

## Beitrag der Durchflusszytometrie zur Diagnose und Differentialdiagnose der Thrombozytopenie

Contribution of flow cytometry to the diagnosis and differential diagnosis of thrombocytopenia

Richard Mauerer<sup>1,\*</sup> und Rudolf Gruber<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Medizinisches Versorgungszentrum für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie, Synlab Weiden, Weiden, Deutschland

<sup>2</sup> Medizinisches Versorgungszentrum für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie, Synlab Nürnberg, Nürnberg, Deutschland

### Zusammenfassung

Thrombozytopenien sind häufig und werden nicht nur bei Patienten mit klinischer Blutungsneigung, sondern auch bei der labordiagnostischen Abklärung anderer Erkrankungen oder bei Routineuntersuchungen klinisch gesunder Personen als Zufallsbefund gefunden. Die Ermittlung der Ursache der Thrombopenie ist daher von essentieller Bedeutung. Labordiagnostisch steht dafür ein breites Angebot unterschiedlicher analytischer Methoden zur Verfügung. Ein großer Vorteil der Durchflusszytometrie besteht darin, dass nur eine vergleichsweise geringe Menge Patientenprobe benötigt wird, was vor allem bei der Abklärung ausgeprägt thrombopenischer oder pädiatrischer Proben eine Rolle spielt. Aus diesem Grund wird auch die immunologische Bestimmung der Thrombozytenzahl am Durchflusszytometer derzeit als Referenzmethode empfohlen, um eine exakte und möglicherweise therapieentscheidende Quantifizierung sehr niedriger Thrombozytenzahlen zu erreichen. Auch die Differenzierung Thrombozytenbildungsstörung vs. Verbrauch durch die Bestimmung unreifer Plättchen ist eine etablierte Methode, welche durch die routinemäßige Verfügbarkeit dieses Parameters an modernen Blutbildautomaten an Bedeutung gewinnen wird. Eine weitere Anwendung der Durchflusszytometrie besteht im Nachweis von immunologisch vermittelten Thrombopenien, wobei die Antikörper wie bei der Autoimmunthrombopenie gegen Glykoproteine der Thrombozytenoberfläche oder wie bei der Heparin-induzierten Thrombopenie (HIT) gegen einen Komplex aus Heparin und Plättchenfaktor 4 gerichtet sein können. Darüber hinaus

kommen durchflusszytometrische Assays auch in der Abklärung der seltenen kongenitalen Thrombopenien zum Einsatz. Beim Bernard-Soulier-Syndrom sichern sie die Diagnose, bei anderen Erkrankungen können sie zumindest den Weg für eine weiterführende Diagnostik weisen.

Auf die Möglichkeiten der Durchflusszytometrie bei der Abklärung von Leukämien und Lymphomen, die durch verdrängende Prozesse im Knochenmark häufig zu einer Thrombopenie führen, wird in diesem Beitrag nicht eingegangen.

**Schlüsselwörter:** Durchflusszytometrie; Heparin-induzierte Thrombopenie; Immunthrombopenie; kongenitale Thrombopenie; retikulierte Thrombozyten.

### Abstract

Thrombocytopenia is commonly found in patients with apparent bleeding tendency, and in the laboratory evaluation of patients with other disorders or in clinically healthy individuals. Identification of the underlying cause is therefore crucial. There are several different laboratory tests available for this purpose. Flow cytometry employs very small sample volumes, which is of particular interest in patients with severe thrombocytopenia or in pediatric samples. Thus, the immunological determination of platelet numbers by flow cytometry is recommended as the reference method to achieve an exact quantification of very low platelet numbers, which could influence therapeutic decisions. In addition, flow cytometric analysis of immature platelets plays a role in the differentiation of increased platelet destruction and decreased platelet synthesis. As this parameter can be measured by current hematology analyzers, it will become more important in routine use. Another field for flow cytometry is the investigation of immunologically mediated thrombocytopenias. These can be caused by antibodies against platelet-specific glycoproteins such as autoimmune thrombocytopenia or by antibodies against heparin-PF4 (platelet factor 4) complexes such as heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Moreover, flow cytometric assays are used for the diagnosis of rare congenital thrombocytopenias, where they are either able to confirm a certain diagnosis, e.g., Bernard-Soulier syndrome, or at least establish a basis for further analyses. The contribution of flow cytometry to the investigation of lymphoma and leukemia, which regularly cause thrombocyto-

\*Korrespondenz: Dr. med. Richard Mauerer, MVZ für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie Synlab Weiden, Zur Kesselschmiede 4, 92637 Weiden, Deutschland  
Tel.: +961-309-0  
Fax: +961-309-224  
E-Mail: mauerer@synlab.de

penia by bone marrow infiltration, is not discussed in this article.

**Keywords:** congenital thrombocytopenia; flow cytometry; heparin-induced thrombocytopenia; immune thrombocytopenia; reticulated platelets.

## Einleitung

Die Thrombozytenzahl im peripheren Blut liegt bei Erwachsenen methodenabhängig bei ca.  $150$  bis  $450 \times 10^9/L$ . Da bei Werten  $> 100 \times 10^9/L$  auch unter hämostaseologischer Belastung in der Regel keine Blutungsneigung besteht, wird im klinischen Alltag häufig erst bei Werten unter dieser Grenze von einer Thrombozytopenie gesprochen. Sinken die Thrombozyten auf Werte  $< 30 \times 10^9/L$  ist zunehmend auch mit dem Auftreten spontaner oder schwerwiegender zerebraler und intestinaler Blutungen zu rechnen [1].

Eine Verminderung der Thrombozytenzahl kann bei einer Vielzahl von Erkrankungen auftreten, die man unter pathogenetischen Gesichtspunkten in drei Hauptgruppen zusammenfassen kann (siehe Tabelle 1). 1) Verminderte Bildung. Abgesehen von den seltenen hereditären Ursachen führen vor allem myelosuppressive Medikamente oder verdrängende Prozesse im Knochenmark zu einer herabgesetzten Thrombozytenneubildung. 2) Vermehrter Abbau bzw. Verbrauch. Hier sind immunologische Mechanismen wie die Autoimmunthrombozytopenie, die zu einem Abbau antikörperbeladener Thrombozyten in der Milz führt, sowie nicht-immunologische Mechanismen wie ein erhöhter Verbrauch, z.B. im Rahmen einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC), zu nennen. 3) Verteilungsstörung. Im Normalfall zirkulieren etwa 70% bis 80% der außerhalb des Knochenmarks befindlichen Blutplättchen im peripheren Blut, die restlichen 20% bis 30% sind in der Milz gespeichert. Dieser Anteil kann, z.B. im Rahmen einer Splenomegalie, deutlich anstei-

gen und so zu einer erniedrigten Thrombozytenzahl führen. Ausgehend von diesen drei Hauptgruppen sollten die einer Thrombopenie zugrunde liegenden Ursachen durch gezielte Anamnese (Medikamente, Infekte etc.) sowie eine gründliche körperliche Untersuchung (Splenomegalie, Blutungszeichen etc.) weiter eingegrenzt werden. Je nach vermuteter Ursache können dann spezifische weiterführende Untersuchungen (infektionsserologische Untersuchungen, Knochenmarkzytologie, Nachweis thrombozytärer Antikörper etc.) angeschlossen werden. In diesem Zusammenhang liegt die Domäne der Durchflusszytometrie vor allem in der Abklärung Autoantikörper-bedingter Immunthrombopenien, in der Abgrenzung einer vermindernden Thrombozytenproduktion von einem erhöhten Thrombozytenverbrauch durch den Nachweis junger, unreifer Blutplättchen sowie im Nachweis einiger seltener angeborener Thrombozytenfunktionsstörungen, die mit einer Thrombopenie einhergehen. Bevor nachfolgend auf diese Bereiche genauer eingegangen wird, bleibt anzumerken, dass vor allen weiterführenden Untersuchungen – vor allem bei asymptomatischen thrombopenischen Patienten – eine EDTA-induzierte Pseudothrombopenie ausgeschlossen werden muss, die mit einer Häufigkeit von ca. 1% auftritt. Dabei handelt es sich um ein In-vitro-Phänomen, bei dem das in den Routineblutbildröhren enthaltene Antikoagulans EDTA zu einer Agglutination der Blutplättchen führt, die dann von Blutbildautomaten nicht mehr erkannt und daher falsch niedrig bestimmt werden. Im Blutausstrich stellen sich die Thrombozytenaggregate zumeist als Mikrogerrinsel, seltener als Anlagerung an die Leukozyten („Satellitenphänomen“) dar. Um eine genaue Zählung der Thrombozyten zu erhalten und ggf. eine durchflusszytometrische Analytik zu ermöglichen, wird in diesen Fällen die Blutentnahme in Zitratröhren bzw. die Verwendung speziell für diesen Zweck entwickelter Blutentnahmeröhrchen (z.B. ThromboExact, Sarstedt) empfohlen.

Die EDTA-induzierte Pseudothrombopenie hat keine pathologische Relevanz, sollte aber Patient und Arzt bekannt sein, um unnötige Diagnostik und ggf. Therapie zu vermeiden.

**Tabelle 1** Differentialdiagnose der Thrombotopenie (mod. nach [2]).

1. Pseudothrombozytopenie (meist EDTA-induziert)
2. Angeborene Thrombozytopenien
3. Erworbene Thrombozytopenien
  - 3.1. Verstärkter Thrombozytenabbau
    - Immunologisch-vermittelt: ITP, neonatale Alloimmunthrombopenie, medikamentös-induzierte ITP, posttransfusionell, Autoimmunerkrankungen, lymphoproliferative Erkrankungen, HIV, HCV, Helicobacter pylori, HIT
    - Nicht-immunologisch vermittelt: Gefäßprothesen, DIC, TTP/HUS, HELLP, Eklampsie
  - 3.2. Verminderte Neubildung
    - Neoplasien: Knochenmarkinfiltration, therapieassoziiert (Zytostatika)
    - Virusinfektionen: EBV, CMV, Röteln, VZV, Parvovirus B19
    - Megaloblastäre Anämie
  - 3.3. Verteilungsstörung
    - Hypersplenismus

## Immunologische Bestimmung der Thrombozytenzahl

Die Thrombozytenzahl wird an Blutbildanalyzern meist über das Widerstandsmessprinzip ermittelt, das eine Zuordnung der Zellen im Wesentlichen nach ihrer Größe vornimmt. Bei pathologischen Blutbildern die z.B. Mikrozyten, Zellfragmente o.ä. enthalten, kann das dazu führen, dass die Thrombozyten nicht mehr sicher abgegrenzt werden können, was zu einer Fehlbestimmung der Thrombozytenzahl führen kann. Das ist natürlich vor allem bei Patienten mit sehr niedrigen Thrombozytenzahlen unter  $10000$  oder  $20000/\mu L$  von besonderer Relevanz. Auch der Einsatz optischer Detektionsysteme in modernen Hämatologieanalyzern hat die Situation nur verbessern, aber nicht befriedigend lösen können. Das International Council for Standardization in Haematology (ICSH) empfiehlt daher als Referenzmethode die durchflusszytometrische Bestimmung der Plättchenzahl nach Markie-

rung mit thrombozytenspezifischen Antikörpern [3]. Die gemessene Thrombozytenzahl wird dabei in Relation zu der parallel gemessenen Erythrozytenzahl gesetzt. Aus dieser Ratio und der am Blutbildanalyser ermittelten Erythrozytenzahl kann dann die absolute Thrombozytenzahl berechnet werden.

### Retikulierte Thrombozyten

Wenn eine Thrombopenie festgestellt wird, ist die Differenzierung, ob es sich um eine Bildungsstörung oder einen erhöhten Verbrauch handelt, von zentraler Bedeutung. Eine Möglichkeit, Informationen über den Zustand der Thrombopoese zu bekommen, ist die Durchführung einer Knochenmarkpunktion mit entsprechender zyto- bzw. histologischer Aufarbeitung. Weit weniger invasiv ist die Bestimmung junger Thrombozyten im peripheren Blut. Diese können durch hochaffine RNA-Farbstoffe wie Thiazolorange angefärbt und durchflusszytometrisch quantifiziert werden, wobei die Spezifität durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter thrombozytenspezifischer Antikörper erhöht werden kann [4, 5]. Obwohl morphologisch nicht zutreffend, werden die so angefärbten Thrombozyten in Analogie zu den Retikulozyten, den unreifen Vorstufen der Erythrozyten, als retikulierte Thrombozyten bezeichnet. In einigen Studien konnte mittlerweile gezeigt werden, dass dieser Parameter geeignet ist, um zwischen verbrauchenden und aplastischen Ursachen einer Thrombopenie zu differenzieren [6, 7]. Wenngleich die Bestimmung der retikulierten Thrombozyten am Durchflusszytometer mit dem Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper als Goldstandard anzusehen ist, ist diese Methode zu aufwändig und teuer, um sich als „echter“ Routineparameter bei der Abklärung erniedriger Thrombozytenzahlen zu etablieren. Diese Lücke könnte durch die Messung dieses Parameters an modernen Hämatologieanalyzern geschlossen werden. So bieten derzeit die Geräte der Firma Sysmex die Möglichkeit, den Anteil der unreifen Thrombozyten an der Gesamtthrombozytenzahl, ausgedrückt als unreife Plättchenfraktion (Immature Platelet Fraction, IPF), zu bestimmen. Die Messung erfolgt dabei nach Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff im Retikulozytenkanal. In der Durchflusszelle werden dann Vorrärtsstreulicht und Fluoreszenzgehalt analysiert. In verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass die IPF bei Patienten mit erhöhtem Thrombozytenverbrauch, z.B. im Rahmen einer Autoimmunthrombopenie erhöht war, bzw. dass ein Anstieg der IPF ein früher Marker für eine Erholung der Knochenmarkfunktion nach Chemotherapie oder Stammzelltransplantation ist, so dass z.B. auch eine Steuerung der Transfusion von Thrombozytenkonzentraten über diesen Parameter denkbar erscheint [8–11]. Da auch andere Hersteller von Blutbildautomaten an der automatisierten Messung retikulierter Thrombozyten arbeiten und in absehbarer Zeit einführen werden (Fa. Siemens, persönliche Mitteilung), ist zu vermuten, dass dieser Parameter mit der routinemäßigen Verfügbarkeit Eingang in die Basisdiagnostik finden wird.

### Autoantikörper-induzierte Thrombopenien

Die Immunthrombopenie (ITP) wird durch Autoantikörper ausgelöst, die gegen spezifische Oberflächenantigene der Thrombozyten gerichtet sind. Die Antikörper-beladenen Blutplättchen werden dann verstärkt in der Milz abgebaut und es kommt zur Thrombopenie. Es ist somit naheliegend, den Nachweis plättchengebundener oder frei im Serum vorliegender Autoantikörper gegen Thrombozyten zur Diagnostik der ITP heranzuziehen, was sich in der Praxis jedoch deutlich schwieriger gestaltet. Ältere, jedoch auch heute noch immer eingesetzte Assays weisen die Gesamt-Immunglobuline auf Thrombozyten nach (platelet-associated IgG, PAIgG). Allerdings erfassen diese Teste neben den Autoantikörpern auch in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichertes, an Fc-Rezeptoren gebundenes und unspezifisch auf der Thrombozytenoberfläche immobilisiertes IgG, was je nach eingesetztem Testsystem zu einer Sensitivität zwischen 59% und 74% und einer Spezifität zwischen 19% und 74% führt [12]. Eine deutliche Verbesserung der Spezifität ergab die Einführung von Assays, die nicht mehr die Gesamt-Immunglobuline, sondern nur noch spezifische, gegen Thrombozytenglykoproteine gerichtete Immunglobuline nachweisen. Bereits Ende der 1980er wurde der Monoclonal Antibody-specific Immobilisation of Platelet Antigens (MAIPA) als neuer diagnostischer Test entwickelt [13], der bis heute als Goldstandard in der Plättchenimmunologie gilt [14]. Zusätzlich wurden eine Reihe von durchflusszytometrischen Assays für die Diagnose einer ITP entwickelt, auch um Limitationen des MAIPA zu umgehen. Die einfachste Methode ist der Nachweis einer Beladung der Patiententhrombozyten mit IgG oder IgM, was letztlich mit dem Nachweis PAIg in einem Immunfluoreszenztest vergleichbar ist. Die Spezifität der Antikörper kann dann theoretisch in einem zweiten Schritt durch den Einsatz eines glykoproteinspezifischen EIA gesichert werden [15]. Dazu werden die plättchengebundenen Antikörper Säure-eluiert und dann in den EIA eingesetzt. Allerdings zeigen unsere praktischen Erfahrungen mit diesem Test, dass positive Proben in der Regel ein identisches Reaktionsmuster im EIA aufweisen und häufig mit mehreren getesteten Glykoproteinen reagieren, so dass die Spezifität dieser Methode zumindest fraglich ist. Andere durchflusszytometrische Assays versuchen den Nachweis plättchengebundener glykoproteinspezifischer Antikörper in einem Schritt zu realisieren. 1995 wurde ein Assay vorgestellt, der auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) beruht [16]. Dieser Assay konnte sich aber aufgrund der schlechten Standardisierbarkeit nicht in der Routinediagnostik durchsetzen [17]. Ein weiterer Assay wurde entwickelt, der auf dem durchflusszytometrischen Nachweis von Antikörper beruht, die spezifisch mit auf Microbeads immobilisierten GPIIb/IIIa (CD41a) reagieren [18]. Dabei wird das Plättchenlysat mit den beschichteten Microbeads inkubiert und die Antikörperbindung mit einem zweiten fluoreszein-gelabelten polyklonalen Ziege Anti-Human Antikörper nachgewiesen. Am gewählten Cut-off ergab sich in dieser Studie mit insgesamt 136 Patienten, davon 62 mit ITP, eine Sensitivität von 86% bei einer

Spezifität von 100%. Ein anderer Ansatz wurde mit dem SASPA (Simultaneous Analysis of Specific Platelet Antibodies) Assay gewählt [19]. Dabei werden Patiententhrombozyten mit monoklonalen Maus-Antikörpern gegen verschiedene humane Thrombozytentenglykoproteine inkubiert. Es kommt zur Ausbildung eines trimolekularen Komplexes aus Glycoprotein, gebundenem humanen Autoantikörper und gebundenem Maus-Antikörper. Anschließend werden die Thrombozyten lysiert und der trimolekulare Komplex über eine Bindung an mit Anti-Maus Antikörper beschichtete Beads immobilisiert. Der Nachweis der gebundenen Autoantikörper erfolgt über fluoreszenzmarkierte Ziege-Anti-human Antikörper. Der Assay wurde mit Patientenserum sowie mit Patiententhrombozyten, die im PAIg-IIFT ein positives Ergebnis gezeigt hatte, evaluiert. Es ergab sich eine mit dem MAIPA vergleichbare Sensitivität und Spezifität.

Trotz aller Bemühungen, einen einfach durchzuführenden und aussagekräftigen Assay zum Nachweis thrombozytärer Antikörper zu etablieren, wird nach heutigem Stand die Wertigkeit dieser Tests, in der Diagnose der ITP aufgrund der schlechten Standardisierung und der sehr heterogenen Performance der verschiedenen Testsysteme, sehr unterschiedlich beurteilt. Während die Leitlinien der hämatologischen Fachgesellschaften im anglo-amerikanischen Raum eine Bestimmung der Thrombozytenantikörper nicht empfehlen [20], wird diese Bestimmung in der Leitlinie „Thrombozytopenien“ der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie als eines der diagnostischen Verfahren in der Primärdiagnostik der Thrombozytopenien aufgeführt [1]. Zusammenfassend kann man sagen, dass der Nachweis glykoprotein-spezifischer Autoantikörper gegen Thrombozyten aufgrund der hohen Spezifität die Diagnose ITP erhärten kann, ein fehlender Nachweis aufgrund der niedrigen Sensitivität aber eine ITP nicht ausschließt.

### Heparin-induzierte Thrombozytopenie

Eine weitere Ursache einer immunologisch induzierten Thrombozytopenie ist die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT). Aufgrund des weit verbreiteten Einsatzes von Heparin und der schwerwiegenden, z.T. lebensbedrohlichen Komplikationen einer HIT ist der Ausschluss dieser Erkrankung bei Patienten, bei denen unter Heparintherapie eine Thrombopenie festgestellt wird, von großer Bedeutung. Bei klinischem Verdacht auf eine HIT, dessen Wahrscheinlichkeit mit dem sog. „4T-Score“ (Thrombocytopenia, Timing, Thrombosis and the absence of other explanations) ermittelt werden kann, werden in der Regel Antikörper gegen Heparin-Plättchenfaktor-4-Komplexe mit immunologischen Assays nachgewiesen. Spezifischer, aber auch mit höherem technischem und finanziellem Aufwand verbunden, sind funktionelle Assays wie der Serotonin-Release-Assay oder die Heparin-induzierte Plättchenaggregation [21]. In den letzten Jahren wurden darüber hinaus durchflusszytometrische Assays zur HIT-Diagnostik entwickelt. Diese weisen eine Aktivierung der Blutplättchen beispielsweise darüber

nach, dass Seren von HIT-Patienten zu einer Freisetzung von prokoagulatorischen Plättchen-Mikropartikeln (PMP) aus normalen Spenderthrombozyten führen. Diese PMP können ebenso wie anionische Phospholipide an der Oberfläche aktiverter Thrombozyten durchflusszytometrisch nachgewiesen werden [22]. Eine interessante neue Methode, die den Nachweis von Heparin-PF4-Antikörpern mit dem funktionellen Nachweis der Plättchenaktivierung kombiniert, wurde kürzlich publiziert [23]. Dabei erfolgt der Nachweis der Antikörper mit Heparin-PF4-beschichteten Beads, die Thrombozytenaktivierung wird mittels Annexin-V-Bindung bestimmt.

### Thrombozytopathien mit Thrombopenie

Angeborene Thrombozytendefekte sind insgesamt selten. Wie in einer aktuellen Übersichtsarbeit zusammengestellt [24], weist eine ganze Reihe dieser Erkrankungen neben einer Thrombozytenfunktionsstörung auch eine mehr oder weniger ausgeprägte Thrombozytopenie auf. Die zugrunde liegenden Störungen dieser Erkrankungen sind zudem sehr heterogen, so dass ein breites Spektrum verschiedener labor-diagnostischer Methoden zur Diagnosesicherung beiträgt. 2003 wurde ein Algorithmus zur Identifizierung hereditärer Thrombopenien vorgestellt, der in einer Folgearbeit noch leicht modifiziert wurde [25, 26]. Im Zentrum steht die ausführliche Anamnese – inklusive Familienanamnese – und klinische Untersuchung des Patienten, um syndromische Thrombozytopenien, z.B. assoziiert mit Hörverlust oder skelettalen Deformitäten, zu erkennen. Diese werden dann je nach Verdachtsdiagnose weiter abgeklärt. Die nicht-syndromischen Thrombopenien werden nach der Thrombozytengröße im peripheren Blutausstrich in mikrozytäre, normozytäre und makrozytäre Formen eingeteilt. Liegen keine weiteren morphologischen Auffälligkeiten vor, schließen sich in Form einer Stufendiagnostik die Bestimmung der Ristocetin-induzierten Plättchenaggregation, die immunhistochemische Anfärbung der Schwerketten des Nicht-Muskel-Myosins Typ IIA (NMMHC-IIA) in Leukozyten sowie der durchflusszytometrische Nachweis der Thrombozytentenglykoproteine GP Ib/IX/V an. Mit diesem Algorithmus kann bei vielen Patienten zumindest die Eingrenzung eines spezifischen Defekts erreicht werden, die Diagnosesicherung erfolgt je nach Defekt durch weitere spezifische Untersuchungen wie die SDS-PAGE, molekulargenetische Methoden, Elektronenmikroskopie oder auch die Durchflusszytometrie. Zu den mit dieser Technik diagnostizierbaren Erkrankungen gehört in erster Linie das Bernard-Soulier-Syndrom (BSS), ein seltener, autosomal-rezessiv vererbter Defekt des von-Willebrand-Rezeptor-Komplexes GPIb-IX-V [27]. Dabei können verschiedene Mutationen in den GPIb- $\alpha$ , GPIb- $\beta$  oder GPIX-Genen zu einer verminderten Expression des Rezeptors oder zu einem dysfunktionellen Rezeptorprotein führen. Das klinische Bild ist heterogen, so dass eine leichte Blutungsneigung ebenso möglich ist wie eine lebensbedrohliche. Heterozygote Träger können eine Makrothrombopenie bei fehlenden oder in der Regel milden Symptomen aufweisen.

**Tabelle 2** Immunphänotyp ausgewählter hereditärer Thrombopenien (mod. nach [24]).

Syndrom	Betroffenes Gen	Erbgang	Phänotyp	Immunphänotyp
Bernard-Soulier-Syndrom (BSS)	GPIb- $\alpha$ , GpIb- $\beta$ , GPIX	AR	Sehr große Thrombozyten, keine Aggregation durch Ristocetin auslösbar	Verminderte Expression von GPIb/IX/V auf Thrombozyten
X-chromosomal vererbte Thrombozytopenie (XLT)	WAS	X	Kleine Thrombozyten, kein Immundefekt	Nachweis einer verminderten WASP-Expression in PBMC
Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS)	WAS	X	Kleine Thrombozyten, Immundefizienz, Ekzem, Lymphom	Nachweis einer verminderten WASP-Expression in PBMC
Kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie (CAMT)	c-MPL	AR	Kongenitale Thrombopenie (Plättchen normal groß), im Verlauf weitere Zytopenien	Nachweis einer verminderten c-MPL-Expression in Thrombozyten
Benigne Mittelmeermakrothrombopenie (MTCP) mit Koexpression von Glykophorin A	GPIb- $\alpha$ , andere?	AD	Vergrößerte Thrombozyten	Nachweis einer Koexpression von Glykophorin A auf Thrombozyten

AR, autosomal-rezessiv; AD, autosomal-dominant; X, X-chromosomal; GP, Glykoprotein; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

Die durchflusszytometrische Diagnose wird durch den Nachweis einer verminderten Expression von CD42b (GPIb- $\alpha$ ) gestellt. Konformations-sensitive Antikörper können sogar qualitative Defekte erkennen. Ein beachtenswertes problematisches Detail ist, dass die absolute Zahl der GPIb-IX-V-Komplexe pro Zelle auf den vergrößerten Thrombozyten normal sein kann, die Rezeptordichte aber immer erniedrigt ist [25]. Das kann durch Ratiobildung mit einem anderen, regelrecht exprimierten Rezeptor wie GPIIb oder GPIIIa, detektiert werden. Weitere durchflusszytometrisch erfassbare hereditäre Thrombozytopenien sind die X-chromosomal vererbte Thrombozytopenie (XLT, X-linked thrombocytopenia) [28], das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) [29, 30], die kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie (CAMT) [31, 32], sowie die benigne Mittelmeermakrothrombopenie mit thrombozytärer Koexpression von Glykophorin (MTCP, Mediterranean macrothrombocytopenia) [25]. Eine Übersicht über die durchflusszytometrische Diagnostik dieser Erkrankungen ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

## Fazit

In den letzten Jahren wurden eine Reihe durchflusszytometrischer Assays entwickelt, die zur differentialdiagnostischen Abklärung einer Thrombopenie eingesetzt werden können. Ein Vorteil dieser Methode ist unbestreitbar, dass in der Regel nur kleine Probenvolumina benötigt werden, was vor allem bei der Untersuchung pädiatrischer Proben oder bei der Abklärung von Patienten mit ausgeprägter Thrombopenie von Vorteil ist. Ein weiterer Vorteil ist sicherlich die Möglichkeit, durch die Kombination verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe oder den Einsatz von Beads, in einem Ansatz

mehrere Parameter simultan zu bestimmen. Letzteres bedingt allerdings auch eine gewisse Komplexität, was zum einen entsprechende Ansprüche an die technische und personelle Ausstattung der durchführenden Labore stellt, zum anderen aber auch die Standardisierung und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Labore zumindest erschwert. Eine Standardisierung ist jedoch die Voraussetzung dafür, dass diese Analytik auch weitere Verbreitung finden wird.

Zudem bleibt anzumerken, dass der Wert der Durchflusszytometrie für einige der vorgestellten Erkrankungen von untergeordneter Bedeutung ist oder nur ergänzenden Charakter hat. So ist, z.B. bei der kongenitalen amegakaryozytären Thrombozytopenie (CAMT), die Diagnose mittels Durchflusszytometrie zwar möglich, diagnosesichernd ist aber letztlich der molekulargenetische Nachweis einer MPL-Mutation [33].

## Literatur

- Hiller E, Matzdorff A, Rummel M, Giagounidis A. DGHO Leitlinie Thrombozytopenie. Onkopolis 2009. Available from: URL: <http://www.dgho.de/onkopolis/Thrombozytopenien>.
- Veneri D, Franchini M, Randon F, Nicelle I, Pizzolo G, Ambrosetti A. Thrombocytopenias: a clinical point of view. Blood Transfus 2009;7:75–85.
- Platelet counting by the RBC/platelet ratio method. A reference method. Am J Clin Pathol 2001;115:460–4.
- Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. Blood 1990;75:116–21.
- Matic GB, Chapman ES, Zaiss M, Rothe G, Schmitz G. Whole

- blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability. *Cytometry* 1998;34:229–34.
6. Macchi I, Chamlian V, Sadoun A, Le DA, Guilhot J, Guilhot F, et al. Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. *Eur J Haematol* 2002; 69:152–7.
  7. Wang C, Smith BR, Ault KA, Rinder HM. Reticulated platelets predict platelet count recovery following chemotherapy. *Transfusion* 2002;42:368–74.
  8. Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, et al. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res* 2006; 118:463–9.
  9. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004;126:93–9.
  10. Briggs C, Hart D, Kunka S, Oguni S, Machin SJ. Immature platelet fraction measurement: a future guide to platelet transfusion requirement after haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med* 2006;16:101–9.
  11. Zucker ML, Murphy CA, Rachel JM, Martinez GA, Abhyankar S, McGuirk JP, et al. Immature platelet fraction as a predictor of platelet recovery following hematopoietic progenitor cell transplantation. *Lab Hematol* 2006;12:125–30.
  12. Sachs UJ. [Diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura]. *Hämostaseologie* 2008;28:72–6.
  13. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoclonal antibody – specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 1987;70:1722–6.
  14. Kaplan C, Freedman J, Foxcroft Z, Husebekk A, Metcalfe P, Muniz-Diaz E, et al. Monoclonal platelet antigen capture assays (MAIPA) and reagents: a statement. *Vox Sang* 2007;93:298–9.
  15. Davoren A, Bussel J, Curtis BR, Moghaddam M, Aster RH, McFarland JG. Prospective evaluation of a new platelet glycoprotein (GP)-specific assay (PakAuto) in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia (AITP). *Am J Hematol* 2005; 78:193–7.
  16. Koksch M, Rothe G, Kiefel V, Schmitz G. Fluorescence resonance energy transfer as a new method for the epitope-specific characterization of anti-platelet antibodies. *J Immunol Methods* 1995 16;187:53–67.
  17. Nguyen XD, Kluter H. The SASPA (Simultaneous Analysis of Specific Platelet Antibodies) assay: implementation and performance in the routine laboratory use. *Transfus Med Hemother* 2006;33:254–9.
  18. Tomer A, Koziol J, McMillan R. Autoimmune thrombocytopenia: flow cytometric determination of platelet-associated autoantibodies against platelet-specific receptors. *J Thromb Haemost* 2005;3:74–8.
  19. Nguyen XD, Dugrillon A, Beck C, Kerowgan M, Kluter H. A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA. *Br J Haematol* 2004;127:552–60.
  20. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussel JB, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010;115:168–86.
  21. Warkentin TE, Sheppard JA. Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Transfus Med Rev* 2006;20: 259–72.
  22. Linden MD, Frelinger AL III, Barnard MR, Przyklenk K, Furman MI, Michelson AD. Application of flow cytometry to platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:501–11.
  23. Gobbi G, Mirandola P, Tazzari PL, Talarico E, Caimi L, Martini G, et al. New laboratory test in flow cytometry for the combined analysis of serologic and cellular parameters in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;58:32–8.
  24. Nurden P, Nurden AT. Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thromb Haemost* 2008;99:253–63.
  25. Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F, Gresele P, Iolascon A, Pulcinelli FM, et al. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica* 2003;88:582–92.
  26. Noris P, Pecci A, Di BF, Di Stazio MT, Di PM, Ceresa IF, et al. Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica* 2004;89:1219–25.
  27. Pham A, Wang J. Bernard-Soulier syndrome: an inherited platelet disorder. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1834–6.
  28. Kanegae H, Nomura K, Miyawaki T, Sasahara Y, Kawai S, Tsuchiya S, et al. X-linked thrombocytopenia identified by flow cytometric demonstration of defective Wiskott-Aldrich syndrome protein in lymphocytes. *Blood* 2000;95:1110–1.
  29. Ariga T, Nakajima M, Yoshida J, Yamato K, Nagatoshi Y, Yanai F, et al. Confirming or excluding the diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome in children with thrombocytopenia of an unknown etiology. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:435–40.
  30. Yamada M, Ariga T, Kawamura N, Yamaguchi K, Ohtsu M, Nelson DL, et al. Determination of carrier status for the Wiskott-Aldrich syndrome by flow cytometric analysis of Wiskott-Aldrich syndrome protein expression in peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 2000;165:1119–22.
  31. Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A, et al. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 2001;97:139–46.
  32. Savoia A, Dufour C, Locatelli F, Noris P, Ambaglio C, Rosti V, et al. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: clinical and biological consequences of five novel mutations. *Haematologica* 2007;92:1186–93.
  33. Ballmaier M, Germeshausen M. Advances in the understanding of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2009;146:3–16.