

Nutzen der NEUT-X-Bestimmung in der diagnostischen Routine: Anwendung bei myelodysplastischen Syndromen

Xtra Schweiz | Februar 2011 | Nr. 9

Dieser Artikel stellt eine Übersetzung des englischen Originalartikels dar, veröffentlicht in Sysmex Diagnostic Perspectives 2010, Volume 1, 12–19.

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind häufig auftretende bösartige Erkrankungen des Knochenmarks mit einer schlechten Prognose. Voraussetzung für den optimalen Nutzen einer Behandlung ist eine frühzeitige Diagnose. Allerdings sind die diagnostischen Merkmale eines MDS polymorph und unspezifisch; unter anderem zählt meist eine Anämie dazu. Die von einem automatischen Analysegerät erfassten Standardparameter liefern nur selten ein diagnostisches Argument für die Diagnose eines MDS. Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob einige morphologische Parameter, die bei einer Blutanalyse mit dem Sysmex XE-2100 Hämatologiesystem als sogenannte «Research-Parameter» erfasst werden, die Diagnose von MDS im klinischen Alltag unterstützen können.

Wir konnten zeigen, dass der Neutrophilen-Parameter NEUT-X – der Mittelwert des Seitenstreulichtsignals der Neutrophilen-Population, der die Morphologie der Neutrophilen repräsentiert – für diesen Zweck verwendet werden könnte. Dazu wurde NEUT-X in einen semiquantitativen Parameter, den Granularitätsindex (GI), umgerechnet. Ein negativer GI bei Vorliegen einer Anämie erwies sich als starker Hinweis auf MDS; bei Berücksichtigung der Kombination aus isolierter Anämie und niedrigem GI-Wert als zusätzliches Kriterium für eine Ausstrichuntersuchung stieg der prozentuale Anteil der MDS-Fälle, die einer Ausstrichuntersuchung zugeführt wurden, von 67 % auf 96 %. Darüber hinaus konnten wir bestätigen, dass dieses Vorgehen generell nicht zu einer deutlichen Zunahme an unbegründeten Ausstrichuntersuchungen bei Nicht-MDS-Patienten führte, da bei den Kontrollen lediglich 2 % unnötigerweise untersucht wurden. Die Aufnahme des GI in die Blutbild-Routineparameter, die Sysmex Hämatologiesysteme erfassen, könnte vor allem für nicht spezialisierte Routinelaboratorien eine grosse Hilfe beim Flagging von MDS sein, um diese Fälle einer Ausstrichuntersuchung zuzuführen.

Einleitung

Das myelodysplastische Syndrom (MDS) ist eine häufig auftretende bösartige Erkrankung des Knochenmarks mit einer schlechten Prognose. Es handelt sich dabei um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch ein gemeinsames Merkmal charakterisiert sind: die ineffiziente Produktion reifer Erythrozyten. Nach den Kriterien der WHO wird das MDS in die folgenden sechs verschiedenen Gruppen eingeteilt:

- 5q-minus-Syndrom
- Refraktäre Anämie (RA)
- Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss (RAEB)
- Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)
- Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD)
- RCMD mit Ringsideroblasten (RCMD-RS)

Grundsätzlich können Menschen jeden Alters von diesen Syndromen betroffen sein, aber das Risiko der Entwicklung eines MDS steigt mit zunehmendem Alter an. Im Durchschnitt sind die Patienten bei der MDS-Diagnose ca. 65 Jahre alt. Eine MDS-Diagnose ist bei 20–30% der Patienten mit einem Risiko einer akuten myeloischen Leukämie (AML) verbunden, die fast immer letal verläuft. Weitere schwerwiegende Komplikationen eines MDS sind Zytopenien, die häufig mit Infektionen assoziiert sind.

Bis vor Kurzem wurden MDS lediglich mit einer unterstützenden Therapie, beispielsweise Bluttransfusionen, behandelt. Allerdings wurden bei der Behandlung eines Hochrisiko-MDS Fortschritte erzielt; daher ist die frühzeitige und richtige Diagnose des MDS-Typs von entscheidender Bedeutung. Das immunsuppressive Medikament Lenalinomid™ hat sich bei einer Untergruppe von MDS-Patienten mit 5q-Deletion als sehr wirksam erwiesen. Eine frühe unterstützende Versorgung, zum Beispiel durch eine Behandlung mit Erythropoetin, ist wirksam und senkt den Bedarf an Bluttransfusionen im Krankheitsverlauf. Das Vorliegen eines MDS kann dazu führen, dass sich Begleiterkrankungen, die bei älteren Patienten häufig auftreten, weniger effektiv therapieren lassen.

Unglücklicherweise sind die diagnostischen Merkmale des MDS polymorph und unspezifisch. Zu ihnen gehört in der Mehrzahl der Fälle eine Anämie; auch in unserem Labor ist ein Drittel aller Blutbilder ebenfalls anämisch. Die mit einem MDS assoziierte Anämie ist üblicherweise normozytär oder makrozytisch. 40% der MDS-Patienten weisen bei der Diagnose eine Neutropenie, ein Drittel der Fälle eine Thrombozytopenie auf. Diese Anomalien können entweder allein oder kombiniert vorliegen. Diese Merkmale sind sehr unspezifisch und die vom Hämatologiesystem erfassten Standardparameter liefern keine Informationen, die bei der Differenzialdiagnose der Erkrankung weiterhelfen. Die endgültige Diagnose basiert auf der morphologischen Untersuchung des peripheren Bluts und des Knochenmarks.

Ziele der Studie

Untersuchung mehrerer morphologischer Parameter von Erythro-, Leuko- und Thrombozyten, die vom Sysmex XE-2100 gemessen werden. Diese Parameter werden derzeit nur für Forschungszwecke erfasst und daher nicht routinemässig ausgewertet; sie könnten aber einen Beitrag bei der MDS-Diagnose leisten.

Patienten- und Kontrollgruppen

- 184 Patienten mit MDS.
- 196 Patienten mit Anämie aufgrund einer anderen Ursache als MDS.
- Als Kontrollgruppe dienten 3.545 unselektierte Patientenproben aus dem hämatologischen Routinelabor. Diese Patienten hatten kein MDS, sie hatten aber nicht unbedingt ein normales Blutbild.
- Anhand von 1.053 Proben gesunder Probanden wurde der Referenzbereich für die morphologischen Parameter ermittelt.

Bei den Patienten mit MDS erfolgte die Diagnose anhand der Untersuchung von Knochenmarkaspiraten, Auszählung der Blasten sowie anhand des Dysplasiegrades. In allen Fällen wurde eine Karyotypisierung des Knochenmarks durchgeführt. Die Stratifizierung der Fälle erfolgte gemäss der WHO-Klassifizierung.

Prozentuale Verteilung der MDS-Patienten

Anämie plus Neutropenie und/oder Thrombopenie	50 %
Anämie plus Makrozytose	5 %
Isolierte Anämie/Isolierte Makrozytose	32 %
Neutropenie und/oder Thrombopenie	12 %
Normal, ohne Anämie	1 %

Tabelle 1 Prozentsatz der anormalen quantitativen Parameter bei MDS-Patienten

Methoden

Alle Blutbilder wurden mit dem Analysensystem Sysmex XE-2100 bestimmt. Eine Diagnose auf MDS wurde unter Berücksichtigung der folgenden Parameter erwogen:

- Cut-off-Werte für die folgenden quantitativen Parameter:
 - Hämoglobin < 11 g/dL
 - Thrombozyten < $120 \times 10^9/L$
 - Neutrophile < $1,5 \times 10^9/L$
 - MCV > 110 fL
- Zusätzlich zu den üblichen Parametern wurden folgende morphologische und Reifungsparameter mit aufgenommen:
 - RET-Y und IRF bei Erythrozyten
 - NEUT-X und NEUT-Y bei Neutrophilen
 - P-MFV bei Thrombozyten

RET-Y wird unter Verwendung eines Polymethinfarbstoffs durch Analyse des Vorwärtsstreulichtsignals im Retikulozyten-Kanal gemessen. Der XE-2100 liefert eine Messung der ungefähren Grösse der reifen Erythrozyten und Retikulozyten, angegeben in den Werten RBC-Y und RET-Y. Der IRF-Wert wird durch den Index der gemessenen Retikulozytenfluoreszenz ermittelt und repräsentiert die Fraktion der unreifen Retikulozyten.

NEUT-X und NEUT-Y sind die Mittelwerte des Seitenstreulichtsignals bzw. der Fluoreszenz der Neutrophilen-Population. NEUT-X repräsentiert die Morphologie der Neutrophilen, während NEUT-Y ein Mass für deren Fluoreszenz darstellt.

P-MFV ist der Peak der Verteilungskurve der Thrombozyten. Dies ist ein nützlicher Parameter, weil er im Gegensatz zum Medianwert auch bei einer schweren Thrombozytopenie verfügbar ist.

196 Blutaussstriche von MDS-Patienten und Patienten mit Anämie anderer Ursache wurden von zwei Fachleuten untersucht. Zur Evaluierung der Granularität der Neutrophilen wurde eine semiquantitative Skala mit Werten von 0 (hypergranular) bis 5 (agranular) aufgestellt. Der ermittelte Wert wurde dann zum NEUT-X-Wert in Relation gesetzt.

Im Routinelabor würden nicht alle anormalen quantitativen Parameter zur Untersuchung eines Blutaussstrichs führen. Proben mit einem isolierten Hämoglobingehalt von weniger als 11 g/dL oder mit einer isolierten Makrozytose hätten üblicherweise keine Untersuchung eines Blutaussstrichs zur Folge. Bei einer Neutropenie oder Thrombozytopenie, sowohl als isolierte Anomalie als auch begleitend zu einer anderen Anomalie, würde allerdings ein Ausstrich untersucht werden.

Ergebnisse

Quantitative Parameter bei MDS

Die Häufigkeit der abnormalen Parameter bei MDS ist in Tabelle 1 dargestellt. 32% der MDS-Patienten wiesen eine isolierte Anämie oder Makrozytose auf; daher wäre bei ihnen im Routinebetrieb in unserem Labor keine Untersuchung des Blutausstrichs durchgeführt worden. Zur Identifizierung dieser Patienten sind daher andere Parameter erforderlich.

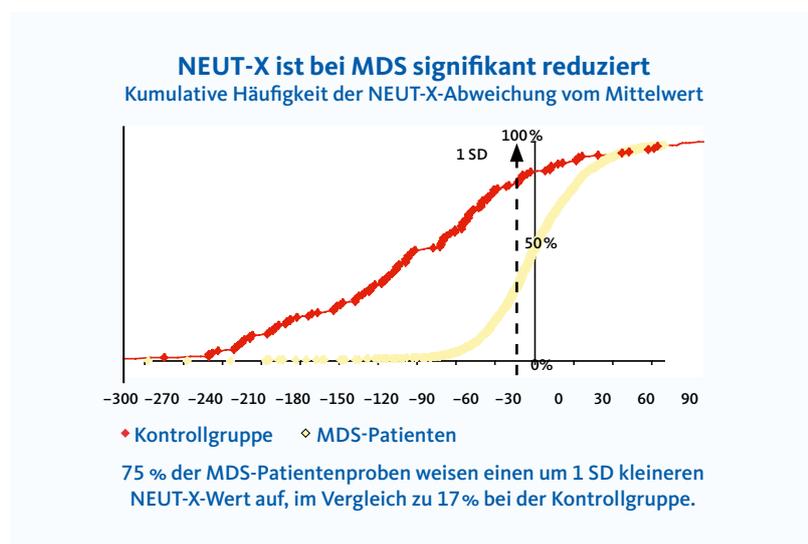


Abbildung 1 Diagramm der kumulativen Häufigkeit von NEUT-X-Abweichungen vom mittleren Normwert bei der Kontrollgruppe und bei Patienten mit MDS.

Morphologische Parameter in der Referenz- und MDS-Gruppe

Zur Bestimmung der medianen Normalwerte und des Variationskoeffizienten (VK) der Parameter Hämoglobin, Leukozyten-, Neutrophilen- und Thrombozytenzahl wurden 1.053 Kontrollproben analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

	P-MFV (fL)	NEUT-X	IRF	RET-Y
MIN.	7,4	1212	17	1720
MAX.	13,4	1413	243	1992
MEDIAN	9,1	1330	103	1872
VK	8%	3%	53%	4%

Tabelle 2 Normalwertbereiche der morphologischen Parameter.
 MIN. = Minimum; MAX. = Maximum; VK = Variationskoeffizient

Insbesondere für den NEUT-X-Wert wurde eine sehr kleine Streuung ermittelt.

Die für die Kontrollgruppe und die MDS-Patienten erhaltenen Ergebnisse wurden mittels einer multivariaten Analysenmethode verglichen. Die Neutrophilenzahl und NEUT-X-Werte waren bei MDS-Patienten signifikant unterschiedlich von den Proben der Kontrollgruppe; NEUT-X war der empfindlichste Parameter und hatte bei MDS einen signifikant niedrigeren Wert. Die kumulative Häufigkeit der Abweichungen des NEUT-X-Wertes bei MDS vom durchschnittlichen Normalwert ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Ungefähr 75% der MDS-Patienten wiesen einen NEUT-X-Wert auf, der mindestens 1 SD unter dem durchschnittlichen Normalwert lag, verglichen zu 17% bei der Kontroll-Patientengruppe.

Beziehung zwischen NEUT-X und morphologischen Merkmalen der Neutrophilen

Zwischen einem niedrigen NEUT-X-Wert und der Hypogranularität der Neutrophilen besteht eine starke Korrelation ($R^2 = 0,867$; siehe Korrelationsdiagramm in Abb. 2). Keine Korrelation bestand zwischen NEUT-X und der Neutrophilenzahl, selbst bei relativ schwerer Neutropenie. Da die MDS-Patientenpopulation im Durchschnitt älter als die Kontrollgruppe war, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen NEUT-X und dem Alter durchgeführt. Eine Korrelation konnte nicht festgestellt werden, d. h., der NEUT-X-Wert hängt nicht vom Alter der Patienten ab.

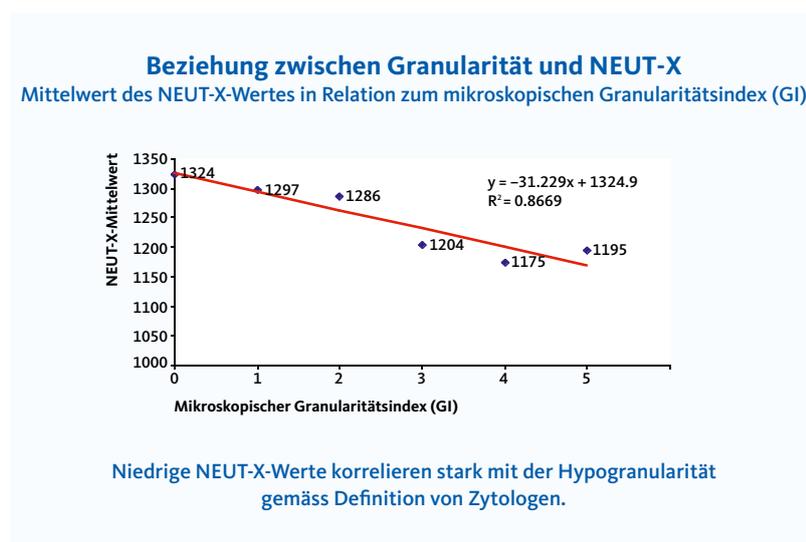


Abbildung 2 Korrelation zwischen NEUT-X und Granularität der Neutrophilen, bestimmt durch mikroskopische Untersuchung unter Verwendung des semiquantitativen Scoring-Systems.

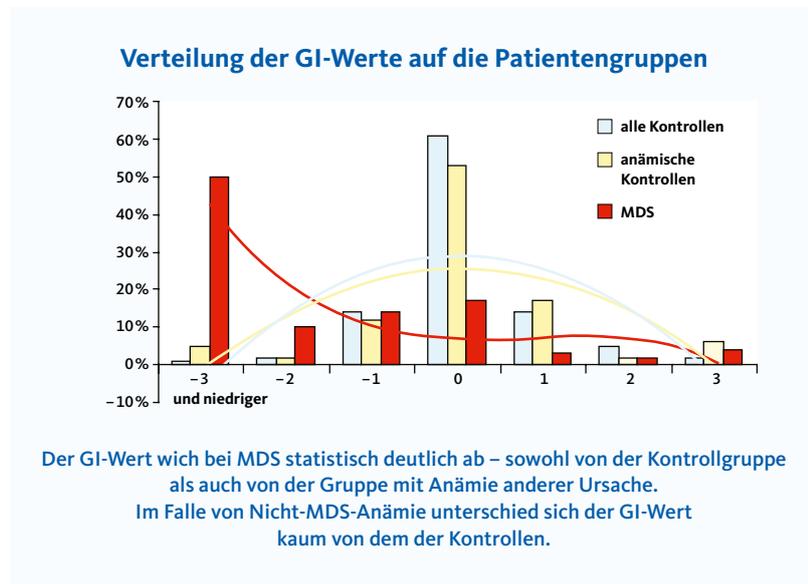


Abbildung 3 Verteilung der GI-Werte auf die drei Patientengruppen. Ein negativer Wert zeigt geringere Granularität der Neutrophilen an. Es sind nur GI-Werte zwischen 3 und -3 dargestellt; bei MDS-Patienten wurden Werte bis -9 erhalten.

Bestätigung der NEUT-X-Werte in der Patienten-Kontrollgruppe und der für die Studie verwendeten Cut-off-Werte

Um zu überprüfen, ob die NEUT-X-Medianwerte in unserer Patienten-Kontrollgruppe nicht einem systematischen Fehler (Bias) durch die in unserem Krankenhaus untersuchte Patientenkategorie unterlag, wurde der Wertebereich für NEUT-X bei Patienten-Kontrollgruppen anderer Krankenhäuser bestimmt. Auf der Grundlage der in diesen Krankenhäusern untersuchten verschiedenen Patientenkohorten wurden drei Labors hierfür ausgewählt. Die Verteilung der NEUT-X-Werte war bei allen Labors gleich.

Der Cut-off-Wert von 30 (= 1 SD) unter dem Normalwert ergab die beste Diskriminierung für die Diagnose eines MDS; dieser Wert – der gleiche wie der in unserer Originalstudie gefundene Wert – wurde in der Zwischenzeit von unabhängigen Statistikern bestätigt.

Abweichung des NEUT-X-Wertes vom Referenzwert	> -90	-61 to -90	-31 to -60	-30 to +30	+31 to +60	+61 to +90	> +90
GI-Wert	-3	-2	-1	0	1	2	3

Table 3 Die Berechnung des Granularitätsindex' (GI) beruht auf den Abweichungen vom Mittelwert des NEUT-X-Wertes der Referenzgruppe normal gesunder Probanden und der Patienten-Kontrollgruppe.

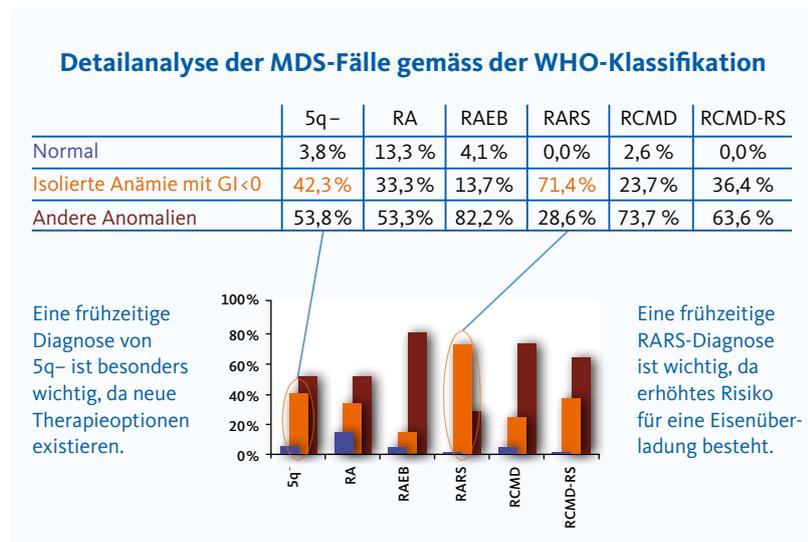


Abbildung 4 Anzahl der untersuchten Blutausstriche für jede der nach WHO klassifizierten MDS-Untergruppen mit und ohne die Verwendung des GI-Flags.

Definition des Granularitätsindex' (GI) und seiner Verwendung als Screening-Hilfsmittel bei der MDS-Diagnose im klinischen Alltag

Wie bereits diskutiert, besteht eine Korrelation zwischen dem NEUT-X-Wert und der Granularität der Neutrophilen. Bei dieser Studie wurde untersucht, ob es möglich ist, den semiquantitativen NEUT-X-Wert als Flag für die Diagnose von MDS im klinischen Alltag zu verwenden. Der NEUT-X-Mittelwert für die Patienten-Kontrollgruppe betrug 1.330, mit einer Standardabweichung (SD) von 30. Dies entsprach derselben Abweichung zwischen den beobachteten Medianwerten der MDS-Patienten und der als Referenz dienenden Gruppe der normal gesunden Probanden. Aufgrund dessen wurde entschieden, einen Granularitätsindex auf der Grundlage von Vielfachen der Standardabweichung zuzuordnen.

NEUT-X \pm 1 SD entspricht dabei einem GI-Wert von 0; ein NEUT-X-Wert, der 1 SD unterschreitet, erhält einen GI von -1 und ein NEUT-X-Wert, der um mehr als 1 SD nach oben vom Mittelwert abweicht, erhält einen GI von +1. Das GI-Scoring-System ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

Verteilung der GI-Werte auf die drei Patientengruppen

Der GI wurde sowohl bei der normalen Referenzgruppe als auch bei der anämischen Kontrollgruppe sowie den MDS-Patienten untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass der GI-Wert bei Patienten mit einer Anämie aufgrund anderer Ursache als MDS dem GI der Gruppe der normalen Probanden vergleichbar war. Demgegenüber war der GI-Wert bei den MDS-Patienten statistisch signifikant niedriger als in den beiden anderen Gruppen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Kontrollgruppe und die Patienten mit Anämie zeigten bezüglich des GI die gleiche Gausssche Verteilung um den GI-Wert von 0. Die Proben der MDS-Gruppe hatten in der Mehrzahl einen GI-Wert von -3 , wobei das Scoring-System bis hinunter zu einem GI von -9 reichte und 50 % der MDS-Patienten einen Wert von -3 oder darunter aufwiesen. Umgekehrt wurde für keine der Kontrollgruppen – weder für die unselektierte noch die anämische Kontrollgruppe – ein GI-Wert von unter -3 erhalten. Nur bei einer geringen Anzahl MDS-Patienten wurde ein GI von 0 oder darüber beobachtet.

Der klinische Nutzen eines GI-Flags für MDS bei Vorliegen einer isolierten Anämie

Wie bereits festgestellt, weisen 33 % der MDS-Patienten einen niedrigen Hämoglobingehalt als einzige Anomalie im Blutbild auf. 54 von diesen 58 Patienten hatten einen niedrigen GI-Wert. Bei Verwendung des GI-Flags wäre bei diesen Patienten eine Untersuchung des Blutausstrichs veranlasst worden. Dadurch wäre der prozentuale Anteil dieser Untersuchung bei Nicht-MDS-Fällen um lediglich 2 % erhöht. Daher erweist sich die Verknüpfung einer isolierten Anämie mit einem niedrigen GI-Wert als starker Hinweis auf ein MDS. Sie wäre demnach ein äusserst nützliches Flag, um in der klinischen Routine neue Fälle von MDS zu identifizieren, ohne dass es zu einer Erhöhung der falsch-positiven Blutausstrichbefunde kommt.

GI-Wert und MDS-Differenzialdiagnose nach den WHO-Kriterien

Wir haben die Bedeutung eines niedrigen GI-Wertes als diagnostisches Kriterium für jede MDS-Untergruppe untersucht. In jeder dieser Kategorien haben wir die Anomalien, die zu einer Ausstrichuntersuchung führen, zusammen berücksichtigt: Neutropenie, Thrombozytopenie, Bi- oder Trizytopenie sowie Anämie mit Makrozytose ($MCV > 110$ fL). Bei den übrigen Fällen würde keine der genannten Anomalien, oder eine isolierte Anämie, für eine Ausstrichuntersuchung in Erwägung gezogen werden. Daher repräsentieren alle Fälle mit einer isolierten Anämie und niedrigem GI-Wert den Nutzen der GI-Berücksichtigung bei Vorliegen einer isolierten Anämie, da diese Proben so einer Ausstrichuntersuchung zugeführt werden.

Wie in Abbildung 4 dargestellt, war dieser Nutzen in allen Kategorien vorhanden; er variierte zwischen 13,7 % bei RAEB und 71,4 % bei RARS. Besonders zu beachten ist, dass 42,3 % der 5q-minus-MDS-Fälle durch diese Kombination aus Anämie + niedrigem GI-Wert entdeckt wurden.

GI in Verbindung mit einer isolierten Anämie hat einen hohen negativ-prädiktiven Wert (97%). Dies bedeutet, dass bei Abwesenheit eines niedrigen GI-Wertes das MDS-Risiko nahe null ist.

Ist der GI-Wert niedriger als -1 , ist die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines MDS beim Patienten 18-mal höher als das Nicht-Vorliegen – die Diagnose MDS ist unter diesen Umständen sehr wahrscheinlich.

Schlussfolgerungen

- Ziel dieser Studie war es, vom Sysmex Hämatologiesystem erfasste Parameter zu identifizieren, die für Routinelaboratorien bei der MDS-Diagnose hilfreich sein könnten.
- Mit der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass NEUT-X, der morphologische Neutrophilen-Parameter, für die Erkennung von MDS verwendet werden kann.
- Dazu wurde NEUT-X in einen semiquantitativen Parameter, den Granularitätsindex (GI), umgerechnet.
- Ein negativer GI in Kombination mit einer Anämie hat sich als starker Hinweis auf ein MDS erwiesen.
- Die Verwendung einer isolierten Anämie in Verbindung mit einem negativen GI-Wert erhöhte den Anteil der Patienten mit MDS, bei denen eine Blutausstrichuntersuchung veranlasst wurde, von 67% auf 96%.
- Bei lediglich 2% der Kontrollen wurden falsch-positive Ergebnisse erhalten, die zu unnötigen Ausstrichuntersuchungen führten.
- Bei Vorliegen einer isolierten Anämie mit positivem GI-Wert ist MDS mit grosser Sicherheit nicht die richtige Diagnose.
- Ein GI-Wert von unter -1 ist ein starker Hinweis für die Diagnose eines MDS (18-mal stärker als für Nicht-MDS).
- Derzeit laufen weitere Studien, deren vorläufige Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Kombination NEUT-X/GI auch bei anderen Krankheitsbildern verwendet werden könnte.

Diese Studie legt nahe, dass NEUT-X/GI in die Auswahl der vom Sysmex Hämatologiesystem erfassten Blutbildparameter mit aufgenommen werden sollte, die im klinischen Alltag routinemässig verwendet werden.

Danksagung

Zu dieser Studie haben alle Mitarbeiter meines Labors sowie folgende Kolleginnen und Kollegen anderer Einrichtungen und Unternehmen beigetragen. Mein Dank geht an: Herrn J. P. Perol (Sysmex Europe) für seine wertvolle Unterstützung bei dieser Studie; Dr. F. Schillinger (EFS Bourgogne-Franche Comté, Besançon), Dr. J. Y. Peltier (CH Saint Germain en Laye), Dr. B. Savin (Laboratoire Gillard, Reims), Dr. Levy (Biostatistik, Hopital St. Louis), Dr. Fenaux (Klinische Abteilung des Hopital Avicenne, Bobigny), J. F. Collon, M. Ganthier und allen technischen Mitarbeitern sowie Dr. G. Leroux und allen medizinischen Mitarbeitern der hämatologisch-biologischen Abteilung am Hopital Avicenne in Bobigny.

Florence Cymbalista

Groupement hospitalier universitaire Nord Avicenne

125, rue de Stalingrad

93009 Bobigny Cedex

Literaturhinweis:

Dieser Artikel stellt eine Übersetzung des englischen Originalartikels dar, veröffentlicht in Sysmex Diagnostic Perspectives 2010, Volume 1, 12 – 19.

Diese Arbeiten wurden mittlerweile auch veröffentlicht als:

Le Roux G et al. 2010: Routine diagnostic procedures of myelodysplastic syndromes: value of a structural blood cell parameter (NEUT-X) determined by the Sysmex XE-2100™. Int J Lab Hematol 32(6 Pt 1): e237 – 243