

Kugellellanämie: Hintergrundinformation und Beispiel aus dem Sysmex XE-5000 Case Manager

Teil 1: Allgemeine Informationen zur hereditären Sphärozytose

Die hereditäre Sphärozytose (HS) ist in Nord- und Mitteleuropa die häufigste Form der angeborenen hämolytischen Anämien (in Deutschland 1 : 2.500). Die Hämolysenparameter sind positiv, eine familiäre Häufung ist erkennbar, und die klinische Manifestation ist meist schon im frühkindlichen Alter deutlich. Die Einteilung erfolgt in 4 klinische Schweregrade (Tab. 1): leichte HS, mittelschwere HS, schwere HS und sehr schwere HS. Ca. 60 % der Sphärozytosen bilden eine mittelschwere Form aus.

Die normale Erythrozytenmembran besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht mit hydrophilen Phosphatresten auf der äußeren und inneren Oberfläche, zusammen mit nicht polaren Fettsäureseitenketten im Zentrum sowie einem variablen Cholesterinanteil. Proteine sind sowohl als transmembranäre integrale Bestandteile, z. B. Bande 3 und Glycophorine A oder B, oder als periphere Moleküle wie Spectrin, Actin sowie Banden 2.1, 4.1 und 4.2, eingebaut. Die Bandennummer bezieht sich auf die Coomassie-Blau-Banden in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. An die Phospholipide und Proteine auf der äußeren Oberfläche sind Kohlenhydratgruppen gekoppelt, welche die Blutgruppen determinieren und als Virusrezeptoren fungieren können.

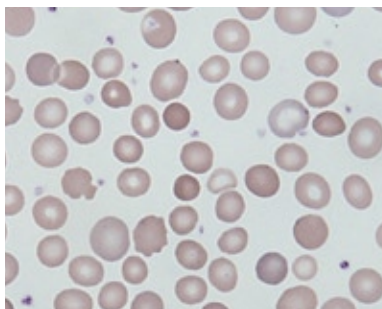


Abb. 1 Mikrosphärozyten im Blutausschlag

Bei der hereditären Sphärozytose kommt es zu verschiedenen Veränderungen (Gen-Defekte) der Proteine in der Erythrozytenmembran. Diese führen zu einer verminderten Verformbarkeit und einer erhöhten Membranpermeabilität mit vermehrtem Natriumeinfluss; Glykolyse und ATP-Umsatz sind gesteigert. Die daraus hervorgehenden kugeligen Zellen haben ein normales Zellvolumen, aber aufgrund der Form eine verkürzte Lebensdauer. Der vorzeitige Erythrozytenabbau erfolgt in der Milz.

Klinik und Labor

Ein starkes Krankheitsgefühl besteht oft nicht; ein Subikterus ohne klinische Symptome, Splenomegalie, evtl. Gallensteine, je nach Schweregrad eine Anämie, sowie hämolytische Krisen im Verlauf von Virusinfektionen sind möglich. Die Hämolysenparameter Bilirubin (erhöht), LDH (erhöht) und Haptoglobin (erniedrigt) sind positiv, zusammen mit einer deutlichen Retikulozytose.

Der Retikulozyten-Produktions-Index (RPI) zeigt eine adäquat gesteigerte Erythropoese (RPI > 2). Der direkte Coombstest ist negativ. Die osmotische Fragilität der Erythrozyten ist erhöht. Im Ausstrich sind je nach Schweregrad vereinzelt bis vermehrt Mikrosphärozyten zu finden (Abb. 1). Das Blutbild zeigt häufig einen MCHC-Wert von > 35 g/dL und eine erhöhte Erythrozyten-Verteilungsbreite (RDW).

	Leichte HS	Mittelschwere HS	Schwere HS [b]	Sehr schwere HS [c]
Anteil an Patienten (%)	25 – 33	60 – 70	≈ 10	3 – 4
Hämoglobin (g/L)	110 – 150	80 – 110	60 – 80	< 60
Retikulozyten (%)	1,5 – 6	≥ 6	≥ 10 (meist > 15) [d]	≥ 10
Bilirubin (mg/dL)	1 – 2	≥ 2	> 2 – 3	≥ 3
Osmotische Fragilität				
Frisches Blut	Normal oder gering erhöht	Deutlich erhöht	Deutlich erhöht	Deutlich erhöht
Inkubiertes Blut	Deutlich erhöht	Deutlich erhöht	Deutlich erhöht	Deutlich erhöht
Sphärozyten u.a. im Blutausstrich	Oft nur vereinzelt	Deutlich vermehrt	Deutlich vermehrt	Mikrosphärozyten und Poikilozyten

Tab. 1 Klinische Schweregrade der hereditären Sphärozytose [a]

AWMF-Leitlinien-Register Nr. 025/018 [3]

[a] Modifiziert nach Eber et al., 1990 [1] und Eber und Lux, 2004 [2]

[b] Patienten benötigen in den ersten beiden Jahren gehäufte, z. T. regelmäßige Transfusionen.

[c] Patienten müssen regelmäßig transfundiert werden, um einen Hämoglobinwert über 60 g/L zu halten.

[d] Die Retikulozyten sind infolge der verzögert einsetzenden Erythropoese z. T. nur mäßig erhöht.

Wichtige Untersuchungsparameter bei einer HS sind:

- Milzgröße
- Blutbild
- Erythrozytenmorphologie
- Retikulozytenzahl und RPI
- Bilirubin (gesamt, direkt)
- LDH (Lactat-Dehydrogenase)
- Haptoglobin
- Coombstest
- Osmotische Fragilität der Erythrozyten im frischen und 24h inkubierten EDTA-Blut
- Durchflusszytometrische Messung der Eosin-Maleimid-Bindung von Erythrozyten (EMA-Test)

Klassische hämatologische Parameter

Bei der Befunderstellung von Blutbildern mit hereditärer Sphärozytose sollten die folgenden Sachverhalte bedacht werden:

1. Sphärozyten haben *in vivo* ein normales Zellvolumen.
2. In den Messkanälen des Hämatologiesystems reagieren die Zellen mit den Reagenzien.
3. Sphärozyten haben einen Erythrozytenmembrandefekt und hierdurch eine veränderte Permeabilität und damit einen besonderen Einfluss auf die Messung (MCV, Hämatokrit, MCHC und Retikulozyten).

Erythrozyten

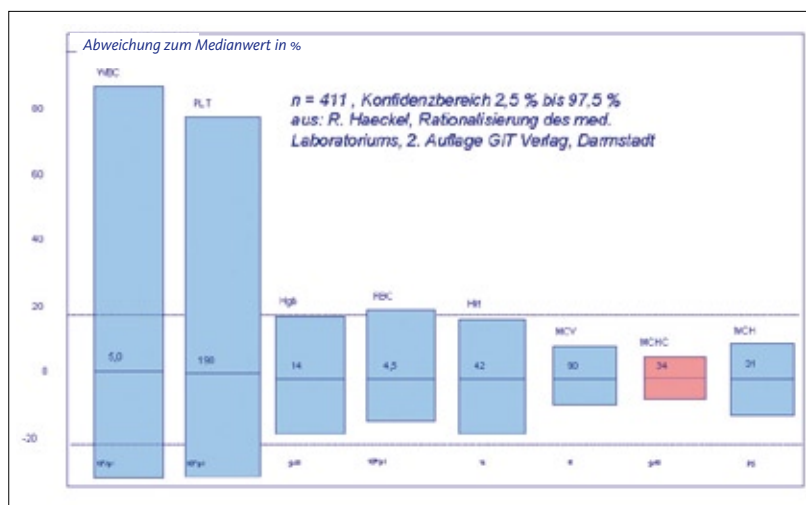
Die *in vivo* aufgekuugelten Erythrozyten (Sphärozyten) verhalten sich während der Messung der Erythrozytenzahl wie Mikrozyten, d.h. je nach Schweregrad der HS wird das MCV als mikrozytär und nicht als normozytär ermittelt. Der Hämoglobingehalt der einzelnen Zelle ist jedoch normal.

Hämatokrit

Der Hämatokrit ist die Summe aus der Messung der Einzelimpulse der Erythrozyten und ist abhängig vom Erythrozytenvolumen. Aufgrund der veränderten Erythrozytenpermeabilität wird der Hämatokrit zu niedrig gemessen.

MCHC

Der MCHC-Wert ist der Quotient aus Hämoglobin und Hämatokrit. Er hat normalerweise eine sehr geringe biologische Streuung und kann als konstant betrachtet werden (siehe Abb. 2: Biologische Streuung der Parameter des kleinen Blutbildes). In der Literatur zur Sphärozytose wird als charakteristischer Blutbild-Befundparameter meist eine erhöhte MCHC genannt (> 36 g/dL). Ursache hierfür ist der zu niedrig gemessene Hämatokrit.



$$\text{MCHC [g/dL]} = \frac{\text{HGB [g/dL]} \times 100}{\text{HCT [\%]}}$$

Referenzbereich MCHC: 32 – 35 g/dL

Abb. 2 Biologische Streuung der Parameter des kleinen Blutbildes

RDW-SD

Je nach Schweregrad ist die Erythrozytenverteilungsbreite *RDW-SD* ein zusätzlicher Marker. Die *RDW-SD* ist ein Maß für die Anisozytose. Bei hereditären Sphärozytosen bewirkt die Anzahl der Retikulozyten und der Kugelzellen eine erweiterte Erythrozytenverteilungsbreite und somit einen erhöhten *RDW-SD*-Wert.

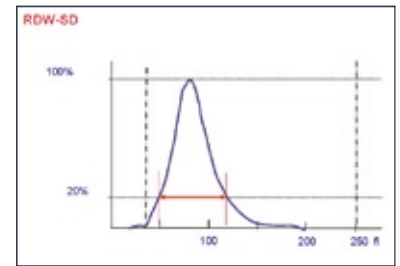
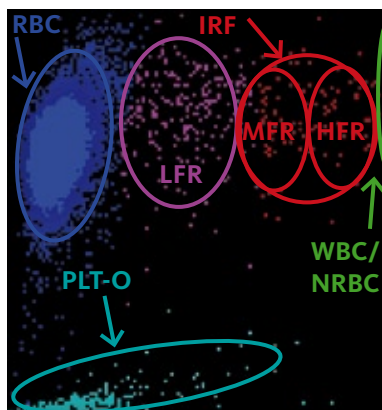


Abb. 3 Erythrozytenverteilungsbreite (red cell distribution width, standard deviation)

Retikulozyten

Eine weitere Besonderheit bei hereditären Sphärozytosen finden wir bei der Zählung und Differenzierung der *Retikulozyten*. Das Messprinzip im Retikulozyten-Kanal ist die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Die Zellmembran der Retikulozyten wird durch den Diluent perforiert und somit für den Fluoreszenzfarbstoff durchgängig gemacht, der dann die in den Retikulozyten vorhandene restliche RNA anfärbt. Die Zählung und Differenzierung der Retikulozyten (Abb. 4) erfolgt mittels eines Halbleiterlasers über die Fluoreszenzintensität (RNA-Gehalt) und das Vorwärtstreulicht (FSC, Volumen).



LFR = Low Fluorescence Reticulocyte -> reife Retikulozyten

MFR = Medium Fluorescence Reticulocyte -> mittelreife Retikulozyten

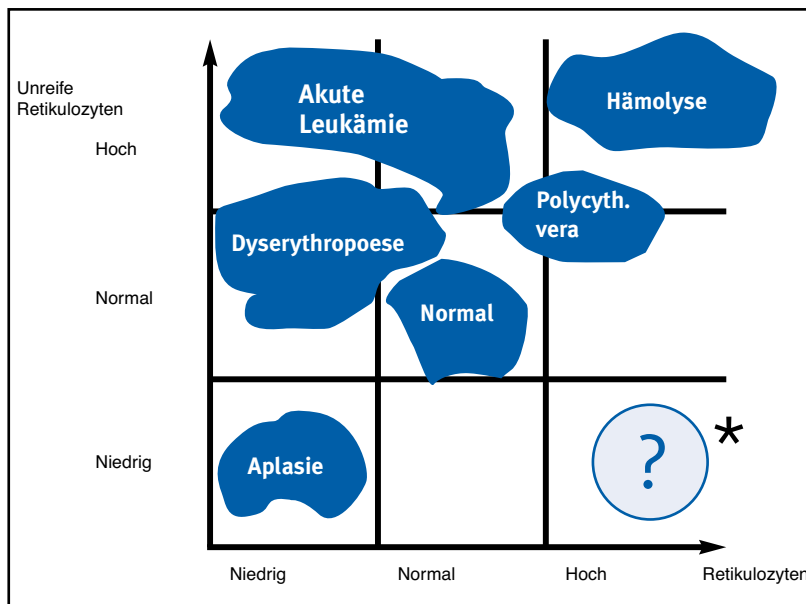
HFR = High Fluorescence Reticulocyte -> unreife Retikulozyten

IRF = Immature Reticulocyte Fraction -> MFR + HFR

Referenzbereich IRF: w 1,1 – 15,9%, m 1,5 – 13,7%

Abb. 4 RET-Scattergramm mit den Darstellungsbereichen der verschiedenen Zellpopulationen

Das folgende Diagramm zur Indikation von Retikulozytenzählungen zeigt, dass bei einer Hämolyse eine hohe Retikulozytenzahl mit einer hohen Anzahl an unreifen Retikulozyten einhergeht.



* In diesem Fall kann umgekehrt daraus geschlossen werden, dass eine hohe Anzahl von Retikulozyten mit einer niedrigen Anzahl von unreifen Retikulozyten nicht plausibel erscheint und hinterfragt werden sollte.

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

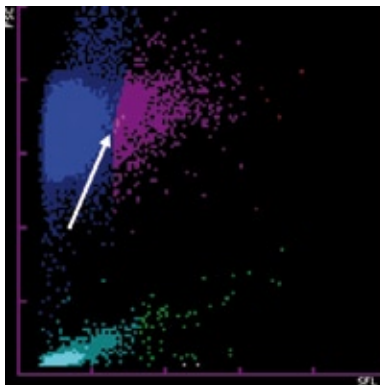


Abb. 6 Das Flag »RET abn. Scg.« wird bei Überlagerung von RBC (blaue Wolke) und LFR (violette Wolke) ausgelöst und sollte als Hinweis beachtet werden.

Bei der hereditären Sphärozytose kann aufgrund des Membrandefektes der Fluoreszenzfarbstoff nicht vollständig in die Zelle eindringen, so dass die Reaktion nur unvollständig abläuft (Abb. 6). Daraus resultiert eine Retikulozytose, aber ohne entsprechenden Anteil an unreifen Retikulozyten (IRF ist nicht erhöht!). Diese Kombination einer Retikulozytose mit einem nicht erhöhten IRF ist bei einer HS als differentialdiagnostischer Parameter zu anderen hämolytischen Anämien hilfreich.

Problematik

Die Verdachtsdiagnose »hereditäre Sphärozytose« stützt sich momentan, zusammen mit den familiären Daten, auf die Kombination von klinischen Befunden sowie auf die Ergebnisse der Blutbildparameter (MCHC, MCV, RDW, Retikulozyten). Das Erkennen einer HS anhand der »normalen« Hämatologieparameter und damit der Auslöser für weiterführende Untersuchungen ist gerade bei den leichteren Formen der HS häufig nicht sensitiv genug.

Spezifischer und sensitiver zur Erfassung der hereditären Sphärozytosen durch hämatologische Parameter sind die Parameter %MicroR, %HYPO-H_e, der Index aus diesen beiden genannten Parametern und die Betrachtung der Retikulozyten mitsamt des Reifungsparameters IRF (immature reticulocyte fraction; Anteil unreifer Retikulozyten), die mit dem Analysensystem XE-5000 in einem Analysenvorgang gemessen werden können.

Im 2. Teil dieses Themenblattes wollen wir Ihnen auszugsweise ein Fallbeispiel aus dem Case Manager des XE-5000 vorstellen, der anhand eines komplexen Regelwerkes Patientenbefunde mit einem Beispielfall vergleicht und damit die Diagnose einer HS erleichtern und beschleunigen kann. Die neuen Parameter werden erläutert und in den direkten Kontext gestellt.

Teil II: Extravaskuläre Hämolyse: Hereditäre Sphärozytose (Auszug aus dem Fallbeispiel des XE-5000 Case Managers)

Zusammenfassung

Bei diesem hämatologischen Befund ...

- erhöhte Retikulozytenzahl
- keine erhöhte Fraktion der unreifen Retikulozyten (IRF)
- keine isolierte Thrombozytopenie
- erhöhte Prozentzahl mikrozytärer RBC (%MicroR)
- keine erhöhte Prozentzahl hypo-hämoglobinisierter RBC (%HYPO-H_e)

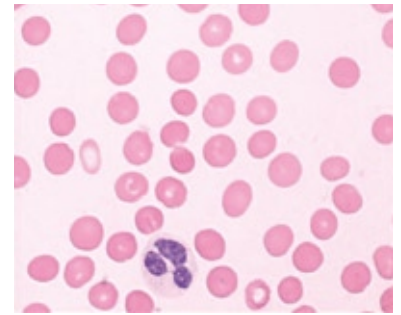


Abb. 7 Peripherer Blutausstrich, in dem kleine, intensiv angefärbte Mikrospärozyten zu sehen sind

... ist zu berücksichtigen

Was ist die Ursache für diese Retikulozytose mit einer erhöhten Fraktion mikrozytärer roter Blutzellen? Liegt ein Fall von akuter oder chronischer hämolytischer Anämie vor, z. B. eine Hämoglobinopathie oder eine Sphärozytose? Warum ist die Fraktion der unreifen Retikulozyten nicht erhöht?

Hintergrund

In einigen Fällen, beispielsweise bei hereditärer Sphärozytose, erleichtern spezifische Merkmale der automatisierten Bestimmung die Diagnose: Eines dieser spezifischen Merkmale liegt in der Anfärbungscharakteristik der Retikulozyten begründet. Auch wenn der HGB-Wert im Normbereich liegt, können rote Blutzellen (RBC) mit einem Membrandefekt als mikrozytäre RBC erscheinen und als solche erfasst werden. Dies ermöglicht die einfache Differenzierung von anderen Erkrankungszuständen mit einem erhöhten Prozentsatz an Mikrozyten, wie z. B. Eisenmangelanämie, funktionellem Eisenmangel oder Thalassämie.

Fallbeispiel

Fallgeschichte

Ein dreijähriges Kind mit anhaltender Erschöpfung und leichter Gelbsucht, bestätigt durch einen leicht erhöhten Bilirubinspiegel von 2,1 mg/dL (Norm: < 1,0 mg/dL), wurde dem Allgemeinmediziner vorgestellt. Das kleine Blutbild (CBC) deutete auf eine moderate Anämie bei nur leicht erhöhter mittlerer Hämoglobinkonzentration (MCHC) hin. Der direkte Coombs-Test war negativ. Weitere Blutuntersuchungen sind erforderlich.

Diagnostische Situation

Die herkömmlichen Blutbildparameter wiesen einen HGB-Wert von 102 g/L (6,33 mmol/L) auf, waren aber ansonsten – für ein dreijähriges Kind – unauffällig. Das mittlere Erythrozytenvolumen (MCV) lag im Normbereich, allerdings war die MCHC mit 359 g/L (22,3 mmol/L) erhöht. Weitere Analysen und eine Messung mit dem XE-5000 zeigten, dass bei dem Patienten eine Retikulozytose vorliegt, die Fraktion der unreifen Retikulozyten (IRF) aber nicht erhöht ist.

Fragestellung

Das klinische Bild und die Retikulozytose legen eine hämolytische Anämie nahe; aber was ist die Ursache dafür? Liegt ein Fall von akuter autoimmunhämolytischer Anämie oder eine chronische hämolytische Anämie vor? Warum sind die Retikulozytenzahl und der Retikulozyten-Produktionsindex (RPI) erhöht, nicht aber die IRF? Ein erhöhter MCHC-Wert wird häufig bei Fällen von hereditärer Sphärozytose (HS) gefunden. Auf der Grundlage einer Kombination der CBC-Parameter RBC, MCH, MCV, MCHC und der Retikulozyten könnte die Diagnose einer HS angenommen werden. Allerdings sind diese Parameter oft nicht empfindlich genug.

Problemlösung

Für die Differenzialdiagnose verschiedener hämolytischer Anämieformen wird eine Kombination mehrerer Analysenparameter des XE-5000 verwendet. Dabei wird ein spezifisches Merkmal der automatisierten Bestimmung ausgenutzt, um verschiedene Ursachen einer Sphärozytose differenzieren zu können.

Der bei einer HS vorliegende Membrandefekt der Erythrozyten führt zu einer Diskrepanz zwischen der mit dem XE-5000 gemessenen hohen Retikulozytenzahl (RET#) und der verhältnismäßig niedrigen Fraktion der unreifen Retikulozyten (IRF). Dieses Messergebnis ist wahrscheinlich auf ein unzureichendes Eindringen des Fluoreszenzfarbstoffs in die geschädigten Zellen zurückzuführen. Folglich ist das Verhältnis aus Gesamt-Retikulozytenzahl zur Fraktion der unreifen Retikulozyten anormal hoch, was spezifisch ist für eine hereditäre Sphärozytose. Bei einer Retikulozytose anderer Ursache, wie z. B. einer Thalassämie oder anderen hämolytischen Anämieformen, ist eine erhöhte IRF-Fraktion zu erwarten.

Darüber hinaus führt die bei einer HS vorliegende Schädigung zu einem Membranabbau der RBC, die mit einer offensichtlichen Reduktion der Zellgröße einhergeht, aber nicht zu einem Verlust des Zellinhalts führt. Bei der Analyse mit dem XE-5000 spiegeln sich diese Veränderungen in einer Erhöhung des prozentualen Anteils mikrozytärer Zellen (erhöhter %MicroR-Wert) wider, der jedoch nicht einhergeht mit einer vergleichbaren Erhöhung der unzureichend hämoglobinierten Zellen, d.h. mit keiner oder einer nur geringfügigen Erhöhung des Parameters %HYPO-H_e.

Ergebnisse

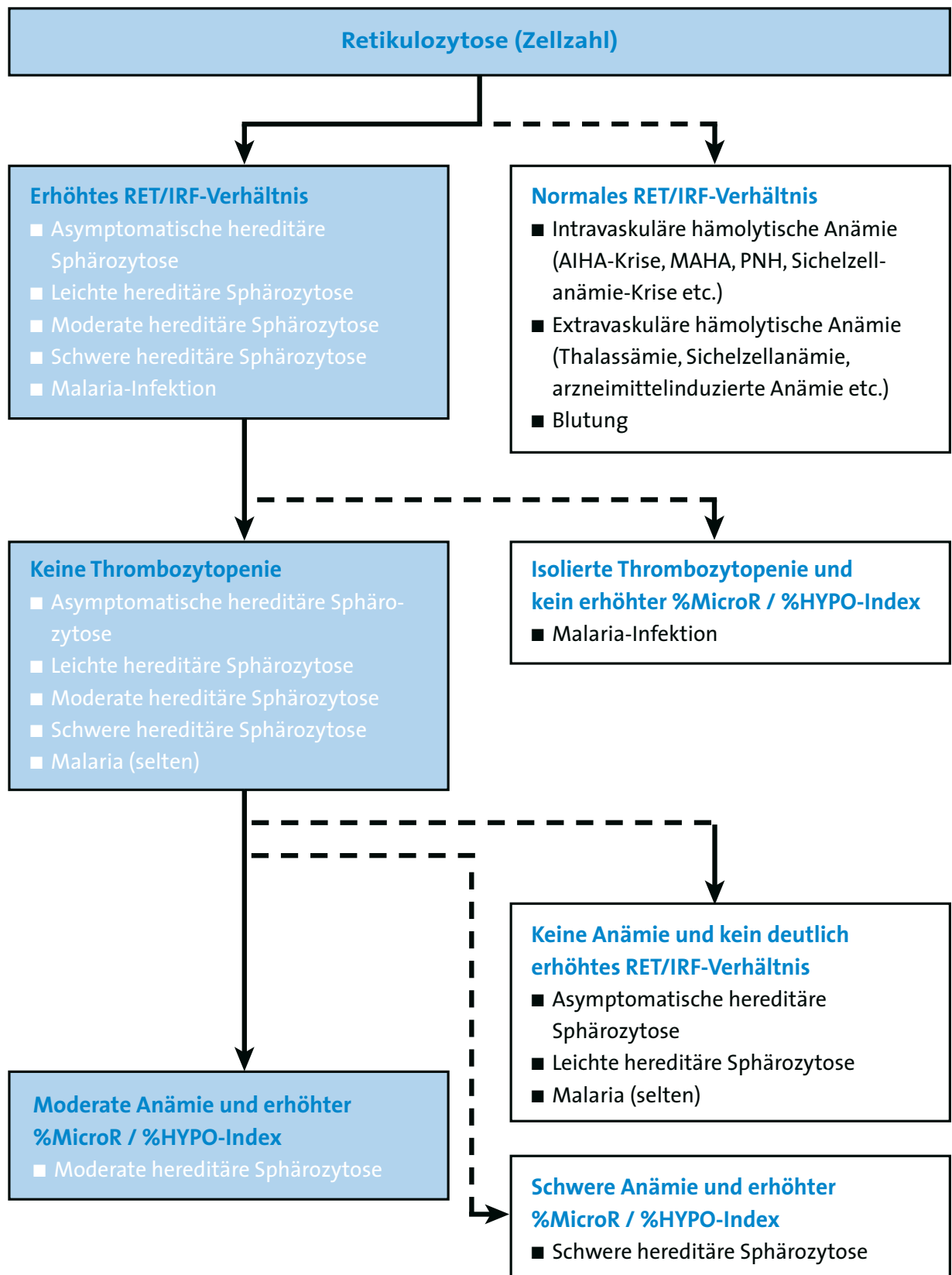
Bei diesem Patienten wurde ein Wert von 7,9 % mikrozytärer roter Blutzellen (%MicroR) gemessen, ein Großteil davon war jedoch nicht hypochrom (%HYPO-H_e = 1,1 %). Eisenmangel oder Thalassämie, bei denen hingegen ein erhöhter Wert auch für hypochrome RBC auftritt, können daher als Ursache für die mikrozytären Erythrozyten ausgeschlossen werden. Die bereits gemessene hohe Retikulozytenzahl bei niedriger IRF erhärtet den Verdacht auf hereditäre Sphärozytose.

Ausgang

Im Blutausschlag des Patienten zeigten sich kugelförmige (sphärozytische) rote Blutzellen, und ein osmotischer Resistenztest der Erythrozyten ergab einen erhöhten Wert. Die Diagnose einer moderaten hereditären Sphärozytose wurde durch klinische Daten und weitere Laboruntersuchungen – Durchflusssytometrie (Eosin-5'-Maleimid-Assay), Ektazytometrie und SDS-PAGE-Elektrophorese – endgültig bestätigt.

Für die Differenzialdiagnose hämolytischer Anämieformen sind das Verhältnis RET# / IRF% sowie der Index der XE-5000-Parameter %MicroR (Prozentsatz der RBC mit geringem Zellvolumen) und %HYPO-H_e (Prozentsatz der RBC mit niedrigem HGB-Gehalt) von großem Wert. Die Kombination aus diesem Verhältnis und dem Index hat sich bei der Differenzierung zwischen HS, anderen hämolytischen Anämien, Eisenmangelanämie (IDA) und funktionellem Eisenmangel (FID) als nützlich erwiesen. Eine erhöhte Anzahl von nicht hypochromen Mikrozyten wird nur bei HS gemessen, während bei IDA, FID und Hämoglobinopathien die mikrozytären RBC gewöhnlich hypochrom sind.

Differenzialdiagnose



Aus dem Labor

Alle auf die Erythrozyten bezogenen Parameter des Patienten sind leicht vermindert, aber unauffällig für ein dreijähriges Kind (HGB: 102 g/L; RBC: $3,10 \times 10^{12}/L$; und HCT: 0,28 L/L), mit Ausnahme der Erhöhung der Gesamt-Retikulozytenzahl auf $291 \times 10^9/L$ (6,5 %) und der MCHC auf 359 g/L (22,3 mmol/L). Das MCH von 29,8 pg (1.851 amol) und der zelluläre Hämoglobingehalt der RBC (RBC- H_e) von 29,4 pg (1.826 amol) waren vergleichbar.

Das Messergebnis einer hohen Retikulozytenzahl ohne eine vergleichbar erhöhte Fraktion der unreifen Retikulozyten (IRF) von 4,7 % wird wahrscheinlich durch ein unzureichendes Eindringen des Fluoreszenzfarbstoffs in die geschädigten Zellen verursacht, was zu einem anormal hohen Verhältnis zwischen diesen beiden Parametern führt. Der Verlust an Erythrozytenmembranproteinen (Bande-3-Protein, Ankyrin, Spectrin) führt zu einer gestörten Reaktion der Sphärozyten auf die Permeabilisierung. Das Anfärbungsverhalten ist daher zum Zeitpunkt der Messung anormal. Dies wiederum führt zu einer verringerten RNA-Anfärbung und zu einer normalen IRF, wie im RET-Scattergramm zu erkennen ist (siehe Abb. 8). Eine verminderte RNA-Konzentration in den RBC deutet auf einen höheren Reifegrad hin; daher werden die unreifen Retikulozyten fälschlicherweise in einer »reiferen« Fraktion (MFR oder LFR) erfasst. Die intensiv fluoreszierenden unreifen Retikulozyten mit dem höchsten RNA-Gehalt sind reduziert.

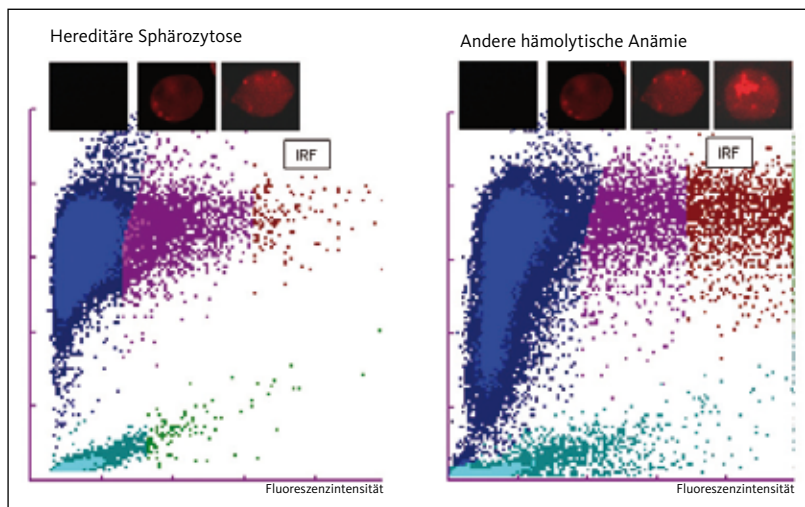


Abb. 8 RET-Kanal-Messung des XE-5000 – auf der x-Achse ist die Fluoreszenzintensität und auf der y-Achse das Zellvolumen wiedergegeben. Die IRF (Fraktion der unreifen Retikulozyten – die rot gefärbte Population im Scattergramm rechts) ist die Zellpopulation mit der höchsten Fluoreszenz. Bei diesem Patienten (linkes Scattergramm) ist die IRF-Wolke kleiner, weil alle Retikulozyten als Zellen höheren Reifegrads erfasst werden und daher vermehrt im LFR-Bereich (violette Wolke) des Scattergramms erscheinen. Die Zellen mit der höchsten Fluoreszenzintensität, oben dargestellt, werden nicht erfasst.

Bei einer Retikulozytose anderer Ursache und ohne einen vergleichbaren Membrandefekt, z. B. bei einer Thalassämie oder anderen hämolytischen Anämieformen, ist eine erhöhte IRF-Fraktion zu erwarten. Darüber hinaus liegt mit einem %MicroR-Wert von 7,9 % (Prozentsatz der RBC mit kleinem Zellvolumen) ein Hinweis für das Vorhandensein von mikrozytären Zellen vor, was sich auch in dem erhöhten RDW-CV-Wert zeigt (18,6 %). Interessanterweise sind die mikrozytären Zellen nicht

hypochrom, da der Parameter %HYPO- H_e (Prozentsatz der RBC mit niedrigem HGB-Gehalt) mit 1,1 % im Normbereich liegt. Dies wiederum schließt eine Eisenmangelanämie aus, weil bei diesem Krankheitsbild sowohl %MicroR als auch %HYPO- H_e erhöht sind.

Die Retikulozytenzahl ist hoch, wie auch der RPI mit einem Wert von 3,8 – dies bedeutet, dass die Erythropoese-Rate um den Faktor 3,8 erhöht ist. Eine entsprechende Erhöhung der IRF liegt nicht vor; dabei muss es sich um ein Artefakt aufgrund des Erythrozytenmembrandefekts handeln, denn in allen Fällen einer Retikulozytose ist davon auszugehen, dass die Zahl der unreifen Retikulozyten, die in den peripheren Kreislauf freigesetzt werden, erhöht ist.

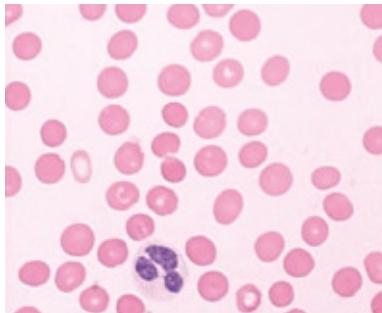


Abb. 9 Peripherer Blutausstrich, der das Vorhandensein kleiner, intensiv angefarbter Mikrosphärozyten zeigt

Zur morphologischen Untersuchung der Erythrozyten wurde ein Ausstrich angefertigt. Darin waren zahlreiche Mikrosphärozyten zu sehen (siehe Abb. 9). Diese Zellen werden anhand ihrer geringen Größe und der intensiven Anfärbung identifiziert; außerdem fehlt ihnen die zentrale Aufhellung, wie sie bei normalen roten Blutzellen zu sehen ist. Bei einer Sphärozytose nimmt das Verhältnis von Zelloberfläche zu Zellvolumen aufgrund des Verlusts an Membranproteinen und des Übergangs der Zellen zur Kugelform ab. Durch das niedrigere gemessene Zellvolumen liegt im Zellinneren eine hohe Hämoglobinkonzentration vor, dementsprechend ist auch der MCHC-Wert hoch.

In dem Ausstrich wurde eine moderate Polychromasie beobachtet, was die erhöhte Retikulozytenzahl bestätigte.

Sphärozyten werden von der Milz rasch aus dem Blutkreislauf entfernt, sodass eine extravaskuläre Hämolyse vorliegt. Die Parameter MCH und RBC- H_e weisen annähernd gleiche Werte auf, weshalb die Möglichkeit einer intravaskulären Hämolyse ausgeschlossen werden kann. Allerdings ist der Bilirubin-gehalt aufgrund des Häm-Abbaus aus den freigesetzten Blutzellen erhöht.

Bei der Hämolyse handelt es sich nicht um eine Erkrankung des Immunsystems, da der direkte Coombs-Test negativ war. Ein osmotischer Resistenztest ergab, dass die Erythrozyten des Patienten in hypotonischer Lösung hämolyseanfälliger waren als normale rote Blutzellen.

Die Diagnose einer moderaten hereditären Sphärozytose wurde durch klinische Daten und weitere Laboruntersuchungen – Durchflusszytometrie (Eosin-5'-Maleimid-Assay), Ektazytometrie und SDS-PAGE-Elektrophorese – endgültig bestätigt.

Erläuterung:

Die mikrozytäre (%MicroR)* und makrozytäre (%MacroR)* Erythrozytenpopulation

Durch die hydrodynamische Fokussierung entspricht die Größenverteilung der Erythrozyten (RBC) nahezu einer Gaußschen Normalverteilung. Diese technische Funktion ist wichtig, denn es verhindert Koinzidenzen in der Messöffnung. Bei fehlender hydrodynamischer Fokussierung würde es dagegen zu Störsignalen kommen. Dies ist von essenzieller Bedeutung, um die Parameter %MicroR und %MacroR zuverlässig zu bestimmen. Diese Parameterwerte werden aus beiden Flanken des RBC-Histogramms ermittelt. Proben, die Mikrozyten enthalten, ergeben

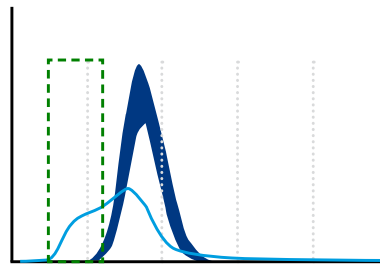


Abb. 10 Der Bereich der Mikrozyten (grün gepunktete Linie) im RBC-Histogramm. Die blaue Kurve zeigt die Größenverteilung bei einer normalen Probe.

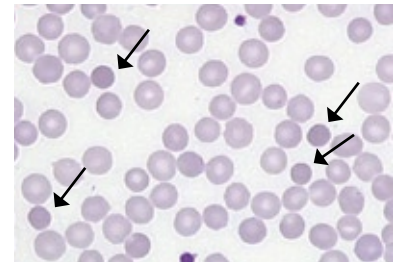


Abb. 11 Mikroskopisches Bild von Mikrozyten (Pfeile) und Normozyten

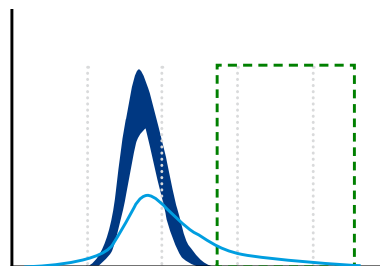


Abb. 12 Der Bereich der Makrozyten (grün gepunktete Linie) im RBC-Histogramm. Die blaue Kurve zeigt die Größenverteilung bei einer normalen Probe.

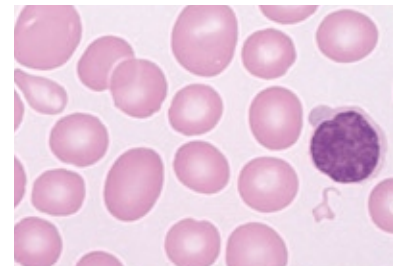


Abb. 13 Mikroskopisches Bild von Makrozyten (bei Vitamin-B12-Mangel)

ein RBC-Histogramm, das aufgrund einer Zunahme der kleinen RBC nach links verschoben ist (siehe Abb. 10 und 11), wohingegen eine weniger steile Flanke auf der rechten Seite der Histogrammkurve die Anwesenheit von Makrozyten anzeigt (siehe Abb. 12 und 13).

Durch das Setzen von zwei verschiedenen Diskriminatoren im unteren und oberen Wertebereich des Histogramms lassen sich jeweils eine mikrozytäre und eine makrozytäre RBC-Population abgrenzen. Bei bestimmten Krankheitsbildern (z. B. bei MDS) können die Patienten eventuell einen MCV-Wert aufweisen, der sich noch im Referenzbereich befindet, obwohl die Anzahl der Mikrozyten bei ihnen erhöht ist. Der Parameter »%MicroR« ist daher hilfreich, um die möglichen Ursachen einer Anämie weiter einzugrenzen.

* Forschungsparameter

Anteil der hypo-hämoglobinierten Erythrozyten (%Hypo-H_e)* und Anteil der hyper-hämoglobinierten Erythrozyten (%Hyper-H_e)*

Die Parameter %HYPO-H_e und %HYPER-H_e gehören zu den erweiterten Parametern, die im Retikulozyten-(RET-)Kanal des XE-5000 analysiert werden. Die Grundlage für die Analyse dieser Parameter bildet der mittlere Hämoglobingehalt aller Erythrozyten (RBC), die in diesem Kanal erfasst werden. Erythrozyten mit einem niedrigeren Hämoglobingehalt als normal werden als hypo-hämoglobinierte Zellen klassifiziert; im Unterschied dazu weist die Population der hyper-hämoglobinierten Erythrozyten einen höheren Hämoglobingehalt als normal auf.

Der Hämoglobingehalt der Erythrozyten wird durch Analyse des Vorwärtsstreulichtsignals gemessen. Im RET-Kanal werden in einem Scattergramm, in dem die Fluoreszenzaktivität (diese ist direkt proportional zum RNA-Gehalt) und das Vorwärtsstreulichtsignal (dieses ist direkt proportional zum Hämoglobingehalt) aufgetragen sind, die reifen RBC von anderen Zellpopulationen getrennt dargestellt. Jede gezählte Zelle wird entsprechend ihrer Fluoreszenzaktivität (auf der x-Achse) und ihres großwinkligen Vorwärtsstreulichtsignals (auf der y-Achse) im RET-Scattergramm dargestellt, sodass die beiden charakteristischen Parameter Zellgröße und zellulärer Gehalt gleichzeitig angezeigt werden. Der RBC-H_e-Wert gibt den mittleren intrazellulären Hämoglobingehalt in reifen Erythrozyten wieder, gemessen anhand des großwinkligen Vorwärtsstreulichtsignals. Mithilfe eines von Sysmex entwickelten Algorithmus* wird dieser Wert in pg umgerechnet, der sich bei gesunden Erwachsenen mit dem mittleren zellulären Hämoglobin-Gehalt (MCH) aus dem kleinen Blutbild (CBC) deckt.

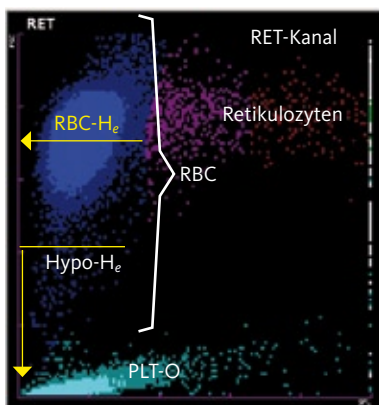


Abb. 14a Fall einer normalen Blutprobe mit einem HYPO-H_e von unter 1 %

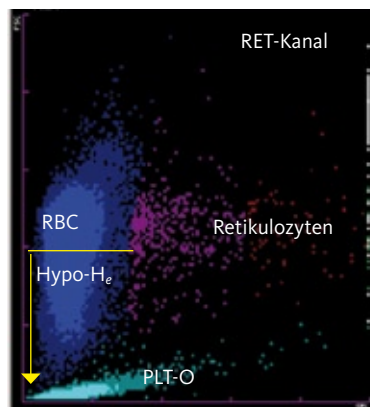


Abb. 14b Extrem abnormaler Fall mit einem HYPO-H_e-Anteil von über 70 %

Bei normalen Proben liegt eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen RBC-H_e und MCH vor, wobei letzterer Wert aus den Parametern HGB und RBC errechnet wird. Diese Parameter werden in den konventionellen spezifischen HGB- und RBC-Kanälen des XE-5000-Analysengeräts mithilfe der LED-Photometrie bzw. der Mantelstrom-Impedanzmessung

bestimmt. Durch Kombination der in den verschiedenen Kanälen (Durchflusszytometrie, Impedanz und Photometrie) gemessenen Parameter lassen sich bestimmte Abnormalitäten optimal nachweisen.

* Forschungsparameter

Einen zusätzlichen diagnostischen Wert bei der Differenzialdiagnose hämolytischer Anämien liefert das Verhältnis von %HYPO-H_e (Prozentsatz der RBC mit niedrigem Hämoglobingehalt) zu %MicroR (Prozentsatz der RBC mit niedrigem Zellvolumen). Der Case Manager des XE-5000 berechnet einen Index, indem er den prozentualen Anteil der mikrozytären RBC durch den Prozentsatz der hypochromen RBC dividiert. Blutproben mit einem erhöhten Indexwert in Kombination mit anderen Parametern wie MCHC, RDW-SD oder einem abnormalen Wert für die Fraktion der unreifen Retikulozyten (IRF) deuten stark auf das Vorliegen einer hereditären Sphärozytose (HS) hin. Der aus beiden Parametern abgeleitete Index hat sich auch als nützlich erwiesen, um HS von anderen hämolytischen Anämien und einer Eisenmangelanämie (IDA) sowie von einem funktionellen Eisenmangel (FID) zu differenzieren. Eine erhöhte Anzahl von nicht hypochromen Mikrozyten wird nur bei HS gemessen, während bei IDA, FID und Hämoglobinopathien die mikrozytären RBC gewöhnlich hypochrom sind.

Literaturhinweise

- [1] Eber SW, Armbrust R, Schroter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility, and autohemolysis. *J Pediatr* 117: 409-16, 1990
- [2] Eber S, Lux SE. Hereditary spherocytosis – defects in proteins that connect the membrane skeleton to the lipid bilayer. *Semin Hematol* 41: 118-41, 2004
- [3] AWMF-Leitlinien-Register Nr. 025/018. AWMF: Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
- [4] Sysmex Xtra 01/2007. »Der Retikulozyt und seine Bedeutung«
- [5] Fuchs, Staib. *Manual Hämatologie* 2008, St.-Antonius-Hospital, Eschweiler
- [6] Hoffbrand, Pettit. *Sandoz Atlas, Klinische Hämatologie*, 1993
- [7] *Handbuch Sysmex XE-5000 Case Manager*
- [8] d'Onofrio. Reticulocytes in haematological disorders. *Clinical and Laboratory Haematology* 18, 29-34, 1996
- [9] R. Haeckel. *Rationalisierung des med. Laboratoriums*, 2. Auflage GIT Verlag, Darmstadt, 1980
- [10] Urrechaga E., Borque L., Escanero J.F. (2009): Potential utility of the new Sysmex XE 5000 red blood cell extended parameters in the study of disorders of iron metabolism. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 47:1411–6