

Thomas Nebe*

Hämatologische Labordiagnostik bei Thrombozyten

Platelet analysis in laboratory hematology

DOI 10.1515/labmed-2014-0034

Eingang 25.8.2014; Akzeptanz 29.8.2014

Zusammenfassung: Die hämatologische Labordiagnostik von Thrombozyten weist eine Reihe von technischen Schwierigkeiten auf und stellt besondere Anforderungen an die Präanalytik. Auch der Umgang mit Aggregationsphänomenen wirft in der täglichen Routine immer wieder Fragen auf. Der Artikel fasst den gegenwärtigen Stand der Thrombozytenzählung zusammen und der notwendigen Differentialdiagnostik.

Schlüsselwörter: Durchflusszytometrie; Präanalytik; retikulierte Thrombozyten; Thrombozytenzählung; Thrombozytopenie.

Abstract: Hematological laboratory diagnostics of platelets is faced with technical difficulties and requires preanalytical considerations. The handling of platelet agglutination needs to be addressed in daily routine. This article summarizes the current state of platelet counting and subsequent differential diagnosis.

Keywords: flow cytometry; platelet counting; preanalytics; reticulated platelets; thrombocytopenia.

Einleitung

Isolierte Thrombozytopenien und Thrombozytosen gehören zum normalen Laboralltag der Blutbilddiagnostik, jedoch wird die Thrombozyten- im Vergleich zur

Leukozytendiagnostik und der Anämieabklärung oft stiefmütterlich behandelt und lediglich ihre Konzentration zur Kenntnis genommen. Dies hat sicherlich nicht zuletzt auch mit dem manuellen Aufwand einer weiteren Abklärung, den begrenzten routinediagnostischen Möglichkeiten, der komplexen Funktionsdiagnostik und der Unkenntnis der Differentialdiagnosen zu tun. Die Blutplättchen werden zu Unrecht auf ihre Bedeutung im Rahmen der Hämostase reduziert, dabei werden Thrombozyten bei Entzündungen vermehrt freigesetzt, sind über ihre Fc-Rezeptoren an Entzündungsreaktionen beteiligt und sind eines der ersten Zeichen einer Immunantwort (akut Phase-Reaktion). Das für ihre Konzentration verantwortliche Thrombopoietin wird in der Leber gebildet, die an den meisten Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Der Übersichtsartikel soll die Differentialdiagnosen beleuchten und die notwendigen Kenntnisse im Bereich der zytometrischen Messtechnik vermitteln.

Die Konzentrationsschwankungen der Plättchen innerhalb eines Individuums über die Zeit sind deutlich niedriger als es der breite Referenzbereich von 150.000 bis 350.000 Thrombozyten pro Mikroliter erwarten lässt (Abbildung 1). Die Referenzbereiche werden von Labor zu Labor und von Lehrbuch zu Lehrbuch unterschiedlich angegeben, wobei v.a. der obere Grenzwert zwischen 350.00 bis 450.000/μL schwankt. Als untere Grenze wird zumeist eine Zahl von 150.000/μL angegeben. Die Normwertstudie des Arbeitskreises Labor an gesunden Personen nach strengen Kriterien hat jedoch gezeigt, dass die Referenzbereiche schmaler als zumeist angenommen und sogar geschlechtsabhängig sind (Abbildung 2) [1].

Stufendiagnostik

Hämatologische Labordiagnostik ist natürlich eine synoptische Betrachtung aller Parameter, die eine Einordnung von Veränderungen erlauben, die in einem direkten oder indirekten Zusammenhang mit hämatologischen

*Korrespondenz: Dr. med. Thomas Nebe, Hämatologie-Labor Mannheim, Hans-Böckler-Str. 1, 68161 Mannheim, Deutschland, Tel.: +49 621-43 73 29 91, Fax: +49 621-43 73 67 33, E-Mail: thomas.nebe@haema-labor.de

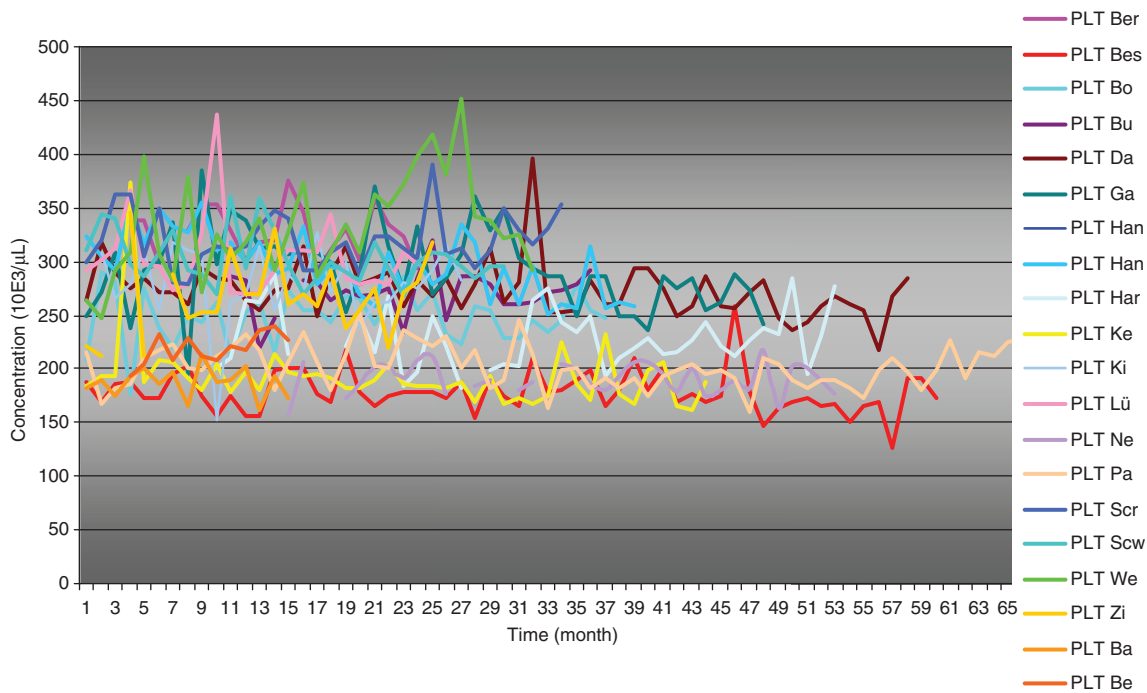


Abbildung 1 Thrombozytenkonzentration.

Breiter Referenzbereich aber begrenzte Schwankungen innerhalb eines Individuums bei gesunden Personen.

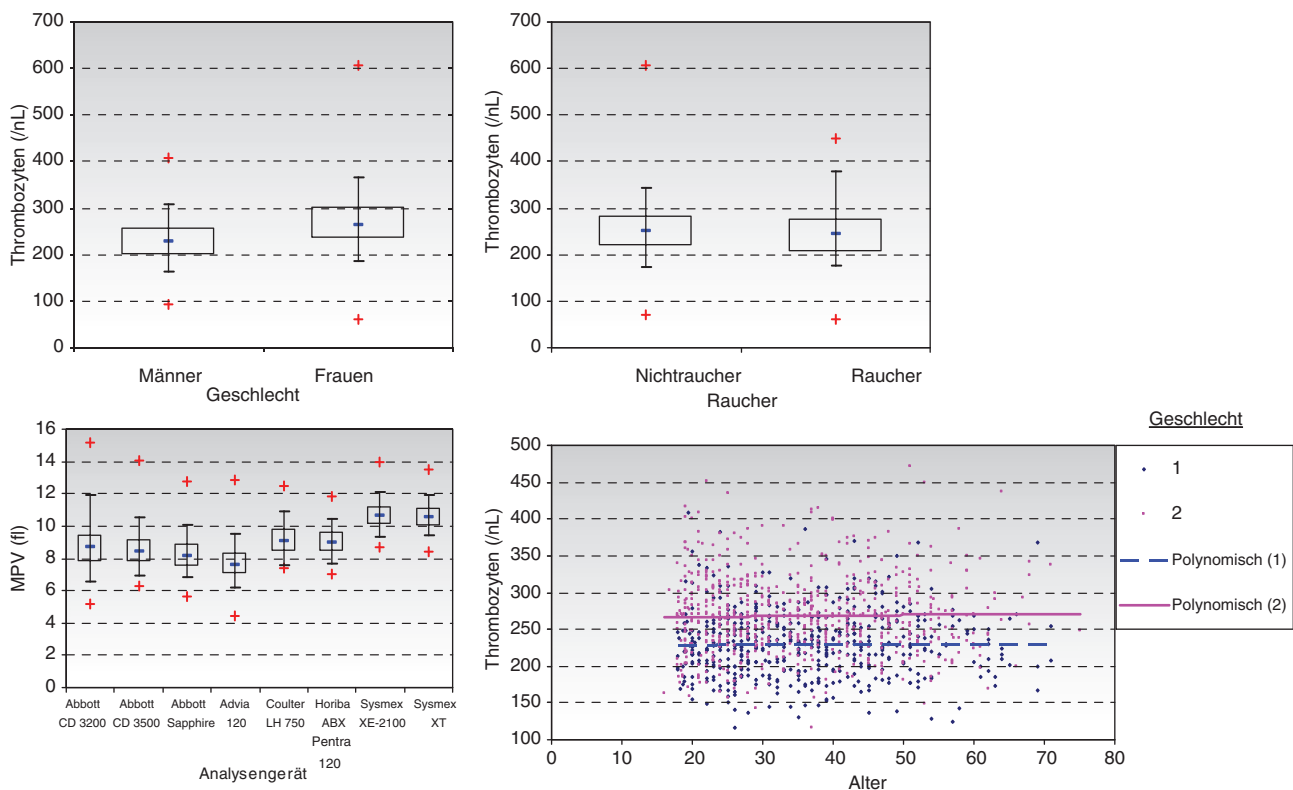


Abbildung 2 Die Thrombozytenkonzentration bei gesunden Spendern ist geschlechts- aber nicht altersabhängig.

Das mittlere Thrombozytenvolumen ist dabei eine schlecht standardisierte Messgröße. Die Whisker-Plots zeigen Median, 50er und 95 Perzentilen sowie die Extremwerte.

Erkrankungen stehen. Das Blutbild ist die häufigste Laboruntersuchung überhaupt und die Anämie ist das häufigste pathologische Ergebnis. Sie ist mit Abstand das häufigste Symptom einer gestörten Hämatopoese, beeinträchtigt das Wohlbefinden des Patienten und ist immer erklärungs- und abklärungsbedürftig. Ähnliches gilt jedoch auch für die Thrombozyten, die innerhalb enger Grenzen konstant bleiben, wobei bei Vermehrung oder Verminderung allein zunächst i.d.R. keine Beeinträchtigungen auftreten, abgesehen von petechialen Blutungen bei ITP oder Thrombosen bei der ET. Daher besteht zumeist die Frage, welche Erkrankung dem Symptom Thrombozytopenie zugrunde liegt. Wichtig ist dabei, ob es sich um eine primäre hämatologische Erkrankung handelt, z.B. eine Thrombozytose durch MPN, oder um eine sekundäre Veränderung im

Rahmen einer anderen Erkrankung (z.B. Entzündung, Infektion...) oder eine Verminderung durch Verdrängung maligner Prozesse oder immunologischer Mechanismen. Analoge Überlegungen gelten natürlich auch für die Veränderungen der Leukozyten und Erythrozyten.

Das Laborprogramm hämatologischer Diagnostik zur Abklärung einer Thrombozytopenie bzw. Thrombozytose ist eine Stufendiagnostik und es wird bestimmt durch Angebot und Nachfrage. Das Angebot ist das Parameterspektrum, was der Laborarzt meint für sein Einsenderklientel zur Verfügung stellen zu müssen und die Nachfrage ist das was der behandelnde Arzt von seinem Labor erwartet, im direkten wie auch im indirekten Zugriff durch Vergabe von Unteraufträgen (s. Tabelle 1). Die Abbildung 3 zeigt ein mögliches Szenario für eine Blutbilddiagnostik

Tabelle 1 Laborparameter bei Thrombozytopenie.

-
- Thrombozytenbestimmung in EDTA parallel zu Citrat oder Thrombexakt®
 - Thrombozytenzählung mit laseroptischen Methoden, ggf. Immunfluoreszenz
 - Großes Blutbild, manuell differenzierter Ausstrich (Ausschluss einer Pseudothrombopenie, ALL, AML, B-NHL, T-NHL!)
 - „Retikulierte“ Thrombozyten (*manuelle Färbung mit hochaffinen RNA-Farbstoffen und manuelle Auswertung notwendig*)
 - Glykoprotein-spezifische Antikörper (MAIPA, SASPA)
 - plättchen-assoziiertes Immunglobulin (höhere Sensitivität, schlechtere Spezifität, paraneoplastisch, z.B. bei CLL?)
 - Autoantikörper (ANA, Anti-phospholipid-AK, Lupus-Antikoag.)
 - Quick, Albumin, Cholinesterase (Leberfunktion)
 - Fibrinogen, D-Dimer (Gerinnungsaktivierung)
 - Megakaryozyten im KM (*Knochenmarkpunktion*) gleichzeitig Ausschluss von Lymphomen (insbes. HCL, LPL), MDS
 - PCR auf HBV, HCV, HIV, CMV, Parvovirus B19, H.pylori
 - Thrombopoietin
 - Immunglobulin-Spiegel (bei Kindern, Erwachsene v.a. IgM)
-

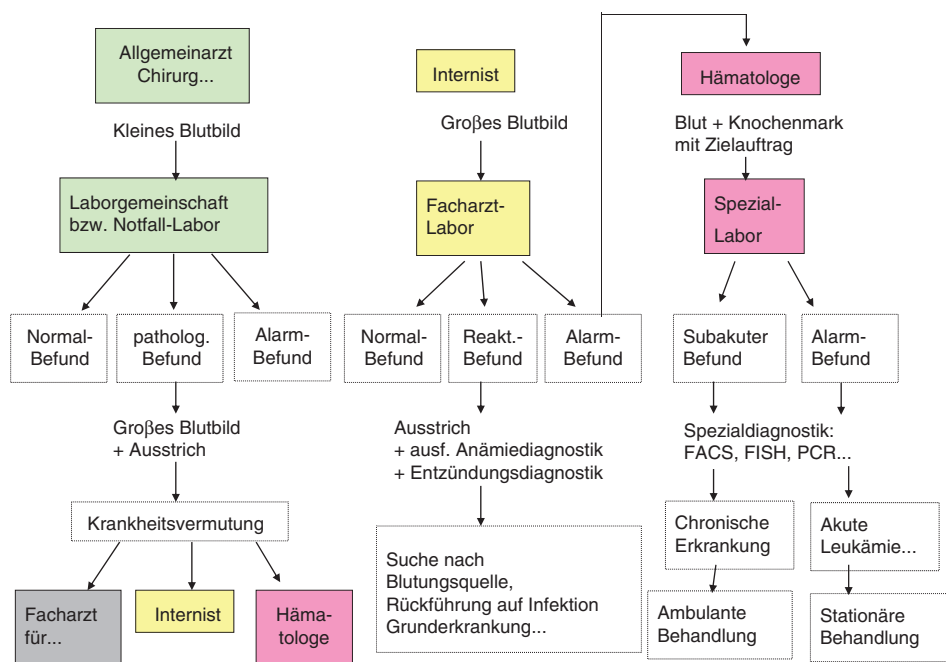


Abbildung 3 Stufendiagnostik in Abhängigkeit vom Einsenderklientel.

für die unterschiedlichen medizinischen Fachgebiete. Über allen möglichen Szenarien liegt eine wie auch immer geartete Stufendiagnostik bei der auch heute noch, selbst wenn manche Autoren etwas anderes suggerieren möchten, das manuelle mikroskopische Differentialblutbild immer noch eine entscheidende Rolle spielt. Man kann unter pragmatischen Gesichtspunkten ein diagnostisches Sieb definieren, um laborökonomisch sinnvoll mit den Ressourcen umzugehen und eine kosteneffiziente Diagnostik zu betreiben. Was die zelluläre Seite betrifft, ist es in Abbildung 4 dargestellt. Hämatologiegeräte nach dem Coulter-Prinzip müssen bei Thrombozytopenie und je niedriger umso eher durch laseroptische Geräte kontrolliert werden, die wiederum von fluoreszenzoptischen Methoden mit Nukleinsäurefarbstoffen und diese wiederum durch immunphänotypische Methoden kontrolliert werden. Die Aggregatbildung sollte dabei möglichst früh mikroskopisch ausgeschlossen werden, weil die Warnhinweise (sog. flagging) bei den meisten Geräten auch neueren Baujahrs relativ insensitiv sind. Die Aggregate liegen meist am Rand und am Ende der Fahne des konventionellen Ausstrichs der von den automatisierten Mikroskopen nicht untersucht wird (DM-Systeme, Fa. CellaVision, Lund, SE, HemaCAM, Fa. Horn Imaging, Aalen, DE u.ä.) im Gegensatz zum kapillären Ausstrich nach dem Prinzip eines in der Markteinführung befindlichen Gerätes (Bloodhound bzw. Cobas m511, Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, DE).

Megakaryopoese und Thrombopoietin

Die Megakaryopoese mit Bildung von Thrombozyten unterscheidet sich deutlich von der Erythropoese: Die Megakaryozyten bleiben ortsständig im Knochenmark und ihre in die Sinusoide der postkapillären Venolen



Abbildung 4 Diagnostisches Sieb.

hineinragenden Zellfortsätze setzen fortlaufend Thrombozyten frei. Je älter und reifer die Megakaryozyten werden, umso größer werden sie und umso mehr Thrombozyten können sie pro Megakaryozyt freisetzen (Abbildung 5). Bei der Immuntrombozytopenie (IgG-vermittelter M. Werlhof) ist dies im Knochenmarkbröckelausstrich besonders gut zu sehen, wie durch den vermehrten Bedarf die Megakaryozyten frühzeitig die Thrombozyten freisetzen, wodurch sie kleiner und die präformierten Thrombozyten deutlicher zu sehen sind (ineffektive Megakaryopoese, s. Abbildung 6). Die Zahl der pro Megakaryozyt freigesetzten Thrombozyten ist dabei deutlich geringer.

Im Gegensatz zu den übrigen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wird Thrombopoietin (TPO) in den Hepatozyten in einer konstanten Menge produziert, unabhängig vom Bedarf. Nach der Abgabe in das Blut wird das TPO an Thrombozyten gebunden. In dieser Form ist es inaktiv. Eine Stimulation auf die Megakaryozyten (MK) erfolgt nur durch freies, ungebundenes TPO. Bei einer Thrombozytose wird viel TPO an die Plättchen gebunden, der freie Anteil ist klein, der Impuls auf die MK gering. Folge: Die Thrombozytenzahl fällt. Umgekehrt ist bei einer nicht durch Antikörper verursachten Thrombozytopenie der Anteil des freien TPO erhöht, entsprechend stärker ist die Proliferation der Megakaryozyten und Thrombozytenfreisetzung. Folge: Die Plättchenzahl steigt (Abbildung 7).

Im Gegensatz zu einer nicht immunologisch bedingten Thrombozytopenie ist bei der ITP zu wenig freies Thrombopoietin zur Stimulation der Thrombopoese vorhanden. Gleichzeitig werden vermehrt Plättchen durch die Antikörper zerstört. Die Folge ist eine Thrombopenie (Abbildung 8). Hinzu kann auch eine Hemmung der

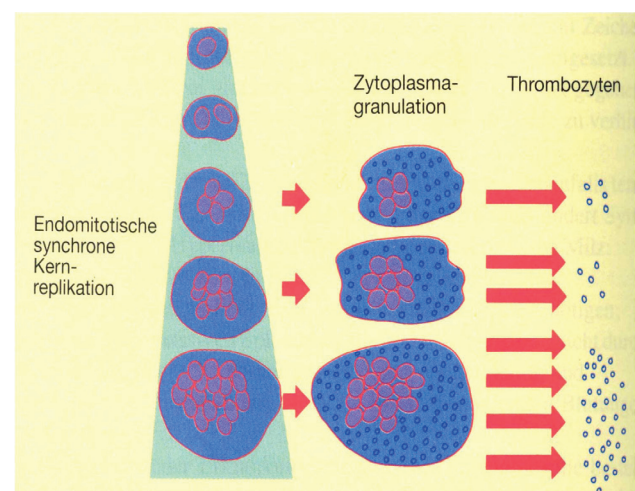


Abbildung 5 Unterschiedliche Effizienz der Thrombozytenneubildung in Abhängigkeit vom Bedarf.

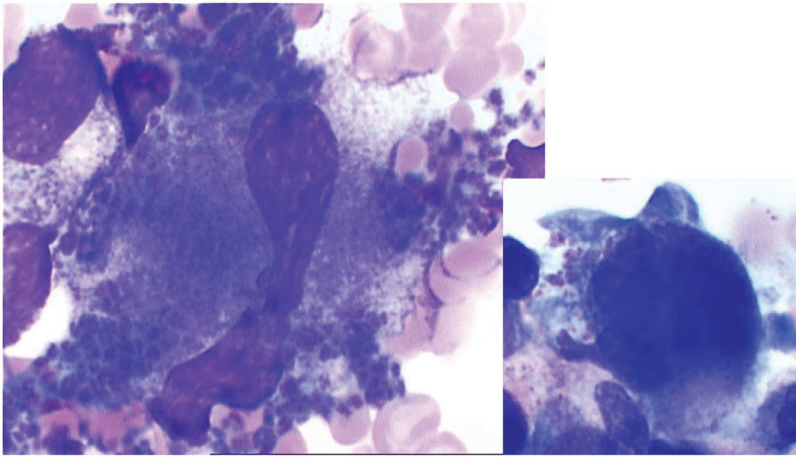


Abbildung 6 Ineffektive Megakaryopoese bei ITP und vermehrte Bildung von „retikulierten“ Thrombozyten mit erhöhtem Nukleinsäuregehalt.

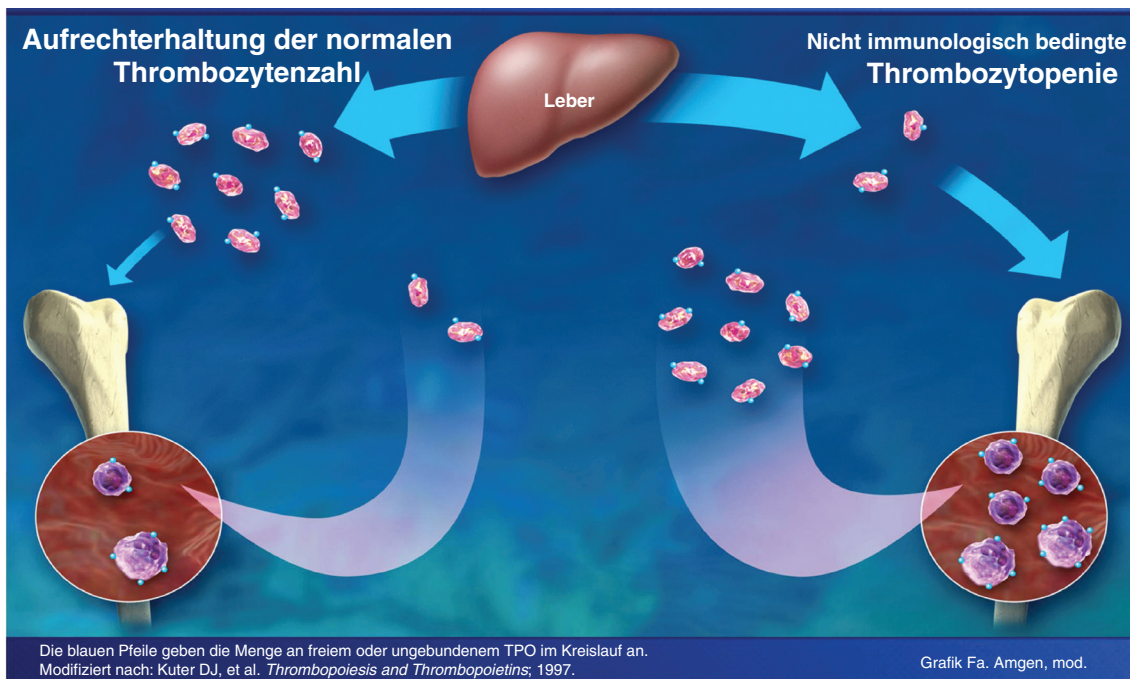


Abbildung 7 Die Konzentration von freiem Serum-Thrombopoetin steuert die Bildung von Thrombozyten.

Megakaryozyten durch zytotoxische CD8-positive T-Lymphozyten kommen.

Retikulierte Thrombozyten

Die bei der ITP verfrüht freigesetzten Thrombozyten sind im Mittel größer und enthalten deutlich mehr RNA, weshalb sie Ken Ault in Analogie zu den Retikulozyten als sog.

„retikulierte“ Thrombozyten bezeichnet hat [2, 3], nachdem Kienast erstmals den Zusammenhang zwischen dem RNA-Gehalt mit der Megakaryopoese im Knochenmark aufgezeigt hatte [4]. Im Gegensatz zu den Retikulozyten der Erythropoese ist eine netzförmige Struktur morphologisch nicht nachvollziehbar (keine netzartige Präzipitation der RNA durch Farbstoffe). Die Thrombozyten enthalten im Gegensatz zu Erythrozyten morphologisch ein sog. Granulomer, d.h. präformierte Vesikel und sekretorische Gänge, die eine unspezifische Anfärbung mit den RNA-Farbstoffen

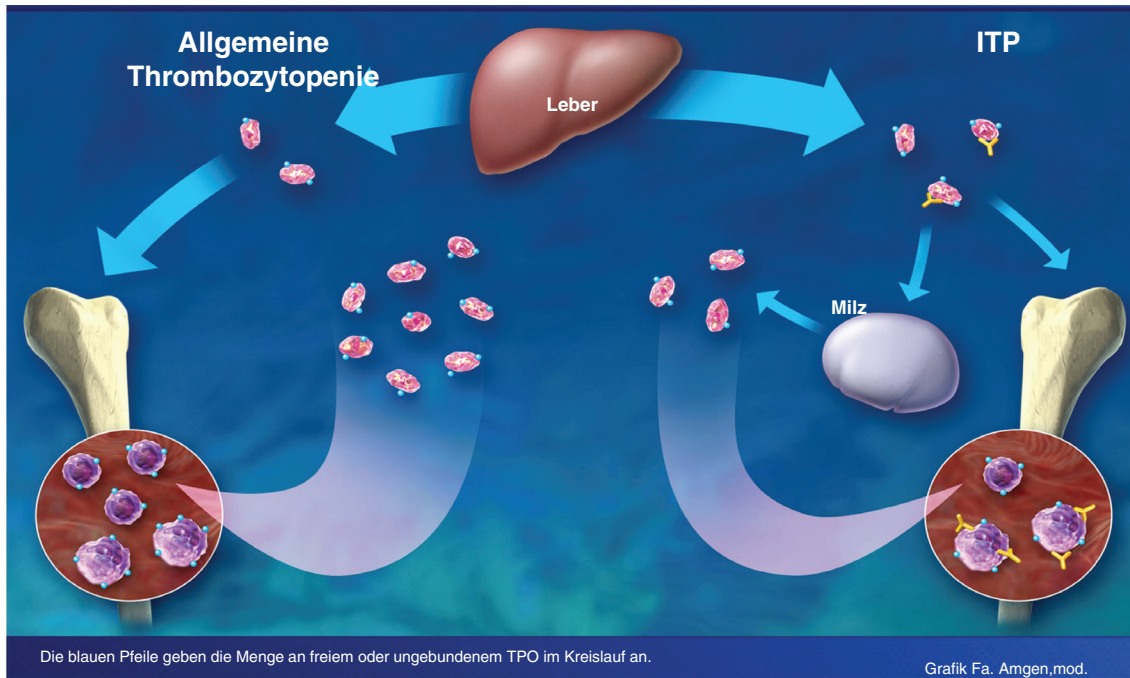


Abbildung 8 Thrombopoetin-Regulation bei Immuntrombozytopenie.

hervorrufen (Abbildung 9). Dem kann man nur durch sehr hochaffine RNA-Farbstoffe begegnen und teilweise durch eine Degranulation, z.B. mit dem Peptid TRAP6. Die im Mittel gestiegene Größe der Thrombozyten (mean platelet volume, MPV) ist mehr noch als bei den im Vergleich zu den Erythrozyten vergrößerten Retikulozyten bei den Plättchen eine unzuverlässige Größe, was die Pathophysiologie UND die Messtechnik betrifft (hohe Sensitivität, schlechte Spezifität für ITP bzw. vermehrte Regeneration) [5]. Das Granulomer ist in der Pappenheimfärbung etwas kräftiger violett abgefärbt, aber die Unterschiede sind nicht so deutlich wie im Knochenmark (Abbildung 4), da im Blut eine gewisse Ausreifung eintritt. Die Färbedauer für die Darstellung der „retikulierten“ Thrombozyten muss 15 min und mehr betragen (z.B. zwei Stunden mit Thiazolorange), was in den Hämatologieautomaten nicht erreicht wird, weshalb die derzeit am Markt befindlichen Geräte trotz gegenteiliger Behauptungen eine schlechte Spezifität für „retikulierte“ Thrombozyten besitzen, auch wenn der Zusatz von RNase als Beweisführung herangeführt wird und das Signal etwas reduziert. Daher haben sich die Erwartungen in den Nachfolgestudien zu den Originalpublikationen mit manueller Messung am Durchflusszytometer [6–12] an Routinegeräten mit Retikulozytenkanal nicht oder nur teilweise erfüllt [13–18], da die Korrelationskoeffizienten nach Spearman bei nur etwa 0,6 liegen. Dieser klinisch wertvolle Parameter der gesteigerten frühzeitigen Thrombozytenfreisetzung

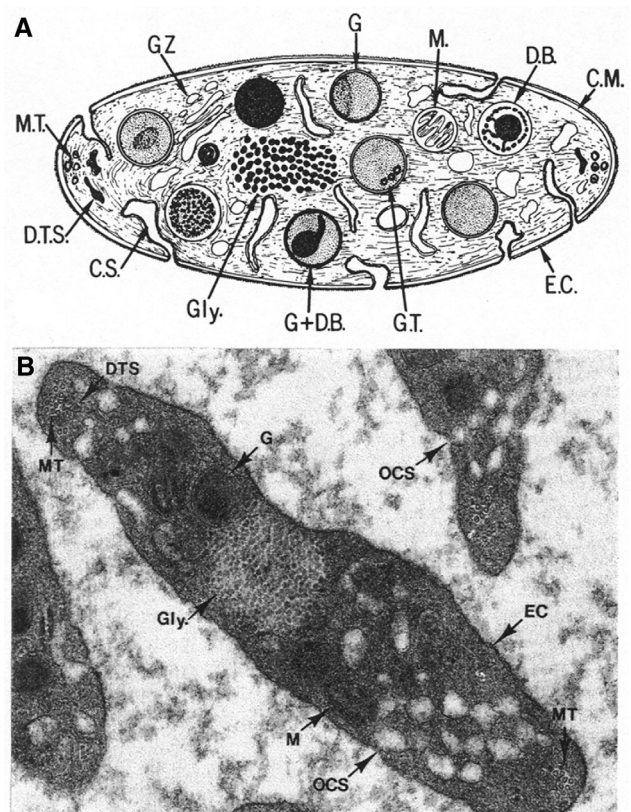


Abbildung 9 Die komplexe Binnenstruktur der Thrombozyten stört die RNA-Färbung.

hat daher selten Eingang in klinische Entscheidungen in der Differentialdiagnostik der Thrombozytopenie gefunden. Unter korrekten Färbe- und Messbedingungen zeigt sich dann eine gute Auftrennung zwischen Gesunden und Kranken (Abbildung 10). Es bleibt derzeit also nur die manuelle Färbung und manuelle Messung an einem Durchflusszytometer oder einem Hämatologiegerät nach manueller Vorbereitung (Abbildung 11). Die Hersteller der Hämatologiegeräte sehen momentan keinen Handlungsbedarf, da der Parameter bereits offiziell angeboten wird und die Validierungsdaten von der Aufsichtsbehörde (FDA) akzeptiert wurden.

Thrombozytopenie

Die Hämatologen sind durch Überweisung vom Hausarzt oft mit der Frage der Abklärung von Thrombozytopenien konfrontiert (ohne vorliegende Gerinnungsanalysen), insbesondere wenn sie nicht isoliert auftreten, sondern von Anämie oder Neutropenie begleitet werden. Umgekehrt erreichen den Hämostaseologen hämatologische Patienten und es wurden alle aufwändigen und teuren Thrombozytentests gemacht, ohne dass ein Blutaussstrich untersucht worden wäre. Die wesentliche Diagnostik bei Thrombozytopenie bleibt überschaubar (s. Tabelle 1) und ist, was die ITP betrifft, nicht unumstritten [19].

Pseudothrombozytopenie

Reflexartig stellt sich zunächst beim erfahrenen Arzt bei Erstdiagnose einer Thrombozytopenie die Frage, ob die

Thrombozytenzahl überhaupt stimmt, d.h. ob sie korrekt ermittelt werden konnte oder durch Aggregatbildung verfälscht wurde. Allen und z.T. aufwändigen Untersuchungen zur Differentialdiagnose der Thrombozytopenie voran geht daher der Ausschluss einer **Pseudothrombozytopenie**, die im Vergleich zu einer Immunthrombozytopenie viel häufiger vorkommt und nicht nur durch EDTA bedingt ist! Die Zuverlässigkeit der Anzeige der Aggregate bzw. ihr Warnhinweis ist je nach Hämatologieanalyzer mehr oder weniger unzuverlässig oder nicht vorhanden. Im Blutaussstrich liegen die großen Aggregate bei EDTA vorzugsweise am Rand oder am Ende der Fahne und können bei der Leukozytendifferenzierung übersehen werden (Abbildung 12). Angeronnene Proben weisen eher viele kleinere homogen verteilte Aggregate auf. Die Aggregate bei Essentieller Thrombozythämie (ET), einer chronisch myeloproliferativen Neoplasie, enthalten oft unterschiedlich große Thrombozyten und erhöhte Werte werden fälschlich als normal berichtet. Das Entnahmeröhrchen selbst wird mit einem Holzstäbchen auf Gerinnsel geprüft. Gerade bei venöser Abnahme bei Säuglingen kann es zu einer Verwechslung der farbigen Deckel bei den Entnahmeröhrchen kommen und das Antikoagulans hat gefehlt.

Aggregate in Form von Thrombozytenwolken haben also vielfältige Ursachen: In vitro: Angeronnene Proben, eine EDTA-induzierte IgM-vermittelte Autoaggregation, Heparin-induziert im Entnahmeröhrchen durch dessen Endotoxin-Kontamination und in vivo durch wirksame Anti-Heparin-Antikörper des Patienten (Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ I und Typ II nach Immunisierung) oder Kälteagglutinine (gehäuft bei bestimmten Infektionen (z.B. Mykoplasmen), Autoimmunerkrankungen oder Hepatitis C). Ein neues Hämatologiegerät mit Bildanalyse statt Zytometrie (Cobas M511, Fa. Roche) soll sogar die Thrombozyten innerhalb von Aggregaten einzeln zählen können.

Als **Satellitenphänomen** bezeichnet man die zirkuläre Anheftung der Thrombozyten v.a. an Neutrophile und weniger auch an Monozyten. Dieses Phänomen findet sich v.a. bei heparinisiertem Blut, sei es durch Heparin-gabe in vivo (Hochdosis bei akuter Thrombose) oder in vitro zwecks Antikoagulation (Abbildung 12).

Bei der **EDTA-assoziierten Pseudothrombozytopenie** sind niedrig-titrige IgM-Antikörper die Ursache, bei denen es sich meist um Kälteantikörper handelt. Sie verursachen im Patienten in vivo KEINE Thrombozytopenie im Gegensatz zu den in vivo auftretenden Aggregaten bei der Heparin-induzierten Thrombozytopenie nach therapeutischer Gabe, v.a. von hochmolekularem Heparin und echten Kälteantikörpern! Die Pseudothrombozytopenie entwickelt oder verstärkt sich in der Zeit nach der

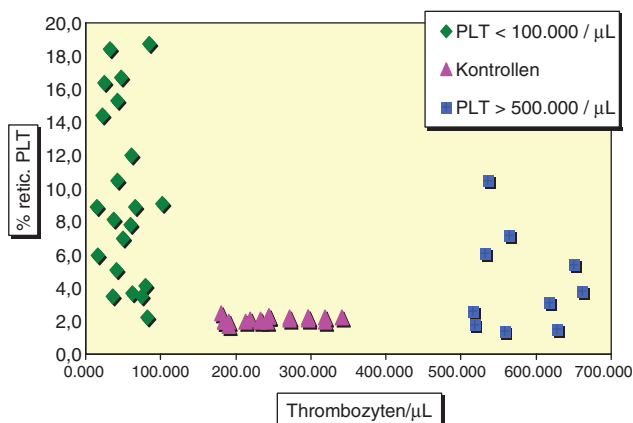


Abbildung 10 Anteil der „retikulierten“ Thrombozyten bei gesunden und unselektierten Patienten mit Thrombozytopenie oder Thrombozytose.

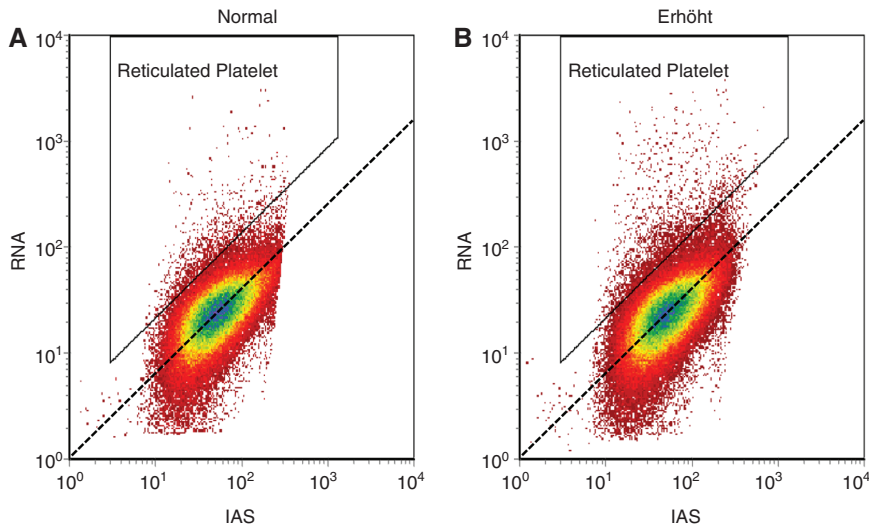
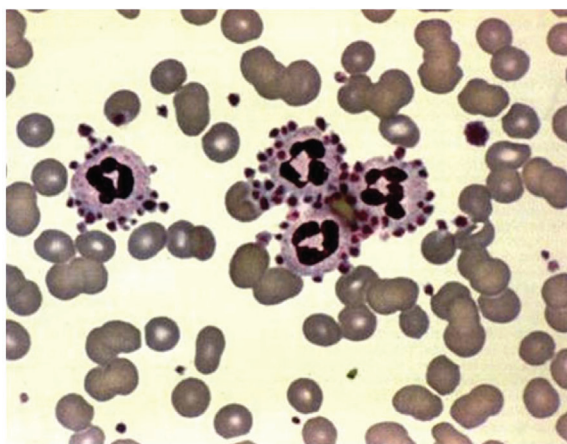
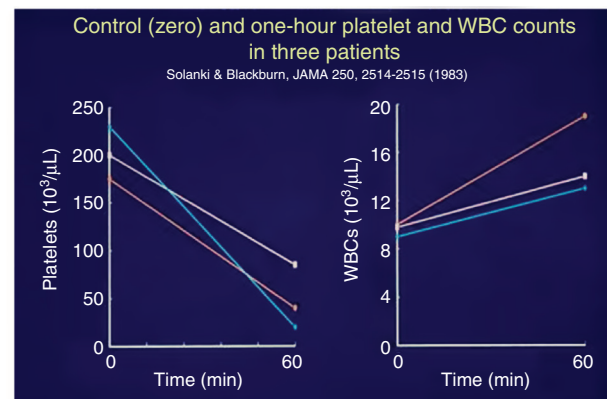


Abbildung 11 „Retikulierte“ Plättchen am CellDyn Sapphire bei manueller Vorinkubation mit dem hochaffinen RNA Farbstoff Syto61. Durch ein automatisiertes Gating wird eine verbesserte Präzision erreicht. Automatisierte Verfahren (Abbott, Sysmex) mit nur sekundenlanger Färbedauer sind wenig geeignet. Nur die zweiparametrische korrelierte Darstellung gegen die Zellgröße erlaubt eine gute Abtrennung.



Platelet Satellitism

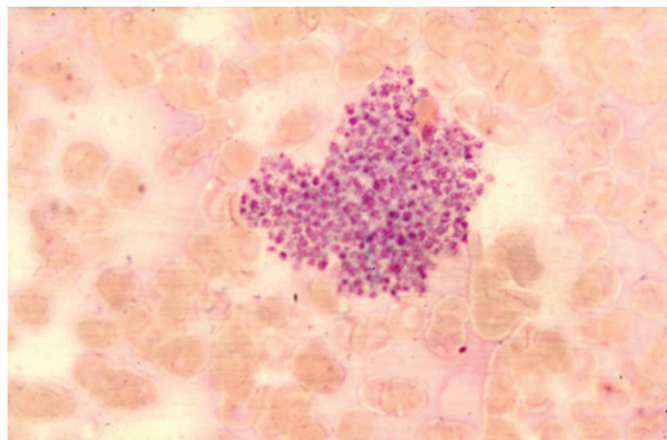


Abbildung 12 EDTA- induzierte Pseudothrombopenie und Satellitenphänomen.

Blutentnahme (>2 h) und die Probe muss daher zusätzlich nach 24 h im Kühlschrank erneut analysiert werden, wenn der Verdacht im Raum steht. Bei direkter Messung nach der Blutentnahme tritt sie meistens nicht in Erscheinung, was zu diskrepanten Werten zwischen Ambulanz mit eigenem Gerät und Zentral- bzw. Einsendelabor führt. Als Ersatz für EDTA und zur Ermittlung des wahren Wertes wird zumeist Citratblut herangezogen. In ca. 10% der Fälle einer EDTA-induzierten Pseudothrombozytopenie sind diese Antikörper jedoch auch in Citrat wirksam, weshalb ein eigenes Abnahmeröhrchen mit Magnesiumsulfat anstelle von EDTA entwickelt wurde (Thrombexakt® Fa. Sarstedt, Nürmbrecht, DE), was spätestens dann zusätzlich herangezogen werden muss. Bei Ausstrichpräparaten aus diesem neuen Entnahmesystem zeigt sich jedoch regelmäßig eine mehr oder weniger starke Aggregation der Leukozyten (Nebe, unveröffentlicht). Eine kapilläre Blutentnahme aus der Fingerbeere mit direktem Ausstrich auf einem Objektträger ist eine Alternative, die oft vergessen wird.

Da das Phänomen der EDTA-Pseudothrombozytopenie i.d.R. dauerhaft erhalten bleibt, sollten Patient und seine behandelnden Ärzte darüber informiert sein, um nicht falsche Rückschlüsse zu ziehen und z.B. eine notwendige Operation zu unterlassen oder zu verschieben oder Erkrankungen hineinzuinterpretieren. Aus diesem Grund sollte die Erstdiagnose auch eindeutig gestellt werden durch den o.g. Vergleich von EDTA mit Citrat bzw. Thrombexakt® und ggf. eine Zeitkinetik erstellt werden, was die Pseudothrombozytopenie von einer angeronnenen Blutprobe oder in vivo wirksamen Kälteantikörpern gegen Thrombozyten unterscheidet und es sollte ein eigener, getrennter Befund geschrieben werden.

Auch bei Ergebnissen im normalen Konzentrationsbereich können bei der essentiellen Thrombozythämie durch mangelhafte Auflösung der Thrombozytenwolken nach Freisetzung im Knochenmark falsch niedrige Werte gemessen werden. Da die erstgenannten In-vitro-Artefakte häufiger sind als die pathogenetisch relevanten Ursachen in vivo, hat die Beachtung des Phänomens der In-vivo-Agglutinate in der Praxis wenig Beachtung gefunden.

Umgekehrt können **Kryoglobuline**, die oft als kleine kugelförmige Präzipitate auftreten, Thrombozyten vortäuschen (Abbildung 13). Im Ausstrich sind sie manchmal ohne Kontrastverstärkung schwer zu erkennen und sie können sich unter Immersionsöl wieder auflösen. Eine andere Störgröße sind **Zytoplasmafragmente**, die durch apoptotische Abschnürungen von leukämischen Blasten v.a. bei AML und lymphoblastischen Lymphomen entstehen können und die dort auftretenden schweren Thrombozytopenien teilweise kaschieren.

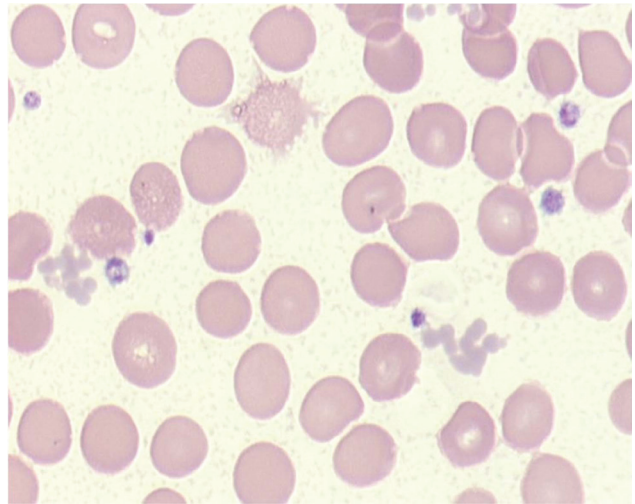


Abbildung 13 Kryoglobuline als artifizielle Thrombozyten.

Da die Thrombozyten bei der zytometrischen Messung durch ihre Teilchengröße definiert werden, können auch Erythrozytenfragmente Thrombozyten vortäuschen, wie sie beim schweren Eisenmangel oder den Erythrozytenfragmentationssyndromen vorkommen. Die immunologische Konzentrationsbestimmung unter Verwendung fluoreszenter monoklonaler Antikörper ist an dieser Stelle hilfreich. Besonders eindrucksvoll ist dieser Fehler bei den Erythrozytenfragmentationssyndromen zu beobachten (TTP, HUS, HELLP-Syndrom), wo Fragmentozyten und Thrombozytopenie gleichzeitig vorkommen. Die Impedanzänderung im Elektrolyten bei Durchtritt einer Zelle durch eine runde Messöffnung (Coulter-Prinzip, benannt nach dem Erfinder und Firmengründer Wallace Coulter) ist zwar proportional dem Zellvolumen, kann aber den Zelltyp nicht unterscheiden. Das Messergebnis eines Gerätes mit dem Coulterverfahren (bei vielen Herstellern noch verbreitet) sollte bei Werten unterhalb von $30.000/\mu\text{L}$ mit Vorsicht betrachtet und mit anderen Methoden kontrolliert werden. Laseroptische Streulichtmessungen sind vorteilhaft und der Einsatz von Farbstoffen oder besser noch Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern gegen Thrombozytenantigene (CD41, CD42, CD61) führen zu einem korrekten Ergebnis (Abbildung 14), v.a. im Zählbereich unterhalb von 30.000 Thrombozyten pro Mikroliter, welcher bei Kontrollreagenzien und Ringversuchen vornehm ausgelassen wird, was die Problematik verschleiern. Die Überprüfung der Plausibilität kann mit einfachen Methoden wie der Zählkammer nach Neubauer (Hämatozytometer) unter dem Mikroskop stattfinden oder im gefärbten Blutaussstrich aus dem Verhältnis Erythrozyten:Thrombozyten geschätzt werden. Die Präzision beider Methoden erlaubt

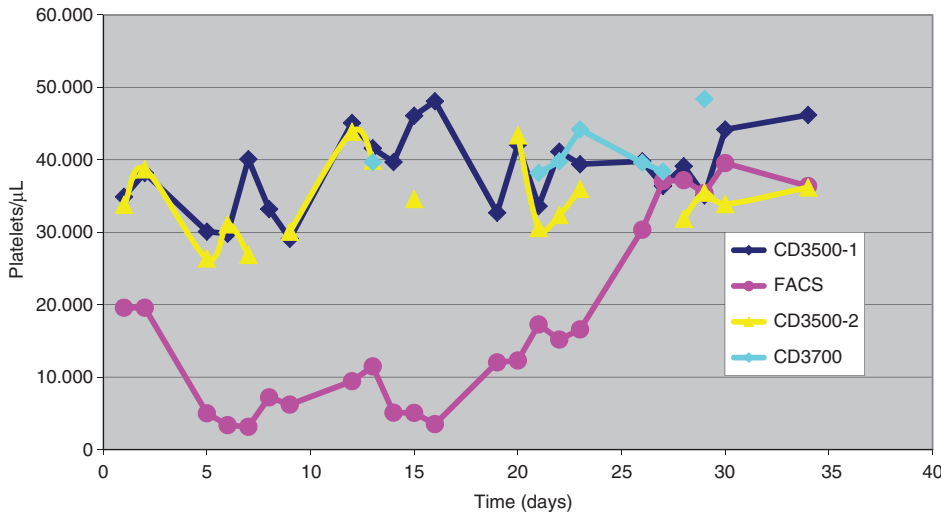


Abbildung 14 Probleme der Thrombozytenzählung in klinischen Proben.

Störung durch Fragmentozyten am Beispiel eines Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS). Die Markierung mit fluoreszenten Antikörpern liefert den wahren Wert (FACS).

keine sichere Unterscheidung z.B. von 15.000 und 18.000 PLT/ μ L. Man zählt hier in der Neubauer-Kammer 15 oder 18 Thrombozyten, die bei ITP nicht so hübsch aussehen wie bei Gesunden. Bei allem Eifer für eine korrekte Thrombozytenbestimmung sollten jedoch z.B. die möglicherweise vorhandenen Blasten einer ursächlichen z.B. akuten T-Zell-Leukämie nicht übersehen werden, weshalb die Prüfung im MGG-gefärbten Blutausschlag viel informativer ist im Vergleich zur Kammerzählung. Auch **Verunreinigungen** der Geräte- oder Waschlösungen sowie elektrische Störimpulse aus dem Stromnetz können v.a. beim einfachen Coulter-Verfahren fälschlicherweise als Thrombozyten gezählt werden und die wahre Thrombozytopenie verschleiern.

Bei einer Blutentnahme aus Infusionssystemen, insbesondere bei Intensivpatienten, kommen weitere Überlegungen hinzu, die weiter unten behandelt werden.

Die dann nach Ausschluss all der Störgrößen korrekt ermittelte Thrombozytopenie kann als solche verschiedene Ursachen haben, weshalb die korrekte Bestimmung der **retikulierten Thrombozyten** eine wichtige erste Entscheidungshilfe in der Differentialdiagnostik darstellt. Die Bildung und Ausreifung von Thrombozyten aus den Megakaryozyten wird hauptsächlich durch Thrombopoetin reguliert, welches ausschließlich aus der Leber stammt. Ausgeprägte Lebererkrankungen verursachen daher regelhaft eine Thrombozytopenie, wenn sie mit einer Synthesestörung einhergehen, weshalb Funktionsparameter wie Quick-Wert, Cholinesterase, Albuminspiegel... beachtet werden müssen. Es sei daran erinnert, dass der Thrombozytenspiegel selbst über die Rückkopplung via freiem

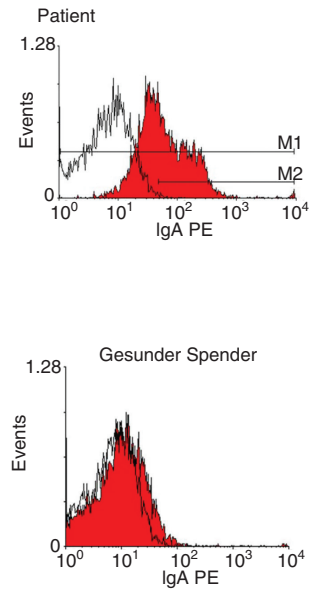
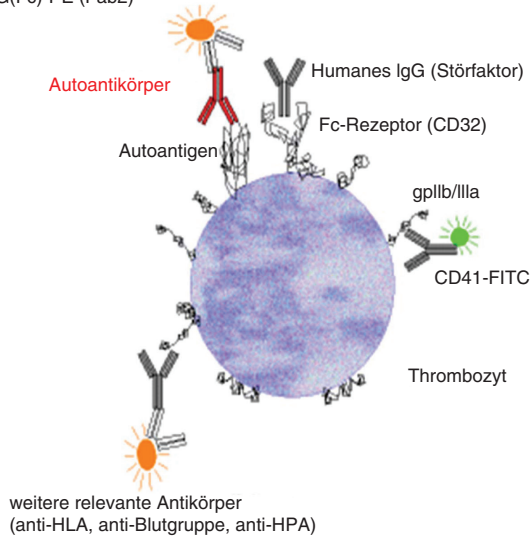
Thrombopoietin für einen relativ konstanten Thrombozytenwert sorgt. Umgekehrt täuschen die Thrombozytenfragmente mit ihren TPO-Rezeptoren bei ITP dem System einen normalen Spiegel vor und bewirken damit eine inadäquat niedrige Nachproduktion. Die Megakaryozyten können wie oben beschrieben zu jedem Zeitpunkt ihrer Reifung vor dem Erreichen ihrer maximalen Größe bei Bedarf vorzeitig Thrombozyten freisetzen und dabei je vorzeitiger umso weniger, d.h. die Megakaryopoese wird dramatisch ineffizienter. Die mikroskopischen Bilder im KM-Bröckel-ausschlag bei ITP zeigen dies eindrucksvoll (Abbildung 6).

Immunologisch bedingte Thrombozytopenien

Die Thrombozyten sind über ihre **Fc-Rezeptoren** am Transport der Immunkomplexe beteiligt und können selbst eine Zielscheibe des Immunsystems werden (Abbildung 15). Das immunogene Neoantigen kann ein kombiniertes Epitop aus infektiösem Fremdmolekül bzw. Medikament und Thrombozytenprotein sein, wodurch die Thrombozytopenie nach Abklingen der Infektion bzw. Absetzen des Medikaments wieder verschwindet, wie es bei der akuten ITP bei Kindern nach Virusinfektionen oder z.B. HIT Typ II in aller Regel der Fall ist. Wenn aber das vom Antikörper erkannte Epitop aus einer reinen Thrombozytenstruktur besteht, kommt es zur chronischen Immunthrombozytopenie (ITP, M. Werlhof), bei der die Plättchen in der Milz abgefangen werden oder T-Zell-vermittelt und gegen Megakaryozyten gerichtet, erst gar nicht hergestellt werden,

Detektion antithrombozytärer Antikörper

Anti-hu-IgG(Fc)-PE (Fab2)

**Abbildung 15** Plättchen-assoziiertes Immunglobulin und Antikörper gegen Thrombozyten.

oder apoptotisch zugrunde gehen, bevor sie Thrombozyten freisetzen können (Abbildung 16). Weiterhin verursacht ein Hypersplenismus, gleich welcher Ursache, eine Thrombozytopenie und manchmal auch eine Neutropenie. Standard bei der ITP-Diagnostik ist der MAIPA-Test, wie er von Prof. Kiefel erstmals beschrieben wurde [20]. Aber auch

die Thrombozytenantikörperbestimmung mit Immunfluoreszenz an autologen Plättchen (PIFT) ist recht erfolgreich (analog zum direkten Coombs-Test), wenn sie korrekt durchgeführt wird. Beim MAIPA werden nur die Moleküle des gpIIb/IIIa-Komplex aus Thrombozytenlysat aus EDTA-Blut des Patienten über Antikörper an die Mikrotiter

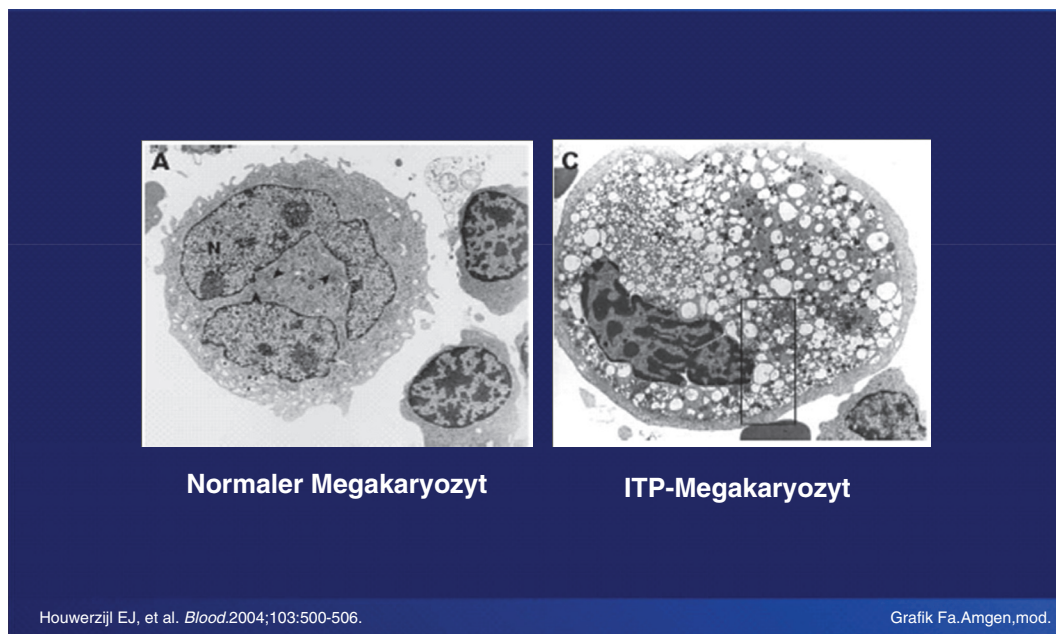


Abbildung 16 T-Zellen und Autoantikörper stimulieren Apoptose bei Megakaryozyten bei ITP. Elektronenmikroskopische Analyse eines normalen und eines ITP-Megakaryozyten zeigen dessen ausgeprägte zytoplasmatische Vakuolisierung als präapoptischen Zustand.

ELISA-Platte gebunden und mit einem anti-Human-IgG im Sandwichverfahren die Autoantikörper detektiert. Es können daher auch nur Autoantikörper gegen den gpIIb/IIIa-Komplex gefunden werden, der ein häufiges Target bei der ITP darstellt und nur die Antikörper-Klassen, die vom Zweitantikörper erkannt werden. Eine Abwandlung des Tests prüft dies auf Mikropartikel im Durchflusszytometer (SASPA-Test, Dr. Nguyen, ehem. DRK-Blutbank Mannheim) und hat weitere Capture-Antikörper hinzugenommen, die auch anti-HLA-Antikörper erfassen [21] und eine gute Übereinstimmung mit dem MAIPA zeigt [22]. Wichtig ist es dabei, IgG, IgM UND IgA-Antikörper getrennt zu erfassen: IgA wird im Original-Ansatz nicht gemessen, ist aber bei 10%–20% der ITP-Fälle positiv. IgM kennzeichnet das Anfangsstadium und, wenn es allein vorkommt, wie bei der CLL, ist bei Persistenz des IgM auch an paraneoplastische AK zu denken. Der Vorteil der selektiven MAIPA- und SASPA-Tests ist bei gelungener Dissoziation der Membranproteine die Entfernung der störenden Fc-Rezeptoren (CD32) aus dem Test, die bei inkompletter Auflösung der Membran noch vorhanden sind und so wie beim PIFT ein Hintergrundsignal verursachen, welches die Nachweisgrenze verschlechtert. Eine Fixierung der Thrombozyten ist ebenfalls kontraproduktiv, sowohl im direkten als auch im indirekten Test, denn dieser Schritt fixiert auch die FcR-gebundenen Immunglobuline und erhöht zusätzlich mit Formalin die Autofluoreszenz der Zellen. Die gewaschenen und über Nacht oder noch länger stehen gelassenen unfixierten Thrombozyten geben die FcR-gebundenen störenden Immunglobuline wieder frei, während die Fab-seitig bindenden Antikörper bleiben. Damit wird eine deutlich bessere Nachweisgrenze erreicht, die den durchflusszytometrischen PIFT als Screeningtest klinisch brauchbar macht, da er die begrenzte Sensitivität des MAIPA kompensiert. Dabei muss man den Überbegriff einer Immunthrombozytopenie (ITP) von dem klassischen M. Werlhof, der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (auch und bereits früher mit ITP abgekürzt), unterscheiden, für den der MAIPA bzw. SASPA wiederum eine bessere Spezifität besitzt. In der klinischen Praxis (Gerinnungsambulanz) sind aber viele Begleitthrombozytopenien zu finden, die v.a. im Rahmen von Infektionen, chronischer Entzündungen, Infektionen oder Lymphomen (v.a. M. Waldenström) auftreten, die man nicht als M. Werlhof bezeichnen möchte.

Die Thrombozytenfragmente nach Komplementlyse (sog. „platelet dust“) sind beim M. Werlhof noch gerinnungsaktiv, wo bereits wenige Antikörpermoleküle eines hochaffinen IgG pro Zelle zu einer Lyse führen können, weshalb diese Patienten die niedrigen Thrombozytenkonzentrationen oft ohne Blutungskomplikation tolerieren.

Die Immunkomplexe aus Membranfragmenten von Thrombozyten und Antikörpern sind auch im Zytometer noch messbar (Trigger auf fluoreszenzmarkierte Thrombozytenantigene wie CD61), stellen aber hohe Anforderungen an Test (partikelfreie Lösungen) und Messtechnik (Optik). Erstaunlicherweise existieren in den wenigsten ITP-Fällen freie Antikörper, die im indirekten Test (analog zum indirekten Coombs-Test bei den Erythrozyten) auf gesunden Test-Thrombozyten nachweisbar wären, weshalb die meisten immunhämatologischen Laboratorien den indirekten Test eingestellt haben. Eine Begründung für dieses Phänomen steht bis heute noch aus.

Ein ungeliebtes Thema ist bei den ITP-Experten die Frage nach der **zellulären zytotoxischen Immunantwort** gegen die Megakaryopoese und deren Anteil an der Pathogenese der ITP beim jeweiligen Patienten, da sie im PIFT, MAIPA- bzw. SASPA-Test nicht gesehen wird und man heute meint, auf die Antikörperdiagnostik und die KM-Punktion bei der Diagnose der ITP verzichten zu können [19, 23]. Dass dieser nicht-Antikörper-vermittelte Mechanismus existiert, ist ganz einfach in der KM-Zytologie zu sehen, da die gesteigerte Megakaryopoese trotz klinisch diagnostizierter ITP vermindert ist und PIFT, MAIPA und SASPA negativ, die retikulierten Thrombozyten nicht erhöht und keine apoptotischen Megakaryozyten zu finden sind. Die Rolle der T-Zellen bei der ITP wurde bisher auf die regulatorischen T-Zellen beschränkt [24–28] und in einer Publikation sogar die antigenpräsentierenden Monozyten vor die T-Zellen gestellt [29]. Bei einer Studie mit einem Medikament, welches LGL induziert, wurde umgekehrt der positive Zusammenhang dargestellt [30]. Viele Kollegen und so auch die Konsensusempfehlungen diagnostizieren daher angesichts der nicht unproblematischen Labordiagnostik die ITP allein über die Klinik, d.h. Anamnese und Thrombozytenzahl, da die o.g. Tests nicht ausreichend sensitiv und spezifisch (PIFT) bzw. unvollständig sind (MAIPA). Die Anzahl der benötigten zytotoxischen T-Zellen ist wie die der IgG-Moleküle gering und die Zahl der Targets ist es ebenfalls, weshalb man in der Knochenmarkzytologie morphologisch vergeblich lymphozytäre Infiltrate sucht. Wie man aus In-vitro-Untersuchungen weiß, können einzelne zytotoxische T-Zellen ihre Targetzellen (am Beispiel von Tumorzellen untersucht) nacheinander angreifen, weshalb wenige Zellen ausreichend sind. In den Fällen, in denen die ITP von klonalen T-Zellen vermittelt wird, gelingt dann dieser Nachweis von zytotoxischen Zellen im KM. Man darf sich also nicht wundern, wenn in solchen Fällen, die nicht selten sind, die klassischen Therapieansätze bei ITP, die alle auf der Autoantikörper-Hypothese basieren, ganz oder teilweise versagen (anti-D, intravenöses Immunglobulin, Rituximab, Splenektomie). Cortison

verzeichnet auch bei den T-Zellen zu Beginn einen Erfolg und dann tritt eine zunehmende Resistenz der T-Zellen ein (Apoptoseresistenz gegen Cortison). Die teuren Agonisten der Thrombopoese können dennoch einen partiellen Thrombozytenanstieg erreichen [31].

Die Oberflächenproteine der Thrombozyten sind z.T. polymorph, was das HPA-System und die HLA-Moleküle betrifft. Beide können zu einer Immunisierung führen. Die ersten sorgen für die **Alloimmunthrombozytopenie** (analog zur Neutropenie) des Neugeborenen durch Immunisierung in der Schwangerschaft und die zweiten für den Thrombozytenabfall nach Transfusion HLA-ungematchter Thrombozytenpräparate, wie sie in aller Regel verabreicht werden.

Thrombozytopenie und Thrombozytose bei hämatologischen Erkrankungen

Die Thrombozytopenie bei chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) ist ein gutes Paradebeispiel für die unterschiedlichen Ursachen der paraneoplastischen Thrombozytopenie: Es können eine Verdrängung der Megakaryopoese im Knochenmark vorliegen oder antithrombozytäre Antikörper oder ein Hypersplenismus durch Milzbefall der CLL oder auch eine Kombination davon. Dies trifft natürlich auch auf andere B-NHL zu und beim Immunozytom (LPL) ist die Thrombozytopenie fast die Regel.

Die B-NHL gehen oft mit einer reaktiven Vermehrung von LGL-Zellen einher (NK-Zellen bzw. zytotoxische T-Zellen), die gegen das Lymphom gerichtet sein können, aber in manchen Fällen durch den zytotoxischen Mechanismus zu einer Thrombozytopenie führen können mit oder ohne Neutropenie, die beide bei den large granular lymphocyte Leukämien (meist T-LGL) viel häufiger auftreten.

Bei **myeloproliferativen Erkrankungen** kommt es zwar zunächst zu einer Thrombozytose aber im Verlauf mehr oder weniger zu einer fortschreitenden Fibrose, sei es eine primäre **Myelofibrose** (nach neuer WHO-Klassifikation als PMF, früher als idiopathische Myelofibrose (IMF) oder Osteomyelofibrose (OMF) bezeichnet), die oft mit einem hyperzellulären Stadium beginnt oder eine sekundäre Myelofibrose nach Polyzythämia vera (PV), essentieller Thrombozythämie (ET) oder bei Haarzell-Leukämie (HCL).

Wenn bei einem **myelodysplastischen Syndrom (MDS)** die Megakaryopoese betroffen ist, so kommt es durch eine Reifungsstörung ebenfalls zu einer Thrombozytopenie und bei der PMF mit Myelodysplasie (MDS/MPN) heben sich die beiden Effekte Myeloproliferation und Reifungsstörung gegenseitig auf, trotz vermehrter aber eben

ineffektiver Megakaryopoese im Knochenmark. Da auch bei ITP mit gesteigerter Megakaryopoese Dysplasien vorkommen, ist die alleinige morphologische Betrachtung für die Diagnose eines MDS mit alleiniger Dysplasie der Megakaryopoese ein schwieriges Unterfangen.

Ein Sonderfall in der Gruppe der MDS ist das **5q-Syndrom**, welches mit einer Thrombozytose einhergeht und eigentlich eine eigene Erkrankung darstellt, was sich mittlerweile auch in der Therapie niedergeschlagen hat. Frauen sind häufiger als Männer betroffen und es ist auf morphologische Dysplasiezeichen zu achten.

Die KM-Metastasen solider Tumore wie auch akute Leukämien verursachen i.d.R. keine isolierte Thrombozytopenie, sondern auch eine Anämie.

Reaktive Thrombozytopenie

Die Thrombozytopenie kann auch als Begleitphänomen auftreten und ist als Thrombozytenabfall innerhalb von Stunden das früheste und führende Zeichen bei **disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC)** bzw. einer Verbrauchskoagulopathie, bei der jede Stunde einer früheren Intervention lebensrettend sein kann. Eine intelligente Maßnahme ist es daher, in der Labor-EDV einen sog. Delta-Check für Thrombozyten für Patienten aus Risikogruppen einzuführen (Intensivstationen, Sepsis-Patienten...), der Alarm schlägt, wenn die Thrombozyten plötzlich abfallen, d.h. bereits zu einem Zeitpunkt, wenn die Thrombozytenkonzentration noch im Normbereich liegt und nicht erst, wenn die Plättchen unter den unteren Grenzwert des Referenzbereiches abgefallen sind.

Thrombozytenverminderungen kommen auch regelmäßig bei Verbrennungen, Sepsis und auch bei Malaria vor, jeweils mit ungünstiger Prognose und oft mit einer DIC bzw. Verbrauchskoagulopathie verknüpft.

Wie häufig sind nun die o.g. jeweiligen Situationen Ursache der Thrombozytopenie? Solche Zahlen hängen sehr vom Setting ab: Auf Intensivstation sind es die DIC und Sepsis, beim Hämatologen die Lymphome, in der Gerinnungsambulanz die ITP, beim Tropenmediziner die Malaria... Wichtig ist, dass jeder der Spezialisten nicht nur an sein Klientel, sondern offen in alle Richtungen denkt.

Transfusion von Thrombozyten

Nach dem zuvor Gesagten wird es verständlich, warum es so schwer ist, eine fixe **Transfusionsgrenze** für Thrombozyten festzulegen: Bei ITP ohne plasmatische Gerinnungsstörung ist man toleranter, wie auch bei akuter

ITP im Rahmen von Virusinfekten und kann selbst bei Werten unter $10.000/\mu\text{L}$ zuwarten, während bei Patienten mit Gerinnungsstörung die Indikation großzügiger zu stellen ist. Ebenso wichtig wie die plasmatische Seite ist die Thrombozytenfunktion, deren korrekte Untersuchung jedoch an eine ausreichende Thrombozytenzahl gebunden ist, die gerade hier nicht vorhanden ist. Der ansonsten so geeignete Test des Funktionsmessgeräts PFA100 ist bei der Thrombozytopenie wenig brauchbar und führt in dieser Situation im Alltag oft zu Fehldiagnosen durch Fehlinterpretation. Je länger man den Patienten kennt bzw. dessen Anamnese, umso besser kann man die Situation einschätzen und die o.g. Tests entlasten. Eine Willebrand-Patientin mit Blutungsneigung hat einen anderen Bedarf im Vergleich zu einem Tumorpatienten mit einer prokoagulatorischen Situation durch die tumor-assoziierten Proteasen. Ein ITP-Patient, dessen Autoantikörper die für die Thrombozytenfunktion notwendigen Rezeptoren blockiert, hat ebenso einen anderen Bedarf im Vergleich zur normalen ITP.

Heparin-induzierte Thrombozytopenie

Innerhalb von zwei Wochen nach erstmaliger Heparin-Gabe können sich in vivo Antikörper entwickeln und zu einer Thrombozytopenie inkl. Gewebnekrosen an der Injektionsstelle führen (**Heparin-induzierte Thrombozytopenie** (HIT Typ 2)). Bei zweiter Gabe treten die Antikörperbildung und die Thrombozytopenie sofort ein. Diagnostisch gibt es bereits verschiedene Ansätze zum Nachweis der HIT TypII: Der HIPA-Test, Serotonin-Freisetzung und ein PF4-ELISA. Der einfachste Test ist eine Zählung der Thrombozyten im Vergleich±Heparininkubation in vitro im Hämatologiegerät. Der Standard des HIPA-Tests nach Prof. Greinacher dauert zwei Tage während die klinische Entscheidung (Absetzen bzw. Umstellung der Heparin-Therapie) schnell getroffen werden muss. Der Hit Typ 1 kommt mehr durch die weitere o.g. Mechanismen zustande und ist weniger dramatisch.

Andererseits gibt es auch in vivo neben der Heparin induzierten andere Antikörper-vermittelte Thrombozytopenien. Wir haben eine solche Reaktion auch nach therapeutischer i.v.-Gabe monoklonaler Antikörper gegen Gerinnungsfaktoren oder Rezeptoren an Thrombozyten gesehen.

Autoantikörper gegen Thrombozyten bzw. Immunkomplexe auf ihrer Oberfläche führen nicht nur oder immer zu einer Thrombozytopenie, sei es durch Komplement-vermittelte Lyse, Phagozytose oder Sequestrierung in der Milz: Sie können auch eine Störung der

Thrombozytenfunktion durch Blockierung der Rezeptorfunktion verursachen, sei sie durch direkte Bindung am Rezeptor oder sterisch bedingt (Immunkomplexe).

Die Autoimmunerkrankungen sind ein komplexes Feld (Medikamentös-induzierte Autoimmunerkrankung, Antiphospholipid-Syndrom, SLE, Rheumatoide Arthritis, Felty-Syndrom, M. Still... u. a.) und ebenso der Hypersplenismus inkl. der infektiologischen Ursachen, bei der parasitäre oder intrazelluläre Erreger gerne eine Splenomegalie verursachen mit geringer oder fehlender CRP-Erhöhung, weshalb die infektiöse DD oft gar nicht in Betracht gezogen wird. Auch können eine LGL-Vermehrung im Blut oder die Aufarbeitung von resezierten Lymphknoten Hinweise auf eine infektiologische Ursache geben, sofern daran gedacht und die Frage an den Diagnostiker formuliert wird.

Die Abklärung einer Thrombozytopenie ist also ein komplexes Feld und Patienten mit Thrombozytopenien sind Grenzgänger zwischen Hämatologen, Hämostaseologen und Transfusionsmediziner, da es eine übergreifende Darstellung aller Ursachen von Thrombozytopenien in der Form nicht gibt. Die Abbildung 17 fasst daher das Gesagte noch einmal zusammen.

Thrombozytenmikropartikel und Exosomen

Die Messung kleiner Partikel stellt eine besondere Anforderung an die Durchflusszytometrie dar, die oft in Unwissenheit ignoriert werden. Es hat sich daher eine „small particle interest group“ etabliert, die sich mit dem Thema intensiv befasst. Wichtig sind die Partikelfreiheit aller Lösungen (Hüllstromflüssigkeit, Waschlösungen und Antikörperreagenzien) und die Notwendigkeit eines inline-Sterilfilters, der die Dreckpartikel aus den Schlauchleitungen eliminiert, die Anpassung des Durchmessers des Laserstrahls und das Rauschsignal des Lasers. Da mit dem Volumen des Partikels auch seine Fluoreszenzintensität abnimmt, muss das Licht effektiv gesammelt werden (numerische Apertur der 90° -Sammellinse, Immersion der 90° -Linse (Ankopplung an die Messküvette), Anzahl der Filter im Lichtweg des Fluoreszenzlichts, Hohlspiegel vor der Küvette gegenüber der 90° -Sammellinse, Einbringen eines Schlitzes auf Bildebene zum Ausblenden der Umgebungsfluoreszenz um die Zelle herum im Laserstrahl (Reduktion des Hintergrund aus dem „illuminated volume“). Als Triggerparameter sind bei kleinen Partikeln Engwinkelvorwärtsstreulicht (FSC) und axialer Lichtverlust (ALL)

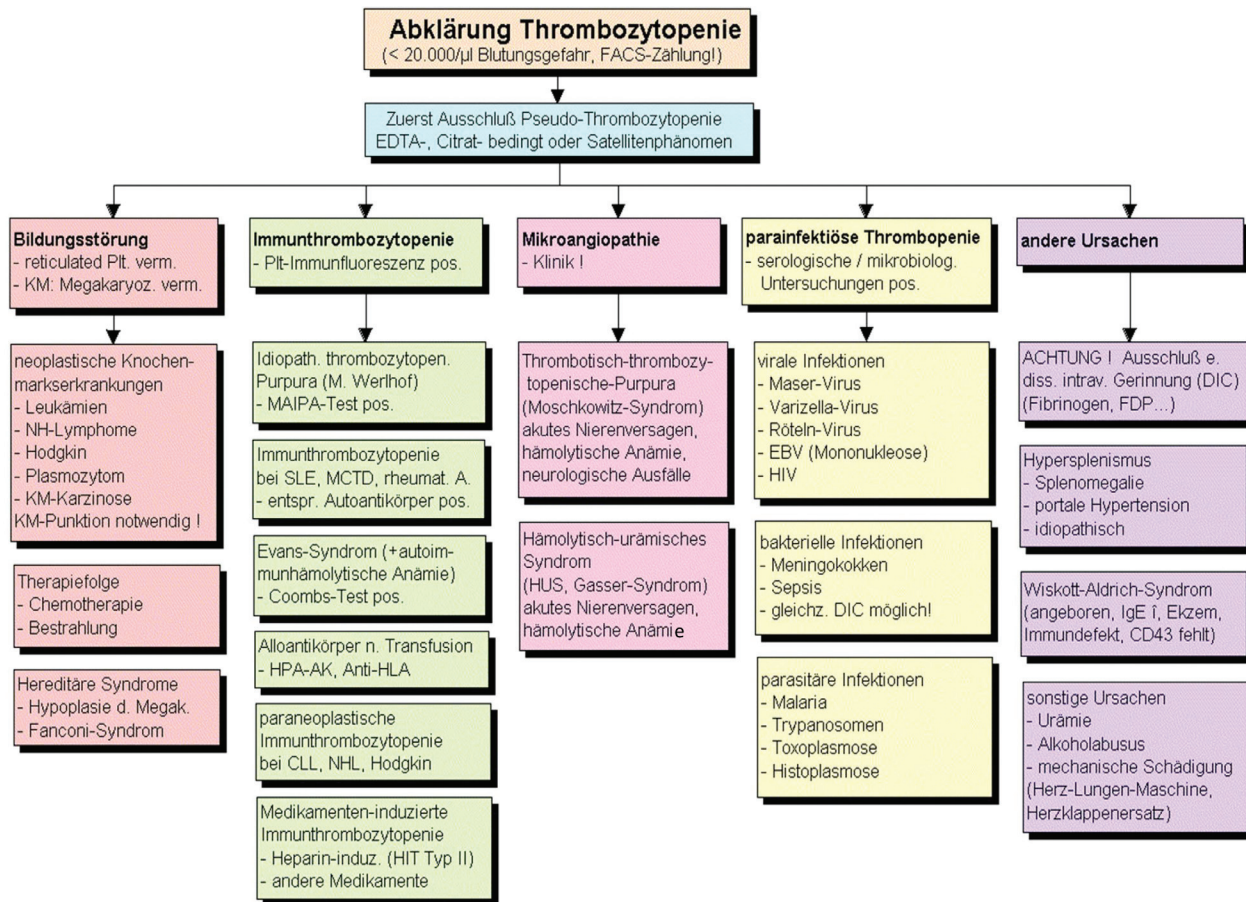


Abbildung 17 Abklärung der wichtigsten Ursachen einer Thrombozytämie.

wenig geeignet und das 90°-Streulicht (SSC) und v.a. die Fluoreszenz von Nukleinsäurefarbstoffen und die Immunfluoreszenz bieten sich an. Aber auch hier muss durch logische Verknüpfungen und Mehrfarbfluoreszenz sichergestellt werden, dass wirklich das analysiert wird, was man meint zu messen. Blut enthält insbesondere nach Erythrozytenlyse deren Fragmente bzw. Ghosts (je nach Reagens), Kernfragmente von Granulozyten u.a. Störfaktoren. Die paramedizinische Disziplin der Dunkelfeldmikroskopie lebt von einer Interpretation der zahlreichen Mikropartikel im Blut neben den eigentlichen Blutzellen.

Je geringer die Konzentration der Zielpopulation bzw. deren Anteil an den Messereignissen, umso mehr spielt eine Multiparameterstrategie eine Rolle. Zunächst kann eine alternative Triggerstrategie helfen (z.B. CD61 als Messschwelle) und den steigenden Messzeiten kann man eine Voranreicherung über eine immunmagnetische Säule entgegensetzen. Aufgrund der anspruchsvollen Messung werden die Mikropartikel momentan noch keinen Eingang in die klinische Diagnostik finden.

Thrombozytose

Ähnlich der Pseudothrombozytopenie gibt es im umgekehrten Sinn eine **Pseudovermehrung** in Form von Kryoglobulinen, die kugelförmige Präzipitate bilden können (Abbildung 13). **Reaktive** Thrombozytosen können bei Intensivpatienten Werte bis $1,2 \text{ Mio}/\mu\text{L}$ erreichen, weshalb die Höhe der Thrombozytenzahl kein sicheres Kriterium für eine Unterscheidung zwischen einer reaktiven und einer **myeloproliferativen Erkrankung** wie der ET oder PMF darstellt. Der Thrombozytenanstieg ist oft das erste Zeichen bei einer Infektion (TPO als akut-Phase-Protein). Die Anisozytose und Größe der Thrombozyten ist ebenfalls kein sicheres Zeichen zur Unterscheidung reaktiver und autonomer Plättchenvermehrung. Hingegen können bei einer Thrombozytose (!) kleinere bis mittlere Aggregate im Ausstrich ein Hinweis auf eine ET sein, die häufig bei diesen Patienten bereits im KM auftreten, wo sich die Thrombozytenwolken nach Freisetzung bzw. Abgabe aus den Megakaryozyten nicht mehr vereinzeln. Der Verdacht liegt insbesondere dann nahe, wenn die Thrombozyten im Aggregat unterschiedlich

groß sind. Der Zusammenhang zwischen solchen In-vivo-Aggregaten und der Thromboseneigung bei nicht wenigen Patienten mit ET ist noch nicht geklärt. Folglich muss auch bei Thrombozytose die Thrombozytenzahl im Ausstrich zumindest bei Erstdiagnose überprüft werden! Schwankende Thrombozytenzahlen im Verlauf sind bei solchen Patienten mit ET relativ typisch. Ansonsten ist der lineare Thrombozytenanstieg über längere Zeiträume (Monate) ein gutes Kriterium für eine CMPE, während reaktive Veränderungen ein An- und Absteigen verursachen bei der innerhalb eines Individuums konstanten Thrombozytenkonzentration ($\pm 5\%$, s. Abbildung 1).

Das Ausmaß der Thrombozytose bei myeloproliferativen Erkrankungen ist bei einer CML geringer ausgeprägt, ebenso bei einer PV. 50% der ET sind wie die PV positiv für eine Mutation im JAK2-Gen, weshalb diese wie auch das bcr-abl-Fusionsgen sowie die MLL- und Calretikulin-Mutationen via PCR bei solchen Patienten untersucht werden müssen. Dabei kann peripheres Blut herangezogen werden und zunächst dem Patienten eine KM-Punktion erspart bleiben. Die primäre Myelofibrose zeigt in der präfibrotischen hyperproliferativen Phase ebenfalls eine Thrombozytose, die zumeist unter $750.000/\mu\text{L}$ bleibt. Die Trennung zwischen ET mit sekundärer Myelofibrose und dem präfibrotischen Stadium einer primären Myelofibrose mit ihrer regelhaften Thrombozytose ist ein schwieriges Unterfangen und neue molekularbiologische Untersuchungen zeigen eine enge Verwandtschaft der beiden Erkrankungen [32].

Die Thrombozytose bei **5q-Syndrom**, einer Unterform des MDS, liegt ebenfalls meist unter $750.000/\mu\text{L}$, der von Wintrobe genannten arbiträren Grenzzahl zwischen reaktiver und autonomer Vermehrung bei ET, die von Kvasnicka und Thiele auf 500.000 gesenkt wurde [33].

Die refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (**MDS-RARS**), eine weitere Sonderform des MDS, kann ebenfalls mit einer Thrombozytose assoziiert sein (RARS-T), weshalb hier neben der SF3B1-Mutation der RARS auch die o.g. Mutationen gesucht werden müssen. Beide sind aber nicht in allen Fällen positiv und eine Eisenfärbung eines bröckelreichen KM-Ausstrichs bleibt anzustreben [34].

Ein ausgeprägter **Eisenmangel** ist zumeist mit einer leichten Thrombozytose assoziiert, weshalb ein Eisenmangel bei Entzündung oder CMPE die Thrombozytose verstärkt (Beispiel M. Crohn). Die Thrombozytenzahlen liegen hier meist unter $500.000/\mu\text{L}$. Technisch kann dies auch durch die dann ausgeprägte mikrozytäre Anisopoikilozytose mit Schistozyten bedingt oder verschärft sein, weshalb in diesen Fällen die Trennung der Thrombozyten und Erythrozyten im Histogramm bzw. der Messpunkt wolken kontrolliert bzw. der Warnhinweis des Gerätes bei mangelhafter Trennung beachtet werden muss.

Thrombozytenfunktion

Die Analyse der Thrombozytenfunktion ist eine Domäne der Hämostaseologen und es gibt in dem Bereich wenig Standardisierung. Jeder der Experten auf dem Gebiet hat neben der PFA-100-Analyse (Fa. Siemens), wo die Verschlusszeit einer Öffnung nach Stimulation gemessen wird, eine eigene Methode oder Modifikation entwickelt, weshalb unterschiedliche Geräte am Markt sind und kein Konsens besteht [35]. Oft wird die Tatsache fälschlich vernachlässigt, dass diese Tests von einer ausreichenden Thrombozytenkonzentration abhängen und ihre Ergebnisse bei Thrombozytopenie nicht verwertbar sind. Die umfangreiche Bestimmung der Neoexpression aktivierungsabhängiger Moleküle auf Thrombozyten u.a. im Rahmen der Arterioskleroseforschung der letzten Jahrzehnte hat sich in der Routine nicht durchsetzen können. Dies hat mit den Scherstress-Bedingungen für die Thrombozyten bei der Blutentnahme zu tun (enge Nadel, Verbindungsschlauch zwischen Entnahmenadel und Entnahmeröhrchen) obwohl es mittlerweile verschiedene, d.h. nicht standardisierte Stabilisierungslösungen gibt, die z.T. als Geheimrezept kommerzialisiert wurden. Der empfindlichste Aktivierungsparameter ist ihr Formwandel noch vor einer gesteigerten oder Neoexpression von Oberflächenantigenen [36]. Der Formwandel der Thrombozyten (shape change) von diskoid zu gestreckt ist zwar ein früher und sensitiver Marker einer Aktivierung, jedoch erzeugt er keinen guten Signalunterscheid im Streulicht (FSC vs SSC) bei der durchflusszytometrischen Analyse, d.h. es gibt keine gute Messmethode dafür. Eine interessante Alternative dazu ist die bereits genannte Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen ex vivo, die recht stabil und reproduzierbar sind. Die Anheftung von Thrombozyten an Monozyten ist dabei besonders interessant und wurde in der Arteriosklerose-Forschung bereits vor vielen Jahren als prätrombotischer Zustand identifiziert durch simultanen Nachweis von Monozyten- und Thrombozytenmarkern auf zirkulierenden Monozyten im Vollblut [37]. Die Adhärenz an Zellen wie Monozyten ist also ein stabiles und ex vivo einfach messbares Korrelat ihrer Aktivierung in vivo und daher weiterhin aktueller Gegenstand der klinischen Forschung [38, 39].

Die Voraktivierung von Thrombozyten bei der Blutentnahme ist ein heikles Thema, bei dem es unterschiedliche Ansichten bei Experten gibt. In jedem Fall ist eine großlumige Kanüle und eine langsame Entnahme mit geringen Scherkräften und wenig Kontakt mit Fremdoberfläche (keine Schläuche, d.h. Butterfly) eine gemeinsame Forderung. Eine detaillierte Thrombozytenfunktionsanalyse ist immer an ein bestimmtes Labor und die Interpretation des

jeweiligen Experten gebunden und erfordert immer eine frische Blutentnahme, weshalb sich der Patient im jeweiligen Labor vorstellen muss, nicht zuletzt weil die speziellen Antikoagulanzen nur dort verfügbar sind.

Präanalytik und Antikoagulantien

EDTA

Für die korrekte Thrombozytenzählung ist eine strikte und schnelle Antikoagulation erforderlich. Unter Routinebedingungen wird im Praxisalltag derzeit nur der Kalziumchelator EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) eingesetzt, obwohl auch Citrat und ACD dies gewährleisten. Die Blutzellen reagieren unterschiedlich darauf und die Neutrophilen am empfindlichsten. Die EDTA-bedingte Blutalterung beginnt spätestens nach 6–8 Stunden, unterschiedlich je nach Person. Thrombozyten hingegen sind über mehr als drei Tage für Zählzwecke stabil. Die Konformation und Expression ihrer membrangebundenen Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren hingegen hängt sehr vom Antikoagulant und den Transportbedingungen ab [40, 41]. Die Temperatur beschleunigt den Vorgang, aber auch die Kühlung der Probe verhindert ihn nicht. Dies macht die Versandproblematik deutlich, die die Anfertigung eines ungefärbten Blutausstrichs direkt nach der Probenentnahme verlangt. Es existieren zwei Formen, K2-EDTA und K3-EDTA. Die zwei unterschiedlichen Salze führen sogar zu leicht unterschiedlichen Referenzbereichen für das Blutbild, wobei die Veränderungen nicht unumstritten sind [42, 43]. Eine der Ursachen ist, dass EDTA eine gewisse Einwirkzeit benötigt, was den Hydratationszustand der Zellen betrifft, weshalb eine frisch entnommene Blutprobe mind. 15 Minuten warten sollte, bevor die Messung begonnen wird. Für Thrombozytenuntersuchungen ist EDTA plus Citrat-Theophyllin-Adenosin-Dipyridamol (EDTA-CTAD) als Ersatz vorgeschlagen worden [44].

Heparin

Bei einer Blutentnahme in **Heparinröhrchen** kommt es relativ häufig zu einer Autoaggregation von Thrombozyten und Neutrophilen oder zu einem sog. Satelliten-Phänomen, wo sich die Thrombozyten rosettenförmig an Neutrophile anlagern. Das Phänomen ist spenderabhängig unterschiedlich stark ausgeprägt und kommt neben der Polyanionen-Wirkung des hochmolekularen Polymer Heparins und dessen unspezifischer Bindung, v.a. durch

den Endotoxin-Gehalt des ungereinigten Heparins der Entnahmeröhrchen und Aktivierung insbesondere der Neutrophilen zustande. Heparin für Blutentnahmesysteme wird als Massenprodukt aus unsteriler Schweinedarmmukosa aus Schlachthöfen gewonnen. Heparinblut wird bei der Leukämietypisierung gerne als Antikoagulant eingesetzt, da zytogenetische Untersuchungen mit Wachstum in Stimulationsmedien einen Kalziumentzug verbietet und die längere Haltbarkeit bei Versand vorteilhaft ist. Neben der störenden Aggregatbildung führt die Anheftung der Thrombozyten an Monozyten oder myeloische Blasten bei der Immunphänotypisierung zu einer Fehlinterpretation der Expression von megakaryozytären Antigenen, was daher immer eine visuelle fluoreszenzmikroskopische Kontrolle erfordert. Eine Blutbildbestimmung aus Heparinblut ist daher obsolet und für die Immunphänotypisierung sind immer noch Kalziumchelatoren erforderlich. Es ist an der Zeit, dass gereinigte Heparine bzw. Analoga wie Hirudin zum Einsatz kommen [45].

Citrat

Citrat muss in flüssiger Form vorgelegt werden und die 10%ige Verdünnung des Blutes bei vollständig gefülltem Röhrchen muss bei Konzentrationsbestimmungen berücksichtigt werden, ein vollständig gefülltes Röhrchen vorausgesetzt (ebenso für die Rekalzifizierung bei den Gerinnungstests). Daher liegt der Citratwert bei Vergleichsmessungen meist fälschlicherweise unter dem EDTA-Wert. Citrat verbessert die Haltbarkeit der Neutrophilen in nur geringem Maße, ist aber für Thrombozyten gut geeignet. Unzentrifugiert kann es bei fehlendem EDTA-Blut als Ersatz dienen. Die Zentrifugation zur Herstellung von Citratplasma für die plasmatische Gerinnungsdiagnostik ist aber ein Automatismus im Labor, der oft kaum zu verhindern ist.

Thrombozytenfunktionsuntersuchungen und Messung der Antikörperbeladungen werden am besten aus thrombozytenreichem Plasma durchgeführt, welches durch einfache Zentrifugation bei nur 100 g aus Citratblut gewonnen wird.

ACD (acid citrate dextrose) ist als Zusatz in den Blutkonserven in Verwendung und eignet sich für die Zählung in ähnlicher Weise wie Citrat. Für andere Thrombozytentests liegen aber keine verlässlichen Validierungsdaten vor.

Entnahme aus Infusionssystemen

Methode der Wahl ist die direkte, langsame Entnahme von venösem Blut mit möglichst weitlumigen Stahlnadeln

am sitzenden oder ersatzweise liegenden Patienten (Einfluss auf den Hämatokrit). Auf Intensivstation ist eine häufige Blutentnahme pro Patient an der Tagesordnung zu der jedoch bei Entnahme aus einem Infusionsschlauch korrekterweise eine Vorentnahme von mind. 10 mL Blut gehört angesichts der komplexen Verkabelung und des durch Infusion verdünnten Blutes in der Armvene. Nach einer Woche Intensivstation wird i.d.R. eine Menge an Blut entnommen, die der Menge einer Blutkonserve (Erythrozytenkonzentrat) entspricht, was unethisch ist, wie auch zusätzliche Blutentnahmen zu Studienzwecken ohne Einverständnis des Patienten. Die Vorwegentnahme wird dann z.T. weggelassen oder vergessen, was inkorrekte Werte ergibt und den Vorwertvergleich erschwert und Studienergebnisse verfälscht. Die daraus resultierende Frage, ob eine Thrombozytopenie durch Verdünnung aus Infusionssystemen oder durch Infusionstherapie stammt, lässt sich durch einen weiteren Vorwertvergleich klären, der i.d.R. bei diesen Patienten leicht möglich ist, da Vorwerte z.B. aus der Notaufnahme existieren. Bei artifizieller Verdünnung aus dem Infusionssystem sind alle Zellkonzentrationen etwa um den gleichen Faktor vermindert, während bei Hämodilution durch Infusionstherapie die Thrombozyten aus dem Knochenmark sehr schnell nachgeschoben werden im Gegensatz zur Erythropoese, die nur langsam reagiert.

Aufmischen der Blutprobe und Kontrollmaterial

Beginnend mit dem Abstellen des Entnahmeröhrchens in einen Probenständer beginnt die Sedimentation der Blutzellen (10–15 mm/h bzw. 2 mm in 10 min). Das Mischen kann manuell oder maschinell geschehen. Beste Methode ist ein Überkopf-Mischen der Probe (>10-fach). Das Kontrollmaterial erfordert eine besondere Behandlung. Es sollte abwechselnd manuell zwischen den Handflächen gerollt und Überkopf gemischt werden, da es noch gründlicher gemischt werden muss. Wird einmal aus einer ungemischten Probe entnommen und gemessen, ist der Fehler nicht mehr rückgängig zu machen: Die Entmischung und damit begonnene Fehlmessung setzt sich zwangsweise bei der nächsten Verwendung fort. Da eine nicht korrekt geschulte Person den Fehler i.d.R. immer gleich macht, wird der Fehler von Mal zu Mal größer. Eine weitere Gefahr droht von eingetrocknetem Blut v.a. bei Systemen mit Schraubgewinde. Die eingetrockneten und zerfallenden Erythrozyten werden als Thrombozyten gezählt. Eingetrocknetes Blut bzw. Restblut am Gewinde muss daher mit einem Papiertuch entfernt werden. Das

Kontrollmaterial sollte idealerweise wie eine Probe am Gerät gesetzt werden, jedoch sind die Röhrchen des Kontrollmaterials oft unterschiedlich im Vergleich zu Patientenproben und dann nicht mit dem Greifarm bzw. Mischkopf des Hämatologiegerätes kompatibel. In der Praxis werden gerne sog. Taumelmischer eingesetzt, die das Röhrchen drehen und gleichzeitig schaukeln (teilweises Überkopf-Mischen). Über die maximale Dauer der beschriebenen maschinellen Mischung, bevor ein Zellschaden eintritt, gibt es keine Literatur. Konsens ist, dass sich die Probe weniger als 30 min auf dem Mischer befinden und Kontrollmaterial von Hand gemischt werden sollte (Eminenz-basierte Empfehlung).

Probentransport

Die Proben sollten baldmöglichst im Labor analysiert werden. Bei Versand sind in jedem Fall Vorsichtsmaßnahmen notwendig. Eine Versandtemperatur unter +4 °C wie auch schwankende Temperaturen sind unbedingt zu vermeiden. Eine ungeschützte Zugabe von gefrorenen Kühlelementen in eine Styroporbox mit den Proben wird zu einer Zellschädigung führen. Aufgezeichnete Verlaufskurven von Temperaturloggern im Probenraum zeigen immer wieder dieses Phänomen. Eine Temperatur von 10–14 °C ist anzustreben. Diese Empfehlung stammt aus einer nicht publizierten Studie einer Firma im Auftrag der britischen Armee. Auch wenn die Fahrdienste der Labore dickwandige Styroporbehälter einsetzen, so kam es doch bei Overnight-Fahrten im Winter zum Einfrieren im LKW bei Außentemperaturen von unter –15 °C. Umgekehrt entstehen im Sommer im PKW in der Sonne hinter der Windschutzscheibe (z.B. Taxifahrten) schnell Temperaturen von 50–70 °C. Temperaturlogger haben weiterhin gezeigt, dass bei längeren Transportstrecken (auch innerhalb Deutschlands), bei denen Flugzeuge eingesetzt werden, in deren Frachträumen Temperaturen um die 0 °C erreicht werden. Dies alles zwingt bei solchen Versendungsarten zu temperaturstabilisierten Verpackungsformen, die zuvor einer Prüfung unterzogen wurden und zu einem zumindest stichprobenartigem Einsatz von Temperaturloggern.

Kontrollmaterial

Sowohl bei der Spezifikation der Kontrollmaterialien als auch bei den Vorgaben der Richtlinien der Bundesärztekammer sind die niedrigen Thrombozytenkonzentrationen ein heikles Thema, welches bisher nicht gelöst wurde, d.h. fehlende Kontrollen und Vorgaben im Bereich

unterhalb von 50.000 Thrombozyten pro Mikroliter. Die interne Qualitätskontrolle anhand von Levey-Jennings-Graphiken zeigt denn auch, dass die Thrombozyten ein heikles Thema sind: Sie zeigen im Verlauf einer Charge (Kontrollperiode) eine stetig steigende Konzentration durch Zerfall der Erythrozyten und Leukozyten, was in der Low-Kontrolle am meisten auffällt. Wir haben hierbei alle namhaften Hersteller von stabilisiertem Kontrollblut getestet und das Problem der niedrigen Thrombozytenkonzentrationen in relevanten Bereichen unter 30.000/ μL ist vermutlich nur mit getrenntem Kontrollmaterial mit künstlichen Mikropartikeln zu lösen. Besserung wäre hier nur in Sicht, wenn die Ringversuchsinstitutionen und Fachverbände dies thematisieren und einen entsprechenden Druck auf die Hersteller aufbauen, aber dies bisher scheuen. Die Akkreditierung und Angst vor einem nicht bestandenen Ringversuch und Zertifikat oder Wechsel der Teilnehmer zu anderen Ringversuchsanbietern ist dabei kontraproduktiv. Dabei wären die Geräte mit guten Laserstreulicht-Analysen, Nukleinsäure-Färbungen oder immunologischer Methode durchaus in der Lage, gute Ergebnisse zu erzielen, während andere Geräte und Methoden Ergebnisse wie „Konzentration $<20.000/\mu\text{L}$ “ berichten müssten.

Referenzmethoden zur Thrombozytenzählung

Die Messung niedriger Partikel- und somit auch Thrombozytenkonzentrationen ist keinesfalls trivial: Plastikpartikel, gesunde Thrombozyten und Thrombozyten bei ITP oder MDS verhalten sich unterschiedlich, genauso wie Pufferlösungen, zentrifugiertes Plasma und Patientenplasma als Matrix. Alle Lösungen des Gerätesystems, Reagenzien, Verdünnungs- und Waschlösungen müssen partikelfrei sein und die Messwege zwischen Ansaugnadel und Messküvette kurz und aus innenseitig hochpoliertem Metall. Schlauchsysteme geben Verunreinigungen ab und die gereinigten Schläuche führen zur Anheftung von Thrombozyten an die Fremdoberfläche, was ja in vivo ihre Aufgabe ist. Bei z.B. zehn Leerwertmessungen nacheinander zur Spülung eines Gerätes vor der Messung einer Probe mit niedrigen Konzentrationen, kann es zunächst zu einem Abfall und dann wieder zu einem Anstieg des Leerwertes kommen, da die Spüllösung Verunreinigungen erst langsam von der Innenseite von Schläuchen und Ventilen ablöst.

In Gegenwart hoher Konzentration an unerwünschten Zellen (Erythrozyten) spielen Koinzidenzen und Totzeiten bei der Signalverarbeitung eine beträchtliche Rolle.

Der DIN-Ausschuss unter Leitung der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) in Berlin und das International Committee for Standardisation in Hematology (ICSH) haben entsprechende Referenzmethoden publiziert, die auf immunphänotypischer Zählung von Thrombozyten basieren [46, 47].

Die Zählung von Thrombozyten in einer Zählkammer im Mikroskop (sog. Hämozytometer) nach Erythrozytenlyse und Kontrastverstärkung eignet sich zur Überprüfung der Plausibilität eines Messergebnisses, ist aber als Referenzverfahren oder zur Verlaufskontrolle nicht geeignet.

Zusammenfassung

Zusammenfassend sind bei der Diagnostik der Thrombozytopenie die Aggregationsneigung von Thrombozyten eine immer zu vergegenwärtigende Störgröße und die Zählung niedriger Thrombozytenzahlen immer noch technisch anspruchsvoll. Die Differentialdiagnosen bei Thrombozytopenie sind vielfältig und da sie Symptom einer schwerwiegenden Erkrankung sein kann, erfordert sie immer eine Abklärung. Bei der Thrombozytose gibt es einen breiten Überlappungsbereich zwischen reaktiver und myeloproliferativer Ursache. Die PCR-Diagnostik der JAK2-, Calretikulin-, MPL- und bcr-abl-Mutationen, die bei myeloproliferativen Erkrankungen mit Thrombozytose je nach Typ in unterschiedlichem Maße auftreten, hat hier eine Teilentlastung gebracht. Die Kombination aus Laserstreulicht- und Immunzytometrie, intelligenter Signalprozessierung bzw. Bildanalyse wird zu einer besseren Qualität führen können, wenn die Vergütungssysteme es erlauben. Der kaskadierte Einsatz verschiedener Messsysteme im Rahmen einer Stufendiagnostik unter Einschluss der manuellen Begutachtung des Blutausstrichs ist ein in der Zwischenzeit gangbarer Weg, um fehlerhafte Ergebnisse durch Störgrößen abzufangen.

Danksagung

Dieser Artikel ist Frau Dr. Silke Heller aus Anlass Ihres Ausscheidens aus den aktiven Ämtern gewidmet. Es ist ihr über viele Jahre hinweg im Arbeitskreis Laboratorium der DGHO unter ihrer Leitung gelungen, Hämatologen, Labormediziner, Transfusionsmediziner, Pathologen und Zytogenetiker zu vereinen, um gemeinsam die Qualität im hämatologischen Labor durch Fortbildungen, Ringversuche und Akkreditierung zu fördern und

weiterzuentwickeln. In den verschiedenen nationalen und internationalen Gremien und Kommissionen hat sie die hämatologische Labordiagnostik immer kompetent vertreten und war auch über Jahre hinweg Redaktionsleiterin für die Sektion Hämatologie dieser Zeitschrift.

Interessenkonflikt: Der Autor erklärt, dass keine wirtschaftlichen oder persönlichen Interessenkonflikte bestehen.

Literatur

1. Nebe T, Bentzien F, Bruegel M, Fiedler GM, Gutensohn K, Heimpel H, et al. Multicentric Determination of Reference Ranges for Automated Blood Counts. *Laboratoriumsmedizin-J Lab Med* 2011;35:3–28.
2. Ault KA, Rinder HM, Mitchell J, Carmody MB, Vary CP, Hillman RS. The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. *Am J Clin Pathol* 1992;98:637–46.
3. Ault KA. Flow cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets. *Ann NY Acad Sci* 1993;677:293–308.
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.
5. Diquattro M, Gagliano F, Calabro GM, Tommasi M, Scott CS, Mancuso G, et al. Relationships between platelet counts, platelet volumes and reticulated platelets in patients with ITP: evidence for significant platelet count inaccuracies with conventional instrument methods. *Int J Lab Hematol* 2009;31:199–206.
6. Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:606–10.
7. Richards EM, Baglin TP. Quantitation of reticulated platelets: methodology and clinical application. *Br J Haematol* 1995;91:445–51.
8. Ogata H. Measurement of reticulated platelets in thrombocytopenia – methodology and clinical utility. *Kurume Med J* 1998;45:165–70.
9. 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.
10. 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.
11. Takami A, Shibayama M, Orito M, Omote M, Okumura H, Yamashita T, et al. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:501–7.
12. Thomas-Kaskel AK, Mattern D, Kohler G, Finke J, Behringer D. Reticulated platelet counts correlate with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and help identify the complex causes of thrombocytopenia in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:241–8.
13. 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.
14. 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.
15. Hayashi S, Nishiyama M, Suehisa E, Kashiwagi H, Kurata Y, Tomiyama Y. [Comparison between two methods for the measurement reticulated platelet and their clinical significance – flow cytometry (FCM) method and IPF method using automated hematology analyzer (XE-2000)]. *Rinsho Byori* 2009;57:1039–44.
16. Koike Y, Miyazaki K, Higashihara M, Kimura E, Jona M, Uchihashi K, et al. Clinical significance of detection of immature platelets: comparison between percentage of reticulated platelets as detected by flow cytometry and immature platelet fraction as detected by automated measurement. *Eur J Haematol* 2010;84:183–4.
17. Meintker L, Haimerl M, Ringwald J, Krause SW. Measurement of immature platelets with Abbott CD-Sapphire and Sysmex XE-5000 in haematology and oncology patients. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:2125–31.
18. Pons I, Monteagudo M, Lucchetti G, Munoz L, Perea G, Colomina I, et al. Correlation between immature platelet fraction and reticulated platelets. Usefulness in the etiology diagnosis of thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2010;85:158–63.
19. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton–Maggs P, Bussell JB, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010;115:168–86.
20. 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.
21. 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.
22. Nguyen XD, Goebel M, Schober M, Kluter H, Panzer S. The detection of platelet antibodies by simultaneous analysis of specific platelet antibodies and the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens: an interlaboratory comparison. *Transfusion* 2010;50:1429–34.
23. Sachs UJ. [Diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura]. *Hamostaseologie* 2008;28:72–6.
24. Zhao CH, Hou M. [Advances of research on abnormality of cell immunity in idiopathic thrombocytopenic purpura: review]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2006;14:1045–8.
25. Semple JW, Provan D, Garvey MB, Freedman J. Recent progress in understanding the pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Curr Opin Hematol* 2010;17:590–5.
26. Toltl LJ, Nazi I, Jafari R, Arnold DM. Piecing together the humoral and cellular mechanisms of immune thrombocytopenia. *Semin Thromb Hemost* 2011;37:631–9.
27. Johnsen J. Pathogenesis in immune thrombocytopenia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:306–12.
28. Semple JW, Provan D. The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia: T cells still take center-stage. *Curr Opin Hematol* 2012;19:357–62.

29. Zhong H, Bao W, Li X, Miller A, Seery C, Haq N, et al. CD16+ monocytes control T-cell subset development in immune thrombocytopenia. *Blood* 2012;120:3326–35.
30. Mustjoki S, Auvinen K, Kreutzman A, Rousselot P, Hernesniemi S, Melo T, et al. Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia* 2013;27:914–24.
31. Shih A, Nazi I, Kelton JG, Arnold DM. Novel treatments for immune thrombocytopenia. *Presse Med* 2014;43:e87–95.
32. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014;123:1544–51.
33. Thiele J, Kvasnicka HM. [Thrombocytosis versus thrombocythemia – differential diagnosis of elevated platelet count]. *Pathologe* 2000;21:31–8.
34. Mohamed M. Refractory anemia with ring sideroblasts associated with thrombocytosis (RARS-T). *Blood* 2014;123:314.
35. Norman JE, Westbury SK, Jones ML, Mumford AD. How should we test for nonsevere heritable platelet function disorders? *Int J Lab Hematol* 2014;36:326–33.
36. Shah U, Ma AD. Tests of platelet function. *Curr Opin Hematol* 2007;14:432–7.
37. Pawelski H, Lang D, Reuter S. Interactions of monocytes and platelets: implication for life. *Front Biosci (Schol Ed)* 2014; 6:75–91.
38. Fahim A, Crooks MG, Morice AH, Hart SP. Increased platelet binding to circulating monocytes in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 2014;192:277–84.
39. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood* 1991;78:1730–7.
40. Ritchie JL, Alexander HD, Rea IM. Flow cytometry analysis of platelet P-selectin expression in whole blood – methodological considerations. *Clin Lab Haematol* 2000;22:359–63.
41. Hagberg IA, Lyberg T. Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimised methods for clinical studies. *Platelets* 2000;11:137–50.
42. Goossens W, Van Duppen V, Verwilghen RL. K2- or K3-EDTA: the anticoagulant of choice in routine haematology? *Clin Lab Haematol* 1991;13:291–5.
43. Phillis J, Coiner E, Smith D, Becker J, Leong G. Performance of K2EDTA- vs. K3EDTA-collected blood specimens on various hematology analyzers. *Lab Hematol* 1998;4:17–20.
44. Macey M, McCarthy D, Azam U, Milne T, Golledge P, Newland A. Ethylenediaminetetraacetic acid plus citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole (EDTA-CTAD): a novel anticoagulant for the flow cytometric assessment of platelet and neutrophil activation ex vivo in whole blood. *Cytometry B Clin Cytom* 2003;51:30–40.
45. Menssen HD, Melber K, Brandt N, Thiel E. The use of hirudin as universal anticoagulant in haematology, clinical chemistry and blood grouping. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:1267–77.
46. DIN 58932-5:2007-10. Hämatologie – Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut – Teil 5: Referenzverfahren zur Bestimmung der Konzentration der Thrombozyten. In. Berlin: Beuth-Verlag.
47. Harrison P, Ault KA, Chapman S, Charie L, Davis B, Fujimoto K, et al. An interlaboratory study of a candidate reference method for platelet counting. *Am J Clin Pathol* 2001;115:448–59.