	$\geq 2,6\%$	$\geq 3,5\%$	> 2,2% für HGB < 12,0 g/dL für HGB < 7,4 mmol/L
■ MicroR/Hypo-He (8,0 g/dL < HGB < 12,0 g/dL) (5,0 mmol/L < HGB < 7,4 mmol/L)	$\geq 2,5$	$\geq 2,5$	$\geq 2,5$	$\geq 3,5$ für HGB > 12,0 g/dL für HGB > 7,4 mmol/L
■ MicroR/Hypo-He (HGB < 8,0 g/dL) (HGB < 5,0 mmol/L)	$\geq 2,0$	$\geq 2,0$	$\geq 2,0$	
Leistung				
■ Sensitivität	100%	100%	94,1%	100%
■ Spezifität	99,3%	99% (ohne Splenektomie)	96,7%	92,1%

Regeln zur Abklärung inkorrekturer RBC-Indizes

Obwohl die gezielte Identifizierung der hereditären Sphärozytose aus anderen hämolytischen Erkrankungen die Diagnostik und Workflow-Effizienz verbessert, spiegelt sie die Bedürfnisse der Ärzte und die alltägliche Arbeitsbelastung der Labore nicht vollständig wider. Berda-Haddad *et al.* fanden heraus, dass Fälle von Erythrozytenerkrankungen, hauptsächlich Sichelzellenanämie und hereditäre Sphärozytose, zunächst aufgrund einer erhöhten mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration (MCHC) (> 36,5 g/dl, 22,7 mmol/l) vermutet werden konnten, und entwickelten einen Entscheidungsbaum, um diese Krankheiten von anderen Ätiologien mit vermeintlich inkorrekten Erythrozyten-Indizes zu unterscheiden.

MCHC gilt als stabiler Index der roten Blutkörperchen mit einem sehr engen Bereich. Wann immer ein erhöhter Wert auftritt, ist es für den behandelnden Arzt wichtig zu verstehen, ob dieses Phänomen ein Artefakt (z. B. Kälteagglutination) ist oder ob es tatsächlich einen pathologischen Zustand widerspiegelt. Um dieses Problem zu lösen, verglichen Berda-Haddad *et al.* die Messungen von RBC und HGB zwischen den Standardmesstechnologien und der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie-Analyse der automatisierten Hämatologie-Systeme von Sysmex. Basierend auf der Biologie der Erkrankung, und einer visuellen Beurteilung der Blutprobe, erstellten sie ein kleines Regelwerk, das RBC-Kälteagglutination, optische Interferenzen und RBC-Erkrankungen identifizieren und voneinander unterscheiden kann.

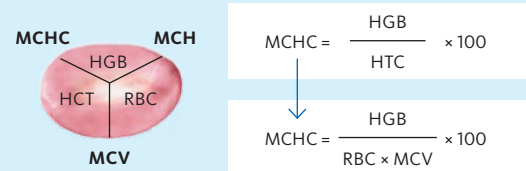
RBC-Kälteagglutination konnte aus einem Unterschied zwischen der fluoreszenz-optischen Messung und der hydrodynamisch fokussierten Impedanzmessung der Anzahl roter Blutkörperchen nachgewiesen werden. Da die fluoreszenz-optische Methode keine Interferenz aufwies, ist es diejenige, die berichtet wurde.

Fälle von optischer Interferenz und RBC-Erkrankungen zeigten die gleichen Unterschiede im Hämoglobin zwischen den beiden Technologien des Systems. Eine Unterscheidung zwischen den beiden wurde mit dem RBC-Score ermöglicht, der aus der Retikulozytenzahl und der Anzahl fragmentierter roter Blutkörperchen (FRC) berechnet wurde. Beide Parameter nehmen in den Proben mit bekannten RBC-Erkrankungen zu.

Fälle von Sichelzellerkrankung und hereditärer Sphärozytose hatten einen positiven RBC-Score und spiegelten Fälle von echter MCHC-Erhöhung wider. Die beschriebenen Regeln werden in der *Extended IPU* von Sysmex als CBC-O Anwendung bereitgestellt [27].

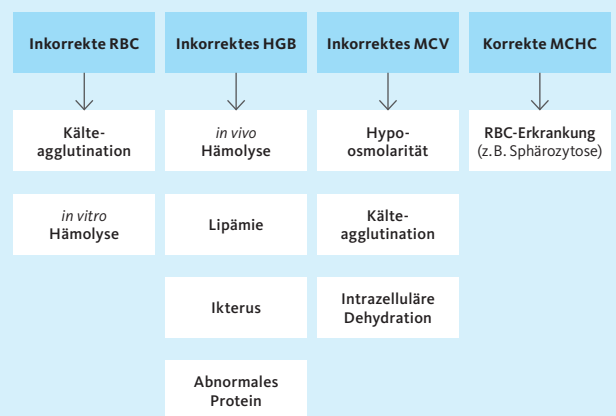
Erhöhte MCHC und CBC-O-Anwendung

MCHC wird aus dem Verhältnis von HGB zu HKT berechnet, welcher wiederum aus der RBC-Zahl und dem MCV berechnet wird.



Die CBC-O-Anwendung vergleicht die RBC-Indizes, die durch die hydrodynamisch fokussierte Impedanzmessung und die SLS-Hämoglobin Methode erzeugt werden, mit denen aus dem fluoreszenz-optischen Messkanal, die zusammen mit einer visuellen Beurteilung der Probe die wahrscheinlichste Ursache für die erhöhte MCHC nahelegen. Die Applikation erlaubt einen Vorschlag, welche der beiden Messwerte vertrauenswürdig ist und übertragen werden sollte.

Präanalytische und analytische Störfaktoren können zu falschen RBC-, HGB, oder MCV-Werten führen. Ein typisches Beispiel sind Kälteagglutinine. Eine echte MCHC-Erhöhung ist charakteristisch für Erkrankungen der roten Blutkörperchen, wie z. B. die hereditäre Sphärozytose.



RBC Disease Manager

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Studien zeigen das hohe Interesse und die Notwendigkeit einer zuverlässigen Diagnose von Hämoglobinopathien und Erythrozyten-Membranerkrankungen aus anderen Ursachen von Erythrozyten-Index-Anomalien. In einer Reihe von zwei Studien konnten Nivaggioni *et al.* einen ganzheitlichen Ansatz liefern und einen zuverlässigen Algorithmus beschreiben, der mehrere erbliche Erkrankungen der roten Blutkörperchen (einschließlich heterozygoter Hämoglobinopathien, Sichelzellerkrankung, hereditäre Sphärozytose und Südostasiatische Ovalozytose) von Patienten und Patientinnen mit IDA (einer erworbenen Erkrankung) oder anderen Erkrankungen unterscheidet. Die Indikation für jede Krankheit wurde von den empfohlenen Follow-up-Tests begleitet, die die Diagnose bestätigen können. Dadurch wurden unnötige Tests vermieden, die falsche Ergebnisse generieren könnten. Das reduziert letztendlich die Arbeitsbelastung des diagnostischen Labors.

Der Algorithmus bewertet das Vorhandensein mehrerer RBC- und RET-Parameter: MicroR (Anteil mikrozytäre RBC), NRBC, RDW-SD, MCHC und HYPO-He zu MicroR-Verhältnis. Proben mit normalen MCHC-Werten ($\leq 36,5$ g/dl, 22,7 mmol/L) gelangten von Anfang an in den Algorithmus, während Proben mit tatsächlich erhöhtem MCHC ($> 36,5$ g/dl, 22,7 mmol/L), wie durch die im vorherigen Kapitel beschriebene CBC-O-Anwendung identifiziert, direkt in den unteren Teil des Entscheidungsbaums gelangten (siehe Abbildung 2).

Heterozygote Hämoglobinopathien und IDA wurden als Fälle mit normalen MCHC-Werten ($< 36,5$ g/dl, 22,7 mmol/L) zusammen mit dem Vorhandensein von mikrozytären Zellen (MicroR $> 12,9\%$) dargestellt. Eine Unterscheidung zwischen den beiden wurde dadurch ermöglicht, dass Patienten und Patientinnen mit Hämoglobinopathie eine niedrige RDW-SD ($< 38,5$ fL) aufwiesen. Fälle von Sichelzellerkrankung zeigten sich sowohl mit normaler als auch mit erhöhter MCHC. Im ersten Fall wiesen die Fälle unterschiedliche Anteile an mikrozytären Zellen auf, unterschieden sich jedoch von anderen Bedingungen oder IDA durch höhere NRBC ($> 0,9\%$) mit MCHC $> 33,8$ g/dl (21,0 mmol/L) oder die höhere RDW-SD ($> 38,5$ fL) mit MCHC $> 33,0$ g/dl (20,5 mmol/L). Diese Fälle wurden dann an den unteren Teil des Algorithmus weitergeleitet und ausgewertet.

Hereditäre Sphärozytose, Südostasiatische Ovalozytose und ein Teil der Fälle von Sichelzellerkrankungen wurden alle von der CBC-O-Anwendung als echte Fälle von erhöhtem MCHC identifiziert. Zusammen mit den verbleibenden Fällen der Sichelzellerkrankung aus dem oberen Teil des Algorithmus wurden sie zunächst durch den RBC-Score bewertet. Sichelzellerkrankung und hereditäre Sphärozytose hatten aufgrund erhöhter Retikulozytenzahlen einen positiven RBC-Score. Die Südostasiatische Ovalozytose hingegen manifestierte sich nicht mit einer erhöhten Freisetzung von Retikulozyten im peripheren Blut, so dass der RBC-Score sehr niedrig blieb ($< 0,15$).

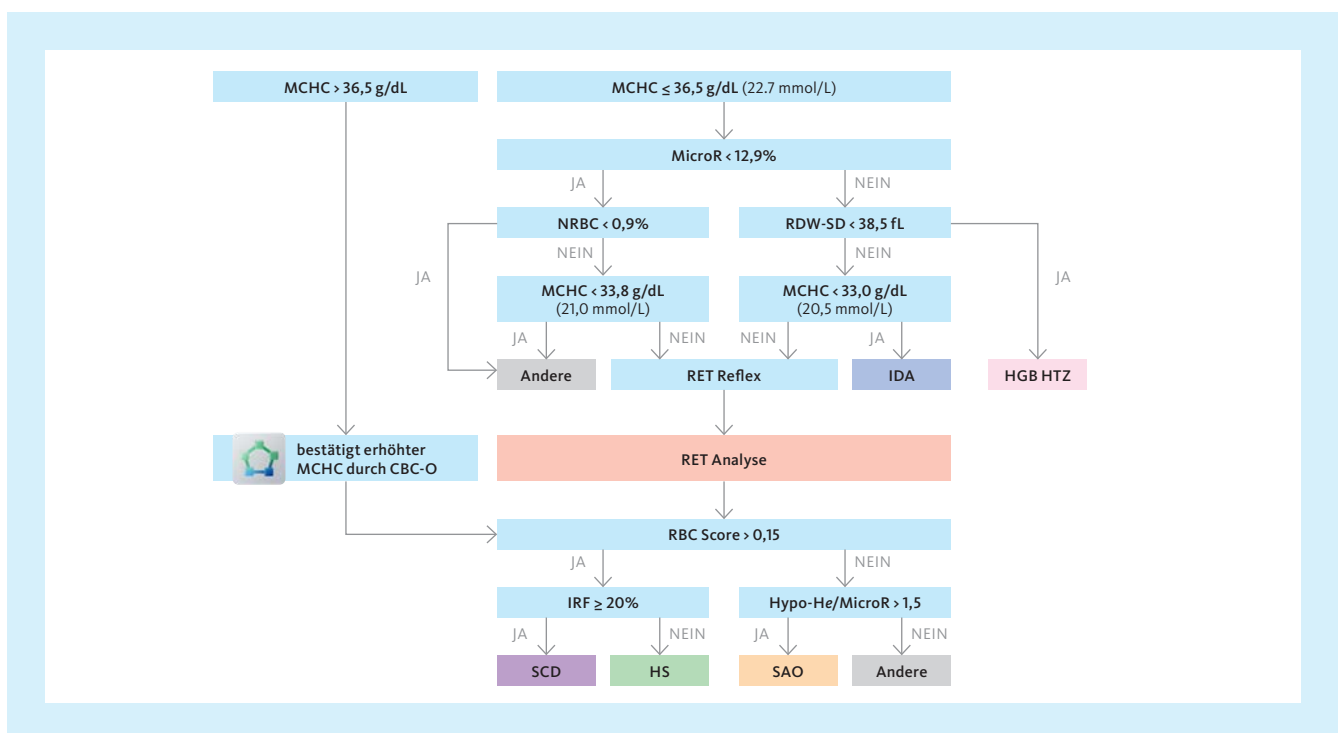


Abb. 2 RBC Disease Manager. Ein optionales Regelset, das Fälle von heterozygoten Hämoglobinopathien (HGB HTZ), Eisenmangelanämie (IDA), Sichelzellerkrankung (SCD), hereditärer Sphärozytose (HS) und Südostasiatischer Ovalozytose (SAO) basierend auf Ergebnissen des CBC, CBC-O inkl. RBC Score sowie erweiterten RBC- und RET-Parametern identifiziert. Modifiziert nach Nivaggioni V *et al.* 2021 [29].

Eine Differenzierung zwischen den beiden Erkrankungen mit einem positiven RBC-Score wurde auf der Grundlage der Tatsache vorgenommen, dass Fälle von Sichelzellerkrankung einen IRF von mehr als 20% aufwiesen. Die Fälle der Südostasiatischen Ovalozytose wurden durch ein HYPO-He/MicroR-Verhältnis von mehr als 1,5 bestätigt (siehe Abbildung 2 und Tabelle 2) [28, 29].

Tabelle 2 RBC-Indizes und RBC-Score von Proben mit RBC Erkrankung. (Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall). Hervorgehobene Werte zeigen im Algorithmus verwendete Daten [29].

	Sichelzell- krankheit	Sphäro- zytose	Ovalo- zytose	Andere
Erkrankte	n = 24	n = 14	n = 18	n = 68
MCHC (g/dL)	36,9 [36,6 – 37,6]	37,4 [36,6 – 38,3]	37,4 [36,7 – 38,2]	37,0 [36,6 – 38,7]
RBC Score	0,918 [0,15 – 1,00]	0,560 [0,01 – 1,00]	0,004 [0,00 – 0,06]	0,013 [0,00 – 1,00]
IRF (%)	30,0 [10,0 – 42,8]	9,7 [6,1 – 16,0]	14,4 [6,0 – 36,8]	10,8 [0,0 – 49,6]
HYPO-He/ MicroR	0,46 [0,11 – 1,33]	0,07 [0,00 – 0,32]	6,72 [2,78 – 11,87]	0,10 [0,00 – 0,86]
Hypo-He (%)	1,7 [0,2 – 10,5]	0,3 [0,1 – 2,5]	20,5 [9,5 – 38,7]	0,2 [0,0 – 4,6]
MicroR (%)	5,5 [0,3 – 19,9]	3,3 [1,7 – 17,2]	2,8 [1,5 – 10,1]	2,5 [0,5 – 23,0]

Fazit

Obwohl Hämatologiesysteme nicht in der Lage sind morphologische Anomalien direkt zu bestimmen, spiegelt sich die Biologie von Erythrozytenerkrankungen in den Indizes der roten Blutkörperchen und in erweiterten Parametern der roten Blutkörperchen wider. Intelligente Interpretationen von Blutbildern und Algorithmen, die Krankheitsmerkmale ausnutzen, stellen eine schnelle und sensitive Lösung zur Identifizierung bestimmter RBC-Erkrankungen dar, mit der Fähigkeit, sie von anderen Ätiologien zu unterscheiden, die zu abnormalen Erythrozytenindizes führen. Dies unterstützt eine rechtzeitige Diagnose und eine für die einzelnen Patienten und Patientinnen angemessene Behandlungsentscheidung sowie eine reduzierte Arbeitsbelastung im Labor aufgrund unnötiger Untersuchungen.

Literatur

- [1] **Thom CS et al. (2013):** Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(3): a011858.
- [2] **Kohne E. (2011):** Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 108(31-32): 532–40.
- [3] **Rosetti M et al. (2015):** A rare case of Hemoglobin Leiden interfering with the DIFF channel of Sysmex XE-2100. *Scand J Clin Lab Invest* 75(5): 436–7.
- [4] **Jongbloed W et al. (2018):** Unstable haemoglobin variant Hb Leiden is detected on Sysmex XN-Series analysers. *Clin Chem Lab Med* 56(9): e249–e50.
- [5] **Moioli V et al. (2019):** Mozhaik haemoglobin variant effects on leukocyte differential channel using the Sysmex XN series. *Clin Chem Lab Med* 57(12): e324–e7
- [6] **Mongelli F et al. (2016):** A rare and unstable hemoglobin variant, Hb M Dothan beta 25/26 (-GTG), detected by the anomalous cytogram on Sysmex XE-2100. *Clin Chem Lab Med* 54(2): e31–3.
- [7] **Teixeira C et al. (2017):** Automated detection of unstable hemoglobin variants by Sysmex XE-Series analyzers. *Clin Chem Lab Med* 55(11): e243–e6.
- [8] **Danise P et al. (2009):** Nucleated red blood cells and soluble transferrin receptor in thalassemia syndromes: relationship with global and ineffective erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med* 47(12): 1539–42.
- [9] **Urrechaga E et al. (2011):** Erythrocyte and reticulocyte parameters in iron deficiency and thalassemia. *J Clin Lab Anal* 25(3): 223–8.
- [10] **Schoorl M et al. (2012):** Efficacy of advanced discriminating algorithms for screening on iron-deficiency anemia and beta-thalassemia trait: a multicenter evaluation. *Am J Clin Pathol* 138(2): 300–4.
- [11] **White Paper:** Efficacy of advanced discriminating algorithms for screening on iron-deficiency anemia and beta-thalassemia trait: a multicenter evaluation. *Am J Clin Pathol* 138(2): 300–4.
- [12] **Urrechaga E et al. (2017):** Critical appraisal of discriminant formulas for distinguishing thalassemia from iron deficiency in patients with microcytic anemia. *Clin Chem Lab Med* 55(10): 1582–91.
- [13] **Merono F et al. (2011):** Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G8 automated HPLC analyzer for hemoglobin analysis in beta-thalassemia mode. *Clin Biochem* 44(5-6): 441–3.
- [14] **Sears DA et al. (2004):** Pappenheimer bodies: a brief historical review. *Am J Hematol* 75(4): 249–50.

- [15] **Thomas L. (2020):** *Clinical Laboratory Diagnostics 2020, 10th edition.* TH-Books.
- [16] **Jiang H et al. (2019):** *Interferents of Automated Reticulocyte Analysis Integrated with Relevant Clinical Cases.* *Clin Lab* 65(7).
- [17] **Tomaiuolo G. (2014):** *Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics.* *Biomicrofluidics* 8(5): 051501.
- [18] **Lux SEt. (2016):** *Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions.* *Blood* 127(2): 187-99.
- [19] **Perrotta S et al. (2008):** *Hereditary spherocytosis.* *Lancet* 372(9647): 1411–26.
- [20] **Flatt JF et al. (2020):** *Expression of South East Asian Ovalocytic Band 3 Disrupts Erythroblast Cytokinesis and Reticulocyte Maturation.* *Front Physiol* 11: 357.
- [21] **Kato GJ et al. (2018):** *Sickle cell disease.* *Nat Rev Dis Primers* 4: 18010.
- [22] **Mullier F et al. (2011):** *Additional erythrocytic and reticulocytic parameters helpful for diagnosis of hereditary spherocytosis: results of a multicentre study.* *Ann Hematol* 90(7): 759–68.
- [23] **King MJ et al. (2015):** *ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders.* *Int J Lab Hematol* 37(3): 304–25.
- [24] **Bobée V et al. (2018):** *Screening for hereditary spherocytosis in routine practice: evaluation of a diagnostic algorithm with focus on non-splenectomised patients.* *Ann Hematol* 91(2): 301–2.
- [25] **Sottiaux JY et al. (2020):** *Evaluation of a hereditary spherocytosis screening algorithm by automated blood count using reticulocytes and erythrocytic parameters on the Sysmex XN-series.* *Int J Lab Hematol* 42(2): e88–e91.
- [26] **Bobee V et al. (2018):** *Screening of hereditary spherocytosis and pyruvate kinase deficiency by automated blood count using erythrocytic and reticulocytic parameters.* *Int J Lab Hematol* 40(6): 697–703.
- [27] **Berda-Haddad Y et al. (2017):** *Increased mean corpuscular haemoglobin concentration: artefact or pathological condition?* *Int J Lab Hematol* 39(1): 32–41.
- [28] **Nivaggioni V et al. (2020):** *Use of Sysmex XN-10 red blood cell parameters for screening of hereditary red blood cell diseases and iron deficiency anaemia.* *Int J Lab Hematol* 42(6): 697–704.
- [29] **Nivaggioni V et al. (2021):** *Detection of Southern Asian Ovalocytosis with Sysmex XN-10: A complement to the decision tree previously described.* *Int J Lab Hematol* online ahead of print.

Weitere Hintergrundinformationen finden Sie in den White Papers auf unserer Website:
www.sysmex.de/whitepaper