

## **4. Diagnose eines Eisenmangels bei Blutspendern mit Erythrozyten- und Retikulozytenindizes**

### **4.1. Spezielle Fragestellung**

Die Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration bei Spendewilligen ist nicht geeignet, um einen prälatenten oder latenten Speichereisenmangel ohne Anämie festzustellen. Dies ist zwar durch die Bestimmung der Serum-Ferritins und/oder des löslichen Transferrin-Rezeptors möglich, die Messmethoden sind aber zeitaufwendig und teuer. Seit kurzem ist eine neue Generation von Hämatologie-Automaten verfügbar, die über die Bestimmung der hämatologischen Standardparameter hinaus in der Lage sind, Erythrozyten- und Retikulozyten-Indizes an Einzelzellen zu ermitteln. Die diagnostische Aussagekraft dieser neuen Indizes geht weit über die Aussagekraft der bisher bekannten summarischen Indizes wie MCH (mean cellular hemoglobin) oder MCV (mean cellular volume) hinaus. Insbesondere der prozentuale Anteil hypochromer reifer Erythrozyten (HYPOM) und die Hämoglobinmenge in den Retikulozyten (CHR) sind sensitive Parameter für die Diagnose eines funktionellen Eisenmangels.<sup>20,21,51,102</sup> Ergebnisse an Blutspendern liegen bisher noch nicht vor.

In der vorliegenden, bereits publizierten Untersuchung<sup>80</sup> wurde die Aussagekraft dieser neuartigen Erythrozyten- und Retikulozytenindizes zur Diagnose eines Eisenmangels mit der Bestimmung des Serum-Ferritins und des löslichen Transferrin-Rezeptors bei unselektierten Spendewilligen verglichen.

### **4.2. Materialien und Methoden**

In die Studie wurden insgesamt 1142 unselektierte Spendewillige im Alter von 18 bis 67 Jahren eingeschlossen. Ein positives Votum der Ethik-Kommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin lag vor. Von jedem Teilnehmer wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Bei den Studienteilnehmern handelte es sich sowohl um Erst-, als auch um Wiederholungs- und Apheresespender (Tab. 3).

Tab. 3: Geschlecht der Studienteilnehmer und Anzahl der Spenden im vorangegangenen Jahr

<b>Spendenzahl im vorangegangenen Jahr</b>	<b>Männer</b>	<b>Frauen</b>	<b>Gesamt</b>
Erstspender	89	79	168
0	53	41	94
1	135	83	218
2	111	65	176
3	107	54	161
4	107	-	107
5	79	-	79
Apherese-Spender	110	29	139
	791	351	1142

Die Hämoglobin-Konzentration wurde aus dem Kapillarblut der Fingerbeere mit der Azid-Methämoglobin-Methode in einem HemoCue Hämoglobin B-Photometer (HemoCue, Großostheim, Deutschland) bestimmt. Gemäß den Richtlinien<sup>109</sup> wurden Spendewillige mit unzureichenden Hämoglobin-Werten unter 13,5 g/dl (Männer) bzw. unter 12,5 g/dl (Frauen) nicht zur Blutspende zugelassen.

Venöse Blutproben wurden entweder unmittelbar vor der Blutspende aus dem „predonation sampling bag“ oder durch eine zusätzliche Venenpunktion bei den zurückgestellten Spendern gewonnen. Die Ferritin-Konzentration und die Konzentration des löslichen Transferrin-Rezeptors im Serum wurden mittels immunoturbidometrischer Assays (Olympus Diagnostica, Lismeehan, Irland; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in einem AU400 Analyse-Automaten (Olympus Diagnostica) bestimmt. Zur Abschätzung des Gesamtkörper-eisenbestandes wurde der  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  (Logarithmus des Quotienten aus Konzentration von löslichem Transferrin-Rezeptor und Ferritin-Konzentration) berechnet.<sup>31,94</sup> Wegen der fehlenden Standardisierung der Transferrin-Rezeptor-Assays wurde in der Gruppe der Erstspender die 95%-Perzentile berechnet. Als Eisenmangel wurde ein  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  oberhalb dieses Wertes definiert.

Eine Blutbildanalyse wurde innerhalb von einer Stunde aus EDTA-antikoaguliertem Blut in einem Advia 120 Hämatologieautomaten (Bayer HealthCare, Fernwald, Deutschland) durchgeführt. Das Blutbildanalyse umfasste neben den Standard-Blutbildparametern die Bestimmung der Retikulozyten, des zellulären Hämoglobingehalts der Retikulozyten (CHR) und des Anteils hypochromer reifer Erythrozyten (HYPOM).

Die statistische Auswertung der Daten einschließlich „receiver operating characteristics“ (ROC-Analyse) und Berechnung der Sensitivität und Spezifität erfolgte mit der Software Stata for Windows (Stata Corp., College Station, Texas, USA). Die Sensitivität errechnete sich als Quotient aus Spendern mit abnormalen Werten und Spendern mit Eisenmangel, die Spezifität als Quotient aus Spendern mit normalen Werten und Spendern ohne Eisenmangel.

### 4.3. Ergebnisse

Wegen unzureichender Hämoglobin-Werte unter 13,5 g/dl (Männer) bzw. unter 12,5 g/dl (Frauen) wurden 49 Spendewillige nicht zur Blutspende zugelassen.

Die mittlere Ferritin-Konzentration bei männlichen und weiblichen Spendern nahm signifikant mit steigender Anzahl an Vollblutspenden in den vorangegangenen zwölf Monaten ab (Abb. 4 und 5). Im Gegensatz dazu nahm die Konzentration des löslichen Transferrin-Rezeptors (TfR) bei Frauen nur marginal mit steigender Spendefrequenz zu. Bei Männern mit weniger als zwei Spenden im vorangegangenen Jahr war die TfR-Konzentration vergleichbar mit der Konzentration in der Gruppe der Erstspender. Bei Männern mit zwei oder drei Vollblutspenden in den vorangegangenen zwölf Monaten war die TfR-Konzentration geringfügig, bei Männern mit mehr als drei Spenden erheblich höher. Die Abhängigkeit des Gesamtkörpereisenbestandes von der Spendefrequenz spiegelte sich am deutlichsten im  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  (Logarithmus des Quotienten aus TfR und Ferritin) wider. Das Gesamtkörpereisen der Apheresespender lag in derselben Größenordnung wie bei den Vollblutspendern mit der höchsten zulässigen Spendefrequenz.

Ein Eisenmangel wurde diagnostiziert, wenn der Wert für  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  die 95%-Perzentile in der Gruppe der Erstspender überschritt. Gemäß dieser Definition wiesen 8,2% (94/1142) aller Spender einen Eisenmangel auf, da bei ihnen der Wert für  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  größer oder gleich 2,5 war (Abb. 6). Die Mehrzahl dieser Spender ( $80/94 = 85\%$ ) hatte normale Hämoglobin-Werte  $\geq 13,5$  g/dl (Männer) bzw.  $\geq 12,5$  g/dl (Frauen). Der Anteil von Männern mit Eisenmangel stieg von 1% in der Gruppe der Erstspender auf 20% in der Gruppe der Spender mit fünf Spenden im vorangegangenen Jahr. Der Anteil von Frauen mit Eisenmangel stieg von 6% in der Gruppe der Erstspenderinnen auf 19% in der Gruppe der Spenderinnen mit drei Spenden im vorangegangenen Jahr.

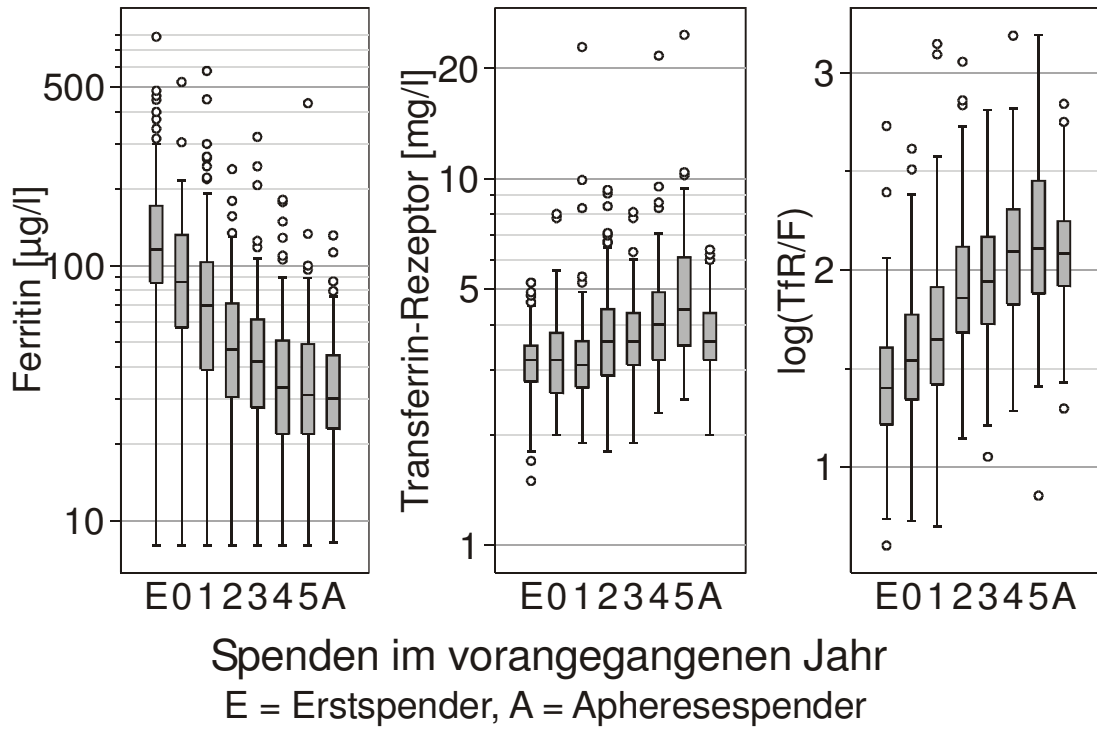


Abb. 4: Ferritin, löslicher Transferrin Rezeptor und  $\log(\text{TfR}/F)$  bei männlichen Spendern

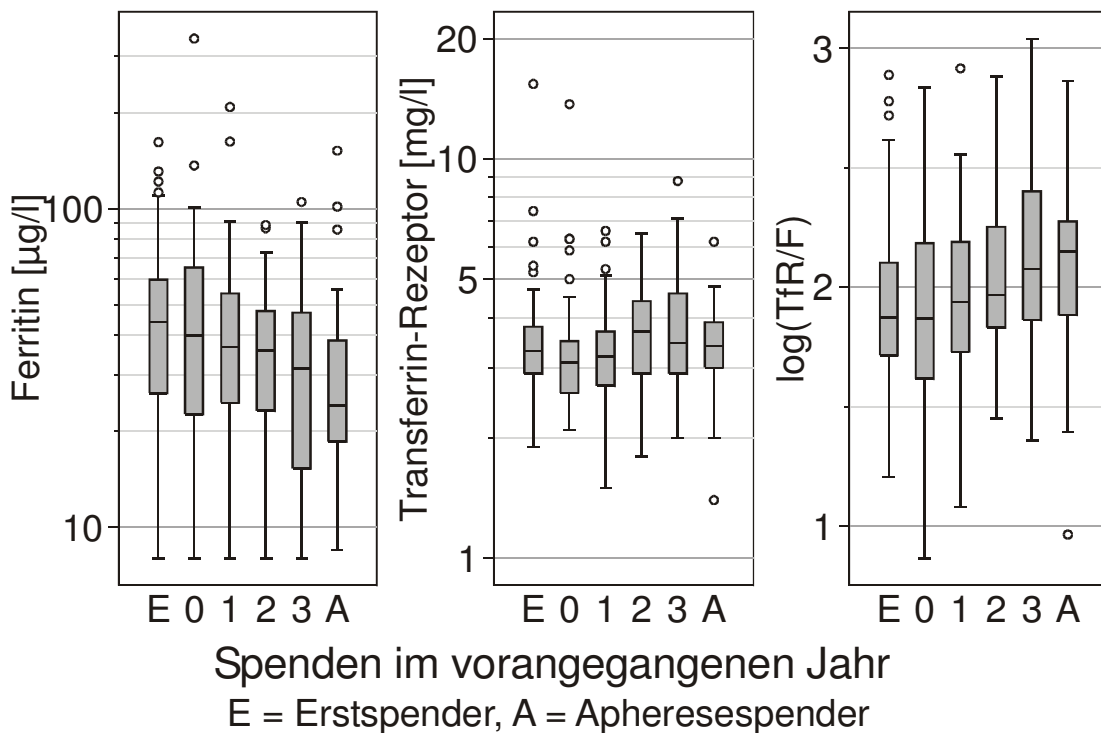


Abb. 5: Ferritin, löslicher Transferrin Rezeptor und  $\log(\text{TfR}/F)$  bei weiblichen Spendern

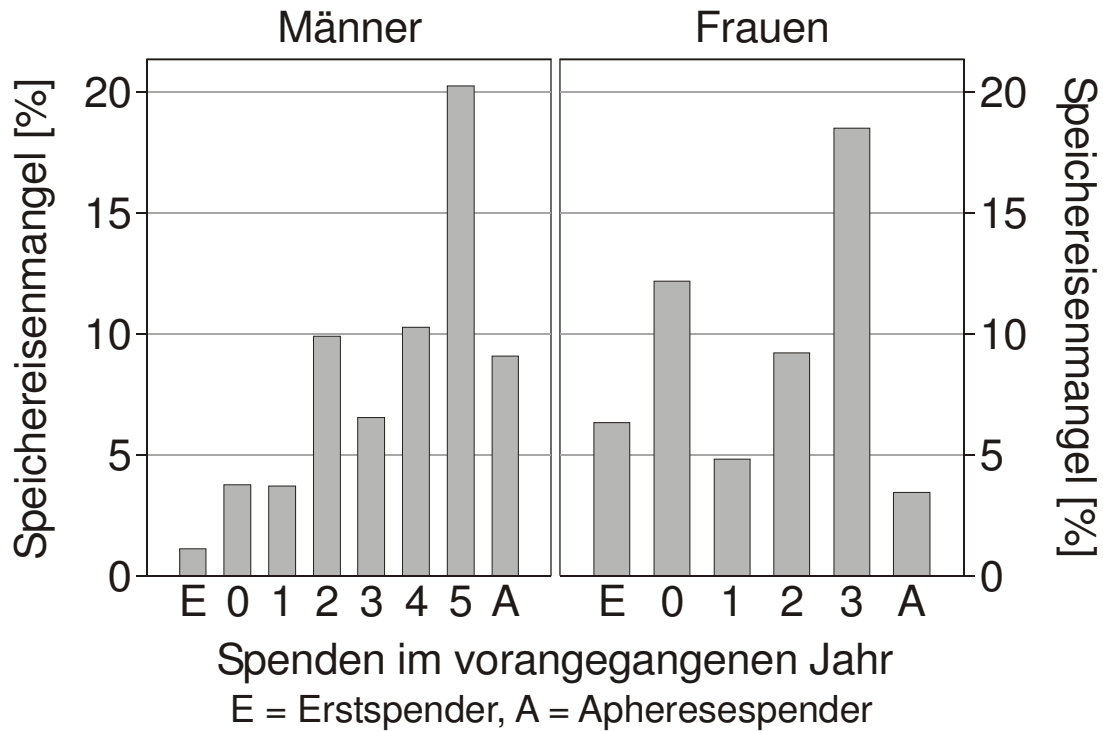


Abb. 6: Häufigkeit eines Speichereisenmangels, definiert als  $\log(\text{TfR}/\text{F}) \geq 2,5$  bei männlichen und weiblichen Spendern

Zwischen den Erythrozyten- und Retikulozytenindizes HYPOM bzw. CHR und dem  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  als Maß für den Speichereisengehalt bestand eine mäßige Korrelation (Abb. 7 und 8). Um die Aussagekraft von HYPOM und CHR hinsichtlich der Diagnose eines Eisenmangels zu prüfen, wurde eine „receiver operating characteristics“ (ROC-Analyse) für die Parameter Ferritin, TfR-Konzentration, zellulärer Hämoglobingehalt der Retikulozyten (CHR), Anteil hypochromer reifer Erythrozyten (HYPOM) und Hämoglobin-Konzentration aus venöser und kapillärer Blutprobe durchgeführt (Tab. 4, Abb. 9). Die Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) war am größten für Ferritin ( $p < 0,001$ ). Die AUCs für TfR und die beiden Erythrozyten- bzw. Retikulozytenindizes unterschieden sich nur marginal. Die AUCs für die Hämoglobin-Konzentrationen aus Kapillarblut und venösem Blut waren signifikant niedriger als die der Erythrozyten- bzw. Retikulozytenindizes ( $p < 0,001$ ).

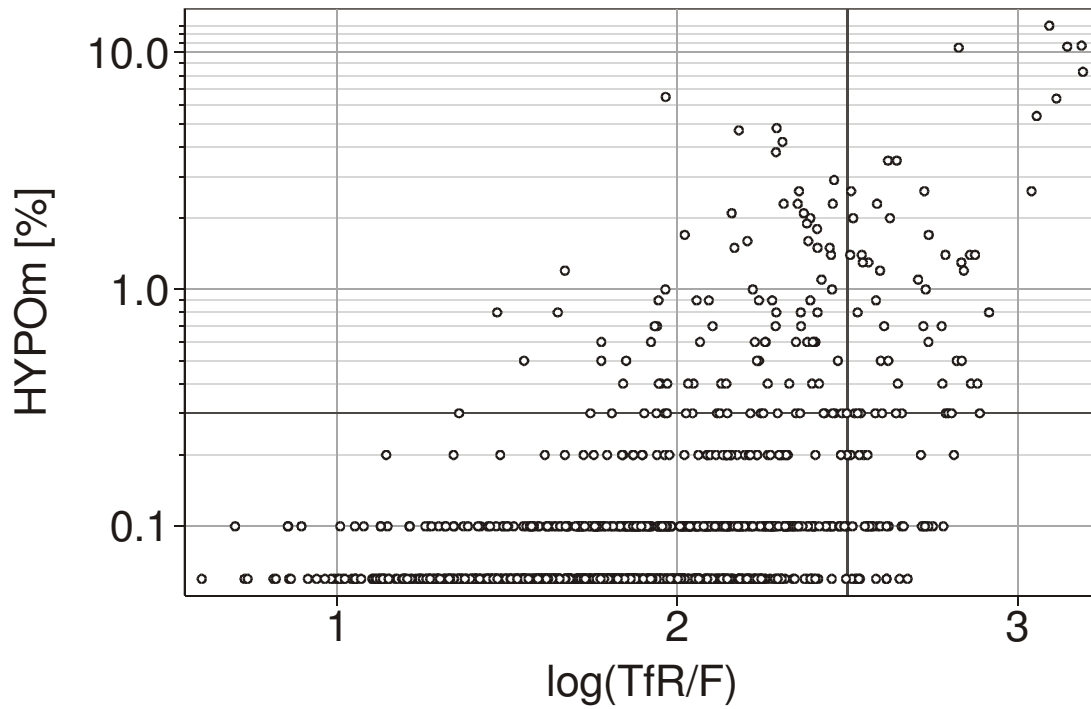


Abb. 7: Zusammenhang zwischen HYPom und  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman  $r = 0,50$ )

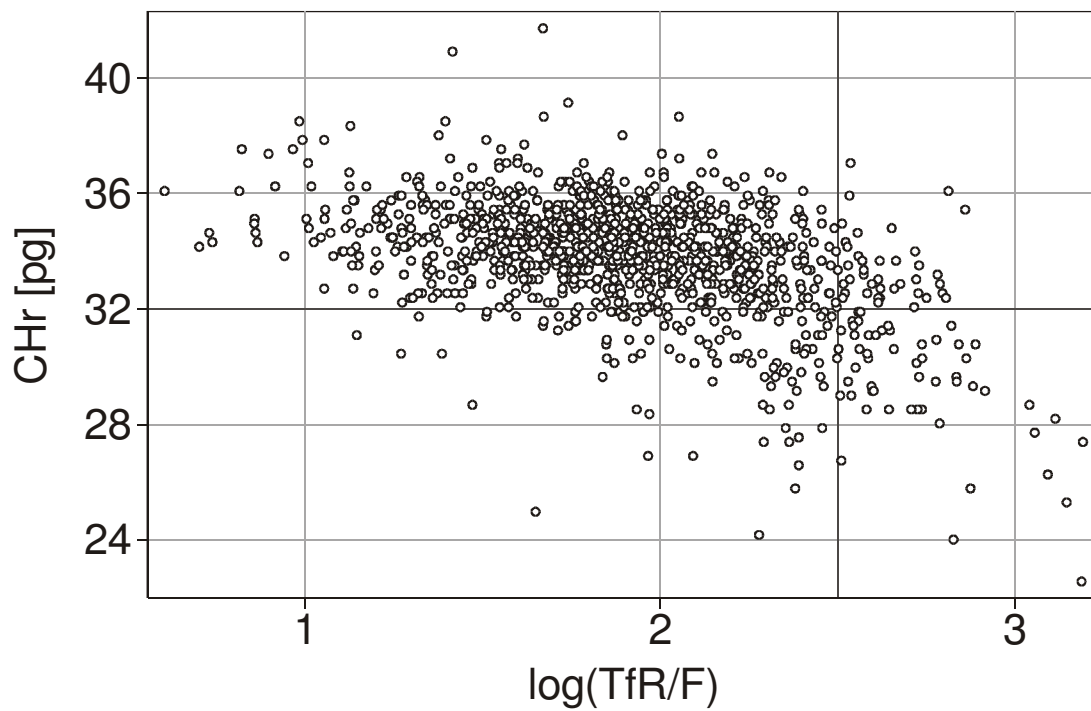


Abb. 8: Zusammenhang zwischen CHr und  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  (Korrelationskoeffizient nach Pearson  $r = -0,48$ )

Tab. 4: Fläche unter der „receiver operating characteristic“ Kurve (AUC) für verschiedene Parameter als Marker für einen Eisenmangel, definiert als  $\log(\text{TfR}/\text{F}) \geq 2,5$

Parameter	AUC	95% Konfidenz-Intervall
Ferritin	0,9777	[0,9687; 0,9868]
TfR	0,8354	[0,7878; 0,8830]
HYPOM	0,8331	[0,7855; 0,8808]
CHr	0,8301	[0,7836; 0,8768]
Hämoglobin (venös)	0,7350	[0,6808; 0,7892]
Hämoglobin (kapillär)	0,6820	[0,6323; 0,7318]

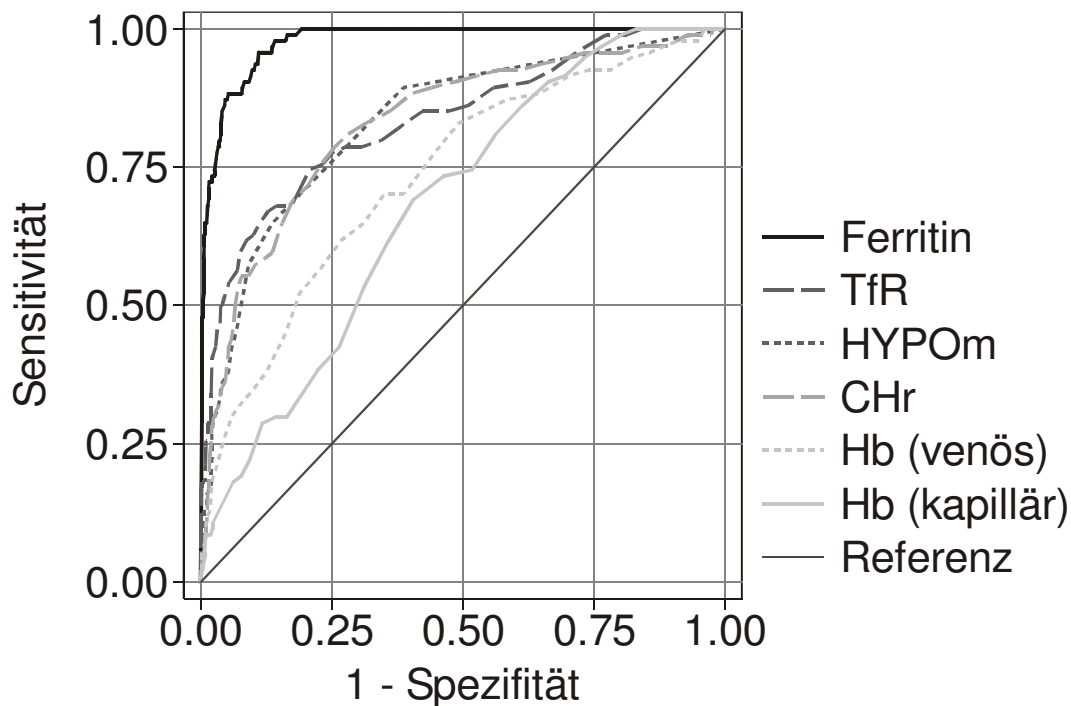


Abb. 9: Receiver operating characteristics (ROC) Analyse für die Parameter Ferritin, TfR, HYPOM, CHr, and Hämoglobin als Marker für einen Eisenmangel, definiert als  $\log(\text{TfR}/\text{F}) \geq 2,5$

Als diagnostische Kenngröße wurden die Sensitivität und Spezifität für die Parameter Ferritin, löslicher Transferrin-Rezeptors (TfR), HYPOM, CHr and Hämoglobin als Marker für einen Speichereisenmangel berechnet (Tab. 5). Tabelle 6 zeigt die Anzahl potentiell zugelassener

bzw. abgelehnter Spender in Abhängigkeit vom gewählten diagnostischen Entscheidungsparameter.

Tab. 5: Sensitivität und Spezifität für verschiedene diagnostische Parameter als Marker für einen Eisenmangel, definiert als  $\log(\text{TfR}/\text{F}) \geq 2,5$ .

Parameter	Grenzwert	Sensitivität	Spezifität
Ferritin	< 12 µg/l	61,7%	99,3%
Ferritin	< 20 µg/l	88,3%	92,3%
TfR	> 4,9 mg/l	62,8%	90,0%
HYPOM	$\geq 0,3\%$	57,5%	90,8%
CHr	< 32 pg	57,5%	89,5%
HYPOM oder CHr*	s.o.	68,1%	85,9%
Hämoglobin (venös)	< 13,5 g/dl (♂) < 12,5 g/dl (♀)	26,6%	95,9%
Hämoglobin (kapillär)	< 13,5 g/dl (♂) < 12,5 g/dl (♀)	14,9%	96,7%

\* Das Ergebnis ist pathologisch, wenn einer oder beide Parameter pathologisch sind.

Gemäß der hier gewählten Definition lag bei 8% aller Spender ein Eisenmangel vor. Ferritin wies bei dem in der Literatur häufig angegebenen Grenzwert für einen Speichereisenmangel von 12 µg/l nur eine Sensitivität von 62% bei einer Spezifität über 99% auf, d.h. mehr als ein Drittel der Spender mit einem Speichereisenmangel wurden nicht erkannt. Setzte man hingegen den Grenzwert auf eine Konzentration von 20 µg/l herauf, stieg die Sensitivität auf 88% bei einer Spezifität von 92% (Tab. 5). Würde Ferritin zur Entscheidung über die Zulassung zur Spende benutzt, würden bei einem Grenzwert von 20 µg/l 14% der Spender abgewiesen werden, von denen nur etwas mehr als die Hälfte einen Eisenmangel hätte (Tab. 6). Allerdings wäre der Anteil von zugelassenen Spender mit einem Eisenmangel mit 1% sehr gering.

Die Sensitivität des TfR lag bei 63%. Die beiden hämatologischen Parameter HYPOM und CHr wiesen mit 54% eine vergleichbare Sensitivität auf, die etwas geringer als die Sensitivität des TfR war. Bei Kombination der beiden Parameter HYPOM und CHr (mindestens einer der beiden Parameter war pathologisch) konnte eine Sensitivität von 68% erreicht werden, wodurch die Spezifität allerdings auf 86% abfiel. Bei kombiniertem Einsatz der beiden hämatologischen Parameter zur Entscheidung über die Zulassung zur Spende würde der



Anteil an Ablehnungen auf insgesamt 19% ansteigen, wobei nur 30% der abgewiesenen Spender einen Speichereisenmangel hätten. Auf der anderen Seite würden nur 3% der zugelassenen Spender einen Eisenmangel aufweisen.

Die Sensitivität der venösen Hämoglobin-Bestimmung lag nur knapp über 25%, der Hämoglobin-Bestimmung aus dem Kapillarblut sogar nur bei 15%. Auf Grundlage der Hämoglobinbestimmung aus dem Kapillarblut wurden gemäß den Richtlinien<sup>109</sup> nur 4% der Spender abgelehnt, von denen nur knapp 30% überhaupt einen Eisenmangel aufwiesen. 7% der zugelassenen Spender wiesen einen Eisenmangel auf.

Tab. 6: Anzahl der (potentiell) zugelassenen bzw. abgelehnten Spender in Abhängigkeit vom gewählten diagnostischen Entscheidungsparameter, Eisenmangel war definiert als  $\log(\text{TfR}/\text{F}) \geq 2,5$

Parameter	Grenzwert	Potentiell abgelehnte Spender		Potentiell zugelassene Spender	
		gesamt	mit Eisenmangel	gesamt	mit Eisenmangel
$\log(\text{TfR}/\text{F})$	$\geq 2,5$	94	94	1048	0
Ferritin	$< 12 \mu\text{g/L}$	65	58	1077	36
Ferritin	$< 20 \mu\text{g/L}$	164	83	978	11
TfR	$> 4,9 \text{ mg/L}$	164	59	978	35
HYPOM	$\geq 0,3\%$	150	54	992	40
CHr	$< 32 \text{ pg}$	164	54	978	40
HYPOM oder CHr*	<i>s.o.</i>	212	64	930	30
Hämoglobin (venös)	$< 13,5 \text{ g/dl} (\text{♂})$ $< 12,5 \text{ g/dl} (\text{♀})$	68	25	1074	69
Hämoglobin (kapillär)	$< 13,5 \text{ g/dl} (\text{♂})$ $< 12,5 \text{ g/dl} (\text{♀})$	49	14	1093	80

\* Das Ergebnis ist pathologisch, wenn einer oder beide Parameter pathologisch sind.

#### 4.4. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Aussagekraft der hämatologischen Erythrozyten- bzw. Retikulozyten-Parameter HYPOM (Anteil hypochromer reifer Erythrozyten) und CHr (Hämoglobin-Gehalt der Retikulozyten) bezüglich der Diagnose eines Eisenmangels mit den eingeführten Eisenstoffwechsel-Parametern Ferritin, löslicher Transferrin-Rezeptor (TfR) und

Hämoglobin-Konzentration verglichen. HYPOM und CHR werden durch Analyse des Streulichtverhaltens der Einzelzellen in einem Blutbildautomaten in kurzer Zeit parallel zur Analyse des Standard-Blutbildes bestimmt. Wie andere Autoren<sup>20,21,51,102</sup> zeigen konnten, besteht eine enge Beziehung zwischen beiden Indizes und dem Körpereisenbestand. HYPOM und CHR haben sich als wertvolle Parameter bei der Differentialdiagnose der Eisenmangelanämie erwiesen und werden nicht durch Akute-Phase-Reaktionen beeinflusst. In einer Untersuchung an anscheinend gesunden jungen Frauen lag die Sensitivität für die Diagnose eines Eisenmangels bei 100% (HYPOM) bzw. 90% (CHR).<sup>51</sup> Da die mittlere Lebensdauer von Erythrozyten bei etwa 120 Tagen liegt, reflektiert HYPOM die Eisenversorgung der Erythropoese in den vorangegangenen drei Monaten, wohingegen CHR einen frühen Marker für akute Änderungen der Eisenversorgung wie zu Beginn einer Erythropoetin-Behandlung darstellt.<sup>20,21,102</sup>

Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen zum Eisenmangel bei Blutspendern wurde in der vorliegenden Untersuchung der  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  (Logarithmus des Quotienten aus TfR und Ferritin) als Maß für den Körpereisenbestand verwendet.<sup>31,94</sup> Da die Assays für TfR nicht ausreichend standardisiert und somit nicht vergleichbar sind,<sup>31</sup> wurde als oberer Normwert die 95%-Perzentile in der Gruppe der Erstspender verwendet. Wie schon von anderen Autoren<sup>3,34,77,90,93</sup> beschrieben, korrelierten sowohl die Werte für  $\log(\text{TfR}/\text{F})$ , als auch der Anteil an Spendern mit einem Speichereisenmangel mit der Anzahl der Spenden im vorangegangenen Jahr. Bemerkenswert war der hohe Anteil an Apheresespendern mit erschöpften Eisenspeichern, was vor kurzem erstmalig beschrieben wurde.<sup>10</sup>

Bezogen auf  $\log(\text{TfR}/\text{F})$  lag die Sensitivität von HYPOM und CHR bei 57%, die Spezifität bei 90%. Durch Kombination der beiden Parameter konnte die Sensitivität auf 68% gesteigert werden. Das bedeutet, dass zwei Drittel der Spender mit einem Eisenmangel korrekt identifiziert werden konnten, in der Mehrzahl der Fälle (40/64) vor Entwicklung einer manifesten Eisenmangelanämie. Die Sensitivität war deutlich höher als die Sensitivität der Hämoglobin-Bestimmung, die nur 27% bei Bestimmung aus venösen Blutproben und 15% bei Bestimmung aus Kapillarblutproben der Fingerbeere betrug.

Die Bestimmung der Erythrozyten- und Retikulozytenindizes stellt einen Fortschritt in der Diagnostik des Eisenmangels bei Blutspendern dar, insbesondere im direkten Vergleich mit der Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration. Der Einsatz als Screening-Methode zur Spendetauglichkeit wird dadurch eingeschränkt, dass eine Nutzung in mobilen Spende-Einrichtungen kaum möglich und zumindest derzeit die Entnahme einer venösen Blutprobe

notwendig ist. Daher ist weiterhin die Notwendigkeit für die Entwicklung besserer und einfacherer Techniken gegeben.