

Diplomarbeit

**ERYTHROZYTEN-MORPHOLOGIE BEI BETA-
THALASSAEMIA MINOR**

eingereicht von
Carolin Körber

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der
Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der
**Klinischen Abteilung für Hämatologie,
Univ. Klinik für Innere Medizin**

unter der Anleitung von
ao. Univ. Prof. Dr. Albert Wölfler (Klin. Abt. f. Hämatologie)
OA Dr. Christoph Robier (Laborverbund der Barmherzigen Brüder Graz)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 04.12. 2015

Carolin Körber eh.

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen Personen danken, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Allen voran gilt mein besonderer Dank meinen beiden Betreuern ao. Univ. Prof. Dr. Albert Wölfler und OA Dr. Christoph Robier für die Bereitstellung des interessanten Themas. Insbesondere danke ich OA Dr. Christoph Robier für seine fortwährende Hilfsbereitschaft und für die motivierende Unterstützung im Rahmen der Mikroskopie sowie des Verfassens der Diplomarbeit.

Ganz besonders möchte ich auch meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und ihre Unterstützung danken.

Des Weiteren gilt mein Dank der Medizinischen Universität Graz für die umfangreiche Ausbildung, die ich hier erhalte.

Zusammenfassung

Hintergrund: Die β -Thalassaemie ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung des Blutes, bei der die β -Globinketten des Hämoglobinmoleküls nur vermindert oder gar nicht produziert werden können. Je nach Ausmaß kommt es dabei zu mehr oder weniger gravierenden klinischen Symptomen und Veränderungen der Erythrozytengröße und -morphologie. Eine häufige Form der heterozygoten β -Thalassaemie wird als β -Thalassaemia minor bezeichnet. Sie führt zu keiner oder nur zu milder klinischer Symptomatik, jedoch kommen auch hier morphologische Veränderungen der Erythrozyten vor. Bislang gibt es nur wenige Studiendaten zur Häufigkeit und Art der Erythrozytenanomalien bei β -Thalassaemia minor. Diese Studie befasst sich mit der Dokumentation und Quantifizierung der unterschiedlichen Erythrozytenanomalien.

Methoden: Es wurden die peripheren Blutausstriche von 33 PatientInnen mit diagnostizierter β -Thalassaemia minor in die Studie eingeschlossen, mittels eines Nummerncodes anonymisiert und mikroskopiert. Dabei wurden definierte morphologische Anomalien der Erythrozyten auf Positivität oder Negativität überprüft und bei Positivität mit 1000-facher Vergrößerung in 20 Gesichtsfeldern gezählt.

Ergebnis: In allen Ausstrichpräparaten wurden morphologische Anomalien gefunden, die sich allerdings in Vorkommen und Anzahl stark unterschieden. Eine einzige Zellanomalie, die Target-Zellen, kam in allen Ausstrichen mit minimal 4 und maximal 279 Zellen pro 20 Gesichtsfelder vor. Anisozytose und Poikilozytose wurden in allen Slides gefunden. Auch andere Morphologien konnten in den meisten Ausstrichen häufig beobachtet werden, dazu gehörten Ovalozyten, Elliptozyten, Zellen mit basophiler Tüpfelung, Stomatozyten und unregelmäßig eingezogene Zellen. Schistozyten, pincer cells, fish cells und Degmazyten waren nur vereinzelt und in wenigen Präparaten zu sehen. Erythroblasten, Präkeratozyten und Zellen mit Howell-Jolly bodies kamen nicht vor.

Diskussion: Das häufige Vorkommen von Targetzellen und Zellen mit basophiler Tüpfelung stimmt gut mit der Literatur überein. Es ist allerdings die erste Studie, in der die Häufigkeit der Anomalien genau quantifiziert und dokumentiert wurde. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die morphologische Abklärung von Anämien zu verbessern.

Abstract

Introduction: β -thalassemia is an autosomal recessive red blood cell disorder, affecting the synthesis of β -globin chains of the hemoglobin molecule, which can be either reduced or absent. Clinical symptoms and alterations of erythrocyte size and morphology correlate to the amount of reduced hemoglobin production. The heterozygous β -thalassemia minor leads to less severe or even no clinical symptoms, yet there might be a variation in red blood cell size and morphology. This study aimed for a comprehensive documentation and quantification of defined abnormal erythrocyte morphologies in this disease.

Methods: We collected peripheral blood smears of 33 patients, who were previously diagnosed with β -thalassemia minor. The blood smears were anonymized and examined for defined morphological abnormalities.

Results: Morphological abnormalities were found in each peripheral blood smear with varying prevalence and numbers of the abnormalities. Only one defined morphological abnormality, the target cell, was found in all blood smears with a minimum of 4 and a maximum of 279 cells per 20 high power fields at 1000-fold magnification. Anisocytosis and poikilocytosis were observed in slides of all patients. Ovalocytes, elliptocytes, cells with basophilic stippling, stomatocytes and irregularly contracted cells were frequently found. Schistocytes, pincer cells, fish cells and degmacytes appeared only occasionally. Erythroblasts, blister cells and cells with Howell Jolly bodies did not occur.

Discussion: The frequent occurrence of target cells and cells with basophilic stippling corresponds well with data from the literature. To our best knowledge this is the first study documenting and quantifying a vast variety of defined morphologies in β -thalassemia minor. Our findings may be helpful to improve the diagnosis of anemia in clinical laboratory routine.

Inhalt

Danksagung	II
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Abkürzungen	VI
Einleitung.....	1
Physiologisches Hämoglobin, Thalassämien und Hämoglobinopathien.....	1
β-Thalassämien.....	2
Labordiagnostik der Beta – Thalassämien und Hämoglobinopathien.....	5
Diagnostische Bedeutung des Blutausstriches	7
Grund der Studie	8
Methoden.....	9
Ethik	9
Laboranalytik.....	9
Mikroskopische Auswertung.....	10
Erythrozytenanomalien.....	12
Ergebnisse.....	31
Basischarakteristik	31
Hämoglobin-Diagnostik/Analytik.....	32
Vorhandensein von Erythrozytenanomalien	32
Auftreten von Anomalien bei n Patienten	34
Häufigkeit von Erythrozyten-Anomalien	36
Anzahl der abnormen Erythrozyten pro 20 Gesichtsfelder, bei 1000-facher Vergrößerung	37
Diskussion	38
Literaturverzeichnis	41

Abkürzungen

Hb	Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MCH	Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
RDW	Verteilungsbreite der Erythrozyten
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPF	Gesichtsfeld, high power field

Einleitung

Physiologisches Hämoglobin, Thalassämien und Hämoglobinopathien

Das Hämoglobinmolekül ist aus einem Proteingrundgerüst aufgebaut, das aus zwei Paaren von ungleichen Globinketten zusammengesetzt ist. (1) Jede Kette trägt eine sauerstoffbindende Häm-Gruppe aus einem Protoporphyrin und einem zweiwertigen Eisenatom. (1) Das, mit einem Anteil von mehr als 90% des Gesamthämoglobins, am häufigsten vorkommende adulte Hämoglobin ist das Hb A, dessen Tetramer aus zwei α - und zwei β -Globinketten besteht ($\alpha_2\beta_2$). (1) Als Nebenkomponenten gibt es die diagnostisch wichtigen Formen Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) und Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), die anstelle von β -Ketten jeweils zwei δ - bzw. γ -Globinketten besitzen. (1)

Die jeweiligen Gene der Ketten liegen auf unterschiedlichen Chromosomen. Während die Gene für die α -Globinketten auf Chromosom 16 lokalisiert sind, werden die Non- α -Globinketten, dazu gehören β -, δ - und γ -Ketten, im β -Gen-Cluster auf Chromosom 11 kodiert. (1)

Anhand der zugrunde liegenden molekularen Defekte lassen sich die Hämoglobinerkrankungen, welche zu den häufigsten monogenen Erbkrankheiten zählen, in Hämoglobinopathien und Thalassämien einteilen. (1) Bei den Hämoglobinopathien (Synonyme: anomale Varianten, anomale Hämoglobine) liegen genetisch bedingte qualitative strukturelle Veränderungen des Hämoglobinmoleküls vor. (1) Die bekannteste und häufigste veränderte Form ist das Hb S, das im Rahmen einer Sichelzellanämie vorkommt. (1) Dieses Hämoglobin aggregiert in Erythrozyten und beeinträchtigt deren Flexibilität, was zu Gefäßverschlüssen und hämolytischer Anämie führt. (1) Die Thalassämien gehen dagegen mit einer quantitativ verminderten Synthese von normalen Globinketten einher. (1) Je nachdem, ob der zugrunde liegende molekulare Defekt die genetische Expression der α - oder β -Ketten beeinträchtigt, wird zwischen α -Thalassämie und β -Thalassämie unterschieden. (1) Die verminderte Synthese der betroffenen Globinkette führt je nach dem zugrunde liegenden genetischen Defekt und dem Ausmaß der Globinkettenexpression zu unterschiedlich schweren klinischen Konsequenzen. (1)

Diese reichen von harmlosen Blutbildveränderungen bis zu lebensbedrohlichen Zustandsbildern im Rahmen von resultierenden schweren Anämien. (1)

β-Thalassämien

β-Thalassämie Syndrome sind eine Gruppe hereditärer Erkrankungen des Blutes, gekennzeichnet durch verminderte oder fehlende Synthese der β-Globinketten. (2) Am häufigsten kommt die β-Thalassämie in mediterranen Ländern und im mittleren, sowie im fernen Osten vor, am häufigsten in Zypern (14% Träger) und in Sardinien (10,3%). (2; 3) Durch Migration und auch durch Spontanmutationen tritt sie jedoch bereits in fast jedem Land auf und gehört zu den häufigsten genetischen Erkrankungen weltweit. (2)

Der Erbgang erfolgt meistens autosomal rezessiv, nur selten dominant. Es sind bereits über 200 verschiedene Mutationen des β-Gens bekannt, meist sind es Punktmutationen, seltener Deletionen. (2; 3; 4) Die von Mutationen betroffenen Menschen sind somit entweder heterozygot, homozygot oder compound heterozygot. (2) Beim heterozygoten Typ ist nur ein Allel des homologen Gens von der Mutation betroffen. (2) Bei den anderen sind es beide, wobei es sich beim homozygoten Typ um dieselbe Mutation in beiden Allelen, beim compound heterozygoten um unterschiedliche Mutationen in jeweils einem Allel handelt. (2; 3)

Eine grobe Einteilung der β-Thalassämie Mutationen erfolgt in β₀ und β₊ Thalassämien, wobei die Synthese der β-Hämoglobinketten bei der β₊ Thalassämie noch reduziert vorhanden ist, jedoch bei der β₀ Thalassämie komplett fehlt. (2; 3) Kommt nun ein homozygoter oder compound heterozygoter Typ (β₀β₀) vor, ist die Produktion von β-Ketten nicht möglich, folglich kann kein normales Hämoglobin gebildet werden. (3) Bei den vielen verschiedenen β₊ Thalassämie Mutationen ist die Ausprägung des Defekts variabel, und reicht von leichten bis zu gravierenden Verminderungen in der β-Globinkettensynthese. (3)

Die klinische Einteilung erfolgt in drei Hauptformen, die Thalassaemia major, Thalassaemia intermedia und Thalassaemia minor. (2; 3; 4)

β -Thalassaemia major

Phänotypisch erscheinen homozygote oder genetisch heterozygote compound β -Thalassämien als Thalassaemia major oder Thalassaemia intermedia. (2)

Die klinisch schwerwiegendste Form, Thalassaemia major, präsentiert sich bereits im Alter zwischen 6 Monaten und 2 Jahren. (2) Betroffene PatientInnen leiden zunächst an Wachstumsstörung und zunehmender Blässe. (2; 4) Sie haben häufig Fieberschübe und eine Vergrößerung der Leber und Milz, was zu einem aufgetriebenen Abdomen führt. (2; 4)

Durch den schweren Mangel oder das komplette Fehlen der β -Ketten kommt es zu einem Überschuss an nicht gebundenen α -Ketten, die sich in den roten Blutzellen ansammeln. Das führt zu einer ineffektiven Erythropoese bei den erythrozytären Vorstufen und Hämolyse bei reifen Erythrozyten. (1; 2) Durch die daraus folgende Anämie kommt es zu einer vermehrten Produktion von Erythropoetin, welches die Bildung von Blutzellen stimulieren soll. Das führt zu einer starken Expansion des Knochenmarks und in weiterer Folge zu Knochendeformitäten. (2)

Um die Symptome zu reduzieren und das Wachstum zu normalisieren benötigen diese sehr jungen Patienten regelmäßige Bluttransfusionen, welche eine Hämoglobinkonzentration von mindestens 9-10,5 mg/dl aufrecht erhalten sollten. (2; 4) Als cut-off Wert für den Beginn einer Transfusionstherapie gilt eine Hämoglobinkonzentration von weniger als 7 g/dl, jedoch hängt diese Entscheidung auch von weiteren Faktoren und Symptomen, wie Wachstumsstopp, Vergrößerung der Milz und beginnenden Knochendeformitäten ab. (2)

Erfolgt keine regelmäßige Bluttransfusion, wie man in Entwicklungsländern beobachten kann, sterben die Patienten bereits in der Kindheit oder Adoleszenz. (4) Aber auch die lebensnotwendigen regelmäßigen Transfusionen bleiben nicht komplikationslos. Sie können zu Eisenüberladung führen, was eine Ansammlung von Eisen in viszeralen Organen, insbesondere Herz, Leber und Hormondrüsen bewirkt. (4) Dadurch kommt es zu Schädigung des Gewebes und letztlich zu Organversagen. (4) Die klinischen Zeichen einer Eisenüberladung sind vielseitig und beinhalten Hypogonadismus, Hypothyreose, Hypoparathyroidismus, Diabetes mellitus, Leberfibrose und Fehlfunktion des Herzens. (2) Kardiologische Ereignisse sind die häufigsten Todesursachen bei therapierter β -Thalassaemia major. (2)

β -Thalassaemia intermedia

Die β -Thalassaemia intermedia bezeichnet das breite klinische Spektrum zwischen β -Thalassaemia major und minor. (3) Patienten, die an dieser Form der Thalassämie leiden, benötigen nur gelegentlich Bluttransfusionen, welche jedoch nicht vital indiziert sind. (3; 2) Es besteht hier auch die Möglichkeit, dass sie bis ins Erwachsenenalter, bis auf eine leichte Anämie, komplett asymptomatisch sind. (2; 3)

β -Thalassaemia minor

Während die beiden bereits erwähnten Formen klinisch mehr oder weniger schwerwiegend verlaufen können, bleibt die β -Thalassaemia minor meistens klinisch stumm. (3) Bis auf eine meist vorhandene leichte Mikrozytose und Hypochromie hat diese Form für die Betroffenen selbst keine Bedeutung. (2; 3) Die Identifizierung dieser sogenannten Träger der rezessiv vererbten Krankheit ist jedoch bedeutsam bei Kinderwunsch, wo der/die PartnerIn ebenfalls untersucht werden sollte. (3) Wären hierbei beide Partner Träger, bestünde zu 25% das Risiko des Auftretens einer schweren Variante. (2)

Manche Mutationen im β -Gen führen in heterozygotem Zustand zu keinen hämatologischen Veränderungen. (3) Dabei unterscheidet man stumme β -Thalassämie Träger und fast stumme β -Thalassämie Träger, wobei bei der stummen β -Thalassämie sowohl die Erythrozytenparameter als auch das Hb A2 im Referenzbereich gelegen sind. (3) Diese Form wird klinisch auch als β -Thalassaemia minima bezeichnet. (3) Es ist folglich nicht möglich, die Träger dieser Mutationen anhand von Laboruntersuchungen ohne DNA-Analyse zu identifizieren. Einige von ihnen werden erst erkannt, weil sie bereits ein Kind mit β -Thalassaemia intermedia haben, andere nie. (3) In den fast stummen β -Thalassämien kommen Veränderungen der numerischen Erythrozytenparameter vor, jedoch keine Erhöhung des Hb A2, somit ähneln sie phänotypisch den heterozygoten Formen der α -Thalassämien. (3)

Aufgrund der zahlreichen verschiedenen Mutationen, die zu einem β -Thalassämie Syndrom führen können, variiert das klinische Spektrum der heterozygoten Formen, abhängig von der Produktionseinschränkung der β -Ketten, von vollkommen stummen bis zu milden β -Thalassämie Merkmalen. (3)

Labordiagnostik der Beta – Thalassämien und Hämoglobinopathien

Zu den empfohlenen Tests für die Diagnose von β -Thalassämien und Hämoglobinopathien gehören in erster Linie ein Differentialblutbild, die Hämoglobinelektrophorese, Tests für Löslichkeit und Sichelung und Quantifizierung von Hb A2 und Hb F mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie. (5)

Differentialblutbild/Blutstatus:

Sowohl das Vorhandensein von Thalassämien, als auch von Hämoglobinopathien hat Einfluss auf das Blutbild. (3; 5; 6) Die Hauptkomponenten des roten Blutbildes beinhalten die Messung von Hämoglobin, die Anzahl der Erythrozyten, das mittlere corpusculäre Volumen (MCV) und die Erythrozytenverteilungsbreite (EVB oder RDW, red blood cell distribution width). (5)

Bei Thalassämien findet sich ein vermindertes mittleres corpusculäres Volumen und ein vermindertes mittleres corpusculäres Hämoglobin, folglich entweder eine Hypochromie und Mikrozytose ohne Anämie oder eine hypochrome mikrozytäre Anämie, während die Anzahl der Erythrozyten typischerweise eher erhöht ist und die Verteilungsbreite im Referenzbereich liegt. (5) Differentialdiagnostisch sind vor allem die Eisenmangelanämie und die Begleitanämie (Entzündungs-, Tumor- Infektanämie, anemia of chronic disease) relevant. (7) Obwohl bei der Eisenmangelanämie ebenfalls eine hypochrome, mikrozytäre Anämie zu finden ist, unterscheidet sie sich von den Thalassämien unter anderem sowohl durch eine Verringerung der Erythrozytenanzahl, als auch durch eine Erhöhung des RDW-Wertes. (5) Ist bei Mikrozytose und Hypochromie ein unauffälliger Eisenstatus (Ferritin) vorzufinden, sollte eine weitere Hämoglobindiagnostik durchgeführt und eventuell ein Blutaussstrich untersucht werden. (5) Zusätzlich können erworbene Abnormitäten wie zum Beispiel Erythropoiesestörungen bei Lebererkrankungen zu Vergrößerung des MCV und Erhöhung des MCH führen, im Falle einer zusätzlichen heterozygoten β -Thalassämie, zu Normalisierung dieser Werte. (3) Diese Fälle können nur dann detektiert werden, wenn das Labor trotz der unauffälligen Erythrozytenparameter eine Messung des Hb A2 Anteils vornimmt. (3) Bei Begleitanämien zeigt sich eine mikrozytäre bis normozytäre Anämie bei normalem bis erhöhtem Eisenspeicher (Ferritin) sowie eine verminderte Erythrozytenzahl; der lösliche Transferrinreceptor ist

im Gegensatz zur Eisenmangelanämie und den Thalassämien, wo üblicherweise eine Erhöhung gefunden wird, vermindert oder im Referenzbereich gelegen. (8)

Hämoglobinelektrophorese:

Die Elektrophorese dient der Identifikation und der Quantifizierung verschiedener Varianten des Hämoglobins mittels Auftrennung des roten Blutfarbstoffes in seine Fraktionen in einem elektrischen Feld. (5) Es ist eine wichtige diagnostische Methode, um abnorme Hämoglobinvarianten und auch vermehrtes Vorkommen physiologischer Hämoglobine nachzuweisen. (5) Die Angaben erfolgen hierbei in Prozent des Gesamthämoglobins, wobei das Hb A in gesunden Erwachsenen über 90% ausmacht. (1; 5) Das Hb A₂, welches aus zwei α -Ketten und zwei δ -Ketten besteht, ist mit einem Anteil von weniger als 3,5% vorhanden und das HbF ($\alpha_2\mu_2$) mit noch kleineren Anteilen von kleiner als 1% (0,8-1% Graubereich). (3; 5) Obwohl die β -Thalassämie die häufigste Ursache für eine Erhöhung des Hb A₂ auf über 3,5% ist, sind einige seltene Differentialdiagnosen zu beachten. (3) Dazu gehören beispielsweise eine genetisch bedingte Erhöhung des Hb A₂, instabiles Hämoglobin oder eine Sichelzellanämie. (3)

Da die Elektrophorese im Vergleich zur HPLC unpräzisere Messungen liefert, entwickelte sich jene zunehmend zur Methode der Wahl. (5)

Hochdruckflüssigkeitschromatographie HPLC (high pressure liquid chromatography)

Die HPLC ist die genaueste Methode für die Quantifizierung von Hb A₂ und Hb F. Studien haben gezeigt, dass sie der Elektrophorese ebenbürtig oder überlegen ist. (5) Nichtsdestotrotz können auch hier die Messungen durch einige Störfaktoren verfälscht werden, zum Beispiel zeigt sich bei Vorkommen von Hb S im Rahmen einer Sichelzellanämie eine fälschliche Erhöhung des Hb A₂, da diese beiden Proteine co-eluieren. (5) Wird das Vorkommen von Hb S jedoch ausgeschlossen, kann Hb A₂ sicher identifiziert werden. (5)

Im Falle der β -Thalassaemia minor ist in der HPLC eine Erhöhung des Hb A₂ und in manchen Fällen auch des Hb F zu beobachten. (1; 5)

Allerdings kann ein Eisenmangel kombiniert mit einer heterozygoten Form der β -Thalassämie auftreten. (3) In diesem Fall ist der prozentuelle Anteil des Hb A₂ durch

den Eisenmangel falsch erniedrigt oder im Normalbereich gelegen. (3) Es empfiehlt sich hierbei zuerst den Eisenmangel zu korrigieren und dann den Anteil an Hb A2 zu messen, falls sich die Erythrozytenparameter nicht normalisieren sollten. (3)

Diagnostische Bedeutung des Blutausriches

Die Untersuchung eines Blutausrichpräparats kann nützliche Hinweise für die Diagnostik von Anämien, sowie für verschiedene Erkrankungen der weißen Blutzellen und Plättchen geben. (9) Wichtig ist hierbei die Untersuchung der Größe, Anfärbbarkeit und Form der roten Blutzellen, sowie das Vorhandensein und die Anzahl von Formanomalien. (9)

Normale Erythrozyten sind rund und haben eine bikonkave Form, sind also peripher dicker als im Zentrum. (9; 7) Auch der Gehalt an Hämoglobin ist hauptsächlich außen lokalisiert, weswegen im Mikroskop eine zentrale Aufhellung sichtbar ist. (7) Diese macht bei physiologischem zellulären Hämoglobingehalt in etwa ein Drittel des Gesamtdurchmessers aus. (9) Der Durchmesser eines Erythrozyten beträgt in etwa 7,5 µm, was etwas kleiner als bei einem kleinen Lymphozyten ist. (7; 9)

Zellen mit normaler Größe und normalem Hämoglobingehalt werden als normozytär und normochrom bezeichnet. (7; 9) Bei Zu- oder Abnahme der Größe spricht man von Makrozytose (Durchmesser größer als 9 µm) oder von Mikrozytose (Durchmesser weniger als 6 µm). (7; 9) Diese Abweichungen können bei der automatischen Messung durch Veränderungen des mittleren zellulären Volumens festgestellt werden. (5) Unter dem Mikroskop kann ein Größenvergleich mit einer weißen Blutzelle aufschlussreich sein. (9) Variiert die Größe der Erythrozyten in einem peripheren Blutausrichpräparat, spricht man von Anisozytose. (9; 7)

Findet man eine Abnahme des Hämoglobingehalts, wird diese als Hypochromie bezeichnet, eine Zunahme als Hyperchromie. (7) Im Mikroskop ist bei zu geringem Hämoglobingehalt eine Vergrößerung der zentralen Aufhellung auf über ein Drittel des Gesamtdurchmessers zu erkennen. (9) Im Blutstatus drückt sich eine Hypochromie durch eine Verminderung des mittleren zellulären Hämoglobingehalts (MCH) aus. (5)

Obwohl moderne Hämatologieautomaten bereits wertvolle Informationen über Anämien und ihre Ursachen geben, kann die Untersuchung eines

Blutausstrichpräparats von großer diagnostischer Bedeutung sein, da einige morphologische Anomalien nur auf diese Weise bestimmt werden können. (10) Bei einer mikroangiopathischen hämolytischen Anämie finden sich beispielsweise Erythrozytenfragmente, die eine ähnliche Größe wie Thrombozyten aufweisen und deshalb von automatischen Instrumenten nicht von diesen unterschieden werden können. (10)

Findet man eine hämolytische Anämie, kann die Form der Erythrozyten diagnostisch sehr wichtig sein, da bei manchen Formen der hämolytischen Anämie der Blutausstrich charakteristisch ist. (10) Beispiele dafür wären die hereditäre Sphärozytose, hereditäre Elliptozytose, die nicht immer mit einer Anämie einhergehen, sowie die seltenen Erkrankungen der hereditären Pyropoikilozytose und die südostasiatische Ovalozytose. (10)

Die Indikationen zur Anfertigung und Untersuchung eines Blutausstriches sind vielseitig. Sie umfassen einige klinische Symptome, sowie Abnormitäten bei der automatischen Auswertung einer Blutprobe. (10) Manchmal ist es möglich, nach der Untersuchung des Blutausstrichpräparates eine genaue Diagnose zu stellen, jedoch dient diese Untersuchung öfter dazu, aufgrund verschiedener möglicher Differentialdiagnosen die Durchführung weiterführende Tests anzuordnen. (10)

Grund der Studie

Obwohl die vorkommenden morphologischen Blutbildveränderungen bei β -Thalassaemia major und intermedia bereits umfangreich beschrieben sind, gibt es für die klinisch milde Form, die β -Thalassaemia minor, wenig genaue Studiendaten. (11; 12; 13) Die Erkrankung hat zwar für die betroffenen PatientInnen selbst keine Bedeutung, da sie meist klinisch stumm verläuft und oft nur im Rahmen eines Zufallsbefundes überhaupt diagnostiziert wird. Sie ist jedoch aufgrund der Heterozygotie ebenfalls wichtig, da bei einem Kind von zwei betroffenen Partnern ein beträchtliches Risiko von 25% für das Auftreten einer schweren homozygoten Form besteht. (2; 3)

Diese Studie befasst sich daher mit den morphologischen Anomalien von Erythrozyten, die speziell bei der β -Thalassaemia vorkommen. Die Studiendaten sollen dazu beitragen, die morphologische Differentialdiagnostik bei Anämien im klinischen Alltag zu erleichtern.

Methoden

Für diese Studie wurden PatientInnen mit vordiagnostizierter β -Thalassaemia minor inkludiert. Die Diagnose erfolgte im Laborverbund des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder Graz im Zeitraum von 01/2001 bis 12/2014 mittels der Hämoglobinelektrophorese, der HPLC und der lichtmikroskopischen Untersuchung der Morphologie der Erythrozyten in den angefertigten Blutaussstrichpräparaten. Entscheidend für die Diagnosestellung waren die Werte von HbA2 mit einem Cut-off Wert von über 3,5% und gegebenenfalls auch von HbF mit einem Cut-off von über 1. Diese sind ebenfalls von Bedeutung für die Unterscheidung zwischen β -Thalassämia minor, intermedia und major.

Die PatientInnen wurden aus den Befunddokumentationsmappen retrospektiv identifiziert und die personenbezogenen Daten aus der Krankenakte ermittelt. Die Einschlusskriterien erfüllten ausschließlich PatientInnen mit β -Thalassämia minor, von denen ein asserviertes beurteilbares Blutaussstrichpräparat vorhanden war, während PatientInnen mit β -Thalassämia minima, intermedia oder major, sowie mit nachgewiesenem abnormen Hämoglobin, nicht in die Studie inkludiert wurden.

Ethik

Das Studienprotokoll wurde sowohl von der Ethikkommission der medizinischen Universität Graz (EK-Nummer: 27-182 ex 14/15), als auch der Ethikkommission der Barmherzigen Brüder Graz begutachtet und genehmigt.

Laboranalytik

Für die Basischarakteristik der Studienpopulation wurden aus der Krankenakte folgende personenbezogene Parameter erhoben:

- Alter
- Geschlecht

Die numerischen Blutbildparameter wurden mit den in der Laborroutine verwendeten Hämatologieautomaten erhoben. In den Jahren 2001-2011 verwendete man hierfür einen Cell –Dyn Sapphire (Abbott, Abbott Park USA), von 2011-2014 einen Advia 2120 (Siemens, Österreich).

Folgende Parameter des roten Blutbildes wurden erhoben:

- Erythrozytenzahl
- Hb
- MCV
- MCH
- MCHC
- Retikulozyten relativ
- Retikulozyten absolut
- RDW

Für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie verwendete man den D10 (BioRad, Österreich), für die Hämoglobinelektrophorese Hyris (Sebia).

Folgende Hämoglobinanalysen wurden durchgeführt:

- HbA2 (HPLC)
- HbF (HPLC)
- Vorhandensein von Hämoglobinvarianten (HPLC und Hämoglobinelektrophorese)

Die genannten Geräte wurden gemäß der Firmenanleitungen und den Grundsätzen der guten Laborpraxis verwendet und wurden regelmäßig im Rahmen der internen und externen Qualitätskontrollen überprüft. (14; 15)

Mikroskopische Auswertung

Die bereits vorhandenen, nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Blutaussstrichpräparate wurden vom Betreuer der Diplomarbeit, OA Dr. Robier, anonymisiert und codiert, daraufhin mit einem Zeiss Axioskop (Zeiss, Deutschland) geblindet von Carolin Körber mikroskopiert. Die unten beschriebenen abnormen

Erythrozytenmorphologien wurden hierbei zuerst auf Positivität oder Negativität untersucht, dann bei Positivität als abnorme Zellen pro 20 Gesichtsfelder bei 1000-facher Vergrößerung (Objektiv 100-fach, Okular 10-fach, Öl-Immersion) quantifiziert. Vor der Analyse der Studienproben erfolgte eine mehrtägige Mikroskop- und Erythrozytenmorphologieeinschulung durch den Diplomarbeitbetreuer OA Dr. Robier. Dabei wurden von jeder Erythrozyten-Anomalie Beispielfotos mit der Mikroskopkamera Nikon DS-Fi1 aufgenommen.

Zu den definierten morphologischen Anomalien zählten folgende:

- 1. Anisozytose
- 2. Poikilozytose
- 3. Hypochromie
- 4. Polychromasie
- 5. Dimorphismus
- 6. Basophile Tüpfelung
- 7. Target-Cells
- 8. Unregelmäßig eingezogene Zellen
- 9. Dakryozyten
- 10. Schistozyten/Fragmentozyten
- 11. Elliptozyten
- 12. Ovalozyten
- 13. Pincer Cells
- 14. Fish Cells
- 15. Stomatozyten
- 16. Bite Cells/Degmazyten
- 17. Erythroblasten
- 18. Howell-Jolly Bodies
- 19. Knizozyten

Erythrozytenanomalien

1. Anisozytose

Die Anisozytose ist eine Veränderung des Blutbildes, die eine erhöhte Variabilität der Erythrozytengrößen beschreibt. (7; 6) Es ist ein unspezifisches Zeichen, das bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen vorkommt, zum Beispiel bei Eisenmangelanämie, Thalassämien, Begleitanämien, megaloblastärer Anämie oder nach Transfusionen. (7; 6)

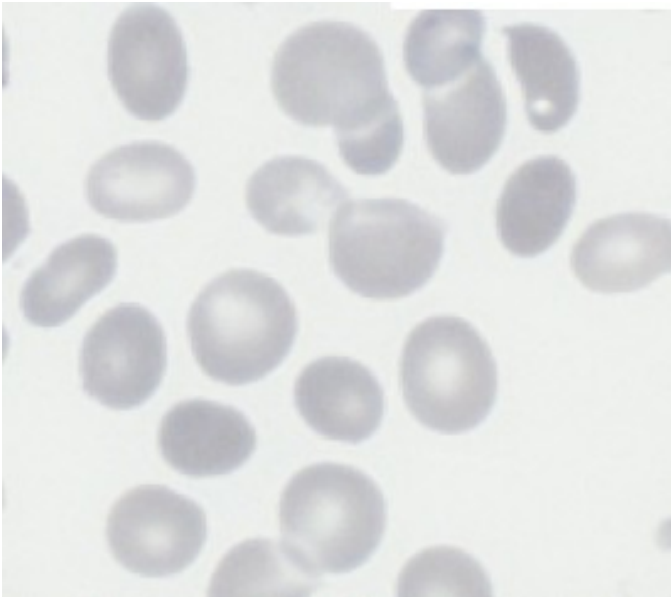


Bild 1: Anisozytose

2. Poikilozytose

Poikilozytose ist ein allgemeiner Begriff und beschreibt einen erhöhten Anteil an Zellen mit atypischer Form. (7) Es handelt sich hier ebenfalls um eine allgemeine unspezifische Änderung des Blutbildes, die bei vielen hämatologischen Erkrankungen vorkommt, allerdings kann vermehrtes Vorkommen gewisser Poikilozyten für eine Diagnose aufschlussreich sein. (7)

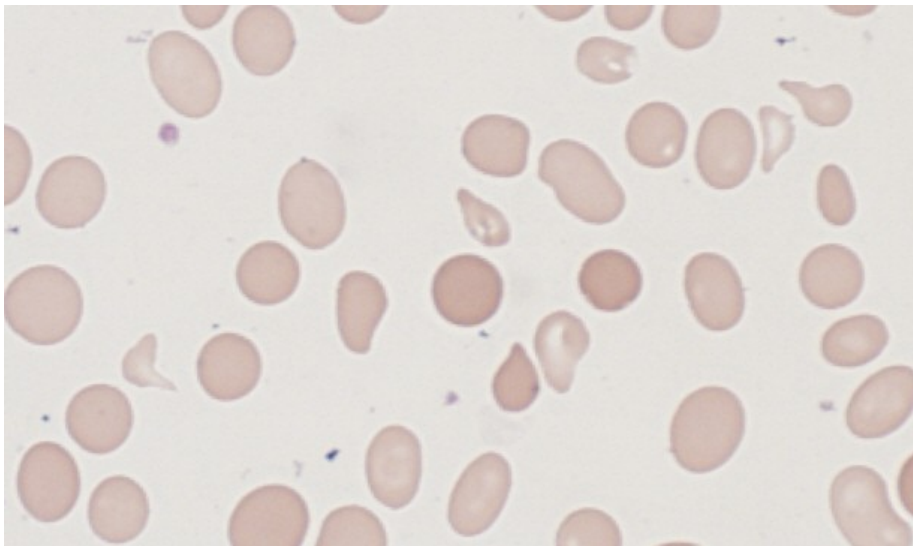


Bild 2 Poikilozytose

3. Hypochromie

Eine Hypochromie erkennt man am erhöhten Durchmesser der zentralen Aufhellung der Erythrozyten, welcher im normalen Blutbild ca. ein Drittel des Gesamtdurchmessers eines Erythrozyten ausmacht. (7) Kombiniert mit einer Mikrozytose kommt die Hypochromie bei Eisenmangel, Thalassämien oder chronischen Erkrankungen vor. (6)

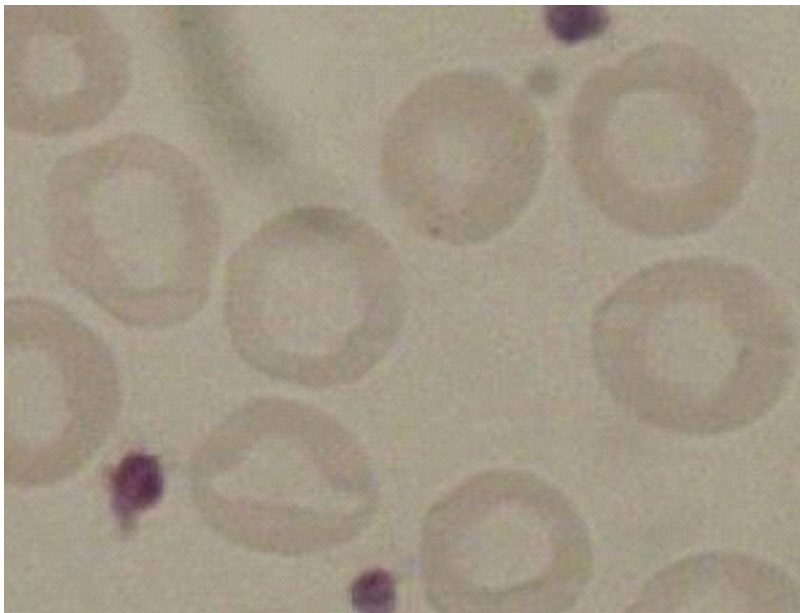


Bild 3: Hypochromie

4. Polychromasie

Bei polychromatischen Zellen handelt es sich um unreife Erythrozyten, die erst kurz zuvor das Knochenmark verlassen haben. (7) Sie sind größer als normale Erythrozyten und aufgrund der zusätzlichen Aufnahme basischer Farbstoffe durch die restliche ribosomale DNA erscheinen sie unter dem Mikroskop bläulich. (7; 6) In einem normalen Blutaussstrich beträgt ihre Anzahl weniger als 0,1%, was noch seltener ist als Retikulozyten. (7) Eine Polychromasie kommt bei gesunden Neugeborenen vor, kann bei Erwachsenen jedoch auf eine Retikulozytose im Rahmen einer hämatopoetischen Belastung hindeuten. (6) Dabei kommt es zu einem erhöhten Erythropoetinspiegel, worauf eine vermehrte Blutbildung und eine Ausschüttung unreifer Erythrozyten folgen. (7)

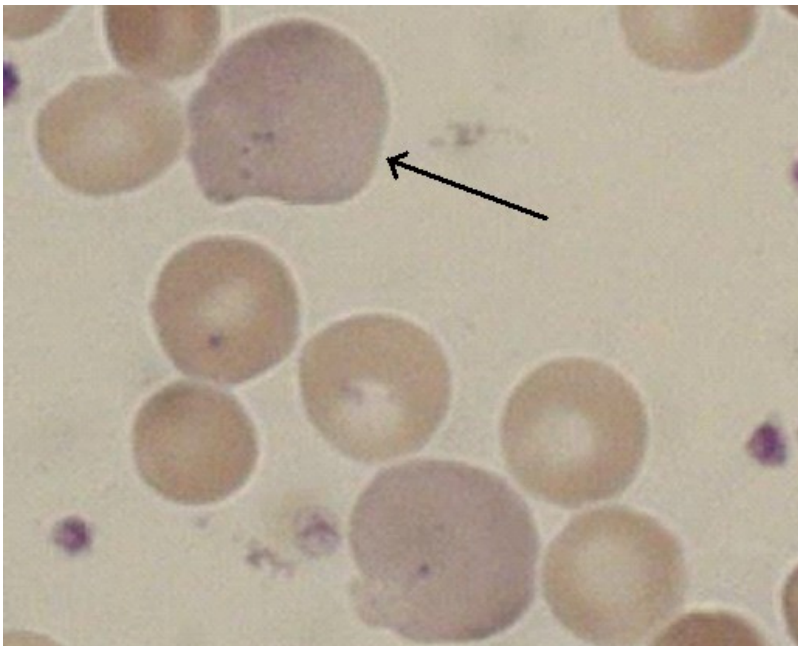


Bild 4: Polychromasie

5. Dimorphismus

Dabei kommen zwei verschiedene Populationen von roten Blutzellen vor. (7) Zum Beispiel kann eine Population mikrozytäre Zellen enthalten, die andere normozytäre. Ein Dimorphismus würde typischerweise bei behandeltem Eisenmangel, bei myelodysplastischen Syndromen oder nach Transfusionen vorliegen. (6)

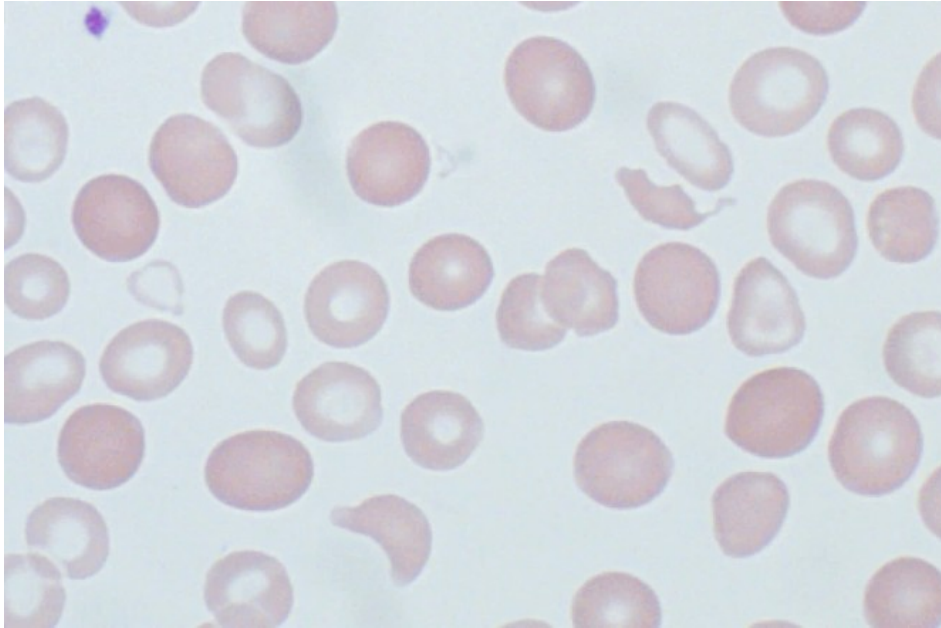


Bild 5: Dimorphismus

6. Basophile Tüpfelung

Bei dieser Zellanomalie treten viele kleine basophile Einschlüsse innerhalb eines Erythrozyten auf. Zellen mit basophiler Tüpfelung kommen auch vereinzelt bei normalen Personen vor. (7) Die Einschlüsse bestehen im Wesentlichen aus Ribosomenaggregaten und enthalten Ribonukleinsäure. (7) Eine Vermehrung wird besonders deutlich bei β -Thalassämien beschrieben, kann jedoch allgemein bei dyserythropoetischen Zustandsbildern, sowie bei Lebererkrankungen und bei Schwermetallvergiftungen vorkommen. (7)

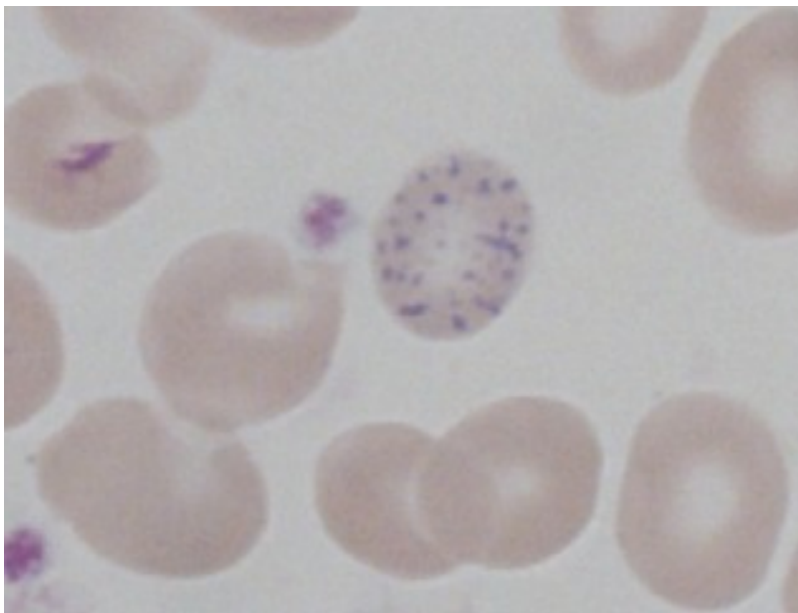


Bild 6: Zelle mit basophiler Tüpfelung

7. Target Cells

In rasterelektronenmikroskopischen Bildern haben Targetzellen eine glockenförmige Gestalt, im Ausstrich unter dem Lichtmikroskop entsteht die typische, an Schießscheiben erinnernde Form. (7) Targetzellen sind sehr häufig sowohl bei der homozygoten, als auch bei der heterozygoten Form der β -Thalassämie zu finden. (3; 7; 6) Darüber hinaus kommen sie auch bei vielen anderen Anämieformen wie bei Hämoglobinopathien oder der Anämie bei Lebererkrankungen vor. (7)



Bild 7:Targetzelle

8. Unregelmäßig eingezogene Zellen

Diese Zellen sind kleiner und dunkler als normale Erythrozyten. Ihnen fehlt oft die zentrale Aufhellung und ihr äußerer Rand ist in manchen Bereichen entrundet. (6)
Diese Veränderung ist unspezifisch und kommt bei verschiedenen Krankheitsbildern, wie zum Beispiel Hämoglobinopathien, vor. (6)



Bild 8: unregelmäßig eingezogene Zelle

9. Dakryozyten

Aufgrund seiner Form wird der Dakryozyt auch als Tränentropfenerythrozyt (teardropcell, teardropoikilocyte) bezeichnet. (7) Je häufiger diese Zellen in einem Blutausstrich vorkommen, umso mehr steigt ihre differentialdiagnostische Bedeutung. (16) Ein sehr häufiges Vorkommen kann auf eine extramedulläre Hämatopoese oder eine Myelofibrose hindeuten. (6; 16)

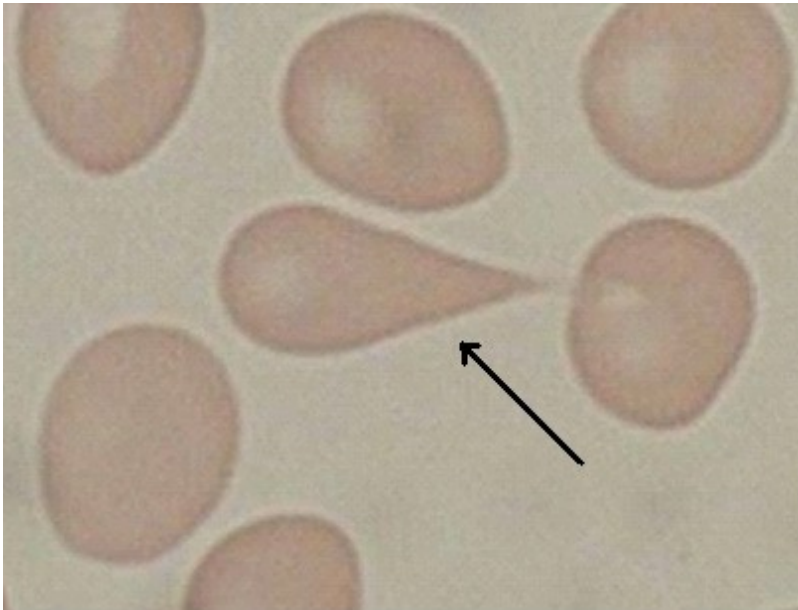


Bild 9: Dakryozyt

10. Schistozyten/Fragmentozyten

Durch den Verlust von Membrananteilen atypischer oder auch normaler Zellen entstehen Erythrozytenfragmente, sogenannte Schistozyten (Fragmentozyten). (7)
Die häufigste Ursache für eine Schistozytenbildung ist eine mikroangiopathische oder mechanisch bedingte hämolytische Anämie. (7)

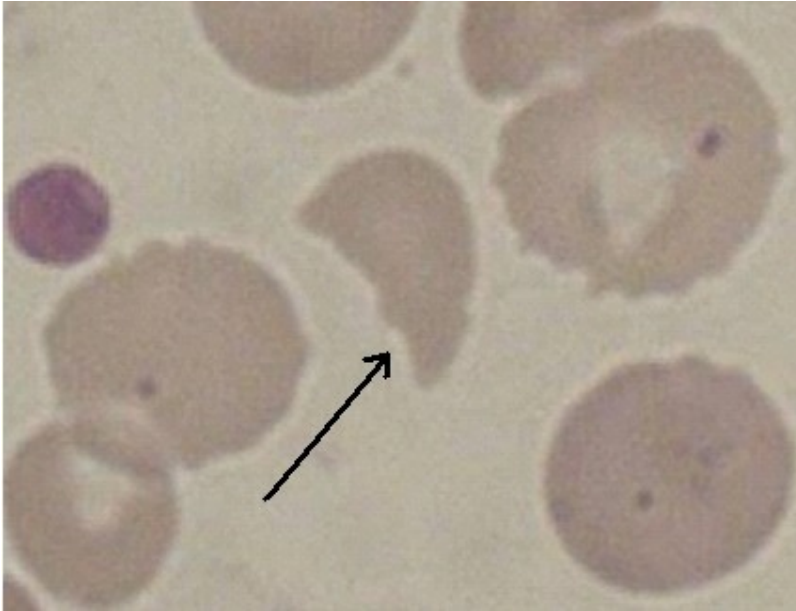


Bild 10: Schistozyt/Fragmentozyt

11. Elliptozyten

Das vermehrte Auftreten von elliptischen Erythrozyten bezeichnet man als Elliptozytose. (7) Stehen diese Zellen in einem Ausstrich im Vordergrund, handelt es sich meist um eine erbliche Abnormität. (7) Geringere Mengen an Elliptozyten weisen auf einen Eisenmangel, megaloblastäre Anämien, Myelofibrose oder auch Thalassämien hin. (7; 6)



Bild 11: Elliptozyt

12. Ovalozyten

Die Begriffe Elliptozyt und Ovalozyt werden in der Literatur oftmals nicht konsequent getrennt. (7) Die Längsachse des Ovalozyten sollte jedoch nicht länger als doppelt so lang sein wie die Querachse. Ist sie länger, handelt es sich um einen Elliptozyt. (7)



Bild 12: Ovalozyt

13. Pincer Cell

Bei Pincer Cells (Mushroom Cells) handelt es sich um pilzförmige Erythrozyten, die meist im Rahmen hämolytischer Anämien, oder auch bei Fällen von Erythroleukämie, beobachtet werden. (7)



Bild 13: Pincer Cell

14. Fish cell

Fischförmige Erythrozyten, hier als „Fish Cells“ bezeichnet, wurden bisher in der Literatur nicht definiert. Sie werden gelegentlich in der Routineblutausstrichdiagnostik beobachtet und gelten bisher als unspezifisch.

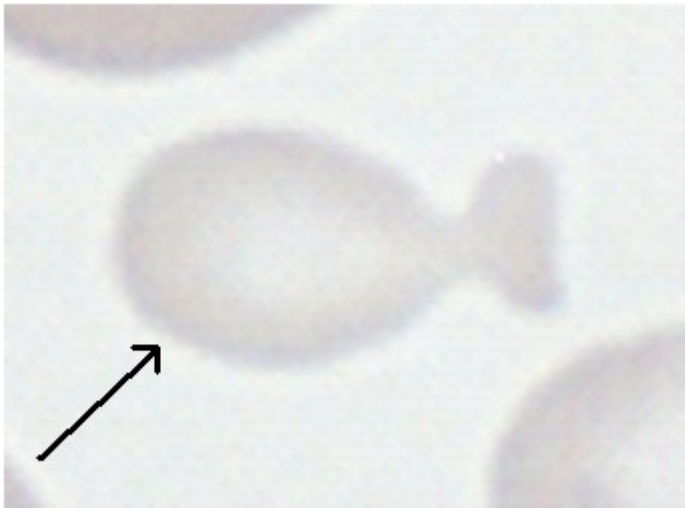


Bild 14: Fish Cell

15. Stomatozyten

Die zentrale Aufhellung bei Stomatozyten ist spaltförmig und gerade statt rund. (7; 6)
Treten in einem Ausstrich nur wenige Stomatozyten auf, kann es sich durchaus um Artefakte handeln. (7; 6) Eine Stomatozytose kann allerdings auch auf eine Schädigung der Leber hinweisen. (7; 6)

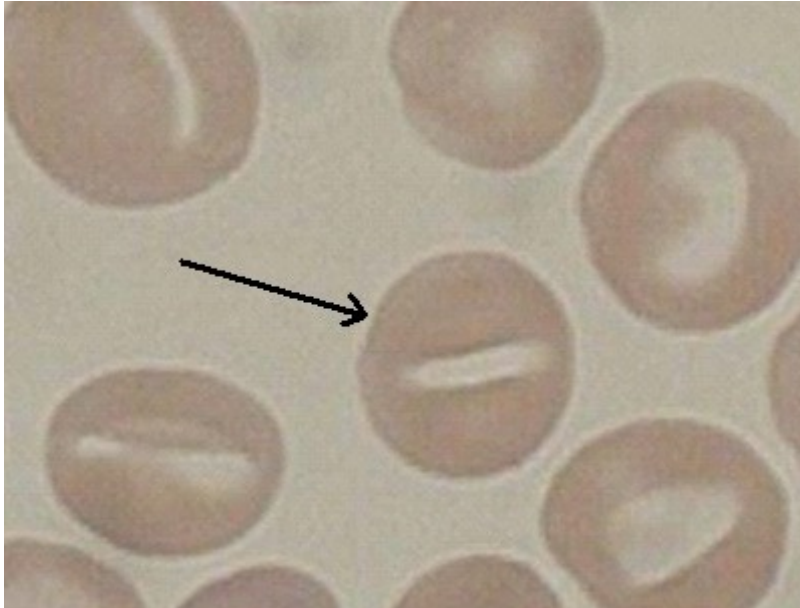


Bild 15: Stomatozyt

16. Bite Cells/Degmazyten

Die rote Blutzelle hat hier eine kleine halbrunde Einziehung an der Außenseite des Zytoplasmas. (6) Ein vermehrtes Vorkommen dieser Zellen kann auf eine Hämolyse zum Beispiel im Rahmen eines G6PH-Mangels oder bei instabilen Hämoglobinen vorkommen. (6)



Bild 16: Bite Cell/Degmazyt

17. Erythroblasten

Bei Erythroblasten handelt es sich um Erythrozytenvorstufen, die noch einen Zellkern enthalten. (7) Sie kommen physiologisch mit Ausnahme der Neugeborenenperiode und in der Schwangerschaft, wo es zu einer Erythroblastämie kommen kann, ausschließlich im Knochenmark vor. (7) Findet man sie im peripheren Blut, kann dies auf verschiedene Erkrankungen wie Myelofibrosen, Knochenmarkinfiltration, myelodysplastische Syndrome oder auch auf eine gesteigerte Erythropoiese wie bei Blutungen oder einer Hämolyse hindeuten. (7)

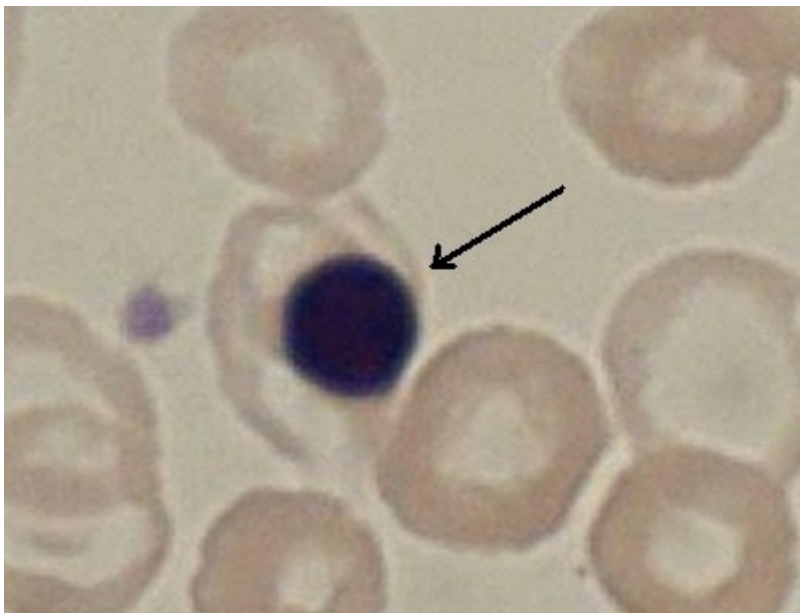


Bild 17: Erythroblast

18. Howell-Jolly Körperchen

Bei Howell-Jolly-Körperchen handelt es sich um basophile Einschlüsse in Erythrozyten. (6) Diese bestehen aus Kernmaterial, welches entweder durch den Zerfall in kleine Fragmente oder durch unvollständige Ausstoßung des Kernes entsteht. (7) Da Erythrozyten mit Howell-Jolly Körperchen normalerweise von der Milz beseitigt werden, kommen sie vorwiegend bei Splenektomie vor. (7; 6)

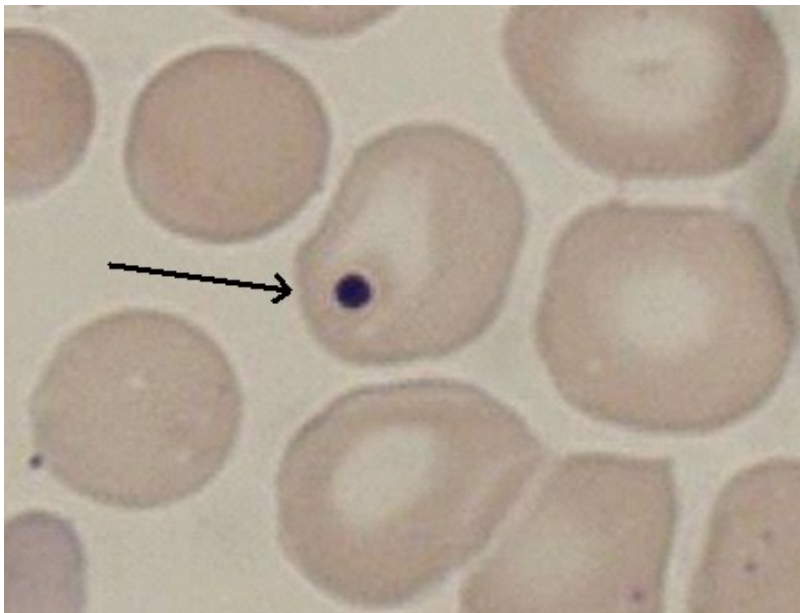


Bild 18: Howell-Jolly Körperchen

19. Knizozyten

Knizozyten sind trikonkave Erythrozyten, bei denen die zentrale Aufhellung wie mit einem Balken unterteilt wirkt. Die Zelle erscheint so, als ob sie einen Henkel hätte. Knizozyten gelten prinzipiell als unspezifisch, werden aber gehäuft bei Lebererkrankungen gefunden. (17)

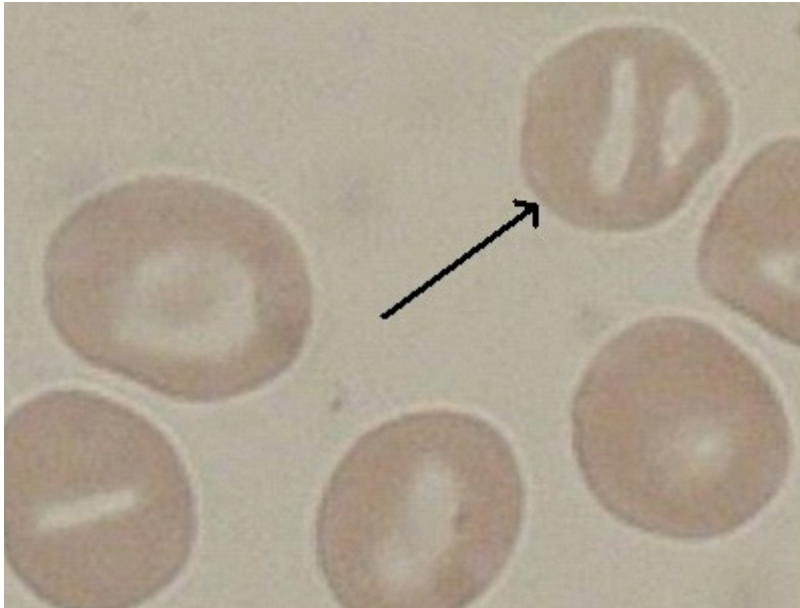


Bild 19: Knizozyt

Ergebnisse

Basischarakteristik

Anhand der Einschlusskriterien wurden zunächst 42 PatientInnen mit β -Thalassaemia minor, die im Zeitraum von 01/2001 bis Ende 12/2014 diagnostiziert wurden, anhand der Krankenunterlagen identifiziert. 9 PatientInnen schieden aufgrund schlechter Ausstrichqualität, fehlender oder zerbrochener Slides, aus. Somit blieben beurteilbare Blutausstrichpräparate von 33 PatientInnen, davon 15 Frauen und 18 Männer, für die Auswertung übrig und wurden in die Studie eingeschlossen. Das Altersspektrum der PatientInnen reichte von einem Jahr bis 56 Jahre.

Bei allen PatientInnen waren sowohl das mittlere zelluläre Volumen (MCV), als auch das mittlere zelluläre Hämoglobin (MCH) und die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) vermindert. Es zeigte sich folglich in allen Fällen eine Hypochromie und eine Mikrozytose.

Viele von ihnen hatten ebenfalls, wie bei der β -Thalassaemia minor typisch, eine kompensatorisch leicht erhöhte Erythrozytenzahl. Die Anzahl der Retikulozyten war normal bis erhöht, ebenso wie die Verteilungsbreite der Erythrozytengröße (RDW-Wert).

Probandenzahl, n	33
Geschlecht	
weiblich, n (%)	15 (45,45)
männlich, n (%)	18 (54,55)
Alter, Median (range)	33(1 – 56)
Erythrozyten ($10^6/\mu\text{l}$), Median (range)	6,07 (5,1 - 7,64)
Hb (g/dl), Median (range)	12,5 (10 – 15)
MCV (fl), Median (range)	65 (58 – 76)
MCH (pg) Median (range)	20 (18 – 24,8)
MCHC (g/dl), Median (range)	31 (28 – 33,3)

Reti relativ (Promille), Median (range)	16 (4 – 25)
Reti absolut (Reti/ μ l), Median (range)	93000 (21500 – 147000)
RDW (%), Median (range)	15 (10 – 27)

Tabelle 1

Hämoglobin-Diagnostik/Analytik

HbA2 (%), Median (range)	5,3 (3,8 – 9,1)
HbF (%), Median (range)	1,5 (>0,5 – 4,6)

Tabelle 2

Vorhandensein von Erythrozytenanomalien

Nach der Auswertung konnte festgestellt werden, dass bei allen Präparaten Anomalien der Erythrozyten gefunden werden konnten, jedoch gab es Unterschiede sowohl im Vorkommen, als auch in der Anzahl der verschiedenen Anomalien. In allen Präparaten war sowohl eine Anisozytose als auch eine Poikilozytose vorhanden. Gefunden wurden Zellen mit basophiler Tüpfelung, Target Cells, unregelmäßig eingezogene Zellen, Dakryozyten, Schistozyten/Fragmentozyten, Elliptozyten, Ovalozyten, PincerCells, FishCells, Stomatozyten und BiteCells/Degmazyten. Einige Zellformen waren in keinem der untersuchten Präparate zu finden, dazu gehörten Erythroblasten, Präkeratozyten/Blister Cells und Zellen mit Howell-Jolly-Bodies. In Rahmen der statistischen Auswertung wurden für jede gefundene Zellanomalie Medianwerte und Ranges ermittelt, um einen Überblick, sowohl im Vorkommen in n Präparaten als auch in der Anzahl der Zellen pro Präparat zu gewinnen. Der Median gibt den Wert an, der bei einer Sortierung nach Größe in der Mitte steht. Daraus folgt, dass 50% der PatientInnen eine höhere Anzahl an einer bestimmten Anomalie als den Medianwert und 50% eine niedrigere Anzahl haben. Es kann somit im Gegensatz zum arithmetischen Mittelwert bestimmt werden, ob es sich bei sehr hohen Maximalwerten um einen einzelnen Ausreißer, oder um ein allgemein häufiges Vorkommen einer Zellanomalie handelt.

Die mit Abstand häufigste Form machten die Target-Zellen aus, welche auch als einzige der identifizierten Anomalien, trotz der stark unterschiedlichen Häufigkeit von minimal 4 bis maximal 278 Zellen, jedoch einem Median von nur 42 Zellen pro 20 Gesichtsfelder, in jedem Präparat vorhanden waren.

Ovalozyten kamen in 32 von 33 Ausstrichen (96,9%) vor, mit einer Häufigkeit von 2-85 Zellen, jedoch einem Median von nur 13 pro 20 Gesichtsfelder.

Stomatozyten und Dakryozyten waren jeweils in 27 der Präparate (81,8%) vorhanden. Die Stomatozyten waren jedoch mit 1-53 Zellen und einem Median von 10 pro 20 Gesichtsfelder häufiger als die Dakryozyten mit 1-23 Zellen und einem Median von 6 pro 20 Gesichtsfelder.

Elliptozyten kamen in 25 Präparaten (75,8%) vor, mit einer Häufigkeit von 1-46 Zellen und einem Median von 7 pro 20 Gesichtsfelder.

Die Zellen mit basophiler Tüpfelung waren in 24 Ausstrichen (72,7%) vorhanden mit 1 bis zu 101 Zellen und einem Median von 7 pro 20 Gesichtsfelder.

Unregelmäßig eingezogene Zellen kamen in 21 Präparaten (63,6%) vor, mit einer Verteilungsbreite von 1-102 Zellen und einem Median von 6 pro 20 Gesichtsfelder.

Schistozyten/Fragmentozyten, Pincer Cells, Fish Cells und Bite Cells kamen nur in wenigen Präparaten vor. In den positiven Blutausrichen waren sie jeweils nur vereinzelt vorhanden.

Genauere Informationen zur Häufigkeit in der Anzahl und im Auftreten der einzelnen Erythrozyten-Anomalien kann man in den Tabellen 3 und 4, sowie in den beiden Diagrammen ablesen.

Auftreten von Anomalien bei n Patienten

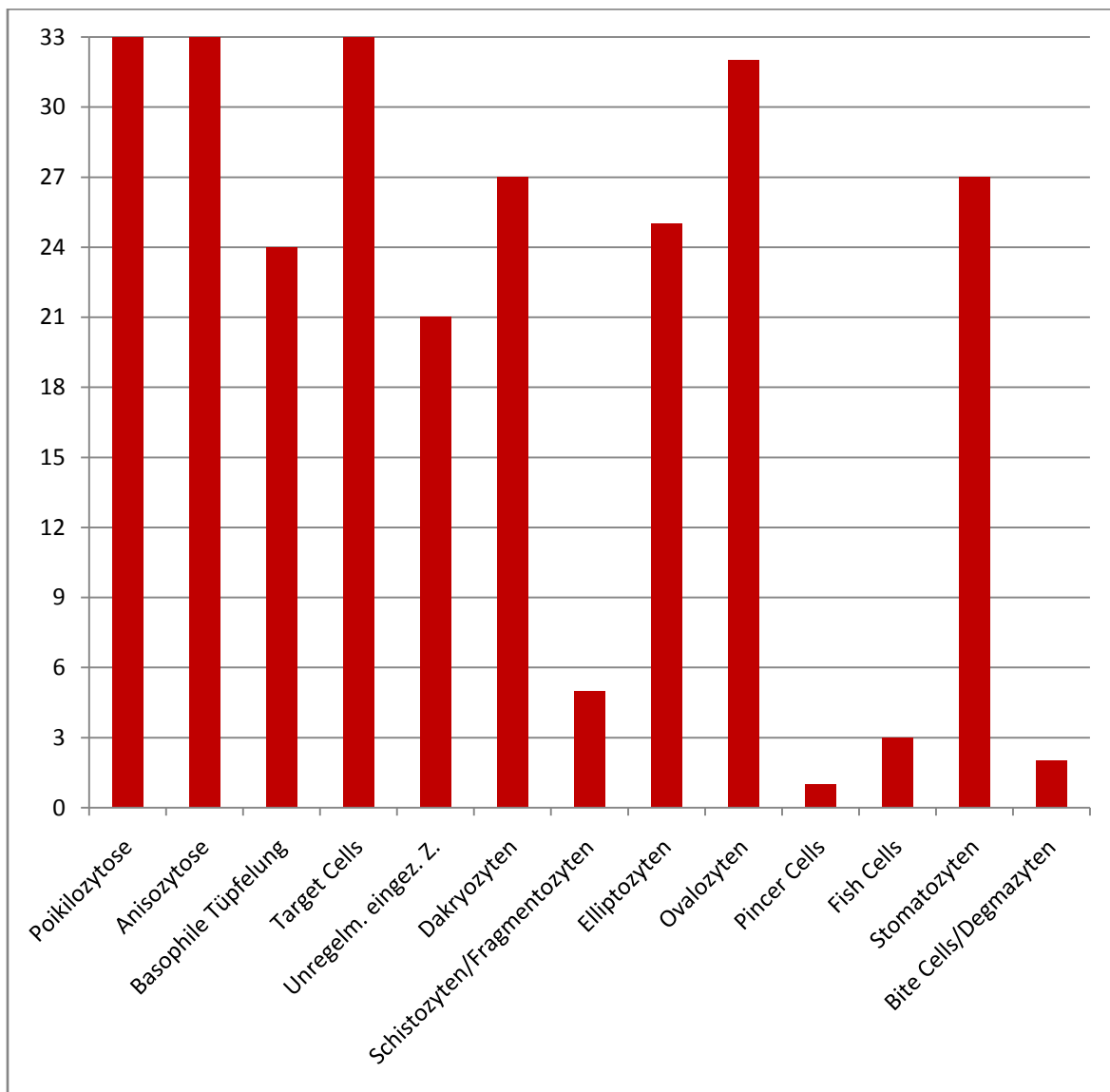
Die folgende Tabelle und das folgende Diagramm geben an, welche Anomalien in wie vielen Präparaten zu finden waren.

Zellanomalie	Häufigkeit des Auftretens n(%)
Anisozytose	33 (100)
Poikilozytose	33 (100)
Basophile Tüpfelung	24 (72,7)
Target cells	33 (100)
Unregelmäßig eingezogene Zellen	21 (63,6)
Dakryozyten	27 (81,8)
Schistozyten/Fragmentozyten	5 (15,2)
Elliptozyten	25 (75,8)
Ovalozyten	32 (96,9)
Pincer cells	1 (3)
Fish cells	2 (6)
Stomatozyten	27 (81,8)
Bite cells/Degmazyten	2 (6)
Erythroblasten	0
Präkeratozyten/Blister cells	0
Howell-Jolly bodies	0

Tabelle 4

Im folgenden Diagramm ist graphisch dargestellt, in wie vielen Ausstrichen die angegebenen Zellen vorhanden waren.

Erythroblasten, Präkeratozyten (Blister cells) und Zellen mit Howell-Jolly Körperchen sind in dem Diagramm ausgespart, da sie in keinem der Präparate zu sehen waren.



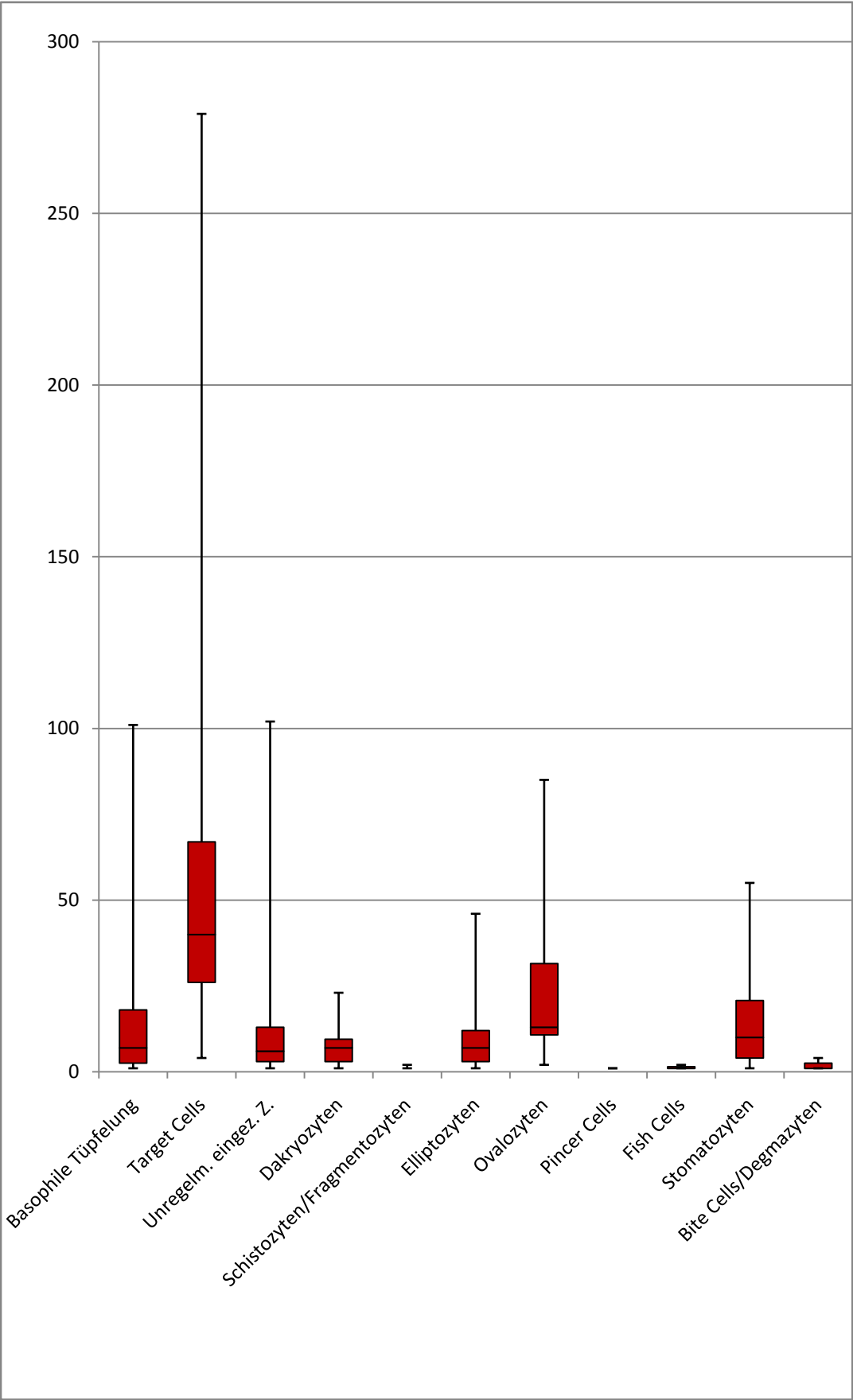
Häufigkeit von Erythrozyten-Anomalien

Die folgende Tabelle und das folgende Diagramm geben die Häufigkeiten der unterschiedlichen Erythrozytenmorphologien in den positiven Blutausstrichpräparaten als Median, Minimum und Maximum an.

Zellanomalie	Zellzahl, Median (range)
Basophile Tüpfelung	7 (0 – 101)
Target cells	42 (4 – 279)
Unregelmäßig eingezogene Zellen	6 (0 – 102)
Dakryozyten	6 (0 – 23)
Schistozyten/Fragmentozyten	1 (0 – 2)
Elliptozyten	7 (0 – 46)
Ovalozyten	13 (0 – 85)
Pincer cells	1 (0 – 1)
Fish cells	1 (0 – 2)
Stomatozyten	10 (0 – 55)
Bite cells/Degmazyten	2,5 (0 – 4)
Erythroblasten	0
Präkeratozyten/Bilster cells	0
Howell-Jolly bodies	0

Tabelle 3

Anzahl der abnormen Erythrozyten pro 20 Gesichtsfelder, bei 1000-facher Vergrößerung



Diskussion

In dieser Studie wurden die Blutausstrichpräparate von 33 PatientInnen mit vordiagnostizierter β -Thalassaemia minor untersucht. Dabei wurde erst das Vorhandensein oder nicht Vorhandensein verschiedener morphologischer Erythrozytenanomalien überprüft und die einzelnen anomalen Zellen im Falle von Positivität bei 1000-facher Vergrößerung und pro 20 Gesichtsfelder gezählt. Zusätzlich wurden routinemäßige, mittels Hämatologieautomaten ermittelte Erythrozytenparameter, wie Erythrozytenzahl, Hb, MCV, MCH, MCHC, Retikulozytenzahl relativ und absolut und RDW aus der Krankenakte ermittelt und ausgewertet.

Dabei wurde festgestellt, dass bei allen Präparaten eine Anisozytose und eine Poikilozytose, jedoch unterschiedlichen Ausmaßes, vorhanden war. Das Spektrum der Anzahl der Erythrozytenanomalien reichte von beinahe physiologischen peripheren Blutausstrichen mit nur wenigen Anomalien bis zu starken Veränderungen in der Morphologie.

Die dominierende Zellanomalie machten die Targetzellen aus, die in jedem Präparat vorhanden waren, mit einem Minimum von 4 Zellen und einem Maximum von 279 Zellen pro 20 Gesichtsfelder. Ovalozyten, Stomatozyten, unregelmäßig eingezogene Zellen, Elliptozyten und Zellen mit basophiler Tüpfelung waren ebenfalls häufig vorhanden. Dakryozyten, Schistozyten, PincerCells, FishCells und Degmazyten kamen nur vereinzelt und in wenigen Präparaten vor, während Erythroblasten, Präkeratozyten und Zellen mit Howell-Jolly Körperchen nicht vorhanden waren. Das beobachtete häufige Auftreten von Targetzellen und Zellen mit basophiler Tüpfelung stimmt gut mit der vorbestehenden Literatur überein. Vermehrtes Vorkommen von Targetzellen und Zellen mit basophiler Tüpfelung bei einer mikrozytären hypochromen Anämie und einem unauffälligen Eisenstatus wurden bereits zuvor als ein Indiz für β -Thalassaemia minor beschrieben. (3; 5; 6; 11; 12) Die anderen häufig beobachteten Zellformen wurden meines Wissens nach bisher in keiner Studie im Zusammenhang mit β -Thalassaemia minor in diesem Umfang untersucht.

Im Jahr 1986 wurde von Joishy SK et al. (11) die Verteilung der Morphologie von roten Blutzellen für die Diagnostik der β -Thalassämieträger analysiert. Dabei wurden die peripheren Blutausstriche von 59 β -Thalassämieträgern, 60 PatientInnen mit

einer Mikrozytose anderer Ursache und 64 PatientInnen ohne Mikrozytose zufällig ausgewählt und blind evaluiert. Der/die UntersucherIn musste anhand morphologischer Kriterien eine Diagnose treffen, von welcher dann sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität bestimmt wurden. Die Kriterien des Experiments beinhalteten das Vorhandensein von basophiler Tüpfelung und entweder Mikrozytose oder Targetzellen. Die Kontrollkriterien beinhalteten nur Mikrozytose und Poikilozytose. Das Ergebnis dieser Untersuchung war eine eher geringe Sensitivität von 73% bei experimentellen Kriterien und Kontrollkriterien, allerdings eine hohe Spezifität von 99% bei den experimentellen Kriterien. Der Vorhersagewert bei den Kriterien des Experiments war ebenfalls mit 98% sehr hoch.

In einer anderen Studie von Calero F. et al. aus dem Jahr 1990 (13) wurden die hämatologischen Daten von 825 Fällen von β -Thalassaemia minor und TrägerInnen von δ - β -Thalassaemia untersucht. Es gab hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Krankheitsformen. Beide zeigten ein signifikant reduziertes MCV, und in den meisten peripheren Blutaussstrichen war eine veränderte Morphologie der roten Blutzellen zu vermerken, insbesondere Zellen mit basophiler Tüpfelung, die bei 96% der Patienten vorkamen.

Harrington, Ward und Kroft (12) untersuchten 2008 vier unterschiedliche morphologische Erythrozytenanomalien bei Patienten mit Eisenmangelanämie, β -Thalassaemia minor oder Anämie bei chronischen Erkrankungen. Zu den Anomalien gehörten Präkeratozyten, Bleistiftzellen (in dieser Studie fallen sie unter Elliptozyten), Targetzellen und Zellen mit basophiler Tüpfelung. Dabei wurden 40 PatientInnen mit Eisenmangelanämie, 30 mit β -Thalassämia minor und 40 mit einer Anämie aufgrund einer chronischen Erkrankung, untersucht. In den Ergebnissen wurde sowohl angegeben, in wie vielen peripheren Blutaussstrichen die angegebenen Zellanomalien vorhanden waren, als auch die mittlere Anzahl der anomalen Zellen pro 1000 normaler roter Blutzellen.

Die Präkeratozyten waren bei 31 von 40 (78%) der PatientInnen mit Eisenmangelanämie vorhanden, bei 11 von 30 (37%) PatientInnen mit β -Thalassaemia minor und bei 5 von 40 (13%) der StudienteilnehmerInnen mit einer Anämie bei chronischer Erkrankung. Die mittlere Anzahl der Präkeratozyten pro 1000 Erythrozyten war bei der Eisenmangelanämie mit 0,78 am höchsten.

Die Bleistiftzellen waren definiert als anomale Zellen, deren Längsachse mindestens drei mal so lang war wie die Breitachse. Sie wurden bei 28 (70%) der Präparate mit

Eisenmangelanämie, 9 (30%) bei β -Thalassaemia minor und bei den Anämien bei chronischer Erkrankung bei 5 (13%) festgestellt. Sie kamen ebenfalls bei Eisenmangelanämie am häufigsten vor.

Die Targetzellen kamen sowohl bei der Eisenmangelanämie mit 38 (95%) der PatientInnen, als auch bei der β -Thalassaemia minor bei 28 (93%) der PatientInnen sehr häufig vor. In Präparaten von PatientInnen mit Anämie bei chronischer Erkrankung waren sie nur in 26 (65%) der Präparate vorhanden.

Zellen mit basophiler Tüpfelung waren hier insgesamt selten und kamen in nur 5 (17%) der β -Thalassämie Ausstriche vor. Bei den anderen beiden Krankheiten waren sie noch seltener.

Trotz einer umfassenden Literaturrecherche wurden keine weiteren genaueren Vergleichsdaten zu Auftreten und Häufigkeit von morphologischen Erythrozytenanomalien bei β -Thalassaemia minor gefunden. Es ist somit meines Wissens nach die erste Studie, die sich genauer mit der Dokumentation der Häufigkeiten eines so großen Spektrums an verschiedenen Erythrozytenanomalien bei β -Thalassaemia minor beschäftigt hat.

Die Erkenntnisse aus dieser Studie können für die Routinediagnostik von peripheren Blutausstrichen relevant sein, da bei Auftreten der dokumentierten morphologischen Anomalien, insbesondere bei Vorliegen einer Hypochromie und Mikrozytose, die β -Thalassaemia minor in die Differentialdiagnostik miteinbezogen werden sollte.

Literaturverzeichnis

1. **Huber A, Ottinger C, Risch L, Regenass S, Hegersberg M, Herklotz R.** Hämoglobinopathien: Pathophysiologie und Klassifizierung. *Schweiz-Med-Forum*. 2004, 4, S. 895-901.
2. **Galanello R, Origa R.** Beta-Thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. Mai 2010, 5:11.
3. **BJ, Bain.** *Haemoglobinopathy Diagnosis*. 2. s.l. : Blackwell Publishing, 2006.
4. **Rund D, Rachmilewitz E.** beta-Thalassemia. *The New England Journal of Medicine*. September 2005, S. 1135-1146.
5. **Clarke GM, Higgins TN.** Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. *Clinical Chemistry*. 2000, S. 1284-1290.
6. **J., Ford.** Red blood cell morphology. *International Journal of Laboratory Hematology*. Jänner 2013, 35, S. 351-357.
7. **Bain BJ, Huhn D.** *Roche Grundkurs hämatologische Morphologie*. s.l. : Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin-Wien. S. 48-67.
8. **Weiss G, Goodnough LT.** Anemia of chronic disease. *New England Journal of Meicine*. 2005, 352, S. 1011-23.
9. **EC, Lynch.** Peripheral Blood Smear. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3, 1990, S. 732-734.
10. **BJ., Bain.** Diagnosis from the Blood Smear. *The New England Journal of Medicine*. August 2005, 353, S. 498-507.
11. **Joishy SK, Shafer JA, Rowley PT.** The contribution of red blood cell morphology to the beta-thalassemia trait. *Blood Cells*. 1986, 11, S. 367-74.
12. **Harrington AM, MD, Ward PCJ, Kroft SH,.** Iron Deficiency Anemia, beta-Thalassemia Minor, and Anemia of Chronic Disease; A Morphologic Reappraisal. *America Journal of Clinical Pathology*. März 2008, 129, S. 466-471.
13. **Calero F, Villegas A, Porres A, Valverde F, del Potro, Sánchez P, Luque JM, Espinós D.** Hematologic Data in 825 cases of beta-thalassemia trait in Spain. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1990, 32, S. 265-70.
14. **Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, Chan V, Fucharoen S, Giordano PC, Hoyer JD, Mosca A, B. Wild B.** ICSH recommendations for the measurement of Haemoglobin A2. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2012, 34, S. 1-13.

15. **Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, Chan V, Davis B, Fucharoen S, Giordano PC, Hoyer JD, Mosca A.** ICSH recommendations for the measurement of Haemoglobin F. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2012, 34, S. 14-20.
16. **Gütgemann I, Heimpel H, Nebe CT.** Die Bedeutung von Tränentropfenerythrozyten im peripheren Blutaussstrich. *J Lab Med*. 2013, 37 (5), S. 227-231.
17. **Lesesve JF, Gorcon L, Lecompte T.** Finding knizocytes in peripheral blood smear. *American Journal of Hematology*. 2012, 87, S. 105-106.