



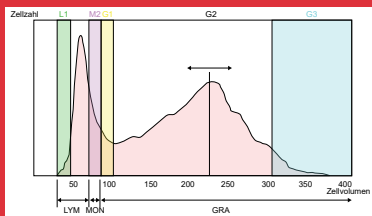
Korrekturformel für Gesamtleukozytenzahl bei Nachweis von Erythroblasten

Bei >5 Erythroblasten auf 100 Lc muss die Leukozytenzahl manuell wie folgt korrigiert werden:

$$100 \times \text{gemessene Lc-Zahl (Gerät)} / (100 + \text{Anzahl Ebl auf 100 Lc (Mik)})$$

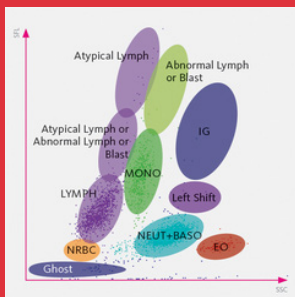
Beispiel:
Lc Gerät 5.60 G/L und 15 Erythroblasten auf 100 Lc (Mik) ergibt eine korrigierte Lc-Zahl von 4.87 G/L.

WBC-Verteilungskurve: Microsemi®

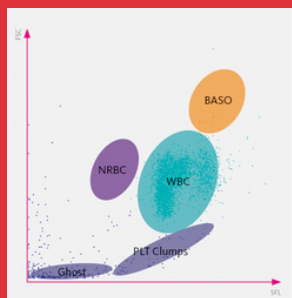


Microsemi®:
Der „L1“-Flag weist auf die anormale Präsenz von kleinen Zellen im Vergleich zu den Lymphozyten im Bereich 30 fL bis 70 fL hin. Dies können Plättchenaggregate, Erythroblasten oder anormale Lymphozyten sein. (Quelle: Microsemi® Manual)

Sysmex XN-Serie®



NRBC-Lage im Scattergramm des WDF-Kanals



NRBC-Population, Lage im Scattergramm des WNR-Kanals (Quelle: Sysmex XN-Serie, «Klinische Fallbeispiele»)

Einleitung

In Arztpraxen, Spital- und Auftragslaboratorien gehören automatische Hämatologiegeräte unterschiedlicher Dimensionen seit Jahren zur Grundausrüstung. Die Vorteile dieser Geräte sind so vielfältig, dass die früher verwendeten manuellen Methoden fast vollständig an Bedeutung verloren haben. Eine grosse Herausforderung im Bereich der automatisierten hämatologischen Analytik bleibt das Erkennen von Interferenzen und Störfaktoren. In diesem Blickpunkt möchten wir anhand unserer Probe MQ 2020-01 H3b die Möglichkeiten unterschiedlicher Analyser für die Erkennung kernhaltiger roter Vorstufen, den Erythroblasten (NRBC=nucleated red blood cells), vergleichen.

Messmethode von 3-Part-Diff-Hämatologiesystemen

3-Part-Diff-Hämatologiesysteme verwenden zwei Messkammern, eine für die Erythrozyten und Thrombozyten sowie eine für die Leukozyten. Für die Leukozytenmessung wird der Probe ein Lysemittel zugegeben, das die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten schrumpfen lässt.

Beim Impedanzverfahren werden die Partikel einzeln durch eine Messöffnung geführt, an der ein Gleichstrom angelegt ist. Jeder Zelldurchtritt verursacht einen elektrischen Impuls. Dabei entspricht jeder Impuls einem gezählten Ereignis und die Impulshöhe ist proportional zum Zellvolumen. Die Abgrenzung einzelner Populationen findet unter Verwendung von Diskriminatoren statt, welche je nach Gerät fix festgelegt oder wie bei den Sysmexgeräten begrenzt verschiebbar sind.

Flags-, Warnhinweise und Fehlermeldungen werden durch Algorithmen der Geräte generiert, welche durch Abweichungen der Diskriminatorpositionen einerseits bzw. An- oder Abwesenheit von Ereignissen in bestimmten Histogrammbereichen andererseits generiert werden. Erythroblasten interferieren aufgrund des Zellkerns im Leukozytenkanal im untersten Lymphozytenbereich. Sie führen also zu falsch hohen Messungen der Lymphozyten und Leukozytenzahl. Klärung kann hier nur eine manuelle Blutbild-Differenzierung mit Ermittlung des Erythroblastenanteils und anschliessend manueller Korrektur des Gesamt-Leukozytenwertes bringen.

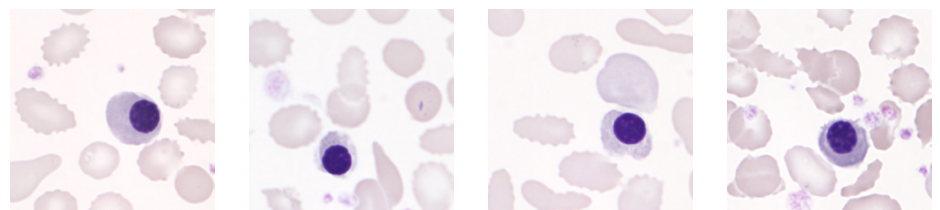
Messmethoden von 5-Part-Diff-Hämatologiesystemen

Diese komplexeren Hämatologiegeräte können auf zusätzliche Messtechniken und Auswertungsmöglichkeiten zurückgreifen, um Interferenzen besser erkennen und abgrenzen zu können. Unsere Ringversuchsproben werden jeweils mit einem Sysmex XN-20 sowie einem ADVIA 2120 analysiert. Im Folgenden werden wir deshalb die Messtechniken dieser beiden Geräte genauer betrachten.

Sysmex XN-Serie

Bei diesen Geräten wird für die Ec- und Thrombozytenmessung ein Impedanzverfahren zur Zählung von Zellen verwendet. Die Thrombozyten können zusätzlich auch mittels Durchflusszytometrie gezählt und differenziert werden (RET- und PLT-F Kanal). Leukozyten werden nach der Zugabe eines spezifischen Lysemittels und Anfärbung mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes durchflusszytometrisch analysiert. Dazu passieren die Zellen eine enge Fließzelle, in welcher das Licht eines Halbleiterlasers (Wellenlänge 633nm) auf sie gerichtet wird. Die Zellen streuen dabei das Laserlicht aufgrund ihrer Zellgrösse und Fluoreszenzintensität in unterschiedlichen Winkeln, unterschiedlich stark. Das Vorwärtstreulicht (FSC) macht eine Aussage über die Grösse der Blutzellen und das Seitwärtstreulicht (SFL) gibt Auskunft über den RNS/DNS Gehalt der Zellen. Das Seitwärtstreulicht (SSC) beurteilt die Granularität der Zellen. Die gemessenen Streulichter werden einander, je nach Kanal, unterschiedlich auf der x- und y-Achse des sogenannten Scattergramms gegenübergestellt. Für die Leukozytendifferenzierung und Detektion der unreifen Leukozyten findet diese Durchflusszytometrie im WDF (White blood cells Differentiation Fluorescence) Messkanal statt. Im WNR Kanal (White cells and Nucleated Red cells) wird die Zahl der Erythroblasten (NRBC%, NRBC#) ermittelt. Dank diesem Verfahren können die NRBC von den Leukozyten unterschieden werden, eine Korrektur ist nicht notwendig.

Es ist trotzdem empfehlenswert, wenn bei einem Patienten zum ersten Mal mehr als 5 Erythroblasten/100 Leukozyten festgestellt werden, den Befund mikroskopisch zu bestätigen.



Mikroskopische Aufnahme der Erythroblasten der Probe MQ 2020-1 H3B



Klinische Relevanz des Erythroblasten (NRBC) - Nachweises

Bei Neugeborenen können in den ersten Lebenswochen physiologischerweise Erythroblasten im peripheren Blut nachgewiesen werden. Liegt die Erythroblastenzahl über dem für Neugeborene festgelegten Referenzbereich kann dies beispielsweise auf einen chronischen oder postnatalen Sauerstoffmangel, eine Anämie, mütterlichen Diabetes, Stress oder auch Infektionskrankheiten zurückzuführen sein.

Beim Erwachsenen finden sich im peripheren Blutbild in der Regel keine Erythroblasten. Diese können z.B. bei schweren Anämien (besonders auch solchen mit ineffektiver Erythropoese wie z.B. der Thalassämie major), Leukämien und anderen hämatologischen Systemerkrankungen wie z.B. myeloproliferativen Neoplasien in grösserer Zahl im peripheren Blut vorkommen.

Zudem beschreiben unterschiedliche Studien den Gehalt an NRBC im peripheren Blut als prognostischen Faktor bei Stammzelltransplantationen oder auch intensivmedizinisch betreuten Patienten. Wobei Patienten mit hohen NRBC-Werte eine erhöhte Transplantat-Abstossungsrate bzw. eine erhöhte Mortalität aufzuweisen scheinen.

Literatur

1. Da Rin, G. Performance evaluation of the automated nucleated red blood cell count of five commercial hematological analyzers. *International Journal of Laboratory Hematology*, 39(6), 663-670.

Impressum

Autorin Annette Steiger
Fotografie Dr. Roman Fried

Fachliche Beratung

Y. Di Marzio, Dr. C. Widmer, Klinik für Medizinische Onkologie und Hämatologie, Universitätsspital Zürich, PD Dr. J. Goede, Kantonsspital Winterthur

© 2020 Verein für medizinische Qualitätskontrolle www.mqzh.ch

ADVIA 2120

Bei diesem Gerät werden ebenfalls zwei verschiedene Techniken angewandt. Im Baso-Kanal wird bei einer Leukozytenzahl bis ca. 20 G/l das Zytoplasma aller Zellen, mit Ausnahme der Basophilen, abgelöst. Danach können die Leukozyten neben den Basophilen aufgrund ihrer Form und Kernkomplexität in mono- und polynukleäre Zellen aufgeteilt werden. In der zusätzlichen Peroxidase-reaktion werden die Leukozyten fixiert und mit Peroxidase angefärbt. Neutrophile, Eosinophile und Monozyten lassen sich mit Peroxidase färben und Lymphozyten, sowie grosse Peroxidase-negative Zellen (LUC = large unstained Cells) lassen sich dadurch in verschiedenen Bereichen voneinander abtrennen. Auf der y-Achse wird die Lichtabsorption, welche proportional zum Peroxidasegehalt ist, angezeigt. Auf der x-Achse gibt das Streulicht der Zellen einen Hinweis auf ihre Grösse und Kernvariabilität. Erythroblasten erscheinen im Baso-Kanal im Bereich der polymorphkernigen Zellen (PMN). Ihre Zahl wird aber aufgrund der Daten aus dem Perox-Zytoprogramm erhoben, wo sie aufgrund ihrer geringen Grösse und der fehlenden Peroxidaseanfärbbarkeit im Bereich links unten zu liegen kommen. Die ermittelten Werte für NRBC (% und #NORMO) führen automatisiert zu einer Korrektur der Leukozytenzahl.

Trotzdem ist bei erstmaliger Feststellung eine mikroskopische Analyse notwendig.

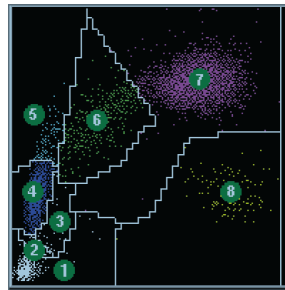
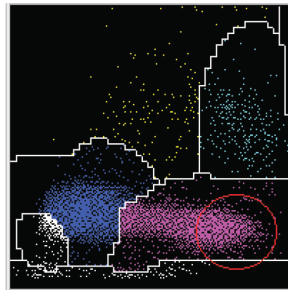
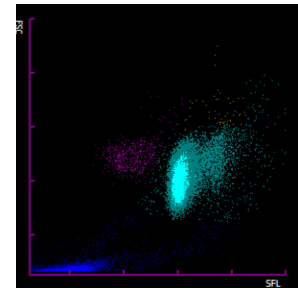
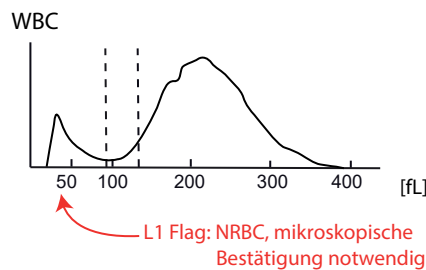


Abb. links: Lage der NRBC im Kopf der PMN-Population im Baso-Kanal.

Abb. rechts: Lage der NRBC im Abschnitt 2 des Peroxidase-Zytoprogramms.

- 1 = Rauschen
- 2 = Erythroblasten
- 3 = Tc-Aggregate
- 4 = Lymphozyten/Basophile
- 5 = LUC- grosse ungefärbte Zellen
- 6 = Monozyten
- 7 = Neutrophile
- 8 = Eosinophile

Messresultate der Probe MQ 2020-1 H3B



Microsemi®: Flagging im WBC Kanal

Sysmex XN-20: Erythroblasten im WNR-Kanal

In der Ringversuchsprobe fanden sich mikroskopisch 3 Erythroblasten auf 100 Lc was einem Absolutwert von rund 0.57 G/l entspricht. Daneben fand sich eine ausgeprägte Aniso-Poikilozytose mit vielen Ovalozyten, wenigen Akanthozyten und Tränenformen. Die 3-Part-Diff-Hämatologiesysteme haben in ihrem RBC-Histogramm alle eine aufgrund der Anisozytose verbreiterte Ec-Kurve. Mythic und Sysmex XP300 zeigen im untersten Ec-Kurvenbereich eine auffällige Schulter, die am ehesten durch kleine Ec respektive Ovalozyten verursacht wird. Dies führt bei Mythic zu FR1 Meldung für «Mikrozyten» und bei Sysmex zur RL-Flag, welche auf eine abnorme Frequenz von Ereignissen am unteren RBC-Diskriminator hinweist. Lediglich das Microsemi CRP Gerät weist aufgrund einer atypischen Leukozytenkurve im untersten Lymphozytenbereich eine NRBC Verdachtsmeldungen aus. Bei diesen Geräten wäre eine Ermittlung der NRBC-Zahl über das Mikroskop mit anschliessender manueller Korrektur der Leukozytenzahl notwendig.

Bei den 5-Part-Diff-Hämatologiesysteme zeigt der Sysmex XN20 eine NRBC-Messung von 2.9 % bzw. 0.56 G/l an, der ADVIA 2120 weist keine NRBC aus. Die Leukozytenzahl wurde beim Sysmex entsprechend automatisch korrigiert. In unserem Beispiel beeinflusst der geringe Anteil an Erythroblasten die Gesamtleukozytenzahl nur minim. Bei leukopenischen Proben mit hohem NRBC-Anteil kann die Differenz zwischen unkorrigierter und korrigierter Leukozytenzahl jedoch relevant sein. Die würde unter anderem auch zu einer falsch günstigen Beurteilung hinsichtlich des Neutrophilen-Absolutwertes (Feststellung einer Neutropenie) führen. Die Detektionsgrenzen für Erythroblasten liegen bei Sysmex XN bei 0.019 G/l, bei ADVIA bei 0.167 G/l (1).