

## Die klinische Relevanz der Bestimmung von NRBC im kleinen Blutbild durch die XN-Serie

Xtra Schweiz | März 2012 | Nr. 10

Der Begriff »NRBC« – »nucleated red blood cells« – bezeichnet kernhaltige Vorstufen der roten Blutzellen, auch bekannt als Erythroblasten oder – veraltet – Normoblasten. NRBC finden sich beim gesunden Erwachsenen und älteren Kind nur im blutbildenden Knochenmark, wo sie heranreifen. Ihr Auftreten im peripheren Blut deutet auf eine extramedulläre Erythropoese (Blutbildung ausserhalb des Knochenmarks) oder eine Störung der Blut-Knochenmark-Schranke hin. Beides kommt nur im Rahmen ernsthafter Erkrankungen vor. Lediglich bei Früh- und Neugeborenen treten NRBC physiologisch im zirkulierenden Blut auf.

### Was sagt die NRBC-Zahl bei Neugeborenen aus?

Es ist eine allseits bekannte Notwendigkeit, bei Neugeborenen die NRBC-Zahl zu ermitteln, um so ein akkurates Zählergebnis der weissen Blutzellen (WBC) zu erhalten – sei es durch die manuelle WBC-Korrektur oder eine automatische Korrektur durch das Hämatologie-Analysensystem. Darüber hinaus kann die NRBC-Zahl bei Neugeborenen aber auch wertvolle weiterführende Hinweise liefern. Bereits im Jahr 1924 wurden die ersten Referenzwerte für die NRBC-Zahl von Neugeborenen am ersten Lebenstag veröffentlicht [1]. Bei 41 von 42 der in dieser Studie untersuchten Neugeborenen konnten NRBC im peripheren Blut festgestellt werden, und zwar mit einer durchschnittlichen Anzahl von 500 NRBC/ $\mu$ L bzw. 0,1% der zirkulierenden roten Blutzellen. In den kommenden Jahrzehnten wurden von verschiedenen Autoren ähnliche Ergebnisse für die ersten Lebenstage ermittelt, von denen einige beispielhaft in Tabelle 1 gezeigt werden. Dort finden sich auch Angaben zu Referenzwerten von Frühgeborenen. Bei gesunden Neugeborenen verschwinden die NRBC normalerweise innerhalb der ersten Lebenswoche aus dem peripheren Blut.

Referenz (Erstautor)	Probenanzahl	NRBC/ $\mu$ L [ $\bar{x} \pm 1$ SD]	Zeitpunkt nach Geburt	Gestationsalter
Naeye [2]	84	919 $\pm$ 1425	1 h	termingerecht
		560 $\pm$ 771	6 h	termingerecht
Green [3]	102	400 $\pm$ 1300	12–24 h	37–41 Wochen
Green [4]	26	2900 $\pm$ 3600	$\leq$ 24 h	23–26 Wochen
	37	1200 $\pm$ 1800	“-	27–29 Wochen
	86	1000 $\pm$ 900	“-	30–32 Wochen
Buonocore [5]	47	8521 $\pm$ 1620	0 h (Nabelschnurblut)	24–27 Wochen
	185	4548 $\pm$ 473	“-	28–36 Wochen
	105	1689 $\pm$ 290	“-	37–41 Wochen

**Tabelle 1:** Referenzwerte gesunder Neugeborener entsprechend ihres Geburts- und Gestationsalters

Die genaue NRBC-Zahl zu kennen, ermöglicht es auch bei Früh- und Neugeborenen, Informationen über den gesundheitlichen Zustand zu erhalten. So weisen NRBC-Zahlen, die über den angegebenen Referenzwerten liegen, z. B. auf einen chronischen oder postnatalen Sauerstoffmangel, eine Anämie, mütterlichen Diabetes oder akuten Stress hin. Extrem erhöhte Werte von bis zu 500 NRBC/100 WBC können sogar ein Zeichen für Infektionskrankheiten wie eine bereits bei der Geburt bestehende Syphilis sein [6]. In 1–2% der Fälle sind extrem erhöhte NRBC-Zahlen jedoch auch ohne erkennbare Ursache zu finden [7]. Normalerweise erfordern aber sichtlich aus der Norm fallende Werte eine zügige Ursachenforschung, um schnell eine eventuell notwendige Behandlung der winzigen Patienten einleiten zu können.

### Welche Aussagekraft hat die Zählung von NRBC im peripheren Blut von älteren Kindern und Erwachsenen?

Bei Erwachsenen und älteren Kindern sind NRBC im zirkulierenden Blut immer ein Zeichen für eine ernstzunehmende Erkrankung. Sie können praktisch bei fast jeder schweren Anämie auftreten. Häufig sind sie Begleiter von hämolytischen Anämien, Thalassämien, hämatologischen Systemerkrankungen wie MDS oder Leukämien, schweren Blutungen, kommen aber auch bei einem allgemein kritischen Gesundheitszustand vor (z. B. bei Traumapatienten auf der Intensivstation). Eine detaillierte Auflistung von Erkrankungen, die mit dem Auftreten von NRBC im peripheren Blut assoziiert sind, sowie die Erklärung der zugrunde liegenden Mechanismen findet sich in dem Übersichtsartikel »Nucleated RBCs – Significance in the peripheral blood film« von Constantino und Cogionis [8]. Wie im Abschnitt *Studien zur klinischen Relevanz der NRBC-Zählung* deutlich wird, geht das Auftreten von NRBC im peripheren Blut von Erwachsenen auch mit einer erhöhten Mortalität einher. Da diese unter anderem mit der Anzahl der NRBC steigt, ist es auch bei erwachsenen Patienten sinnvoll, die Zahl genau zu bestimmen, um das Risiko besser einschätzen zu können. Zudem kann die NRBC-Zahl das Ausmass anzeigen, in dem das Knochenmark gestresst bzw. erkrankt ist.

### Methoden zur NRBC-Zählung – Manuelle Zählung

Im manuellen Differenzialblutbild können etwaig vorhandene NRBC ohne vorhergehenden Warnhinweis eines Hämatologie-Analysators nur zufällig entdeckt werden. Es ist dabei gängige Praxis, in der mikroskopischen Beurteilung die Anzahl von NRBC pro 100 gesichtete WBC anzugeben. Meist werden dabei 100–200 WBC (selten bis zu 400 WBC) unter dem Mikroskop betrachtet. Das Problem der manuellen Zählung liegt jedoch darin, dass die NRBC eine grosse Ähnlichkeit mit kleinen reifen Lymphozyten haben, so dass selbst erfahrenes Personal NRBC übersehen kann und als Lymphozyten wertet. Dadurch wird ein falsch hoher WBC-Wert ermittelt, was besonders bei leukopenischen Patienten, beispielsweise unter Chemotherapie, kritisch sein kann. Deshalb und aufgrund des hohen Arbeitsaufwands ist die manuelle Zählung von NRBC als Screening-Tool denkbar ungeeignet. Wird im Labor ein Hämatologie-Analysator verwendet, der zumindest in der Lage ist, einen Warnhinweis für NRBC zu generieren, kann die manuelle Zählung immerhin etwas zielgerichteter stattfinden. Dennoch ist die manuelle NRBC-Zählung allein aus statistischen Gründen mit einem Varianzkoeffizient von durchschnittlich 40 % (2–110 % [9]) als kritisch anzusehen.

### Durchflusszytometrische Zählung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, NRBC mit Hilfe der Antikörper-vermittelten Durchflusszytometrie zu bestimmen. Allen ist gemein, dass ein Antikörper gegen Oberflächenmerkmale der Zellen (CD; »cluster of differentiation«) verwendet werden muss. Meist wird ein Antikörper gegen CD71 benutzt, welches nur auf roten Blutzellen (RBC) – reifen wie unreifen – vorkommt. Damit die reifen, kernlosen RBC von den unreifen, kernhaltigen NRBC unterschieden werden können, wird zusätzlich der Kern bzw. die DNA angefärbt. Alternativ kann statt CD71 auch CD45 verwendet werden, was sich nur auf weissen Blutzellen findet und somit eine negative Selektion der roten Zellen zulässt. Obwohl die durchflusszytometrische Methode recht genau ist, überwiegen dennoch die Nachteile: Sie ist durch den Einsatz eines Antikörpers recht teuer, zeitaufwendig und setzt geübtes Personal voraus, was sie insgesamt nicht routinetauglich macht.

### Zählung am Sysmex XN

Seit 10 Jahren gibt es NRBC Zählungen an Hämatologiegeräten, aber erst mit der Einführung des XN ist nun endlich eine routinemässige und genaue Bestimmung von NRBC bei jeder Messung ohne erhöhten Zeitaufwand möglich. Da die Zählung bereits im kleinen Blutbild, dem XN-CBC, enthalten ist, spart dies unnötige Wartezeiten durch Reflex-Tests und manuelle Ausstriche und vermeidet mögliche Fehler der manuellen Zählung. So werden durch die Autokorrektur die WBC-Ergebnisse automatisch korrigiert, sobald dies erforderlich ist. Zudem erlaubt es, ernsthafte Erkrankungen frühzeitig zu erkennen und dadurch eine frühe und gezielte Therapie einzuleiten. Auch wird das Monitoring von Patienten bei bestimmten Fragestellungen deutlich erleichtert, was insbesondere Patienten von Stationen wie der Chirurgie, für die häufig nur ein kleines Blutbild angefordert wird, zugute kommt.

Wie funktioniert nun also die NRBC-Zählung im WNR-Kanal? Ein spezielles Reagenz mit niedrigem pH-Wert stabilisiert die basophilen Zellen, die im gleichen Kanal gezählt werden, während alle anderen Leukozyten geschrumpft werden. Das Reagenz lysiert nur die Membran der roten Blutzellen und markiert spezifisch die Kerne eventuell vorhandener NRBC. Interferenzen durch Lipide oder Lyse-resistente RBC werden somit vermieden. Der genaue Mechanismus wird in Abb. 1 gezeigt. Aufgrund der damit verbundenen Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften können die Zellen wie in Abb. 2 gezeigt separiert werden.

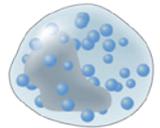
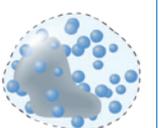
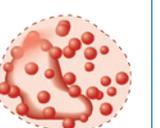
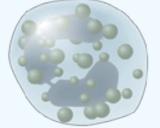
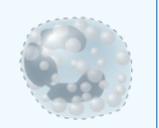
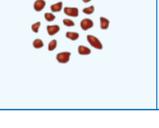
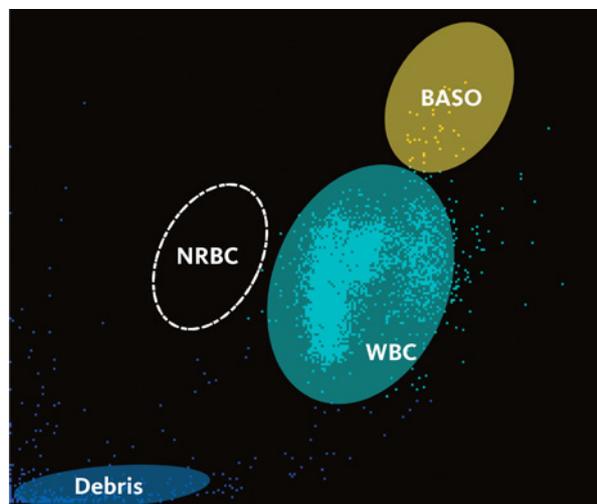
	Lyse		Färbung		Fluoreszenz	Vorwärtsstreulicht	
Basophile		→		→		Kräftig	Kräftig
Lymphozyten		→		→		Mittel	Mittel
Monozyten		→		→			
Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile)		→		→			
NRBC		→		→		Schwach	Mittel
Rote Blutzellen		→		→		Sehr schwach	Sehr schwach

Abb. 1: Lyse- und Markierungsmechanismus im WNR-Kanal



An Hämatologie-Analysatoren der XN-Serie kann die NRBC-Zahl in niedrigen wie auch in hohen Messbereichen akkurat gezählt werden und wird sowohl als absoluter (NRBC#) als auch als relativer Wert (NRBC%, /100WBC) angegeben (Abb. 3). Die Angabe des absoluten Wertes verhindert, dass eine hohe absolute NRBC-Zahl bei einer extremen Leukozytose den relativen Wert als sehr niedrig erscheinen lässt und umgekehrt.

Abb. 2: WNR-Scattergramm am XN

CBC					DIFF					WBC Flag(s)	
Item	Data	Unit	LL	UL	Item	Data	Unit	LL	UL		
WBC	6.98	10 <sup>3</sup> /uL	●		NEUT#	3.06	10 <sup>3</sup> /uL	●			
RBC	3.93	10 <sup>6</sup> /uL	●		LYMPH#	3.11	10 <sup>3</sup> /uL	●			
HGB	7.5	mmol/L	●		MONO#	0.57	10 <sup>3</sup> /uL	●			
HCT	36.3	%	●		EO#	0.21	10 <sup>3</sup> /uL	●			
MCV	92.4	fL	●		BASO#	0.03	10 <sup>3</sup> /uL	●			
MCH	1908	amol	●		NEUT%	43.8	%	●			
MCHC	20.7	mmol/L	●		LYMPH%	44.6	%	●			
PLT &F	198	10 <sup>3</sup> /uL	●		MONO%	8.2	%	●			
RDW-SD	47.2	fL	●		EO%	3.0	%	●			
RDW-CV	13.7	%	●		BASO%	0.4	%	●			
PDW	9.4	fL	●		IG#	0.01	10 <sup>3</sup> /uL	●		RBC Flag(s)	
MPV	9.4	fL	●		IG%	0.1	%	●			
P-LCR	19.0	%	●		PLT-F					PLT Flag(s)	
PCT	0.19	%	●		Item	Data	Unit	LL	UL		
NRBC#	0.00	10 <sup>3</sup> /uL			IPF	1.2	%	●			
NRBC%	0.0	%									

Abb. 3: Bildschirmsicht (main screen) eines normalen Messergebnisses

### Studien zur klinischen Relevanz der NRBC-Zählung

Die hier erwähnten Studien aus den Jahren 2002–2011 wurden am System des XE-2100 durchgeführt. Die daraus resultierenden Schlussfolgerungen sind jedoch auf den XN übertragbar.

- Studie mit stammzelltransplantierten Patienten, durchgeführt an der Jikei Universität in Tokio, Japan, veröffentlicht 2005 [10]:
  - Es wurden die Detektionsraten von NRBC im peripheren Blut von 44 Patienten mit verschiedenen malignen hämatologischen Erkrankungen verglichen, und zwar ab einem Monat vor der Stammzelltransplantation bis nach dem Anwachsen des Transplantats.

- Während direkt nach der Transplantation die Detektionsrate und die absolute NRBC-Zahl bei Überlebenden und Nicht-Überlebenden gleichermaßen anstiegen, sank die Detektionsrate in der Gruppe der Überlebenden nach dem Anwachsen des Transplantats auf 17%. Bei Nichtüberlebenden erhöhte sich die Detektionsrate selbst nach dem Anwachsen des Transplantats auf 100%.
- Das Überwachen der NRBC-Zahl nach Stammzelltransplantation könnte somit nützliche klinische Informationen über die Schwere der Erkrankung und das Fortschreiten liefern.
  
- Studie mit Thalassämie-Patienten, durchgeführt an zwei Krankenhäusern in Salerno und Palermo, Italien, veröffentlicht 2009 [11]:
  - In dieser Studie wurden die NRBC-Zahlen in peripherem Blut von 152 Thalassämie-Patienten evaluiert und mit den Daten von 26 Patienten mit hereditärer Spherozytose verglichen.
  - Die Anzahl der NRBC spiegelte dabei die Ineffektivität der Erythropoese wider: Höchste Zahlen wurden bei Thalassämie-Syndromen mit beinahe komplett ineffektiver Erythropoese ermittelt, während bei Patienten mit hereditärer Spherozytose (effektive Erythropoese) keine NRBC festgestellt werden konnten.
  - Die NRBC-Zahl kann daher nützlich sein, das Ausmass der ineffektiven Erythropoese genauer zu bestimmen und könnte zudem helfen, die Transfusionstherapie bei schweren Thalassämie-Syndromen zu optimieren.
  
- Verschiedene Studien mit Intensivpatienten, durchgeführt an der Ruhr-Universität Bochum, Deutschland, veröffentlicht zwischen 2002 und 2011 [12–15]:
  - In einer der ersten Studien von A. Stachon *et al.* [12] zu diesem Thema wurden NRBC-Werte bei 4173 Patienten der Universitätsklinik Bochum [Allgemein- und Unfallchirurgie, Herzchirurgie, Neurologie und Innere Medizin (ohne spezialisierte Hämatologie)] über einen Zeitraum von 12 Wochen ermittelt. Dabei fiel auf, dass die höchste Inzidenz von NRBC mit 20% bei Patienten der Allgemein- und Unfallchirurgie (AUC) auftrat und diese mit dem Alter zunahm. Zudem wurde bei der in dieser Studie untersuchten Patientenpopulation bei NRBC-positiven eine mit 21,1% gegenüber NRBC-negativen (AUC 0,72 bzw. 0,86) deutlich erhöhte Mortalität beobachtet. Diese stieg mit der Anzahl der NRBC und der Dauer ihres Auftretens.
  - In nachfolgenden Studien [13–15] konnten die Evaluatoren ihre Untersuchungen vertiefen und die Ergebnisse bestätigen. Es zeigte sich, dass die Mortalität von NRBC-positiven Patienten stets höher war als die von NRBC-negativen Patienten (ca. 10x so hoch, abhängig von der jeweils betrachteten Studienpopulation). Die Mortalität von chirurgischen Intensivpatienten mit NRBC im peripheren Blut war insgesamt am höchsten.

- Ein NRBC-Screening könnte helfen, Hochrisikopatienten frühzeitig zu identifizieren, da das Auftreten von NRBC im Blut ein relativ frühes Phänomen im Vorfeld des Todes ist. Darüber hinaus sollten NRBC-positive Patienten eine längere intensivmedizinische Betreuung erhalten, da die Mortalität bei Patienten, die am Tag der Verlegung von der Intensivstation auf eine normale Station NRBC-positiv waren, deutlich höher war als bei am Verlegungstag NRBC-negativen Patienten.

## Literatur

- [1] Lippman HS. (1924): Morphologic and quantitative study of blood corpuscles in the newborn period. *Am J Dis Child* 27:473–515.
- [2] Naye RL, Localio AR. (1995): Determining the time before birth when ischemia and hypoxemia initiated cerebral palsy. *Obstet Gynecol* 86:713–19.
- [3] Green DW, Mimouni G. (1990): Nucleated erythrocytes in healthy infants and in infants of diabetic mothers. *J Pediatr* 166:129–31.
- [4] Green DW, Hendon B, Mimouni FB. (1995): Nucleated erythrocytes and intraventricular hemorrhage in preterm neonates. *Pediatrics* 96:475–8.
- [5] Buonocore G, Perrone S, Gioia D, Gatti MG, Massafra C, Agosta R, Bracci R. (1999): Nucleated red blood cell count at birth as an index of perinatal brain damage. *Am J Obstet Gynecol* 181:1500–5.
- [6] Ingall D, Sanchez PJ. *Syphilis*. (2001): In: Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 5th ed. Philadelphia, WB Saunders: 654.
- [7] Hanlon-Lundberg KM, Kirby RS, Gandhi S, Broekhuizen FF. (1997): Nucleated red blood cells in cord blood of singleton term neonates. *Am J Obstet Gynecol* 176:1149–56.
- [8] Constantino BT, Cogionis B. (2000): Nucleated RBCs – Significance in the peripheral blood film. *Lab Med*, 31:223–229.
- [9] Tsuji T, Sakata T, Hamaguchi Y, Wang F, Houwen B. (1999): New rapid flow cytometric method for the enumeration of nucleated red blood cells. *Cytometry*, 37:291–301.
- [10] Otsubo H, Kaito K, Asai O, Usui N, Kobayashi M, Hoshi Y. (2005): Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients undergoing stem cell transplantation. *Clin Lab Haem*, 27:242–246.
- [11] Danise P, Amendola G, Di Concilio R, Cillari E, Gioia M, Di Palma A, Avino D, Rigano P, Maggio A. (2009): Nucleated red blood cells and soluble transferrin receptor in thalassemia syndromes: relationship with global and ineffective erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med*, 47:1539–42.
- [12] Stachon A, Sondermann N, Imohl M, Krieg M. (2002): Nucleated red blood cells indicate high risk of in-hospital mortality. *J Lab Clin Med*, 140:407–12.
- [13] Stachon A, Kempf R, Holland-Letz T, Friese J, Becker A, Krieg M. (2006): Daily monitoring of nucleated red blood cells in the blood of surgical intensive care patients. *Clin Chim Acta*, 366:329–335.
- [14] Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering S, Krieg M. (2007): Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Critical Care* 11:R62.
- [15] Kuert S, Holland-Letz T, Friese J, Stachon A. (2011): Association of nucleated red blood cells in the blood and arterial oxygen partial tension. *Clin Chem Lab Med*, 49:257–263.
- [16] Hermansen MC. (2001): Nucleated red blood cells in the fetus and newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 84:F211–F215.
- [17] Teil 1 und 2. Schaefer M und Rowan RM. *Sysmex (Xtra 2/1999)*. Klinische Bedeutung der NRBC-Zählung, .
- [18] *Sysmex Xtra 1/2007*. Der Fall des Halbjahres – Erythroblasten im Blut als Zeichen eines gesteigerten Mortalitätsrisikos. Himmelsbach P.