

Hämatologie und Labormedizin

Möglichkeiten und Grenzen des klinisch-chemischen Zentrallabors bei hämatologischen Erkrankungen



H. J. Groß

ZE Klinische Chemie, Universitätsklinikum Ulm

Vitamin B₁₂-Mangel

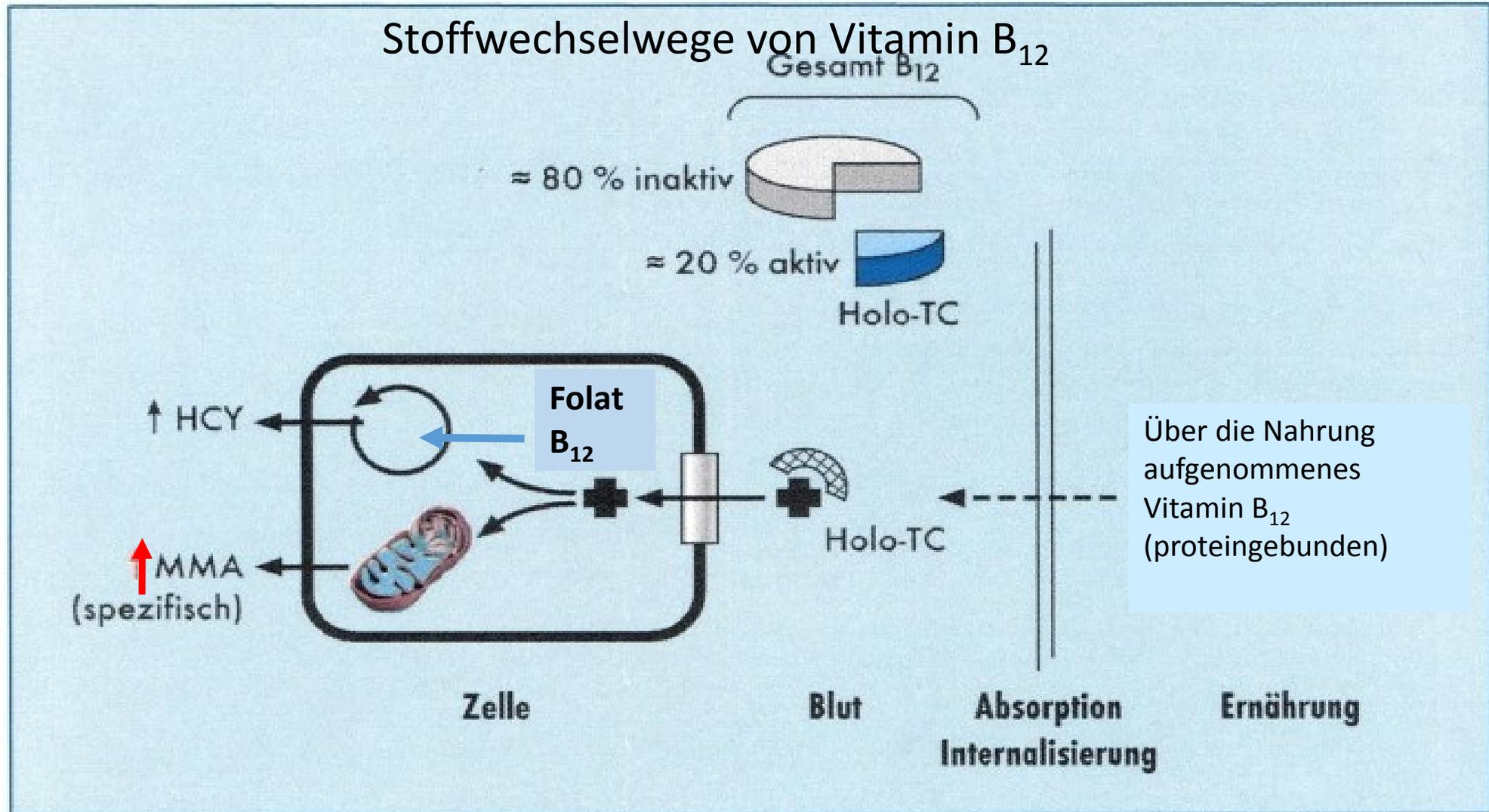
Vitamin B₁₂-Mangel: Oft klinisch unauffällig (subklinisch), aber in der Bevölkerung verbreitet (> 65 J: ca. 10 %)
Labordiagnostisch nur durch eingehendere Diagnostik verifizierbar, Vitamin B₁₂-Messung im Plasma wenig aussagekräftig.
Klinische Manifestationen weit gestreut (neurologische, psychische bis hämatologische Symptomatik)
Spezielle Risikogruppen wie z. B. Vegetarier bzw. Veganer

Referenzbereiche:

Alter, Jahre	Weiblich		Männlich	
	ng/l	pmol/l	ng/l	pmol/l
< 1	228–1.515	168–1.115	293–1.210	216–891
2–3	416–1.210	307–892	264–1.215	195–897
4–6	313–1.410	231–1.040	245–1.075	181–795
7–9	247–1.175	182–866	271–1.170	200–863
12–12	196–1.020	145–752	183–1.090	135–803
13–18	182–820	134–605	214–864	158–638
Erw.	211–911	156–672	211–911	156–672

Vitamin B₁₂-Konzentrationen bei 45 Patienten mit gesicherter B₁₂-Mangel-Diagnose (95%-Bereich): 32–246 ng/l (24–181 pmol/l).
Umrechnungsfaktor: ng/l × 0,738 = pmol/l

Vitamin B₁₂-Mangel



Vitamin B₁₂-Mangel

Diagnostische Parameter:

Konzentration Vitamin B12 im Plasma



Breiter Referenzbereich, Mangel bereits im Referenzbereich möglich
Konzentration im Plasma wenig aussagekräftig, da Korrelation zum Mangel und zur Klinik nur schwach (20 - 30 % Holo-TC)

Konzentration Holo-TC im Plasma



Speicherparameter
Hohe Spezifität, Nachweis entleerter zellulärer Speicher, funktioneller Mangel nicht direkt nachweisbar

Konzentration MMA im Plasma



Funktioneller Parameter,
Hohe Spezifität, Nachweis eines funktionellen Mangels

Konzentration MMA im Urin



Funktioneller Parameter
Hohe Spezifität, Nachweis eines funktionellen Mangels bei Niereninsuffizienz

Konzentration Homocystein im Plasma



Funktioneller Parameter
Eingeschränkte Spezifität, Nachweis eines funktionellen Mangels an Vitamin B₁₂ und/oder Folat

Vitamin B₁₂-Mangel

Diagnostische Parameter:

MMA (Methyl-Malonsäure) im Plasma bzw. Urin:

Parameter für Diagnostik und Therapiemonitoring des Vitamin B₁₂-Mangels

Spezifisch für Vitamin B₁₂-Mangel

Bestimmung mittels LC-MS (mind. 100 µl Plasma)

Hohe Sensitivität, da Konzentration im Plasma ca. 1000fach höher als im Vergleich mit Holo-TC

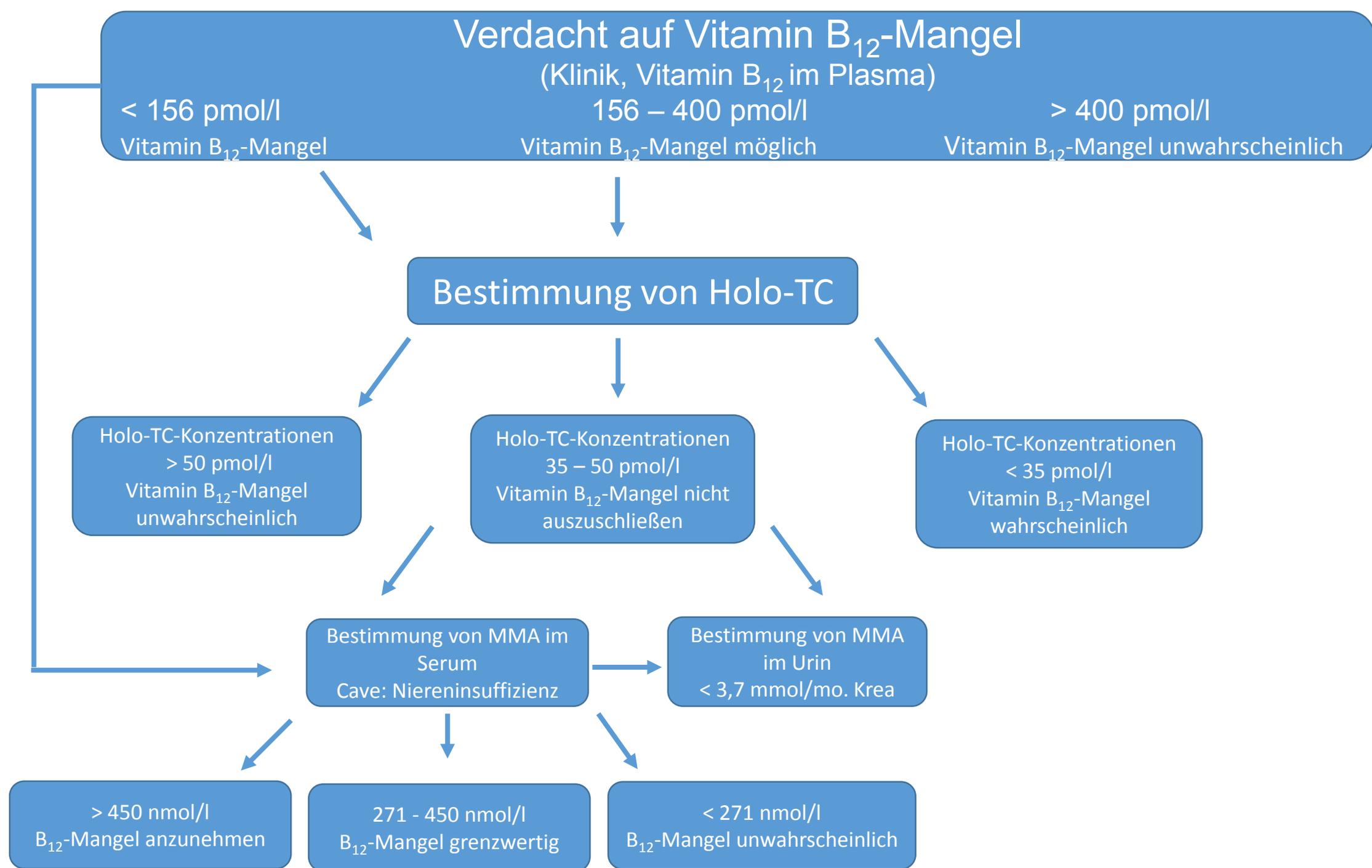
Stabiler Parameter (7 Tage bei RT)

Plasmawert eingeschränkt verwertbar bei Niereninsuffizienz

Alternativ: Bestimmung im Urin in Bezug auf Kreatinin

Bei Supplementierung mit Vitamin B₁₂:

MMA-Konzentration nach 1 – 2 Wochen wieder im Referenzbereich



Vitamin B₁₂-Mangel

Zusammenfassung:

Klinische Kernaussagen

- Ein subtiler, klinisch unauffälliger und labordiagnostisch bislang nicht erfasster Vitamin-B₁₂-Mangel ist in der Allgemeinbevölkerung häufig. Klinische Manifestationen des B₁₂-Mangels reichen von frühen neurologischen bis zu hämatologischen Symptomen.
- Holotranscobalamin (Holo-TC) und Methylmalonsäure (MMA) besitzen, verglichen mit der Vitamin-B₁₂-Bestimmung, eine höhere Sensitivität und Spezifität und gelten daher als moderne Biomarker des B₁₂-Status. Gesamt-Vitamin-B₁₂ führt als Marker zur Unterschätzung der Prävalenz des B₁₂-Mangels.
- Eine Frühdiagnostik des B₁₂-Mangels ist angezeigt, weil neurologische Symptome irreversibel sein können und häufig vor oder ohne hämatologische Manifestationen auftreten.
- Patienten mit neurologischen Symptomen unbekannter Ätiologie sollten auf B₁₂-Mangel und Malabsorption getestet werden. Geringe B₁₂-Aufnahme, Malabsorption, perniziöse Anämie und gastrointestinale Erkrankungen mit pH-Verschiebung sollten bei der Diagnose und Behandlung von B₁₂-Mangel beachtet werden.
- In randomisierten Studien wurde gezeigt, dass eine orale B₁₂-Substitution bei Personen mit normaler Absorption wirksam ist und neurologische wie hämatologische Symptome bessert. Die Therapie sollte durch Bestimmung des B₁₂-Status kontrolliert werden.

Diagnostische Thrombozytenparameter

Fraktion der unreifen Thrombozyten (IPF)

Pathobiochemie:

Unreife Thrombozyten im peripheren Blut sind 1 – 2 Tage alt und besitzen einen erhöhten RNA-Gehalt (retikuläre Thrombozyten)

Die IPF reflektiert die Thrombopoese rate bzw. die Aktivität der Megakaryozyten.

Bei peripherem Verbrauch oder Destruktion ist die IPF kompensatorisch erhöht

Die Höhe der IPF korreliert mit dem Schweregrad der Thrombozytendegradation.

Der Anstieg des IPF geht dem Anstieg der Thrombozyten voraus (1 – 2 Tage)

Einheit IPF: %-Anteil bezogen auf die gesamten Thrombozyten bzw.
 Absolutanzahl in G/l

Messprinzip:

Maschinelle Messung durch Färbung des RNA-Gehaltes der Thrombozyten (Sysmex XE 5000 bzw. XN-Serie)

(Interferenz durch Erythrozytenfragmente und das Thrombozyten-Granulomer bei der RNA-Färbung,

Spezifität daher gegenüber Durchflusszytometrie reduziert)

Messung erfolgt im Retikulozyten-Messkanal, kein zusätzlicher Probenvolumenbedarf

Parameter 24h bei Raumtemperatur stabil

Parameter 24 h verfügbar, 24 h bei RT stabil

(Bei Anforderung Retikulozyten wird der Parameter aktuell „mitgemessen“).

Diagnostische Thrombozytenparameter

Fraktion der unreifen
Thrombozyten (IPF)

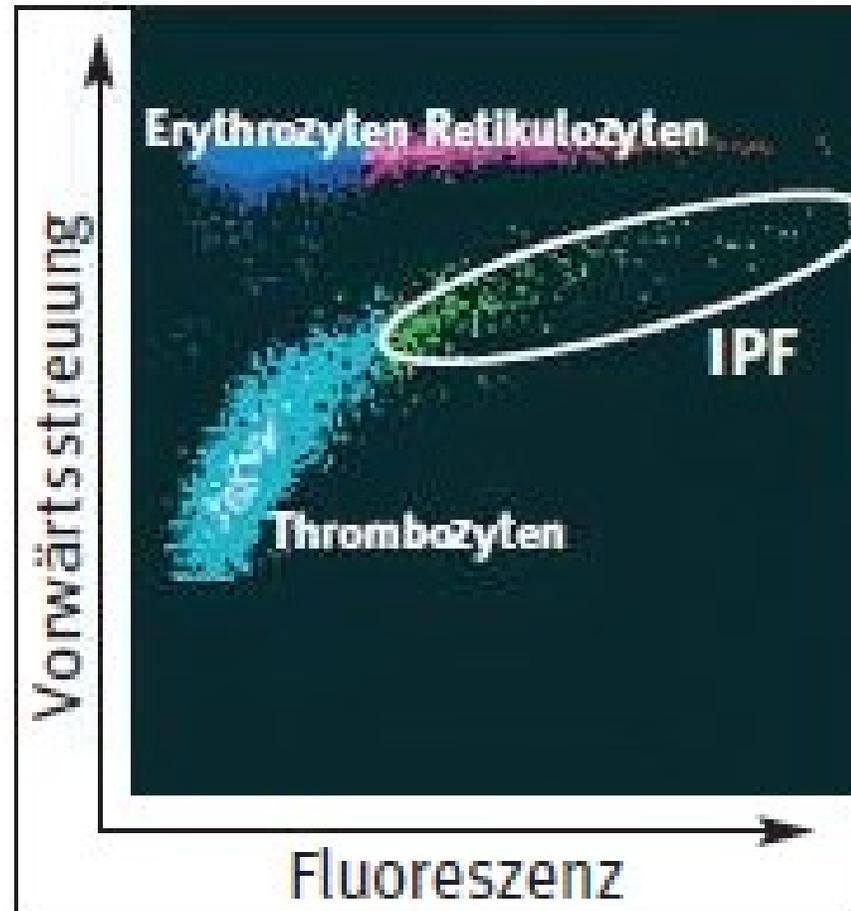


Abb. 1: IPF-Scattergramm

Diagnostische Thrombozytenparameter

Fraktion der unreifen Thrombozyten (IPF)

Indikation:

Differentialdiagnostik Thrombozytopenie:

Knochenmarkinsuffizienz versus Thrombozytenverbrauch

(z. B. TTP, ITP, HUS, HIT, DIC u. a.)

Monitoring der Regeneration der Thrombopoese nach Stammzelltransplantation bzw. Chemotherapie (IPF > 10 %)

(Monitoring Transfusionsbedarf, Vermeidung von Knochenmarkspunktionen)

Referenzbereiche:

	Neugeborene	Kinder > 6 Mon.	Erwachsene
Anzahl der Patienten	682	100	50
Fraktion unreifer Thrombozyten (%)	4,1 ± 1,8 (2,3 – 6,7)	2,7 ± 1,3 (1,4 – 4)	3,4 (1,1 – 6,1)
Unreife Thrombozyten (x 10 ⁹ /L)	9,5 ± 3,8 (5,7 – 13,3)	7,2 ± 3,4 (3,8 – 10,6)	8,6 (3,1 – 16,4) (3,1 – 16,4)

Xtra Fa. Sysmex, Vol 16.1 (2012) Nr. 06

Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Macchini SJ (2004): Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. Br. J. Haematol 126: 93-9

Murray NA, Watts TL, Roberts IA (1998): Endogenous thrombopoietin levels and effect of recombinant human thrombopoietin on megakaryocyte precursors in term and preterm babies. Pediatr res 43: 148-51.

Diagnostische Thrombozytenparameter

Fraktion der unreifen Thrombozyten (IPF)

Klinische Studien:

1. Studie bei Erwachsenen (präliminäre Daten)

Briggs et al, bjh (2004) 126, 93-99

Ergebnisse:

ITP: IPF 9 – 33 % TTP: IPF 11 – 31 %

Bei klinischem V. a. ITP ist bei erhöhter IPF eine Knochenmarkpunktion nicht nötig, ohne erhöhte IPF ist dagegen eine Punktion empfehlenswert.

IPF kann evtl. helfen, die prophylaktische Gabe von Thrombozytenkonzentrat zu steuern

2. Studie bei Kindern (präliminäre Daten)

S. Moschner Dissertation Universität Ulm 2011, Arbeitskreis A. Schulz

Knochenmarktransplantation: bei Rekonstitution sinkt der IPF (hohe Streuung der Werte)

Knochenmarkversagen: keine Signifikanz für erniedrigte IPF-Werte

Problem: geringe Patientenzahl, nur Bestimmung des %-IPF

Diagnostische Thrombozytenparameter

Fraktion der unreifen Thrombozyten (IPF)

Klinische Aspekte:

3. Studie bei Früh- und Neugeborenen mit Thrombopenie
Xtra Fa. Sysmex, Vol. 16.1 (2012) Nr.06, M. Cremer
Anstieg des %-IPF zeigt steigende Thrombozytenkonzentrationen an.
%-IPF korreliert invers zur Thrombozytenkonzentration (Thrombozytenverbrauch).
Absoluter IPF bei Neugeborenen mit schwerer Thrombozytopenie mit $4,7 \times 10^9/l$ ca. 50 % vermindert
(verringerte Aktivität der Thrombopoese)
4. Studie bei erwachsenen Patienten mit Sepsis
Monteiro Enz Hubert R et al (2015): Association of the immature platelet fraction with sepsis diagnosis and severity, Scientific Reports: 1-6
IPF signifikant erhöht bei Patienten mit schwerer Sepsis bzw. septischem Schock
IPF korreliert zum Schweregrad der Sepsis (Apache II-Score)

Diagnostische Thrombozytenparameter

Fraktion der unreifen Thrombozyten (IPF)

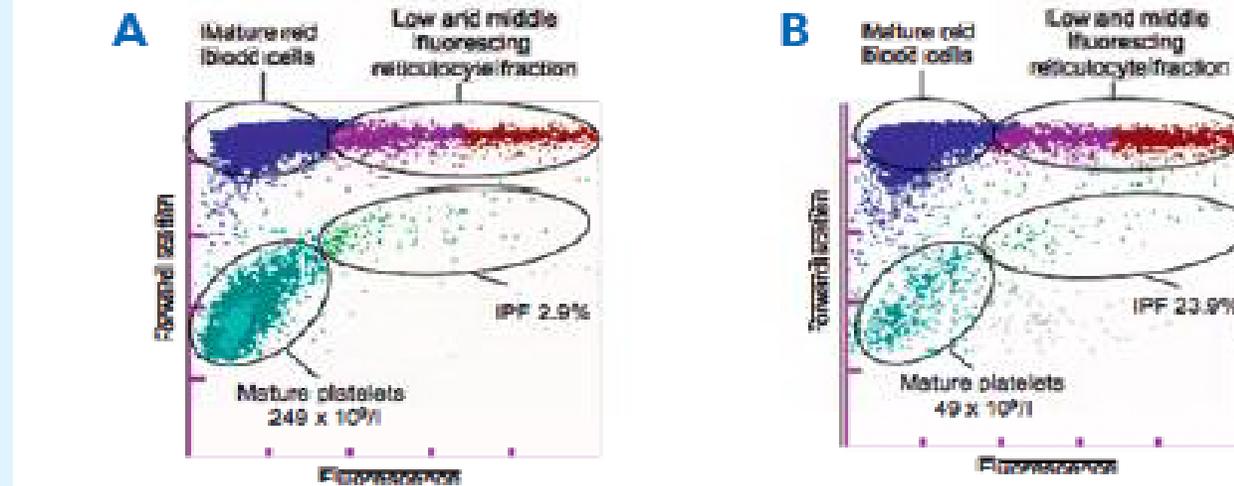


Figure 1 Original scattergrams of blood cell analysis including immature platelet fraction (IPF) in healthy (A) and thrombocytopenic neonates (B) performed with the Sysmex XE-2100 automatic analyzer equipped with the software XE-IPF-Master. Panel A: Analysis in a preterm neonate with normal platelet count ($249 \times 10^9/L$) and normal IPF. Panel B: Scattergram from a blood specimen of a thrombocytopenic neonate ($49 \times 10^9/L$) with high IPF value. Mature platelets appear as turquoise dots, and green dots represent immature platelets characterized by an increased cell volume and higher fluorescence intensity compared to mature platelets.

Diagnostische Thrombozytenparameter

Fraktion der unreifen Thrombozyten (IPF)

Klinische Aspekte:

Aktuelle Verbesserungen in der IPF-Analytik:

Sakuragi M et al (2014): Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders, Int J Hematol 101:369-375

Anwendung des absoluten IPF-Wertes (G/l)

Verbesserter Farbstoffeinsatz bei Sysmex XN-Serie

Höhere Spezifität als bei XE-5000

Keine Interferenz durch Erythrozytenfragmente

Höheres Zählvolumen, dadurch deutlich verbesserte Präzision bei niedrigen Thrombozytenzahlen

Verbesserte Statistik des IPF bei niedrigen Thrombozytenzahlen in der XN-Serie

Kombination mit Thrombopoetin-Konzentration im Plasma

Diagnostische Retikulozytenparameter

Hypochrome Erythrozytenfraktion

Hypo-He (Fa. Sysmex)/% Hypo (Fa. Bayer):

Anteil hypochromer Erythrozyten

Monitoring der Eisenverfügbarkeit der Erythropoese über die letzten 3 – 4 Monate

Hypo-He (Fa. Sysmex):

Absolutmenge des Hb wird bestimmt, unabhängig vom MCV (Cut off < 17 pg Angabe als %-Anteil)

Parameter bei Lagerung der Probe bei RT für mehrere Tage stabil

% Hypo (Fa. Bayer): Hb-Konzentration wird bestimmt Cut off 2,7 %

Diagnostische Retikulozytenparameter

Retikulozyten-Hb

Ret-He (Fa. Sysmex) / CHr (Fa. Bayer):

Pathobiochemie:

Mittlerer Hb-Gehalt der Retikulozyten (Referenzbereich 28 – 35 pg)

Cut off für Eisenmangel < 28 pg (100 % Sensitivität/Spezifität)

Monitoring der Eisenverfügbarkeit für die Erythropoese über die letzten 3 – 5 Tage

Kein Einfluss einer akuten Phase-Reaktion

Parameter auch nach einigen Tagen Lagerung bei Raumtemperatur stabil!

Messprinzip:

Maschinelle Messung durch Färbung des RNA-Gehaltes der Retikulozyten

Messung der Fluoreszenzintensität des RNA-Farbstoffes und des Vorwärtsstreulichts ergibt den Hb-Gehalt pro Zelle (Fa. Sysmex XE 5000 bzw. XN-Serie)

Kein zusätzlicher Probenvolumenbedarf, Parameter 24 h verfügbar

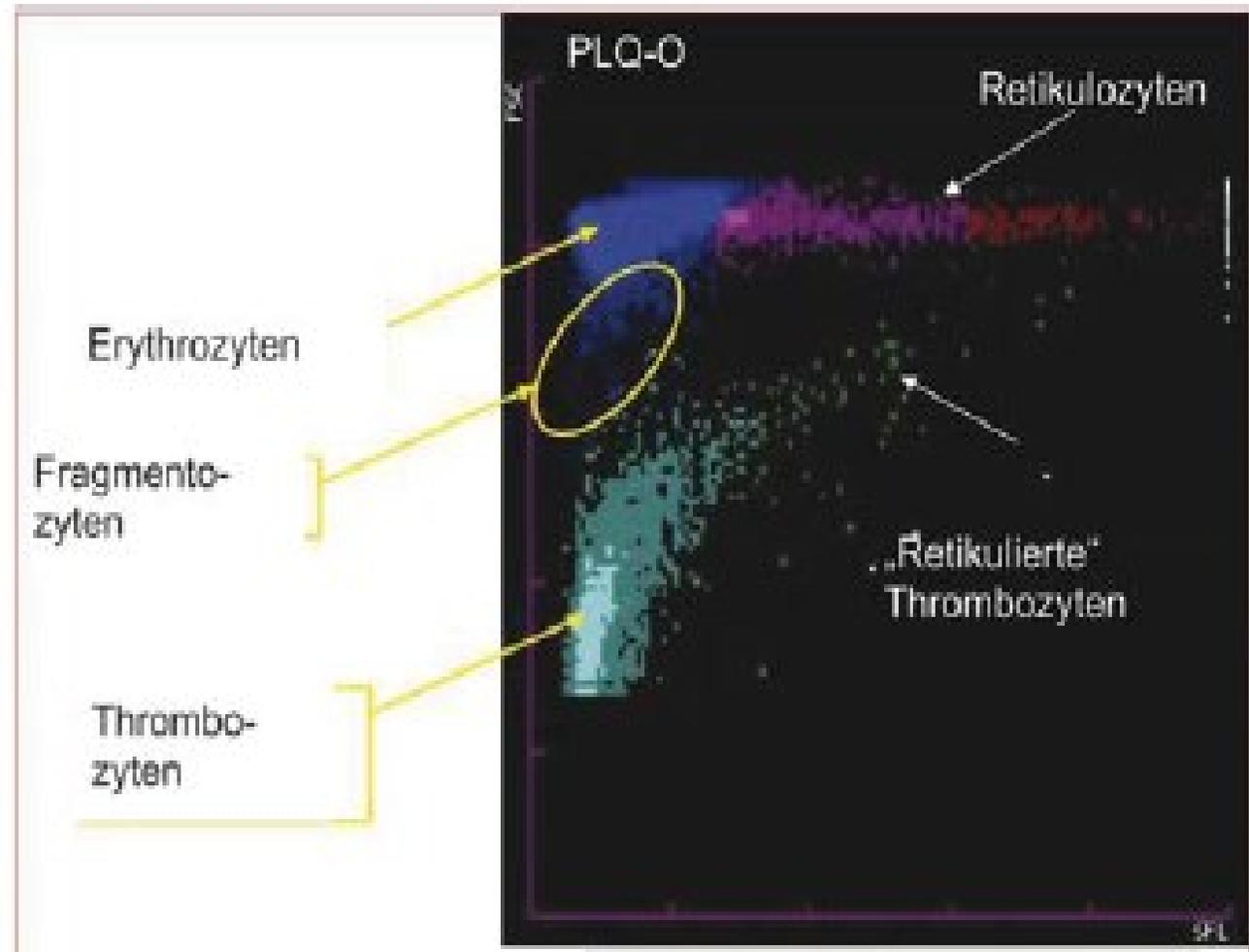
Indikation:

Sensitiver und spezifischer Frühmarker für einen funktionellen Eisenmangel,

Differentialdiagnose einer ACD,

Monitoring einer EPO/Eisentherapie

Diagnostische Retikulozytenparameter



J Lab Med 2010: Aktuelle Aspekte zur Bestimmung der Retikulozytenzahl, 34 (6):295-304

Diagnostische Retikulozytenparameter

IRF

Fraktion der unreifen Retikulozytenfraktion

Aktivität der Erythropoese

Differenzierung hämolytische Anämie und renale Anämie

Früher Marker der Knochenmarkrekonstitution nach Stammzelltransplantation bzw. Chemotherapie

Referenzbereich:

w: 1,1 – 15,9 %

m: 1,5 – 13,7 %

Delta-He:

Differenz von Ret-He und RBC-He

Empfindlichster Parameter eines akuten funktionellen Eisenmangels

Bei ACD negativer Wert, bei reinem Eisenmangel positiver Wert

Diagnostische Retikulozytenparameter

Retikulozyten-Produktions-Index (RPI)

Steigerung oder Verminderung der Erythorzytenproduktion als Index zur Norm (1,0)

Beurteilung des Reaktionsvermögens der Erythropoese bei einer Anämie unter Berücksichtigung des Hämatokrit (HKT) und der Retikulozytenverweildauer im peripheren Blut

Berechnung:

$$\text{RPI} = \frac{\text{Retikulozyten (\%)} \times \text{Hkt}}{\text{Verweildauer} \times 0,45}$$

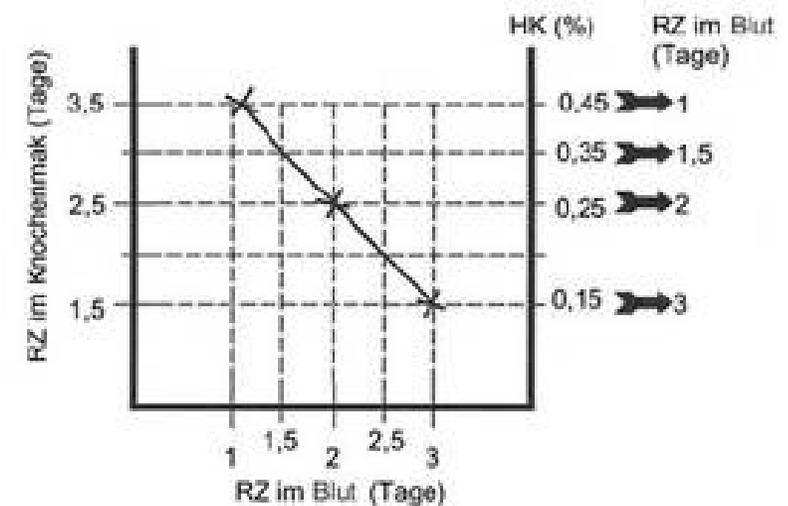
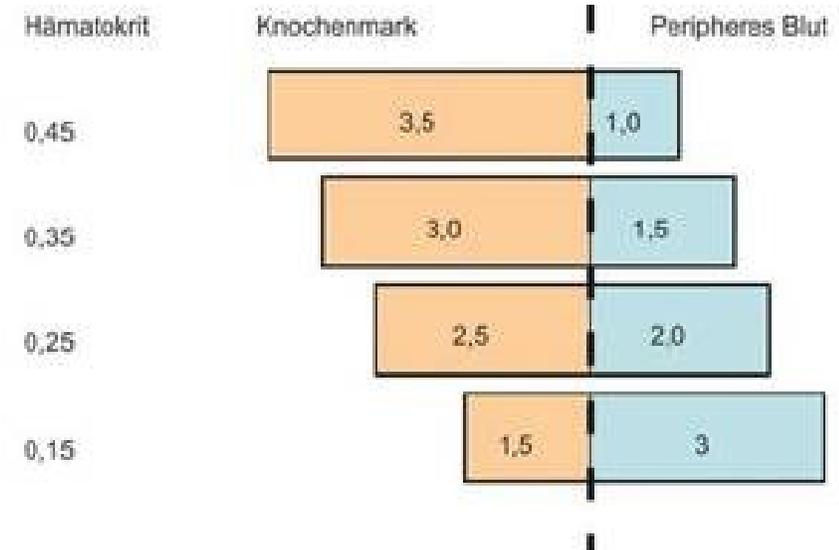
Die Retikulozytenverweildauer hängt vom Grad der Anämie ab, es wird ein linearer Zusammenhang angenommen:

Parameter unabhängig von einer Akut-Phase-Reaktion

Indikation:

Diagnostik einer ACD (speziell bei chronischen Nierenerkrankungen, chron. Infektionen bzw. malignen Erkrankungen)

Monitoring einer EPO/Eisentherapie



Diagnostische Retikulozytenparameter

Retikulozyten-Produktions-Index (RPI)

Hämatokrit, %	Retikulozyten, G/L	RPI
35	150	2–3
25	250	>3
<25	>250	>4

J Lab Med 2010: Aktuelle Aspekte zur Bestimmung der Retikulozytenzahl, 34 (6):295-304

Thomas-Plot zur Anämiediagnostik



Pseudothrombopenie/Pseudothrombozytose

Pseudothrombopenie:

Viel häufiger als ITP u. a.

Ursache:

z. B. angeronnene Probe (kleine, homogen verteilte Aggregate, in vitro)

Kälteagglutinine (im Rahmen von Infektionen, in vivo und in vitro)

Satellitenphänomen (Heparin-induziert, in vivo und in vitro)

EDTA-induziert (niedrig-titrige IgM-Antikörper, in vitro), Thrombexact-Monovette, Befund!

Cave: nicht immer Gerätewarnhinweis vorhanden

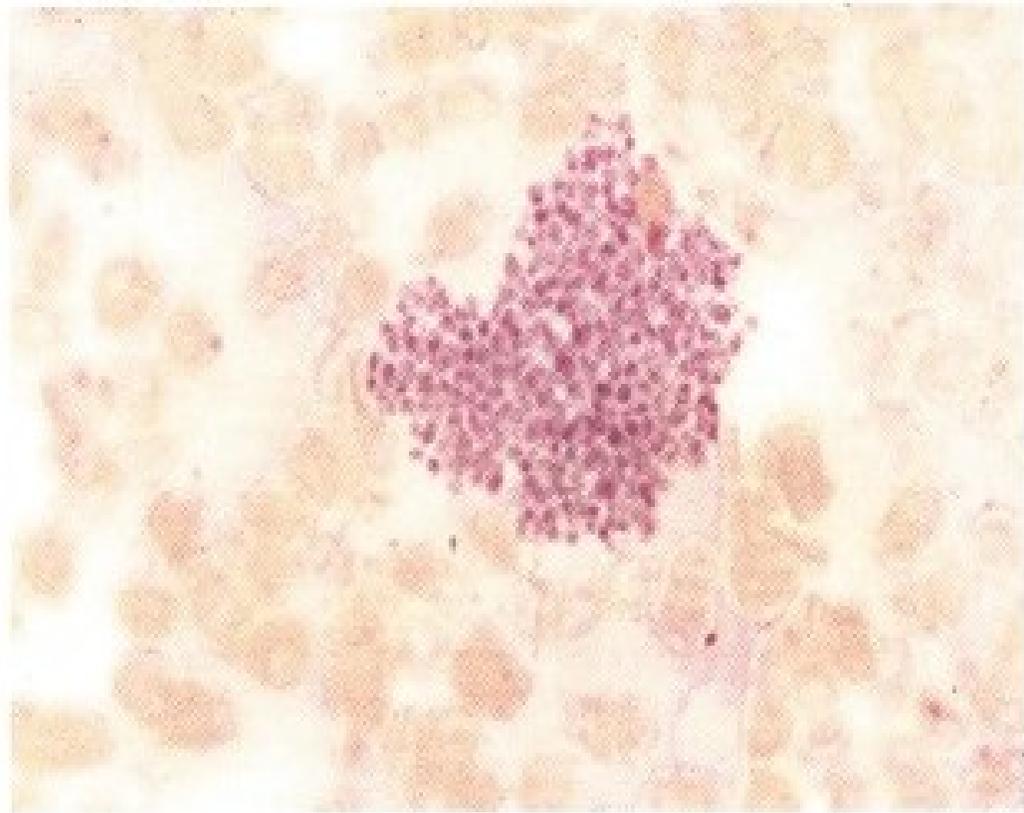
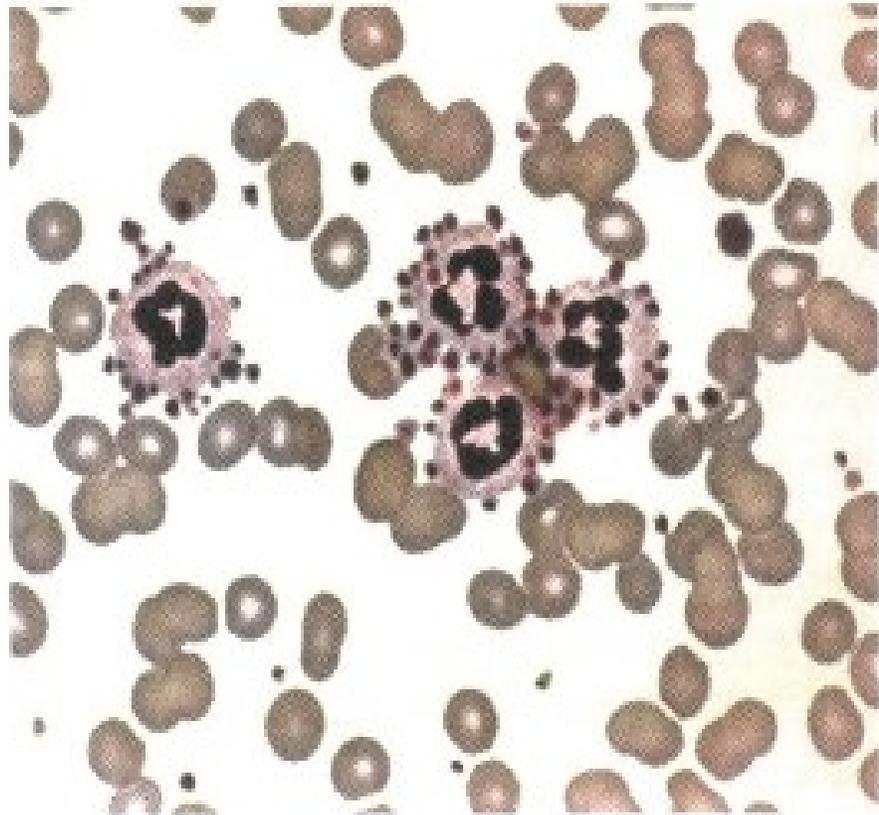
Pseudothrombozytose:

Essentielle Thrombozytose (hohe Größenvarianten der Thrombozytenaggregate, falsch niedrige Zählung)

Kryoglobuline

Zytoplasmafragmente leukämischer Blasten

Erythrozytenfragmente (TTP/HUS/HELLP-Syndrom)



Platelet Satellitism

Abbildung 12 EDTA- induzierte Pseudothrombopenie und Satellitenphänomen.

Klinische Anwendung IRF

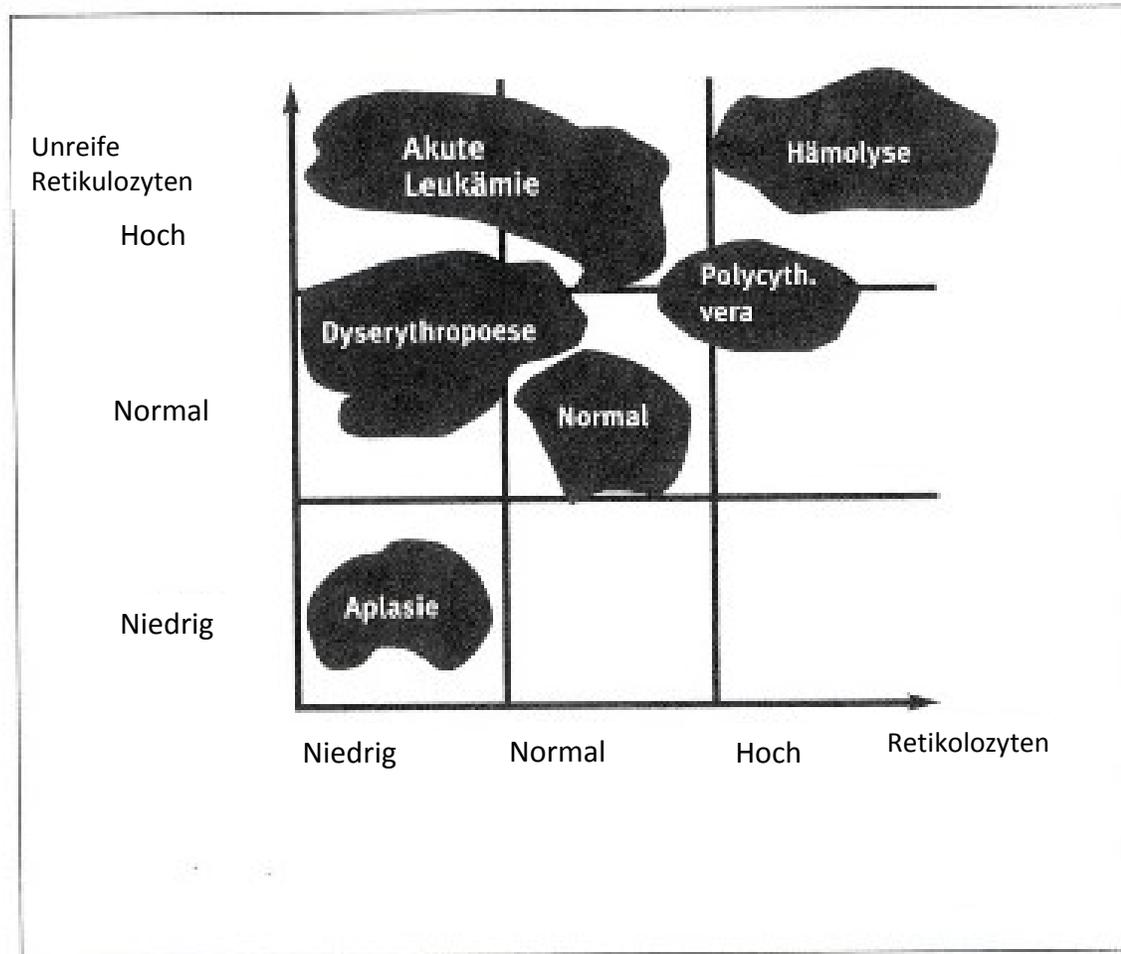


Fig. 5: d'Onofrio (1996). Reticulocytes in haematological disorders.
Clinical and Laboratory Haematology 18,29-34.

Vitamin B₁₂-Mangel

TABELLE

Risikopopulationen mit hoher Frequenz eines Vitamin-B₁₂-Mangels, die regelmäßig (alle 2 bis 3 Jahre) getestet werden sollten

Gruppe	Ursachen und Bemerkungen
vegetarische, vegane und makrobiotische Diät	niedrige Vitamin-B ₁₂ -Aufnahme mit der Nahrung
neugeborene und gestillte Kleinkinder von sich vegetarisch ernährenden Müttern	niedrige Vitamin-B ₁₂ -Aufnahme mit der Muttermilch
alte Menschen	perniziöse Anämie, Achlorhydrie, durch gastrointestinale Erkrankungen verursachte Malabsorption (Magen-/Darm-Operationen, Gastritis, H. pylori, Atrophie, bakterielle Überwucherung des Darmes, Alkohol)
neurodegenerative und -psychiatrische Erkrankungen	Neuropathien, Demenz, M. Alzheimer, kognitive Störungen, Schizophrenie
chronisch atrophische Corpus-Gastritis	Malabsorption von Vitamin B ₁₂ ; M. Crohn
Erkrankungen des terminalen Ileums	Lymphome des Ileums, Ileumresektion, bakterielle Überwucherung des Ileums
makrozytäre Anämie	niedrige Vitamin-B ₁₂ -Aufnahme oder perniziöse Anämie
chronischer Alkoholismus	niedrige Vitamin-B ₁₂ -Aufnahme, Störung der Vitamin-B ₁₂ -Absorption
Medikamente	Protonenpumpen-Hemmer, H ₂ -Rezeptorantagonisten, Lachgas-Inhalation
Aids-assoziierte Myelopathie	abnormale Vitamin-B ₁₂ -abhängige Transmethylierung

Tabelle

Biochemische Marker und Retikulozytenindices zur Beurteilung des Eisenmangels

Marker/Indices	Indikator	Verhalten bei Eisenmangel
Transferrinsättigung	Eisenumsatz	< 16 %
Ferritin	Speichereisenreserve	F < 15 µg/L M < 30 µg/L
Löslicher Transferrinrezeptor (sTfR)	Eisenversorgung der Erythropoese	F+ M > 1,8 mg/L * ¹ F > 4,4 mg/L * ² M > 5,0 mg/L * ²
Ferritinindex (sTfR/log Ferritin)	Eisenversorgung der Erythropoese	F + M > 1,5 bei CRP < 5 mg/L * ¹ F + M > 0,8 bei CRP > 5 mg/L * ¹ F + M > 3,2 bei CRP < 5 mg/L * ² F + M > 2,0 bei CRP > 5 mg/L * ²
Retikulozytenhämoglobin	Funktioneller Eisenmangel	Chr (Bayer Diagnostics) < 28 pg Ret-He (Sysmex) < 28 pg

*¹ sTfR-Bestimmung mit Dade-Behring-Test; *² sTfR-Bestimmung mit Roche-Test;
F, Frauen; M, Männer; Chr, Hämoglobingehalt der Retikulozyten; Ret-He, Retikulozytenhämoglobin