

## Stabkernige Granulozyten – ein Parameter mit klinischer Relevanz?

Xtra Schweiz | Februar 2011 | Nr. 6

### Einleitung

Neutrophile Granulozyten spielen eine bedeutende Rolle in der bakteriellen Immunabwehr. Grundvoraussetzungen hierfür sind sowohl die Spezifizierung und Teilung der neutrophilen Vorläuferzellen als auch die Reifung, Speicherung und der Transport der neutrophilen Granulozyten zum Infektionsgeschehen. Physiologisch finden sich im peripheren Blut hauptsächlich reife Segmentkernige, wenige Stabkernige und ganz vereinzelt auch unreife Granulozyten (IG)<sup>[1]</sup>.

Die Bildung und Differenzierung der Neutrophilen findet im Knochenmark statt und dauert ca. 6–10 Tage. Bei erhöhtem Leukozytenbedarf, z. B. während einer bakteriellen Infektion, kann die Reifungszeit im Knochenmark dadurch verringert sein. Ein Teil der Stab- und Segmentkernigen wird aber auch unter normalen Bedingungen als Reservepool im Mark zurückgehalten, der bei Bedarf abgerufen wird. Nach der Freisetzung aus dem Knochenmark verbringen Granulozyten ca. 6 bis 12 Stunden im zirkulierenden Blut. Im Gewebe überleben sie 2 bis 4 Tage und werden nach Ausübung ihrer Abwehrfunktion oder als Folge von Alterung abgebaut. Die neutrophilen Granulozyten lassen sich in 3 Fraktionen aufspalten: erstens in den granulozytopoetischen Anteil im Knochenmark (d. h. alle unreifen Zellen), zweitens in Granulozyten, die im Knochenmark die gespeicherte Reserve darstellen (reife, funktionsfähige stab- und segmentkernige Granulozyten) und drittens in einen im Blut befindlichen Prozentsatz an Granulozyten.

Bei Erwachsenen beträgt der Umfang der Knochenmarkreserve das ca. 12–14-fache der im Blut befindlichen Granulozyten, die bei Bedarf aktiviert und ausgeschüttet werden können. Neugeborene hingegen haben noch so gut wie keine Knochenmarkreserven. Bei Stimulation, z. B. durch einen bakteriellen Infekt, werden daher sofort stabkernige Granulozyten – bzw. im Extremfall unreife Granulozyten – aus dem Knochenmark ins periphere Blut ausgeschwemmt. Das Vorhandensein bzw. die Anzahl der Stabkernigen ist daher bei dieser Patientengruppe im Vergleich zum Erwachsenen unterschiedlich zu bewerten.

## Neutrophilie und Linksverschiebung

Von einer Neutrophilie spricht man bei einem Vorkommen von segmentkernigen Granulozyten, wenn die Absolutzahl 7.500 Neutrophile pro  $\mu\text{L}$  Blut überschreitet. Eine Neutrophilie kann verschiedene Auslöser haben:

- **Physiologische Faktoren**, wie z. B. körperliche Anstrengung oder Stress, hormonelle Situation (Menstruationszyklus, Schwangerschaft), Alter und Geschlecht. Die Ausschüttung des Knochenmark-Reservepools erfolgt als eine Begleitreaktion. Diese kann mit einer Linksverschiebung mit stabkernigen Granulozyten einhergehen, die als «physiologische Linksverschiebung» bezeichnet wird.
- **Reaktive Faktoren**, wie Infektionen, Medikamente, Rauchen usw.  
Die Ausschüttung des Knochenmark-Reservepools erfolgt als eine erste effiziente Abwehr. Diese kann mit einer Linksverschiebung mit stabkernigen Granulozyten bis hin zur Ausschüttung von Metamyelo- und Myelozyten einhergehen. Die Leukozytenwerte können dabei enorm ansteigen und Werte von bis zu 100.000 Leukozyten/ $\mu\text{L}$  erreichen («reaktive Linksverschiebung»).
- **Maligne Faktoren**, wie myeloproliferative Erkrankungen (CML, ET, PV, OMF); autonome Stimulierung der multipotenten Stammzelle; Leukämien.

Die Differenzierung der Leukozyten-Subpopulationen wird heute weitestgehend von modernen Hämatologieautomaten übernommen. Die Erkennung und Zählung der physiologischen Zellklassen ist dabei für kaum ein Gerät ein Problem. Die grosse Herausforderung innerhalb der Routineanalytik besteht heutzutage darin, pathologische Zellklassen mit hoher Sensitivität und Spezifität zu erkennen. Unreife Granulozyten (IG) können zum Beispiel schon heute durch den Einsatz der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie mit einer sehr viel höheren Genauigkeit als mit der mikroskopischen Methode ausgezählt werden. Der Parameter der Sysmex X-Class-Geräte (XE- und XT-Serie) umfasst Metamyelozyten, Myelozyten und Promyelozyten. Stabkernige Granulozyten werden dabei nicht erfasst. Sie werden bei Bedarf noch immer mikroskopisch ausdifferenziert. Die Aussagekraft und das quantitative Reporting von stabkernigen neutrophilen Granulozyten sind jedoch umstritten. Der Bestimmung der Stabkernigen wird lediglich eine geringe Verwertbarkeit nachgesagt, die durch vielfältige Problematiken verursacht werden kann.

## Problematiken in der manuellen Zählung von Stabkernigen

Zu den eher allgemeinen Störfaktoren der manuellen Zählung von Stabkernigen gehört auch die Blutabnahme. Eine regelgerecht ausgeführte Venenpunktion ist Voraussetzung für eine gute Blutanalytik. Eine Kapillarblutabnahme, besonders nach Quetschung des Punktionsortes, kann zu quantitativen und qualitativen Veränderungen des Blutbildes führen (z. B. Ohrblutmonozytose). Ebenso ist die Qualität des Ausstriches wichtig: Zu dicke oder ungleichmässige Ausstriche machen eine morphologisch korrekte Beurteilung der Blutzellen gerade in Bezug auf die Erkennung von Stabkernigen sehr schwierig. Gerade Neugeborenenblut kann, ausgelöst durch einen hohen Hämatokritwert, eine schlechtere Ausstrichqualität zur Folge haben, die die morphologische Beurteilung erschwert und die Abgrenzung vom Segmentkernigen zum Stabkernigen fast unmöglich macht.

Eine der prägnantesten Problematiken in der Differenzierung ist jedoch der fehlende Konsens zur Definition des Stabkernigen und die unterschiedliche bzw. uneindeutige Klassifizierung, die auch schon innerhalb eines Labors von Labormitarbeiter zu Labormitarbeiter sehr unterschiedlich ausgelegt wird.

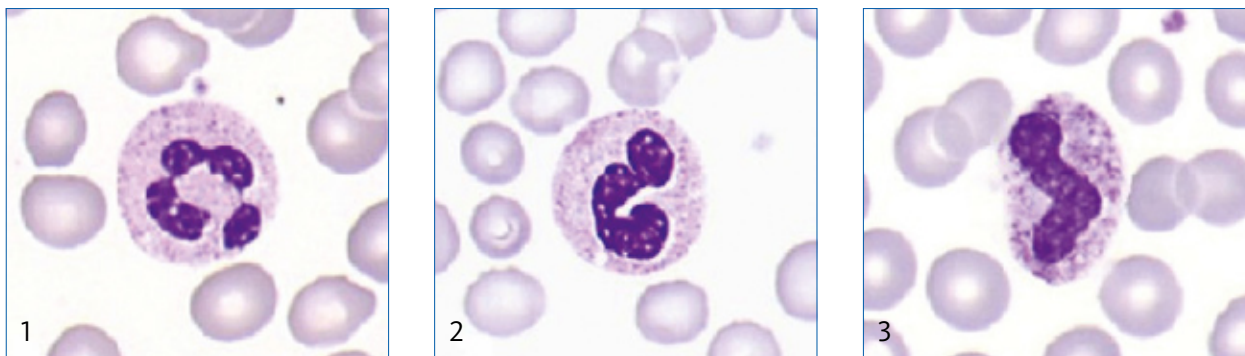


Abb. 1: Unterschiedliche Definitionen von Segmentkernigen und Stabkernigen führen zu Verwirrung

### Unterschiedliche Definitionen zur Klassifikation von Segment- bzw. Stabkernigen

**A.** Ein segmentkerniger Granulozyt weist einen Zellkern mit zwei oder mehr Segmenten auf, welche durch filamentartige Strukturen (Kernbrücken) miteinander in Verbindung stehen. Eine Kernbrücke ist definiert durch eine fadenförmige Verbindung. Alle Zellen ohne Faden werden als stabkernige Granulozyten eingestuft. Aus dieser Definition folgen sehr hohe Zählwerte. Laut dieser Definition entsprechen in Abb. 1 die Bilder 2 und 3 Stabkernigen.

**B.** Ein Segmentkerniger hat eine Kernbrücke zwischen den Segmenten, die definiert ist als eine Einschnürung, deren Durchmesser nicht mehr als  $\frac{2}{3}$  der Breite des dicksten Kernsegments beträgt (laut dieser Definition zeigt die Abb. 1 in Bild 2 einen Grenzfall zwischen stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten und das Bild 3 zeigt einen stabkernigen Granulozyten.)

**C.** Ein Segmentkerniger hat eine Kernbrücke zwischen den Segmenten, die definiert ist als eine Einschnürung, deren Durchmesser nicht mehr als  $2/3$  der Breite des dicksten Kernsegments beträgt, und die Kernformen zeigen überlappende Segmente, welche geknotete oder T- oder Y-Formen annehmen. Laut dieser Definition sind alle diese Zellen als Segmentkernige einzustufen, unabhängig vom Durchmesser der Zellen. Wird nach diesen Kriterien die Einteilung vorgenommen, folgern daraus sehr niedrige Referenzwerte für Stabkernige. Diese dritte Definition ist durch die Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) anerkannt. (Laut dieser Definition zeigt die Abb. 1 Bild 3 einen stabkernigen Granulozyten.)

Da es keine allgemeingültige Definition für die Unterscheidung zwischen Stabkernigen und Segmentkernigen gibt, hat die individuelle Interpretation einen breiten Spielraum. Ebenso spielen die Aufmerksamkeit und der Zeitdruck der mikroskopierenden Person eine Rolle. Wird im Ausstrich eher im dickeren Bereich mikroskopiert, ist die Unterscheidung zwischen Stab- oder Segmentkernigen kaum möglich. Dazu kommen Fehlerquellen, die auf rein statistischer Natur beruhen.

### **Einflüsse durch statistische Fehler in der mikroskopischen Differenzierung**

Selbst unter idealen Verhältnissen (tadelloser Ausstrich, geringe Verteilungsprobleme, Beachtung der laborinternen Definition eines Stabkernigen) ist der statistische Fehler bei nur 100 ausgezählten Zellen so gross, dass 10% gezählte Stabkernige bedeuten, dass der wahre Anteil der Stabkernigen zwischen 4,9–17,6 % liegen kann (Quelle: Rümke Tabelle). Rümke berechnete, dass mindestens 1.000 Zellen gezählt werden müssen, um mit der manuellen Methode alle zellulären Komponenten des weissen Blutbildes zuverlässig zu differenzieren<sup>[2]</sup>.

95%–Vertrauensgrenze für den tatsächlichen Prozentsatz der Leukozyten a = % Leukozyten einer Zellpopulation					
a	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1.000	n = 10.000
0	0–3,6	0–1,8	0–0,7	0–0,4	0–0,1
1	0,0–5,4	0,1–3,6	0,3–2,3	0,5–1,8	0,8–1,3
5	1,6–11,3	2,4–9,0	3,3–7,3	3,7–6,5	4,5–5,5
10	4,9–17,6	6,2–15,0	7,5–13,0	8,2–12,0	9,4–10,7
15	8,6–23,5	10,4–20,7	12,0–18,4	12,8–17,4	14,3–15,8
20	12,7–29,2	14,7–26,2	16,6–23,8	17,6–22,6	19,2–20,8
30	21,2–40,0	23,7–36,9	26,0–34,2	27,2–32,9	29,1–31,0
40	30,3–50,3	33,2–47,1	35,7–44,4	36,9–43,1	39,0–41,0
50	39,8–60,2	42,9–57,1	45,5–54,5	46,9–53,1	49,0–51,0
70	60,0–78,8	63,1–76,3	65,8–74,0	67,1–72,8	69,0–70,9
80	70,8–87,3	73,8–85,3	76,2–83,4	77,4–82,4	79,2–80,8
90	82,4–95,1	85,0–93,8	87,0–92,5	88,0–91,8	89,3–90,6
100	96,4–100	98,2–100	99,3–100	99,6–100	99,9–100

Abb. 2: Rümke-Tabelle

### 4% oder 64% Stabkernige? – Daten einer niederländischen Studie

Die Angabe, wie viele Stabkernige im Blut eines Gesunden vorkommen, variiert von Literaturquelle zu Literaturquelle, was vermutlich auf die vorherig benannten Ursachen zurück zu führen ist. Eine Bestätigung der Schwierigkeiten, einen Konsens in der Auszählung der Stäbe zu erzielen, zeigt eine niederländische Studie. Eine Arbeitsgruppe um Wim van der Meer hatte an 157 Krankenhauslaboratorien der Niederlande jeweils zwei Sätze an Bildmaterial mit je 100 Zellbildern eines septischen Patienten gesendet. Die Aufgabe war, eine mikroskopische Beurteilung durchzuführen und dabei einmal eine Differenzierung von Segmentkernigen und Stabkernigen und einmal die Auszählung der neutrophilen Granulozyten ohne Differenzierung in Stab- und Segmentkernige vorzunehmen. Die Studie wertete jeweils die Krankenhaus-Mittelwerte und den Mittelwert der mikroskopierenden Personen der beiden «Blutbilder» aus. Betrachtet man die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, so wurden für die erste Fragestellung von allen Einsendenden Neutrophilenwerte zwischen 15–72% angegeben, mit einem Mittelwert von 43,9% und einer Standardabweichung (SD) von 11,2. Stabkernige zeigten hier eine Varianz von 4–64% und der Mittelwert lag bei 30,6% (SD = 11,0). Für die zweite Fragestellung, die Auswertung der neutrophilen Granulozyten ohne Differenzierung in Segment und Stabkernige, wurden Werte zwischen 59–77% genannt (Mittelwert 70%, SD = 2,0). Die Auswertung des Mittelwertes aller Krankenhäuser zeigte eine ganz ähnliche Tendenz. Daraus kann

rückgeschlossen werden, dass es zwischen den einzelnen Einsendern sehr unterschiedliche Kriterien gibt, welche Zelle zu den stabkernigen oder den reifen Neutrophilen gezählt wird. Die Autoren der Studie empfehlen daher, die quantitative Angabe der Stabkernigen einzustellen, zumal dieser Parameter nur bei wenigen pathologischen Umständen eine klinische Relevanz hat<sup>[3]</sup>.

Andere Studien zeigen ähnliche Ergebnisse der schlechten Reproduzierbarkeit bei der Zählung von Stäben bzw. sagen ebenfalls aus, dass der klinische Nutzen der Stabkernigen zur Erkennung einer Infektion sehr gering ist und die Auszählung von Stabkernigen unnötig sei<sup>[4, 5]</sup>.

### Umstrittener klinischer Nutzen des Parameters

Eine neutrophile Leukozytose mit oder ohne einen Warnhinweis für Stabkernige (an Hämatologie-Automaten der X-Class-Serie mit dem Warnhinweis «Linksverschiebung?» markiert) und ohne weitere Warnhinweise auf unreife Granulozyten (erhöhter IG-Wert) wird durch die Ausschüttung des Knochenmark-Reservepools verursacht. Die Ursachen können physiologischer oder reaktiver Art sein. Die absolute Neutrophilenzahl ist hier eine wichtige Information, während die Anzahl der Stäbe dem Kliniker in diesem Fall keine weitere Zusatzinformation liefern dürfte und die Angabe des Wertes in den verschiedensten Hämatologie- oder Labormedizinbüchern auch gar nicht mehr empfohlen wird. Auch bei Säuglingen über 3 Monaten wird die Anzahl der Stabkernigen nicht für die Diagnose einer Infektion empfohlen. Bei Neugeborenen mit Verdacht auf eine bakterielle Infektion wird die Anzahl der Stäbe häufig noch innerhalb eines I:T Indexes (immature-to-total) benutzt und dient damit dem Kliniker als ein zusätzlicher Indikator auf eine Neugeborenenrose<sup>[6]</sup>.

### Zusammenfassung

Die quantitative Bestimmung der Stabkernigen innerhalb des manuellen Differenzialblutbildes bringt, ausser im Neugeborenenalter, nur wenig klinisch nachweisbaren Nutzen. Aber selbst in diesem Falle ist die Aussagekraft zu hinterfragen, wenn die Bestimmung des Parameters keiner einheitlichen Definition unterliegt und durch die oben genannten Faktoren eine hohe Streubreite der Ergebnisse zu erwarten ist.

Durch die Einbindung moderner Informationstechnologiesysteme, wie z. B. des Work Area Managers SIS (Sysmex Information System), lassen sich patientendemographische Informationen (wie z. B. Alter, Geschlecht, Diagnose, Fragestellung usw.) und analytische Informationen (Warnhinweise, wie z. B. «Left shift?») miteinander verknüpfen. Sie können dem Laborpersonal gezielt dabei helfen, die Blutbilder heraus zu finden, für die eine intensive Durchmusterung auf morphologische Veränderungen sinnvoll erscheint. So können folgende Regeln, die im Standardregelwerk des Informationssystems enthalten sind, genutzt werden, um einen gefärbten Blutaussstrich gezielt auf Stäbe durchzumustern und die Aufmerksamkeit der mikroskopierenden Person genau auf diese Fragestellung zu lenken:

Regel: Flag «Left Shift?» und Neutrophile nicht erhöht ( $<6000/\mu\text{L}$ ) und Patient älter als 14 Tage  
Erklärung: Bei Patienten ohne Neutrophilie können Stäbe einen schnellen Hinweis auf ein reaktives Geschehen geben (z. B. nach Medikamentengabe G-CSF).

oder

Regel: Flag «Left Shift?» und Patient jünger als 14 Tage  
Erklärung: Die Information über das Vorhandensein von Stabkernigen kann einen schnellen Hinweis auf ein reaktives Geschehen geben, da noch kein reifer Pool im Knochenmark des Patienten vorhanden ist.

## Literatur

- [1] Bruegel M, Fiedler GM, Matthes G, Thiery J. Reference values for immature granulocytes in healthy blood donors generated on the Sysmex XE-2100 automated hematology analyser. *Sysmex Journal International* 14:5–7 (2004)
- [2] Rümke C L. The statistically expected variability in differential leucocyte counting. Reprinted from *Differential Leukocyte Counting*. Collage of American Pathologists, 1979
- [3] Van der Meer W et al. Does the band cell survive the 21st century? *Eur. J Haem* 76; 2006, 251.
- [4] Cornbleet P J, Novak R W. Lack of reproducibility of band neutrophil identification despite the use of uniform identification criteria. *Lab Hem* 1995; 1:89–96.
- [5] Marigold J et al. Band Neutrophil Counts Are Unnecessary for the Diagnosis of Infection in Patients with Normal Total Leukocyte Counts. *Am J Clin Pathol* 1994; 102:646–649.
- [6] Cornbleet P J et al. Interpretation of the peripheral blood film, *Clinics in Lab Med* 2002; 22:1.