

Übersichtsarbeit/Review

Markus Anliker*, Angelika Hammerer-Lercher, Andreas Falkner, Brigitte Heiss, Wolfgang Willenbacher, Hubert Schrezenmeier, Andreas Huber, Günther Gastl und Andrea Griesmacher

Hämatologische Labordiagnostik im interdisziplinären hämatologischen Kompetenzzentrum (IHK) der hämatologisch onkologischen Klinik V der Universitätsklinik Innsbruck und des Zentrallabors der Universitätsklinik Innsbruck

Laboratory examination of hematologic diseases in the Interdiscipline Hematologic Competence Center (IHK) of Innsbruck of the Clinic for Hemato-Oncology V of the University Hospital Innsbruck and the Central Laboratory of the University Hospital Innsbruck

Zusammenfassung: Die hämatologische Labordiagnostik hat in den letzten 30 Jahren große Fortschritte gemacht. Sie basiert heute im Wesentlichen auf vier Säulen: Zytomorphologie, Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik. Weiterhin unerlässlich steht am Anfang jeder Abklärung die Zytomorphologie meist gefolgt von einer Immunphänotypisierung. Beide Untersuchungen erfordern vom Laborteam hohe Expertise und oft Informationsaustausch mit den klinischen Zuweisern. Trotz hochspezialisierter Mitarbeiter ist es für kleine Speziallaboratorien eine große Herausforderung den Anforderungen an Qualitätssicherung und Wirtschaftlichkeit zu genügen. Eine Lösung kann die Zusammenarbeit zwischen der Labormedizin einerseits (meist in einem Zentrallabor angesiedelt) und den meist in der Hämatologie angesiedelten kleineren Speziallaboren sein, wie sie in Innsbruck seit 2008 modellhaft im interdisziplinären hämatologischen Kompetenzzentrum (IHK) praktiziert wird. Auf diese Weise wurde in Innsbruck eine interdisziplinäre Einrichtung geschaffen, welche die gesamte hämatologische Laborkompetenz der Klinik aus Zytomorphologie und Durchflusszytometrie zentral bündelt. Neben der Abklärung bekannter hämatologischer Erkrankungen bietet das IHK auch optimale Voraussetzungen zur gezielten, zeitnahen Erstdiagnostik hämatologischer Erkrankungen (z.B. Zufallsbefunde) aber auch zum Screening von Blutproben eines großen

Klinikums, die aufgrund von morphologischen oder numerischen Auffälligkeiten einer weiteren diagnostischen Abklärung bedürfen. Für die weitere Entwicklung des IHK ist eine zusätzliche Einbindung der zytogenetischen bzw. molekularbiologischen Diagnostik unerlässlich. Die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Labormedizinern, Hämatologen, Zytogenetikern und Molekularbiologen fördert den Wissenstransfer und die Expertise aller beteiligten Mitarbeiter und steigert das Leistungspotential und Qualitätsniveau dieser Laborbereiche. Weitere Vorteile bieten sich im Bereich wichtiger Laborentwicklungsprozesse (z.B. Laborakkreditierung, Einführung neuer teurer Ausrüstungsgegenstände, wie etwa 10-Farben-Flowzytometer, moderner Labor-EDV oder Bildarchivierungssysteme), wobei durch interdisziplinäre Zusammenarbeit und gemeinsame Nutzung hohe Synergieeffekte zu erwarten sind. Die Etablierung interdisziplinärer Kompetenzzentren für hämatologische Diagnostik stellt daher einen Meilenstein in der modernen Labordiagnostik dar.

Schlüsselwörter: Durchflusszytometrie; Hämatologische Labordiagnostik; interdisziplinäre Zusammenarbeit; Zytomorphologie

Abstract: The laboratory examination of hematologic diseases has made great progress in the last 30 years and is

now based on a four-fold strategy: cytomorphology, flow cytometry, cytogenetics, and molecular genetics. Cytomorphology is still the crucial first step, and then it usually followed by flow cytometric immunophenotyping and of relevant cell population. Both investigations require a highly expert laboratory team and, often, an exchange of information among the clinicians. It is a challenge for small specialized laboratories to reach quality standards and economic efficiency nowadays, even with highly specialized personnel. One solution is the collaboration among institutes of laboratory medicine (usually a central laboratory), smaller laboratories specialized in hematology, and usually residents in departments of hematologic diseases, as is the practice in the Interdiscipline Hematologic Competence Center (IHK) of Innsbruck since 2008. Thus, in Innsbruck, this competence center concentrates the whole expertise in the hematology laboratory of the hospital based on cytomorphology and flow cytometry. Besides the clarification of already identified hematologic diseases, the IHK has optimal conditions not only for the specific and prompt first-time diagnosis of hematologic diseases (e.g., additional diagnostic findings) but also for the screening of blood samples, from tertiary care hospitals, that require further diagnostic workup for specific disease clarification based on numeric and morphologic abnormalities. For the further progression of the IHK, the integration of cytogenetic and molecular genetic diagnostics is essential. The interdisciplinary collaboration of specialists in laboratory medicine, hematology, cytogenetics and molecular genetics improves the knowledge transfer and expertise of all members and enhances the efficiency and quality level of such a collaborating laboratory division. Further advantages can be achieved in important laboratory development processes (e.g., laboratory accreditation, implementation of expensive laboratory equipment, such as ten-color flow cytometers, introduction of modern laboratory information systems, or image-archiving systems), with a high potential of synergetic effects stemming from the collaboration. The establishment of interdisciplinary competence centers for hematologic diagnostics is therefore a milestone in modern laboratory diagnostics.

Keywords: cytomorphology; flow cytometry; hematologic laboratory examination; interdisciplinary collaboration.

***Korrespondenz:** Dr. med. Markus Anliker, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm, DRK, Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Helmholtzstr. 10, 89081 Ulm, Deutschland, Tel.: +49-731-150-6869, Fax: +49-731-150-602, E-Mail: m.anliker@blutspende.de

Markus Anliker, Angelika Hammerer-Lercher, Andreas Falkner, Brigitte Heiss and Andrea Griesmacher: Zentralinstitut für medizinische und Chemische Labordiagnostik, Universitätsklinik/Landeskrankenhaus Innsbruck, Innsbruck, Österreich
Hubert Schrezenmeier: Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm, DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Ulm, Deutschland
Wolfgang Willenbacher and Günther Gastl: Abteilung für Hämatologie und Onkologie Innere Medizin V Universitätsklinik/Landeskrankenhaus Innsbruck, Innsbruck, Österreich
Andreas Huber: Zentrum für Labormedizin, Kantonsspital Aarau, Aarau, Schweiz

Einleitung

Leitsymptom fast jeder hämatologischen, malignen Erkrankung ist eine Veränderung des peripheren Blutbildes. Dies können numerische Abweichungen der einzelnen Zelllinien sein oder man findet Zellen, die man normalerweise nicht im peripheren Blut entdeckt. Im Falle einer akuten Leukämie sind dies sehr unreife und undifferenzierte Zellen, sogenannte Blasten.

Bis Mitte der 1980er Jahre fußte die hämatologische Diagnostik derartiger Erkrankungen vor allem auf dem zytomorphologischen Bild (Lichtmikroskopie) unterstützt durch entsprechende zytochemische Färbungen, z.B. der Myeloperoxidasefärbung als Zeichen einer myeloischen Differenzierung der Zellen.

Die bis heute noch im klinischen Alltag häufig verwendete FAB (French American British) Klassifikation beruht alleine auf dem Bild des zytomorphologischen Aspektes der Zellen und den dazugehörigen zytochemischen Färbungen. Auf dieser Grundlage wird eine Einteilung gemäß der Ausdifferenzierung der Zellen vorgenommen. Nach der FAB-Klassifikation werden die akuten myeloischen Leukämien in 8 Subtypen eingeteilt (M0–M7).

Neben dieser ausschließlich lichtmikroskopischen Charakterisierung der Erkrankungen entwickelte sich Anfang der 80er Jahre als wesentliches, zweites Standbein in der hämatologischen Diagnostik die immunologische Charakterisierung der Zellen.

Die zunehmenden Kenntnisse über zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen bösartiger Blutzellen, die durch den enormen methodischen Fortschritt auf diesem Gebiet ermöglicht wurden, haben dazu geführt, dass man z.B. akute myeloische Leukämien, bei denen immer wieder dieselben prognostisch und therapeutisch relevanten Veränderungen im Erbgut gefunden werden (rekurrente genetische Veränderungen), in der neuesten Klassifikation, der WHO-Klassifikation, als selbständige Entitäten klassifiziert hat. Diese Klassifikation

ist für Therapie und Prognose dieser Erkrankungen von größerer Bedeutung.

Genetik und Immunphänotyp hämatologischer Neoplasien – Korrelationen und ihre prognostische Relevanz

Zu Beispielen genetischer Veränderungen bei hämatologischen Erkrankungen, die in der heutigen Diagnostik dieser Erkrankungen nicht mehr wegzudenken sind, gehören unter anderem die BCR/ABL Mutation bei der CML und die JAK2V617F-Mutationen bei anderen myeloproliferativen Neoplasien, die in fast allen Fällen einer Polycythämia vera nachweisbar.

Anhand zytogenetischer Veränderungen kann man die akuten myeloischen Leukämien in drei prognostische Gruppen einteilen [1]: Eher günstig verlaufen Leukämien mit Translokation t(8;21), t(15;17) oder einer Inversion des Chromosom 16, inv(16). Ein mittleres Risiko weisen akute myeloische Leukämien mit einem normalen Karyotyp oder mit einer Translokation t(9;11) auf. Ungünstig verlaufen Erkrankungen mit komplexen Veränderungen des Karyotyps oder einer Translokation t(6;9) oder einer inv(3), sowie sogenannte monosomale Karyotypen.

Teilweise kann auf Grundlage der Zytomorphologie oder des Immunphänotyps bereits der Verdacht auf bestimmte Chromosomenveränderung geweckt werden. So ist die inv(16) meist mit dem zytomorphologischen Bild der nach FAB-Klassifikation als myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie bezeichneten AML M4(eo) vergesellschaftet. Die Translokation t(15;17) entspricht nach der FAB-Klassifikation der Promyelozytenleukämie M3 [2].

Bei der Translokation t(8/21) kommt in der Immunphänotypisierung häufiger eine Koexpression der Antigene CD19 und CD56 vor. Man bezeichnet akute myeloische Leukämien mit t(8;21) oder inv(16) auch als core-binding factor leucaemias [3].

Neben diesen schon auf der Chromosomenebene durch klassische zytogenetische Methoden oder Fluoreszenz in situ Hybridisierung sichtbaren Veränderungen sind weitere Mutationen von Bedeutung, die nur mit molekularbiologischen Methoden auf DNA-Ebene sichtbar gemacht werden können. Ein Beispiel dafür ist die mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftete Mutation im FMS-like tyrosine Kinase 3 (FLT3)-ITD-Gen. Mit einer

besseren Prognose ist eine Mutation im Nukleophosmin 1 Gen bei ansonsten normalem Karyotyp vergesellschaftet, jedoch nur dann, wenn die zuvor genannte FLT3-Genmutation nicht vorliegt.

In der WHO-Klassifikation entfallen trotz des fortschreitenden Wissens weiterhin ca. 30%–40% auf die Kategorie „nicht anders spezifiziert“ [2]. Diese Leukämien werden deshalb nur anhand der Zytomorphologie in Zusammenschau mit der zytochemischen Färbung und dem Immunphänotyp entsprechend ihrer Ausdifferenzierung nach der Einteilung in M0 bis M7 nach FAB klassifiziert.

Tabelle 1 zeigt eine Gegenüberstellung von Immunphänotyp und wichtigen genetischen Veränderungen.

Auch für die malignen Lymphome stellt die WHO Klassifikation die aktuellste weltweit akzeptierte Klassifikation dar. Die aktuelle Version stammt aus dem Jahr 2008. Die WHO-Klassifikation der malignen Lymphome ist eine Fortentwicklung der REAL Klassifikation (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms). Gemeinsames Prinzip ist die Abgrenzung „echter“ biologisch gekennzeichnete Krankheitsentitäten, insbesondere auch im Hinblick auf therapeutische Relevanz (z.B. Abgrenzung der „ALKOME“). Zur Einteilung der Krankheiten werden gleichrangig Merkmale der Morphologie, des Immunphänotyps, des Genotyps, der Klinik und der zellulären Herkunft berücksichtigt [6]. Die WHO-Klassifikation unterscheidet Vorläufer- von reifzelligen B- und T-Zellneoplasien. Da der immunologische Subtyp bei den akuten lymphatischen Leukämien von großer Bedeutung ist, ist eine Immunphänotypisierung bei diesen Erkrankungen immer notwendig. Von großer praktischer Bedeutung ist deshalb auch die EGIL-Klassifikation (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias), die die akuten lymphatischen Leukämien in vier Untergruppen einteilt. Die Untergruppe der reifen B-ALL, die vom Immunphänotyp und der Zellmorphologie auch dem lymphoblastischen Lymphom entspricht, aber mehr als 20% Knochenmarksbefall aufweist, wird in der WHO-Klassifikation zu den reifzelligen B-Zellneoplasien gezählt. Gekennzeichnet ist die reife B-ALL in der EGIL-Klassifikation durch das Vorkommen von Oberflächenimmunglobulinen. Die anderen drei Subtypen (pro-B-ALL, c-ALL und prä-B-ALL) werden durch die EGIL-Klassifikation im Wesentlichen durch das Vorhandensein von CD10 auf der Zelloberfläche und dem intrazytoplasmatischen Nachweis von IgM definiert.

Trotz aller Fortschritte in der Labordiagnostik kann auf die mikroskopische Beurteilung nicht verzichtet werden.

Tabelle 1 Gegenüberstellung Immunphänotyp und wichtige genetische Veränderungen. Modifiziert nach [5].

WHO Klassifikation 2008, bzw.			
Zytogenetik	Molekularbiologischer Nachweis	FAB	Durchflusszytometrie
Akute myeloische Leukämie			
AML mit t(8;21)(q22;q22)	RUNX1-RUNX1T1	Meist AML (M2)	Blasten mit myeloi-scher Ausreifung, vermehrt Koex-pression von CD19 und CD56
AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22)	CFB-MYH11	AML (M4eo)	Coexpression von CD2 [4]
Akute Promyelozyten-leukämie mit t(15;17)(q22;q12)	PML-RARA	AML (M3)	Singuläre Blasten-population mit hohem Seit-wärtsstreulicht und starker intrazyto-plasmatischer MPO-Expression. Fast immer HLADR und CD34 negativ
AML mit t(9;11)(p22;q23)	MLLT3-MLL	Meist AML (M5a)	Monoblasten sind durchflusszyto-metrisch häufig CD34 und CD117 negativ, HLADR wird jedoch meist exprimiert
AML mit t(6;9)(p23;q34)	DEK-NUP214	Alle FAB-Subtypen	Unspezifischer myeloischer Immunphänotyp
AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13)	RBM15-MKL	Ähnlich den Blasten der FAB (M7)	CD41, CD61 positiv und CD45 negativ
	Provisorische Entität AML mit NPM1 Mutation Provisorische Entität AML mit CEBPA Mutation		Bei NPM1 TypA Mutation CD34 und HLADR negativ
Myeloproliferative Erkrankungen			
Chronisch myeloische Leukämie BCR-ABL1 positiv	BCR-ABL1		Unspezifisch keine Befunderweiterung zur Zytomorpho-logie, abgesehen vom Blastenschub
Chronische neutro-philien Leukämie	JAK2V617F)		Unspezifisch keine Befunderweiterung zur Zytomorphologie
Polycythämia vera	(ca. 10% Exon 12 Mutation bei negativen PV Fällen		Unspezifisch keine Befunderweiterung zur Zytomorphologie
Primäre Markfibrose			
Essentielle Thrombozythämie	TET2		Unspezifisch keine Befunderweiterung zur Zytomorphologie
Chronische eosinophilen Leukämie, nicht anders klassifiziert			
Mastozytose	KIT816V (~10%)		Mastzellen sind CD117, CD2 und CD25, Tryptase positiv
Myeloproliferative Erkrankung, nicht klassifiziert			Unspezifisch keine Befunderweiterung zur Zytomorphologie

Ökonomische Lage

Im Gegensatz zu den rasch zunehmenden, viel versprechenden diagnostischen Möglichkeiten steht die ökonomische Limitierung vieler Labore. Oft handelt es sich bei hämatologischen Laboren um kleine Speziallabore,

die von Mitarbeitern ein hohes Maß an Expertise verlangen. Mit dem einseitigen Argument der erforderlichen Kosteneffizienz werden derartige Labore häufig aufgelöst oder sind von der Schließung bedroht. Dies hat zur Folge, dass die fachliche Expertise (vor allem Zytomorphologie und Immunphänotypisierung) der dort arbeitenden

Mitarbeiter und die Rückkopplung an die klinisch tätigen Hämatologen unwiderruflich verloren geht.

Einen möglichen Ausweg aus dieser Problematik bietet die interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen Hämato-Onkologie und Laboratoriumsmedizin mit dem Ziel, Expertise zu bündeln und Synergien zu entwickeln. Diese schon im Jahr 1994 in einem Schreiben der DGHO diskutierte Zusammenarbeit gewinnt heute zunehmend an Bedeutung durch die rasch fortschreitende Entwicklung der hämato-onkologischen Labordiagnostik (Immunphänotypisierung, Molekulargenetik) [7].

In der Universitätsklinik bzw. dem Landeskrankenhaus Innsbruck wurde diese Möglichkeit genutzt und modellhaft entwickelt. Seit dem Jahr 2008 wird die hämatologische Diagnostik in den Bereichen Zytomorphologie und Immunphänotypisierung in Form einer Zusammenarbeit zwischen der Universitätsklinik für Innere Medizin V mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie und dem Zentralinstitut für medizinische und chemische Labordiagnostik durchgeführt. Das Leistungsspektrum wurde, verglichen mit den vorher bestehenden Einzellaboren, erweitert und die Leistungskapazität wurde signifikant gesteigert.

Leistungsangebot und Stufendiagnostik im IHK Innsbruck

Hämatologische Basisdiagnostik

Blutzellzählung und Erstellung des Differentialblutbildes mit Bestimmung der Hämoglobinkonzentration.

Hämatologische Spezialdiagnostik

Mikroskopische Differenzierung inklusive sinnvoller zytochemischer Färbungen von Zellen des blutbildenden Systems in Knochenmark, Liquor und Punktaten und deren Bewertung hinsichtlich Diagnose, Stadium und Verlauf einer Erkrankung.

Durchflusszytometrische Untersuchung des Antigenprofils bei hämatologischen Erkrankungen hinsichtlich normaler oder pathologischer Expression, bzw. andere weiterführende hämatologische Laboruntersuchungen. Im Einzelnen werden folgende Untersuchungen angeboten:

- Quantifizierung der Lymphozytensubpopulationen
- Quantifizierung von Stammzellen
- Nachweis klonaler B-Zellen im Sinne einer Leichtkettenrestriktion, im Falle von Plasmazellen durch intrazytoplasmatische Leichtkettenfärbung

- Nachweis klonaler T-Zellen im Sinne einer immunphänotypischen Analyse des T-Zell-Rezeptors α/β
 - Nachweis und immunphänotypische Charakterisierung von Blasten
 - Nachweis und immunphänotypische Charakterisierung von Plasmazellen
 - Immunphänotypische Beschreibung und Verlaufskontrolle von Leukämien und Lymphomen
 - PNH-Diagnostik
 - Anämie-Diagnostik: Bestimmung der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase-Konzentration
- Abbildung 1 zeigt einen Anforderungsschein des IHK.

Um das Leistungsangebot optimal auf den Bedarf für individuelle Patienten abzustimmen, ist es wichtig, zwischen dem Labor und den Einsendern einen möglichst guten Informationsaustausch zu gewährleisten. In vielen Fällen ist es nicht ausreichend, dass durch Einsender einseitig lediglich Untersuchungen angefordert werden. Die richtige Untersuchungsstrategie kann oft erst durch zeitnahe und intensive Kommunikation zwischen Labor und der Klinik gefunden werden. Durch diesen Informationsaustausch können oft fehlerhafte Anforderungen korrigiert werden. Diese Vorgehensweise spart Zeit und Kosten und führt schneller zu richtigen Befunden.

Die Gestaltung des Anforderungsscheines des interdisziplinären hämatologischen Kompetenzzentrum (IHK) in Innsbruck trägt diesem Grundgedanken Rechnung. Er dient nicht nur der „Bestellung“ von Laboruntersuchungen, sondern soll vielmehr dem Einsender das Leistungsangebot in allgemeiner Form nahe bringen und als Basis dienen, dem Labor die für die Diagnostik wichtigen klinischen Daten zur Verfügung zu stellen, die für die Methodenauswahl und Befundung notwendig sind. Neben Angaben zum Patienten wie z.B. Diagnose, Anamnese, relevanten klinischen Befunden und Laborwerten wird insbesondere nach parallel angeforderten zytogenetischen und molekulargenetischen Untersuchungen gefragt.

Weiterhin wird angestrebt, möglichst keine durchflusszytometrischen Untersuchungen ohne die Mitbeurteilung von zytomorphologischen Präparaten durchzuführen und auszuwerten.

Grundlegende Untersuchung in der hämatologischen Labordiagnostik ist die Zellzählung mit der Differenzierung von Leukozyten. Damit diese Untersuchung auch bei hohem Probendurchsatz eine effektive Screening-Untersuchung darstellt und mit hoher Qualität ausgeführt wird, sind zahlreiche Regeln zur Qualitätskontrolle hinterlegt. Seit Einführung der SIS Software der Firma Sysmex sind diese Regeln in das Laborprogramm integriert. Zusammen

tilak UNIVERSITÄTSKLINIKEN LH1 Innsbruck

MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT INNSBRUCK UNIVERSITÄTSKLINIKEN

Anforderungsbeleg
Hämatologische Diagnostik:
Zytologie | Durchflusszytometrie

Seite 1 von 2

Interdisziplinäres Hämatologisches Kompetenzzentrum (IHK)
Leitung: Univ.-Prof. Dr. Günther Gassl
Univ.-Prof. Dr. Andrea Griesmayer
A.-Dorothea-Str. 39
Telf.: +43 (0) 512 900 90 90
Web: <http://innsbruck.at>

Probenidentifikation

← Patientenkarte für: A patienten
Name: _____ Geschlecht: _____
Vorname: _____ Geburtsdatum: _____
Straße / Nr.: _____
RZ / Ort: _____
Allg. Geb.-Nr.: ☐ Sonder Geb.-Nr.: ☐ Selbstzahler ☐
Klin. Hinweis: _____
Eins. Diagnose: _____

(nicht von der Einsenderin / vom Einsender ausfüllen)

Anforderungen

Angaben zum Patienten / zum Patienten

Diagnose

☐ Verdacht auf Erkrankung
☐ Enddiagnose
☐ Bekannte Erkrankung
Relevante Angaben aus Vorbefunden (z.B. initialer Immunphänotyp): _____

Fragestellung

☐ Sicherung der Diagnose
☐ Weiterführende Abklärung
☐ Verlaufskontrolle

Angaben zum Probenmaterial

Gewonnenes Material

☐ Ganzes Blut ☐ Sonstiges _____
☐ Peripheres Blut ☐ Knochenmark
☐ Liquor ☐ Nähere Angaben (1) _____
☐ Pleura-Punktat ☐ Aszites-Punktat

Probenbezeichnung

Datum / Uhrzeit: _____

Angaben zur Anforderung

Angeforderte Analysen

☐ Zytologie
☐ Durchflusszytometrie

Angaben zur weiterführenden Diagnostik durch den Einsender

Welche weiterführende Diagnostik wird Ihnen parallel durchgeführt?
☐ Zytogenetik ☐ Molekulargenetik
☐ Sonstige weiterführende Diagnostik: _____

Angaben zur anfordernden Ärztin / zum anfordernden Arzt

Name: _____ Unterschrift / Datum / Stempel: _____
Telefon: _____
Abteilung / Ambulanz / Station: _____

* Pflichtfelder
+ Bitte in Druckchrift ausfüllen.
+ RZ Durchflusszytometrische Analysen aus Knochenmark müssen 1-3 Ausstrich-Präparate mit einreichen werden.

DR-Service LH1-rgf-1-800

Abbildung 1 IHK Anforderungsschein.

mit den von den Geräten gesendeten Flags generiert das Programm bei Bedarf eine weitere Abklärung (händischer Ausstrich oder maschinelles Differentialblutbild).

Die Regeln sind in vier Bereiche unterteilt, nämlich Regeln zur Thrombopoese, Erythropoese, Myelopoese sowie kundenspezifische Regeln.

In Tabelle 2 sind jene Kriterien zusammengestellt, welche die Grundlage der kundenspezifischen Regeln bilden und die neben den SIS Standardregeln eine weitere Abklärung, z.B. eine Kammerzählung oder ein Differentialsblutbild, bestimmen.

Da diese Regeln das Ergebnis jahrelanger gesammelter Erfahrungen in der Labordiagnostik der Innsbrucker Universitätsklinik darstellen, berücksichtigen sie zum Teil auch die probenzuweisenden Stationen oder Kliniken. So können oft durch Rücksprache mit Einsendern unnötige weitere Abklärungen vermieden werden, oder es kann im Falle von Hauptzuweisern in Bezug auf hämatologische Erkrankungen, den Proben eine besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

Derart herausgefilterte Proben mit Verdacht auf eine hämatologische Erkrankung können, falls erforderlich, im gleichen Laborbereich durch weitere Methoden, z.B. eine durchflusszytometrische Untersuchung, abgeklärt werden.

Neben diesen Zufallsbefunden werden im Bereich der speziellen Analytik im IHK konkrete Anforderungen aus dem Bereich Knochenmarkszytologie oder der Durchflusszytometrie bearbeitet. Hierbei wird Wert auf eine klare Fragestellung und Indikation gelegt, da dies neben ausreichenden klinischen Angaben zum Patienten eine Grundvoraussetzung für qualitativ hochwertige hämatologische Laborbefunde darstellt. Fehlen derartige Angaben oder sind sie unpräzise, wird mit dem Einsender telefonische Rücksprache gehalten.

Die Abklärungen folgen vor allem im Bereich der durchflusszytometrischen Analytik folgendem Stufenschema:

Stufendiagnostik Durchflusszytometrie

Abklärung NHL-Erstbefund (Anlass ist eine konkrete Anforderung oder ein Zufallsbefund)

Falls eine Fragestellung mit klinischen Angaben vorliegt, wird die Untersuchung durchgeführt, andernfalls erfolgt eine telefonische Rücksprache.

Tabelle 2 Kriterien zur weiteren Abklärung bei Blutbildern.

Leukozyten		
Leukozytose	>16.0 g/L	Ohne passenden Vorwert sollte bei einer derartigen Leukozytose eine weitere Abklärung mittels Differentialblutbild erfolgen.
Leukopenie	<3.5 g/L	Ohne passenden Vorwert wird ein Differentialblutbild angefertigt.
Neutrophilie	>80%	Sind im maschinellen Diff. über 80% neutrophile Granulozyten, wird ein Ausstrich angefertigt zur weiteren Abklärung.
Lymphozytose absolut	>3.8 g/L	Sind im maschinellen Differentialblutbild mehr Lymphozyten nachweisbar, wird ein Ausstrich angefertigt.
Lymphozytose relativ	>40%	Sind im maschinellen Differentialblutbild mehr Lymphozyten nachweisbar, wird ein Ausstrich angefertigt.
	Bei spez. Stationen wie Psychiatrie oder Sportmedizin	Bei speziellen Stationen, bei denen häufiger reaktive Lymphozytosen gefunden werden, wurde der Grenzwert entsprechend erhöht. (Eventuelle Kontrolleinsendung)
	>45%	
Monozytose	>15%	Ausstrich
Eosinophilie	>20%	Ausstrich
Basophilie	>2%	Ausstrich
Flag Blasten	Immer	Ausstrich
Flag Atypical Lympho	Immer	Ausstrich
Abn. Lympho/L-Blasten	Immer	Ausstrich
Flag Linksverschiebung	Immer	Ausstrich
Flag immature Gran	Immer	Ausstrich
Erythrozyten		
Hb	<10 g/L und bei weiteren flags	Ausstrich
RDW >17%	>17% und Einsender medizinische Station oder Kinderklinik	Ausstrich
Makrozytose	MCV >110 fl	Ausstrich
Mikrozytose	MCV <76 fl und MCH <26 pg	Ausstrich
Hypochromie	MCHC <310 g/L und MCH <26 pg	Ausstrich
Poikilozytose	Nur in Zusammenhang mit weiteren Kriterien	Ausstrich
Fragmentozyten	Immer	Ausstrich
Dimorphe Erythrozyten	Kinderklinik und Hämstationen immer	Ausstrich
Reticulozytose	Erwachsene: >35%	Ausstrich
Thrombozyten		
Thrombopenie	<70 g/L	Optische Messung und eventuell Kammerzählung
Thrombopenie	<50 g/L	Bei Erstbefund wird ein Differentialblutbild nachgefordert

Bei auffälliger Morphologie, pathologischem Differentialblutbild und entsprechender Klinik (numerische Abweichung, Lymphozytose, atypische Morphologie, etc.) ohne weiteren Verdacht auf eine reaktive Veränderung folgt eine immunphänotypische Untersuchung.

- Zunächst wird eine Lymphozyten-Basistypisierung mit Leichtkettenfärbung (κ/λ) incl. CD5 durchgeführt.
- Bei B-Zell-Klonalitätsnachweis folgt eine komplette Abklärung mit einem umfassenden NHL-Antikörper-Panel und, falls möglich, eine Klassifizierung in Subtypen (z.B. CLL, HCL, MCL usw.). Falls ein typischer Klon mit dem Immunphänotyp einer B-CLL gefunden wird, aber weniger als 5×10^9 Zellen pro Liter aufweist, lautet der Befund monoklonale B-Zelllymphozytose unklarer Signifikanz. Denn diese

Patienten sind in der Regel asymptomatisch und ein Fortschreiten zu einer B-CLL wird nur in ca. 1%–2% der Fälle pro Jahr beobachtet [8].

- Bei Hinweis für T-Zell-Klonalität, in einer T-Zellsubpopulation aufgrund fehlender oder atypischer Marker bzw. atypischer Expressionsstärke folgt eine Abklärung mit Hilfe des IO Test betaMark zur Untersuchung der T-Zellrezeptor-Variabilität. Bestätigt sich der Verdacht klonaler T-Zellen, folgt noch eine weitere Abklärung mit einem T-Zell-Antikörper-Panel zur immunphänotypischen Charakterisierung der suspekten T-Zellpopulationen. Im Befund wird außerdem die Durchführung einer molekularbiologischen Untersuchung des T-Zellrezeptorrearrangements empfohlen.

Plasmozytom/MGUS

Bei der Fragestellung Plasmozytom/MGUS erfolgt neben der zytomorphologischen Knochenmarksbefundung bei Erstdiagnosen oder in Grenzfällen (nur geringer Anteil an atypischen Plasmazellen) eine weitere immunphänotypische Abklärung.

Neben einer intrazytoplasmatischen Leichtkettenfärbung beinhaltet das Plasmazell-Antikörperpanel folgende Marker: CD19, CD38, CD56, CD138, CD45.

Klonale Plasmazellen weisen eine intrazytoplasmatische Leichtkettenrestriktion auf und sind oftmals CD45w+ bis CD45–, CD19–, CD38+, CD138+, und oft CD56+.

Zur Quantifizierung trägt die Immunphänotypisierung wenig bei, da es meist erhebliche Unterschiede in der Anzahl der Plasmazellen gibt. Durchflusszytometrisch werden oft deutlich weniger Plasmazellen registriert als in der zytomorphologischen Auswertung (Abbildungen 2 und 3).

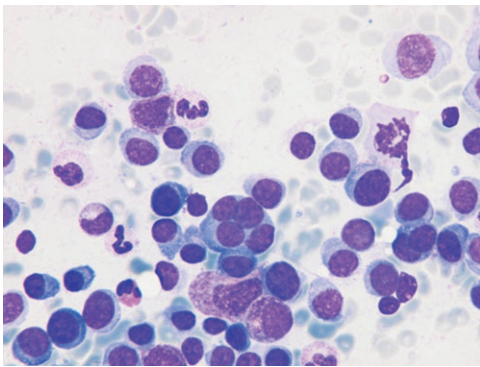


Abbildung 2 Zytomorphologisches Bild eines Multiplen Myeloms mit atypischen, zum Teil mehrkernigen Plasmazellen im Knochenmark.

Abklärung einer akuten Leukämie (Erstdiagnose)

Da eine neu aufgetretene akute Leukämie im Grunde eine Notfallsituation mit dringlichem Behandlungsbedarf darstellt, muss das diagnostische Vorgehen im Krankenhauslabor der Situation in pragmatischer Weise angepasst werden.

Um klinisch tätige Ärzte schnell mit wichtigen Informationen zu versorgen, ist es daher sinnvoll, vorab (vor einer Knochenmarkpunktion) eine durchflusszytometrische Untersuchung aus dem peripheren Blut vorzunehmen.

Die Immunphänotypisierung aus peripherem Blut verfolgt in erster Linie zwei Ziele:

1. Der zytomorphologische Blastennachweis wird mit der durchflusszytometrischen Untersuchung bestätigt und man gewinnt Sicherheit über die zytomorphologisch oft nur vermutete Linienzugehörigkeit. Dies hat Einfluss auf primäre Behandlungsmaßnahmen (z.B. den Einsatz von Kortikosteroiden bei ALL).

Für eine akute myeloische Leukämie typische Oberflächenantigene sind z.B. CD13, CD33, CD14 (monozytäre Differenzierung) oder CD117. Für eine T-Zellleukämie spricht die Expression von CD3, CD2 und CD7. Für eine B-Zellleukämie sind die Marker CD19 und CD10 typisch (kann jedoch auch teilweise bei einer T-ALL exprimiert werden). Marker, die für die Unreife einer Zellpopulation sprechen sind die nicht linienspezifischen Marker CD34 und HLADR [9].

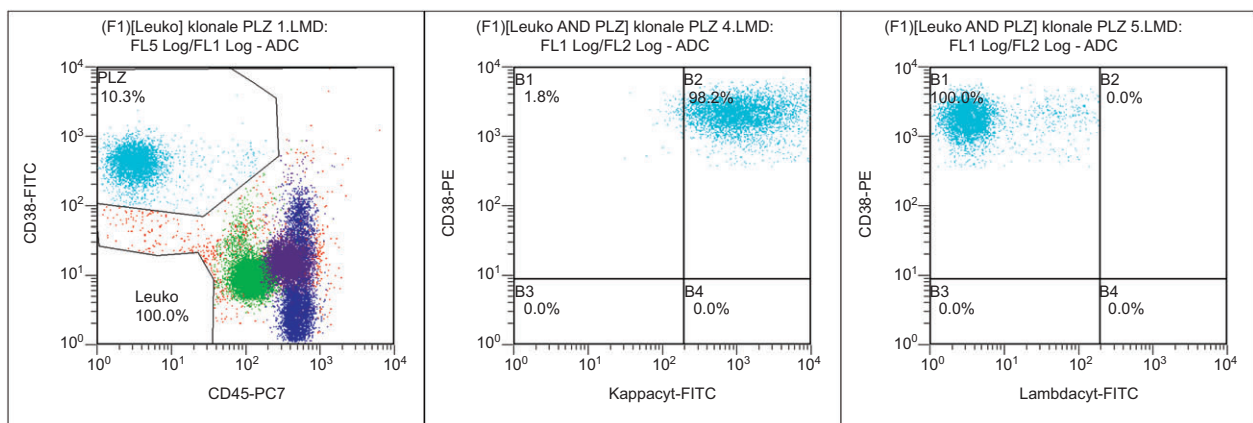


Abbildung 3 Immunphänotypischer Nachweis einer Population klonaler (κ restringierter) Plasmazellen mittels intrazytoplasmatischer Leichtkettenfärbung.

2. Im Falle einer akuten myeloischen Leukämie kann aus peripherem Blut der Verdacht eine akuten myeloischen Leukämie M3 rasch gesichert werden. Diese Leukämieform nimmt sowohl hinsichtlich der akuten Bedrohung des Patienten und in Bezug auf die Therapie eine Sonderstellung ein und kann, mit wenigen Markern verifiziert werden. Charakteristisch für die AML M3 sind höheres Seitwärtsstreulicht einer singulären Blastenpopulation und die Negativität für CD34 und HLADR bei entsprechender Morphologie. Ein ähnliches immunphänotypisches Bild wie die AML M3 hat eine akute myeloische Leukämie, die meist als FAB M1 zu klassifizieren ist und daher eine geringe Differenzierung aufweist. Im Gegensatz dazu sind bei dieser Leukämie, wie bei der AML M3, jedoch keine Progenitormarker (CD34, CD133 und HLADR) nachweisbar und man findet eine starke MPO Expression. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, ist also die Zusammenschau aus Zytomorphologie, Immunphänotyp und Genetik wichtig. Zytomorphologisch findet man bei der AML M3 diese anders als bei der undifferenzierten AML M1 mit ähnlichem Immunphänotyp wie die AML M3 diese in der Regel Promyelozyten. Molekulargenetisch kann AML M1 durch das Vorkommen einer NPM1 Typ A Mutation sowohl von der FAB M3 als auch von den anderen FAB M1 Leukämien abgegrenzt werden [10].

Gleichzeitig sollte bei einer AML M3 die Gerinnungssituation des Patienten analysiert werden.

Durch dieses pragmatische Vorgehen können innerhalb kurzer Zeit (ca. 2–3 Stunden) die wichtigsten Informationen für einen raschen Therapiestart zur Verfügung gestellt werden. Dies ist auch kurz vor dem Wochenende oder an Feiertagen (z.B. Freitagnachmittag oder vor Feiertagen) noch ohne größere zeitliche Probleme möglich.

Die weitere morphologische und immunphänotypische Abklärung kann dann routinemäßig aus dem Knochenmark erfolgen. Die Informationen aus dem peripheren Blut werden dabei für eine gezielte Auswahl der wiederum modular aufgebauten FACS-Antikörperpanels für die Untersuchung des Knochenmarks genutzt.

Bewährt hat sich auch ein extra zusammengestelltes Panel zur Suche bzw. zum Ausschluss von leukämischen Blasten. Eine relativ häufige Fragestellung der Einsender ist die nach dem Blastenanteil in einer Probe, leider oft ohne ein dazugehörendes morphologisches Präparat. Für solche Fälle wurde eigens ein Blastenscreening-Panel zusammengestellt. Es beinhaltet, wie oben beschrieben, solche Marker, die in erster Linie eine Zuordnung zu einer

Differenzierungslinie zulassen (CD5, CD19, CD13, CD15, CD33, CD45), neben Markern, die unreife Zellen charakterisieren, wie CD34, CD117, HLADR, CD10, sowie CD11b für reifere Zellen. Dieses Blastenscreening-Panel wird immer zusammen mit einer Lymphozytenbasistypisierung angesetzt, welche die wichtigsten T-, B- und NK-Zellmarker enthält.

Abklärung von Anämien

Eine weitere große Erkrankungsgruppe in der hämatologischen Labordiagnostik stellen die Anämien dar. Ebenso wichtig wie bei den malignen hämatologischen Erkrankungen ist auch hier eine stufenweise organisierte Diagnostik, die mit den unverzichtbaren Basisuntersuchungen beginnt.

Bei den hämolytischen Anämien z.B. dient die Basisdiagnostik zum Einen der sicheren Diagnose einer Hämolyse. Andererseits geben die Basisuntersuchungen wichtige Hinweise welche Ursachen differentialdiagnostisch in Frage kommen und welche weiteren Untersuchungen zur Abklärung der Anämie sinnvoll sind.

Zur Basisdiagnostik der hämolytischen Anämien gehören ein komplettes Blutbild mit Retikulozyten und Ausstrich, LDH, Bilirubin, Haptoglobin und ein direkter Coombstest.

Eine Übersicht über Veränderungen der Erythrozytenmorphologie bei hämolytischen Erkrankungen und die wichtigen zugehörigen Differentialdiagnosen fasst Tabelle 3 zusammen.

Wichtig ist, dass ein hämatologisches Labor eine Anämie, insbesondere eine hämolytische Anämie, frühzeitig erkennt bzw. die Verdachtsdiagnose stellt, sodass weiterführende Untersuchungen veranlasst werden. Aufgrund der zum Teil seltenen Anämieformen sind spezielle Untersuchungen teilweise Speziallaboren vorbehalten.

Im IHK und im Zentrallabor in Innsbruck werden derzeit neben den Parametern des Eisenstoffwechsels an weiterführenden Untersuchungen zur Abklärung von Anämien folgende Untersuchungen angeboten:

Bestimmung der Glukose-6-Phosphatdehydrogenaseaktivität in Erythrozyten, Hb-Elektrophorese zur Differenzierung von Hämoglobinopathien.

Die Bestimmung der ADAMTS-13 Aktivität und Inhibitors zur weiteren Abklärung einer thrombotisch, thrombozytopenischen Purpura wird im Zentrallabor Innsbruck durchgeführt. Bei dieser lebensbedrohlichen Erkrankung, muss alleine aufgrund der Verdachtsdiagnose, einer typischen klinischen Symptomatik und der Erythrozytenmorphologie (Fragmentozyten), mit einer lebensrettenden

Tabelle 3 Erythrozytenmorphologie in der Diagnostik hämolytischer Anämien. Wesentliche Differentialdiagnosen ohne Hämolyse sind bei den einzelnen pathologischen Formen ebenfalls aufgeführt. MHA: mikroangiopathische hämolytische Anämie. Kursiv: Erkrankungen mit chronischer und/oder akuter Hämolyse [11].

Bezeichnung	Beschreibung	Erkrankung
Sphärozyten	Kugelform, verändertes Volumen/ Oberflächen-Verhältnis, keine zentrale Blässe, erscheinen kleiner als normale Erythrozyten	<i>Membranopathie (hereditäre Sphärozytose)</i> Immunhämolyse mit IgG oder C3-beladenen Zellen <i>MHA (bei gleichzeitiger Anwesenheit von Schistozysten)</i> <i>Akute oxidative Schädigung der Erythrozyten</i> <i>Instabile Hämoglobine</i>
Elliptozyten	Ovale Form (Differenz beider Durchmesser > 2 µm)	Membranopathie (hereditäre Elliptozytose) <i>Thalassämie</i> Megaloblastäre Anämie (in Verbindung mit Makrozytose) Eisenmangelanämie
Stomatozyten	Unikonkav; Schlitzförmig, statt zirkuläre zentrale Aufhellung	<i>Membranopathie (hereditäre Stomatozytose)</i> In geringer Zahl bei Leberzirrhose und bei anderen Lebererkrankungen
Schistozysten (Fragmentozyten)	Abnormer bizarrer Erythrozyt (häufig Form eines Helms, eines Dreiecks oder eines Halbmondes)	Mechanische Hämolyse TTP-HUS Sekundäre TMA Seltener bei: Urämie oder maligner Hypertension <i>Sichelzellanämie</i>
Sichelzellen	Sichelförmiger Erythrozyt (oft erst nach Sauerstoffentzug durch Zugabe von Natriummetabisulfit nachweisbar)	
Target-Zellen	Erythrozyt mit abnormer Hb-Verteilung; durch Verdichtung zum Rand und im Zentrum entsteht schießscheibenartige Struktur	<i>Thalassämie</i> <i>Sichelzellanämie</i> Hämoglobin C-, D-, E-Erkrankung Seltene Hämoglobinopathien Eisenmangelanämie <i>Zieve-Syndrom</i>
Ausgeprägte basophile Tüpfelung	Ansammlung denaturierter RNA, welche sich in der panoptischen Färbung als punktförmig verteilte basophile Substanzen in Erythrozyten zeigt	<i>Thalassämie</i> <i>Instabiles Hämoglobin</i> <i>Pyrimidin-5-Nucleotidase-Mangel</i> Bleivergiftung Sideroblastische Anämie Kälteautoantikörper
Erythrozytenagglutination Heinz Innenkörper	Präzipitiertes denaturiertes Hämoglobin, welches sich in Supravital-Färbung (z.B. mit Brillantkresylblau) als basophil angefärbter Einschlusskörper zeigt (Größe ca. 2 µm). In größerer Zahl meist erst nach Splenektomie	<i>Enzymopathien mit reduzierter Glutathionbildung</i> (z.B. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel) <i>Instabile Hämoglobine</i> <i>Intoxikation durch oxidierende Substanzen</i>
Intraerythrozytäre Parasiten		<i>Malaria</i> <i>Babesiose</i> <i>Bartonellose</i>

Therapie begonnen werden. Hier trägt natürlich das erweiterte diagnostische Angebot im IHK mit gutem Informationsfluss und kurzen Wegen zu einer schnellen Bestätigung der Diagnose bei.

Durchflusszytometrische Untersuchung GPI-verankerter Moleküle aller 3 Zellreihen des peripheren Blutes dienen zur Erkennung einer paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH). Hierzu werden auf Granulozyten die Expression von CD55, CD59, CD16 und CD24 bestimmt,

sowie mittels FLAER direkt der GPI-Anker angefärbt. Auf Monozyten werden die Moleküle CD55, CD59 und CD58 untersucht und auf Erythrozyten CD55, CD58 und CD59. Das Gating der Granulozyten erfolgt über den CD45/Seitwärtsstreulicht Plot. Dies hat den Vorteil, dass man eventuell in der Probe vorhandene Vorstufen, die teilweise Antigene schwächer exprimieren, erkennen kann. Bei den Monozyten ist darauf zu achten, dass man sie nicht, wie üblich, über CD14 abtrennt, da CD14 ja GPI verankert ist.

Für eine derart stufenweise organisierte hämatologische Labordiagnostik ist eine enge Verzahnung zwischen Zytomorphologie und Immunphänotypisierung sowohl in räumlicher als auch in personeller Sicht (Biomedizinische Analytiker und Ärzte) notwendig. Vorteile einer Stufen-diagnostik umfassen die Einsparung materieller Ressourcen, aber auch von Arbeitszeit, bei entsprechend qualifiziertem Personal. Ein gezielter Einsatz des diagnostischen

Repertoires verlangt eine eingehende Auseinandersetzung mit der jeweiligen klinischen und labortechnischen Problemstellung. Diese Vorgehensweise resultiert letztlich in qualitativ hochwertigen Befunden.

Interessenkonflikt: Die Autoren erklären, dass keine wirtschaftlichen oder persönlichen Interessenkonflikte bestehen.

Literatur

1. Schwarzinger I. Den Blasten gründlich auf den Zahn gefühlt. *Arzt Patient* 2010;3:16–8.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. Auflage. Lyon: IARC Press, 2008.
3. Hurwitz CA. Distinctive immunophenotypic features of t(8/21) (q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children. *Blood* 1992;80:3182–8.
4. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T. Rare CBFB-MYH11 fusion transcripts in AML with inv(16)/t(16;16) are associated with therapy-related AML M4eo, atypical cytomorphology, atypical immunophenotype, atypical additional chromosomal rearrangements and low white blood cell count: a study on 126 patients. *Leukemia* 2007;21: 725–31.
5. Yokota H. Genetic tests of hematopoietic malignancies – principles and applications. *Sysmex J Int* 2010;20:32–42.
6. Stein H. Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome. *Dt Arztebl* 1999;96:A-3168-3176 [Heft 49].
7. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e.V. Memorandum zur hämatologischen Laboratoriumsdiagnostik DGHO 1994. Available at: http://www.dgho.de/informationen/grundlegende-dokumente/dokumentenarchiv-1/Memorandum_zurhaematologischen_Laboratoriumsdiagnostik.pdf.
8. Hallek M. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukaemia updating the National Cancer Institute – Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446–56.
9. Wolfgang H, editor. med4you. Anwendung der Durchflusszytometrie in der Leukämie und Lymphomdiagnostik. Available at: <http://www.med4you.at>.
10. Kern W, Haferlach C, Bacher U, Haferlach T, Schnittger S. Flow cytometric identification of acute myeloid leukemia with limited differentiation and NPM1 type A mutation: a new biologically defined entity. *Leukemia* 2009;23:1361–4.
11. Schubert J, Schrezenmeier H, Röth A. Hämolytische Anämien, 1. Auflage. Bremen: Uni-Med Verlag, 2009.