

Diplomarbeit

**Abklärung von Anämien – Welche Laborparameter und
differentialdiagnostischen Überlegungen sind dafür
notwendig?**

eingereicht von
Timon Korte

zur Erlangung des akademischen Grades

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

an der
Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am
**Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik/
Universität Graz**

unter der Anleitung von
PD Dr. Dietmar Enko und PD Mag. Dr. Andreas Meinitzer

Graz, am 06.05.2021

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 06.05.2021

Timon Korte eh.

Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Dietmar Enko und PD Mag. Dr. Andreas Meinitzer für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung bedanken. Ich habe die unkomplizierte und sehr kompetente Zusammenarbeit überaus genossen.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und meinem Bruder die mich in der Studienzeit, auch in belastenden Phasen, stets unterstützt haben und mir zur Seite standen. Ich schätze mich sehr glücklich, in einer so liebevollen Familie aufgewachsen zu sein.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden, insbesondere den „Moises“: Christian, Jan, Marco, Mario und Markus bedanken. Sie haben die Zeit in Graz und mein Leben insgesamt geprägt und bereichert.

Für Opa Gerhard

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNGEN	II
INHALTSVERZEICHNIS	III
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG	VII
ABSTRACT	VIII
1 EINLEITUNG	9
2 MATERIAL UND METHODEN	10
3 ERGEBNISSE	11
3.1 ANÄMIE ALLGEMEIN.....	11
3.1.1 <i>Definition</i>	11
3.1.2 <i>Klassifizierung</i>	19
3.2 MIKROZYTÄR.....	22
3.2.1 <i>Überblick</i>	22
3.2.2 <i>Diagnostik, konventionelle und neue Laborparameter</i>	23
3.3 MAKROZYTÄR.....	34
3.3.1 <i>Überblick</i>	34
3.3.2 <i>Diagnostik, konventionelle und neue Laborparameter</i>	35
3.4 NORMOZYTÄR.....	41
3.4.1 <i>Überblick</i>	41
3.4.2 <i>Hämolytische Anämien</i>	42
3.5 FLOWCHARTS/STUFENDIAGNOSTIK FÜR DEN KLINISCHEN ALLTAG.....	50
3.5.1 <i>Mikrozytäre Anämie</i>	50
3.5.2 <i>Makrozytäre Anämie</i>	51
3.5.3 <i>Normozytäre Anämie</i>	52
4 DISKUSSION	54
5 LITERATURVERZEICHNIS	56

Glossar und Abkürzungen

ACD	<i>Anemia of Chronic Disease</i>
AIHA	<i>autoimmunhämolytische Anämie</i>
AST	<i>Aspartat-Aminotransferase</i>
CED	<i>chronisch entzündliche Darmerkrankungen</i>
CHr	<i>Retikulozytenhämoglobin</i>
DAT	<i>direct antiglobulin test</i>
GOT	<i>Glutamat-Oxalacetat-Transaminase</i>
GPI	<i>Glykosylphosphatidylinositol</i>
Hb	<i>Hämoglobinkonzentration</i>
Hcy	<i>Homocystein</i>
HELLP	<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count</i>
Hkt	<i>Hämatokrit</i>
HoloHC	<i>Holohaptocorrin</i>
HoloTC	<i>Holotranscobalamin</i>
HUS	<i>hämolytisch urämisches Syndrom</i>
IF	<i>Intrinsic Factor</i>
IRIDA	<i>Iron Refractory Iron Deficiency Anemia</i>
LDH	<i>Lactatdehydrogenase</i>
MCH	<i>mittleres korpuskuläres Hämoglobin</i>
MCV	<i>mittleres korpuskuläres Volumen</i>
MMA	<i>Methylmalonic acid (Methylmalonsäure)</i>
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NTDT	<i>Non-transfusion-dependent thalassemias</i>
PIG-A Gen	<i>Phosphatidyl-Inositol-Glykan-Anker Gen</i>
PNH	<i>Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie</i>
RDW	<i>Erythrozytenverteilungsbreite</i>
sTfR	<i>soluble Transferrin Receptors</i>
TDT	<i>Transfusion-dependent thalassemias</i>
TSAT	<i>Transferrinsättigung</i>
TTP	<i>thrombotisch- thrombozytopenische Purpura</i>
UAE	<i>unexplained anemia of the elderly</i>

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: RETIKULOZYTENPRODUKTIONSINDEX.....	20
ABBILDUNG 2: THOMAS PLOT	27
ABBILDUNG 3: FLOWCHART ZUR IDENTIFIKATION VON THALASSÄMIE-TRÄGER.....	31
ABBILDUNG 4: KLINISCHE EINTEILUNG DER THALASSÄMIEN IN NTDT UND TDT	32
ABBILDUNG 5: STUFENMODELL ZUR BESTIMMUNG DES VITAMIN B ₁₂ MANGELS NACH HERRMANN UND OBEID	38
ABBILDUNG 6: FLOWCHART MIKROZYTÄRE ANÄMIE	50
ABBILDUNG 7: FLOWCHART MAKROZYTÄRE ANÄMIE	51
ABBILDUNG 8: FLOWCHART NORMOZYTÄRE ANÄMIE	52

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VORGESCHLAGENE GRENZWERTE FÜR DIE HÄMOGLOBINKONZENTRATION.....	12
TABELLE 2: HÄMOGLOBINKONZENTRATION MIT DEM GERINGSTEN MORTALITÄTSRISIKO	14
TABELLE 3: HÄMOGLOBIN-REFERENZINTERVALL FÜR MENSCHEN ÜBER 60 JAHRE.....	14
TABELLE 4: ADJUSTIERUNG DER GEMESSENEN HÄMOGLOBINKONZENTRATION NACH HÖHE.....	16
TABELLE 5: VERGLEICH DER HÄMOGLOBINKONZENTRATION VON RAUCHERINNEN UND NICHTRAUCHERINNEN	18
TABELLE 6: ADJUSTIERUNG DES GEMESSENEN Hb NACH RAUCHANAMNESE	18
TABELLE 7: EISENSTOFFWECHSELPARAMETER BEI INFLAMMATION	25
TABELLE 8: HÄMOGLOBINKONSTELLATION DER NORMALEN ERYTHROZYTEN	28
TABELLE 9: VERGLEICH VERSCHIEDENER THALASSÄMIE INDICES	33
TABELLE 10: MEDIKAMENTE UND MEGALOBLASTÄRE ANÄMIE	35
TABELLE 11: PLASMIC SCORE ZUR ABSCHÄTZUNG DES TTP-RISIKOS	46

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Anämie stellt eine weit verbreitete Erkrankung dar weshalb Ärztinnen und Ärzte die wesentlichen laborchemischen Biomarker für die Differentialdiagnose von Anämien kennen sollten. Dennoch werden in der klinischen Praxis konventionelle und neue Laborparameter sehr oft nicht zielgerichtet eingesetzt.

Ziel: Das Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, einen Überblick über die verschiedenen Anämieformen und deren Diagnose zu geben. Außerdem wird ein besonderes Augenmerk auf die Eisenmangelanämie und die Gruppe der hämolytischen Anämien geworfen.

Methoden: Es wurden sowohl Fachbücher, speziell zum Thema Labormedizin und Hämatologie, als auch wissenschaftliche Artikel und die medizinische Datenbank „UpToDate“ verwendet. Für die Recherche kamen die Datenbanken „PubMed“ und „Google Scholar“ zum Einsatz.

Ergebnisse: Ein Expertenkomitee der Weltgesundheitsorganisation hat festgelegt, dass bei einer Hämoglobinkonzentration erwachsener Männer von unter 13 g/dL und nicht schwangerer Frauen unter 12 g/dL, die Diagnose Anämie zu stellen sei. Einige Autoren schlagen jedoch davon nach oben abweichende Grenzwerte vor und unterscheiden hier unter anderem auch nach der Ethnie. Die Grenzwerte im Alter werden ebenfalls viel diskutiert. Allerdings waren sich die meisten Wissenschaftler darin einig, dass eine Anämie unter den WHO Grenzwerten auch bei der älteren Bevölkerung ernst zu nehmen und nicht physiologisch ist. Bezüglich mikrozytärer Anämien lässt sich festhalten, dass die Ferritin-Bestimmung und ein Blutbild bei einem unkomplizierten Eisenmangel ausreichen. Zur Diagnose bei einer akuten Phase Reaktion bzw. der Abgrenzung zu einer ACD eignet sich der Thomas Plot. Der entscheidende Tests um eine Thalassämie zu detektieren ist die Hb-Elektrophorese. Nicht selten sind für eine definitive Diagnose jedoch auch molekulargenetische Verfahren notwendig. Bei der Abklärung von makrozytären Anämien kommen das Holotranscobalamin und die Serumfolsäure als first-line Parameter zum Einsatz. Normozytäre Anämien stellen gewissermaßen eine Herausforderung dar und es scheint gerade in dieser Gruppe einige Probleme zu geben eine passende Diagnose zu finden. Eine Unterteilung in hypo- und hyperregenerative Formen mittels Retikulozytenparametern ist sinnvoll. Haptoglobin ist ein geeigneter Primärparameter um eine Hämolyse abzuklären. Zielführend ist auch die Bestimmung des CRP und weiterer Hämolyseparameter wie LDH, indirektes Bilirubin sowie im Zweifelsfall freies Hämoglobin.

Abstract

Background: Anemia is a widespread disease, which is why physicians should know the essential laboratory biomarkers for the differential diagnosis of anemia. Nevertheless, in clinical practice conventional and new laboratory parameters are very often not used in a well targeted manner.

Aim: The aim of this paper is therefore to give an overview of the different forms of anemia and its diagnosis. In addition, special attention will be paid to iron deficiency anemia and the group of hemolytic anemias.

Methods: Textbooks, especially on the subject of laboratory medicine and hematology, as well as scientific articles and the medical database "UpToDate" were used. The databases "PubMed" and "Google Scholar" were utilized for the research.

Results: An expert committee of the World Health Organization has determined that the diagnosis of anemia should be made when the hemoglobin concentration of adult men is below 13 g/dL and of non-pregnant women below 12 g/dL. Some authors, however, propose limits that deviate upwards from this and distinguish between different ethnic groups. The threshold values in old age are also much discussed. However, most scientists agreed that anemia below the WHO thresholds should be taken seriously even in the elderly population and are not physiological. With regard to microcytic anemia, it can be stated that ferritin determination and a blood count are sufficient for uncomplicated iron deficiency. The Thomas Plot is suitable for the diagnosis in an acute phase reaction or the differentiation from ACD. The decisive test for detecting thalassemia is hemoglobin electrophoresis. However, molecular genetic procedures are often necessary for a definitive diagnosis. In the clarification of macrocytic anemia, holotranscobalamin and serum folic acid are used as first-line parameters. Normocytic anemias are somewhat of a challenge and there seem to be some problems in finding a suitable diagnosis in this group in particular. A subdivision into hypo- and hyperregenerative forms by using reticulocyte parameters is useful. Haptoglobin is a suitable primary parameter to clarify hemolysis. The determination of CRP and other hemolysis parameters such as LDH, indirect bilirubin and, in case of doubt, free hemoglobin is also helpful.

1 Einleitung

Die Anämie stellt nicht nur in Entwicklungsländern, sondern auch in Industrienationen eine weit verbreitete Erkrankung dar. Sowohl für Ärztinnen und Ärzte im klinischen als auch im niedergelassenen Bereich ist es notwendig, die wesentlichen laborchemischen Biomarker für die Differentialdiagnose von Anämien zu kennen, um weitere richtige diagnostische und therapeutische Entscheidungen treffen zu können.

Nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist bei Frauen ein Hämoglobinwert (Hb) von unter 12 g/dl und bei Männern ein Hb-Wert von unter 13 g/dl eine Anämie (1). So einfach die Definition der Anämie erscheint, so diffizil ist die differentialdiagnostische Abklärung der unterschiedlichen Anämieformen.

So werden in der klinischen Praxis konventionelle und neue Laborparameter zur differentialdiagnostischen Abklärung von Anämien sehr oft nicht zielgerichtet eingesetzt. Dies ist insbesondere bei der häufigsten Anämie, der Eisenmangelanämie, zu beobachten (2). Außerdem gilt es zu hinterfragen worauf die Definition der WHO basiert und ob es möglicherweise bessere Ansätze gibt (3).

Häufig werden PatientInnen mit bestehender Anämie vom stationären Aufenthalt entlassen. Dies kann ein erhöhtes Risiko für eine Wiederaufnahme bedeuten (4). Dabei handelt es sich überwiegend um normozytäre, normochrome Anämien (5). In dieser Arbeit soll somit auch ein besonderes Augenmerk auf diese Gruppe der Anämien geworfen werden.

2 Material und Methoden

Die vorliegende Diplomarbeit beruht auf einer Literaturrecherche zum Thema „Abklärung von Anämien – Welche Laborparameter und differentialdiagnostischen Überlegungen sind dafür notwendig?“. Zur Schaffung eines Grundwissens wurden Fachbücher zum Thema Innere Medizin, speziell Hämatologie, und Labormedizin herangezogen sowie auf die Datenbank UpToDate zurückgegriffen.

Für die tieferreichende Recherche wurde vor allem die medizinische Datenbank „PubMed“ sowie die Suchmaschine „Google Scholar“ verwendet.

Zum Speichern und Einfügen der Quellen kam das Literaturverwaltungsprogramm „EndNote“ zum Einsatz. Es wurde im Vancouver-Stil zitiert.

Die Gliederung der Arbeit entspricht dem EMED-Format, welches sich aus Einleitung, Methoden, Ergebnissen und Diskussion zusammensetzt. Der Hauptteil befindet sich im Ergebnisteil und beginnt mit einem allgemeinen Überblick über die Anämie, setzt sich fort über die einzelnen Anämieformen um dann in einer grafischen Darstellung einer geeigneten Stufendiagnostik zu enden.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Literaturrecherche vorgestellt. Zunächst soll ein Überblick über die Anämie geschaffen werden und dabei vor allem die Grenzwerte der Hämoglobinkonzentration beleuchtet werden. Anschließend werden die einzelnen Anämieformen, eingeteilt nach ihrer Morphologie, besprochen um dann abschließend Stufenschemata für die Diagnostik vorzustellen.

3.1 Anämie allgemein

3.1.1 Definition

Die Anämie ist definiert als eine Verminderung von einem oder mehreren Parametern der wichtigsten Erythrozytenmessungen: Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit oder Erythrozytenzahl.(6)

In der Praxis wird am häufigsten die Hämoglobinkonzentration oder der Hämatokrit herangezogen.

3.1.1.1 Grenzwerte

Ein Expertenkomitee der Weltgesundheitsorganisation (WHO) postulierte 1968 die unteren Grenzwerte der Hämoglobinkonzentration, ab welcher die Diagnose Anämie zu stellen sei. So wurde der untere Grenzwert für erwachsene Männer auf 13 g/dl und für nicht schwangere Frauen auf 12 g/dl festgelegt (1). Diese Grenzwerte wurden bisher wenig hinterfragt, mehr oder weniger universal akzeptiert und finden in der Praxis festen Halt. Jedoch sind diese Werte offensichtlich nicht als globaler Goldstandard für die Diagnose einer Anämie entworfen worden, sondern im Rahmen von Ernährungsstudien mit einer geringen Fallzahl und inadäquaten Methoden aufgekommen (3).

Deshalb haben Ernest Beutler und Jill Waalen versucht eine eigene Definition zu finden, indem große Datensätze herangezogen wurden und daraus eine normale durchschnittliche Hämoglobinkonzentration ermittelt wurde. Es wurden die Datenbank NHANES-III (3rd US National Health And Nutrition Examination Survey) und die Scripps-Kaiser Datenbank (Sammlung von Daten in San Diego im Zeitraum 1998 - 2002) verwendet. Es konnten Probanden mit Zuständen die normale Hb-Werte verfälschen könnten, wie Eisenmangel,

Chronische Inflammation oder erhöhtes Serum Kreatinin bei Älteren sowie schwangere Frauen, exkludiert werden.

Basierend auf den Scripps-Kaiser Daten, bestätigt durch die NHANES Daten, wurden neue untere Grenzwerte vorgeschlagen. (vgl. Tabelle 1)

Tabelle 1: Vorgeschlagene Grenzwerte für die Hämoglobinkonzentration

Gruppe	Hämoglobin [g/dL]
Männliche Weiße [Jahre]	
20 – 59	13,7
60+	13,2
Weibliche Weiße [Jahre]	
20 – 49	12,2
50+	12,2
Männliche Schwarze [Jahre]	
20 – 59	12,9
60+	12,7
Weibliche Schwarze [Jahre]	
20 – 49	11,5
50+	11,5

Beutler et al., The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration?⁽³⁾

Die Normwerte für die Afroamerikanische Bevölkerung sind deutlich niedriger. Dies hat verschiedene Ursachen. Der Hb Unterschied lässt sich nicht nur auf sozioökonomische Faktoren oder Ernährungsunterschiede zurückführen. Die häufigere HbS Konfiguration und chronische Niereninsuffizienz wurden diskutiert aber scheinen nicht ausschlaggebend für die Differenz zu sein. Das höhere Vorkommen von α -Thalassämien ist ein Grund für die unterschiedlichen Hämoglobinkonzentrationen aber auch andere, bisher nicht hinreichend erforschte, vermutlich genetische Ursachen spielen eine Rolle (7).

Dass die Hämoglobinkonzentration von prämenopausalen Frauen niedriger als die von gleichaltrigen Männern ist, wird auf die Menstruation zurückgeführt, da erst mit dem Einsetzen dieser ein wesentlicher Unterschied festzustellen ist (8).

Jedoch wurde auch herausgefunden, dass es eventuell einen physiologischen Unterschied der Geschlechter in dieser Hinsicht gibt. Es konnte gezeigt werden, dass Frauen durchaus in der Lage wären eine höhere Hämoglobinkonzentration zu erreichen, dies aber nicht tun. Der Erythropoetin (EPO) Spiegel ist bei Frauen vor und nach der Menopause gleich. Dies bedeutet, es wird kein höherer Hb angestrebt. Androgene haben einen direkt stimulierenden Effekt auf das Knochenmark und regen die EPO Produktion in der Niere an. Östrogene haben einen gegenteiligen Einfluss auf das Knochenmark. Diese Wirkungen von Sexualhormonen auf die Markerythropoese oder die renale Produktion von EPO erklären aber nicht das Fehlen eines erhöhten erythropoetischen Antriebs bei Frauen als Reaktion auf ihre verminderten mittleren Hämoglobinspiegel. Sexualhormone verändern jedoch auch den Gefäßdurchmesser durch Vasokonstriktion oder -dilatation und beeinflussen somit die Mikrozirkulation. So konnte gezeigt werden, dass Frauen mehr Erythrozyten in der Mikrozirkulation relativ zur venösen Konzentration als Männer haben. Erwachsene Frauen haben außerdem einen höheren Gesamtkörper-Hämatokrit als Männer bei gleichem mittleren venösen Hämoglobinspiegel und haben für jeden Wert des venösen Hämoglobinspiegels einen höheren mittleren mikrovaskulären Hämoglobinspiegel in der Fingerpulpa (9).

Die Grenzwerte im Alter sind viel diskutiert und es ist schwierig einen allgemein akzeptierten Normwert zu finden. Einige Studien konnten zeigen, dass eine erhöhte Mortalität bei Älteren, die eine Anämie nach WHO Definition hatten, besteht (10-15). So haben Penninx et al., auch nach Berücksichtigung von Alter, Gender, BMI und Komorbiditäten sowie Bestätigung mit ProbandInnen ohne prävalente Krankheit, einen niedrigen Hb als Faktor für erhöhte Mortalität gefunden. Gleichzeitig fanden sie, dass sogar ein Grenzwert im niedrig normalen Bereich schon eine Mortalitätserhöhung mit sich zieht (10). Chaves et al. beschrieben auch, dass ein Hb im mittleren Normbereich besser als ein niedrig normaler sei. Es wurde aber auch darauf hingewiesen, dass eine therapeutische Anhebung eines niedrig normalen Wertes der Hb-Konzentration nicht automatisch eine Mortalitätssenkung mit sich führt (13). In den verschiedenen Artikeln wurden jeweils optimale Hämoglobinkonzentrationen beschrieben, welche in Tabelle 2

aufgelistet sind. Es sei angemerkt, dass Martinsson et al. eine Studienpopulation mittleren Alters, zwischen 44 und 73 Jahren, untersucht hat.

Tabelle 2: Hämoglobinkonzentration mit dem geringsten Mortalitätsrisiko

Studie	Optimaler Hb [g/dL]	
	Weiblich	Männlich
Chaves et al. 2004 ⁽¹³⁾	14,3	
Culleton et al. 2006 ⁽¹¹⁾	13-15	14-17
Denny et al. 2006 ⁽¹²⁾	13-14	14-15
Martinsson et al. 2014 ⁽¹⁵⁾	13	15

Vergleich verschiedener Studien bezüglich der optimalen Hämoglobinkonzentration.

Alle Autoren waren sich darin einig, dass eine Anämie unter den WHO Grenzwerten auch bei der älteren Bevölkerung ernst zu nehmen und nicht physiologisch ist.

Dies fand auch die Deutsche Geriaterin Gabriele Röhrig, die hämatologisch gesunde Probanden ab 60 Jahren untersucht und normale Referenzwerte (vgl. Tabelle 3) für die Hämoglobinkonzentration ermittelt hat. Es wurden nur PatientInnen inkludiert, welche ein normales CRP, Transferrinsättigung, Retikulozyten, LDH, Haptoglobin sowie löslicher Transferrinrezeptor und eine GFR >60ml/min hatten. Andere Komorbiditäten, Alkoholkonsum, Rauchanamnese sowie Medikation wurden nicht beachtet.

Tabelle 3: Hämoglobin-Referenzintervall für Menschen über 60 Jahre

Weiblich	Männlich
12,4 -15,8 g/dL	13,7 – 17,2 g/dL

(2,5te – 97,5te Perzentile) nach Röhrig et al., Red blood cell counts and indices in the elderly German population ⁽¹⁶⁾

Röhrig schloss aus ihren Daten, dass die Studienergebnisse die Referenzwerte der WHO bestätigen und diese sich mit den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für

Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO) decken. Daher seien keine gesonderten Normwerte für Ältere notwendig (16).

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein niedriger Cut-off für Menschen fortgeschrittenen Alters im Vergleich zu jüngeren PatientInnen nicht gerechtfertigt ist und dass auch im Alter Anämien abgeklärt werden sollten. Zumal 1/3 der Anämien auf einem, leicht zu behebbenden Nährstoffmangel beruhen (17). Penninx et al. sehen einen niedrigen Hb sogar als möglichen Gebrechlichkeitsmarker (10).

Menschen, die in großer Höhe leben, zeigen eine erhöhte Hämoglobinkonzentration durch gesteigerte erythropoetische Aktivität als Kompensation gegen Hypoxämie bei niedrigem atmosphärischem Druck.

Das veranlasste die WHO vorzuschlagen, dass für Bevölkerungen, die in höher gelegenen Gebieten leben, anderen Grenzwerte für die Anämie gelten sollten bzw. der gemessene Wert angepasst werden sollte (18). (vgl. Tabelle 4)

Tabelle 4: Adjustierung der gemessenen Hämoglobinkonzentration nach Höhe

Meter über dem Meeresspiegel	Adjustierung des gemessenen Hb [g/dL]
<1000	0
1000	-0,2
1500	-0,5
2000	-0,8
2500	-1,3
3000	-1,9
3500	-2,7
4000	-3,5
4500	-4,5

Vorgeschlagene Grenzwerte der WHO für Menschen die in höher gelegenen Gebieten leben.

WHO, Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control: a guide for programme managers⁽¹⁸⁾

Da dieser Ansatz aber eher mathematisch und nicht basierend auf klinischen Parametern oder Studien zum Outcome zustande gekommen ist, wurde die Hb Anpassung nicht von Kritik verschont.

So untersuchten Gonzales et al. ob die adjustierten Grenzwerte bei Frauen, welche in großer Höhe leben, klinisch begründbar seien. Sie verglichen Anämie bedingte Schwangerschaftskomplikationen je nachdem welcher Grenzwert gewählt wurde. Es stellte sich heraus, dass in der Gruppe, die nach den adjustierten Grenzwerten als anämisch befunden wurden, eine niedrigere Rate an Früh- oder Todgeburten vorkam. Sollten aber die neuen Grenzwerte wirklich die Prävalenz von „echter“ Anämie erhöhen, so müssten auch die damit assoziierten Komplikationen steigen oder zumindest gleichbleiben. Daraus wurde geschlussfolgert, dass offensichtlich nicht anämische Frauen durch die adjustierten Werte fälschlicherweise als anämisch klassifiziert worden sind. Weiter wurde gezeigt, dass die Prävalenz von Anämien in einer untersuchten Tibetischen Bevölkerung nach den neuen Cut-offs auf 40-46% anstieg, was nicht im Einklang mit der weltweiten Prävalenz von nur

etwa 32,9% steht (19). Außerdem ist auffällig, dass nur ein Bruchteil der durch die adjustierten Hb Werte als anämisch klassifizierten Probanden an einem Eisenmangel litten, welcher eine Eisenmangelanämie hervorrufen könnte (26,6% mit Anämie aber nur 5,7% mit signifikantem Eisenmangel). Weltweit ist die Eisenmangelanämie aber die häufigste Ursache für eine Anämie. Die Autoren kommen zum Entschluss, dass die Adjustierung der Hämoglobingrenzwerte zu simpel und willkürlich ist und zu einer Misklassifikation von Anämie und Erythrozytose führen kann. Zudem besteht die Gefahr, dass viele PatientInnen fälschlicherweise als anämisch befunden, unnötigerweise therapiert, und zudem andere Personen mit einer Erythrozytose übersehen werden (19, 20).

Einige Studien verglichen den Hb von RaucherInnen und NichtraucherInnen und kamen zu dem Entschluss, dass der Hb mit dem Rauchen signifikant ansteigt (21-24). In Tabelle 5 sind die Unterschiede in der Hämoglobinkonzentration aufgeführt.

Nadia et al. unterschieden bei den RaucherInnen zusätzlich zwischen „heavy smoker“ (> 20 Zigarette/Tag) und „light smoker“ (< 20 Zigaretten/Tag) und zeigten somit auch eine positive Korrelation zwischen Anzahl der gerauchten Zigaretten und Höhe der Hb Konzentration (23).

Malenica et al. verglichen 56 RaucherInnen und 100 NichtraucherInnen und fanden neben einem Anstieg der Hämoglobinkonzentration auch ein größeres mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH) sowie eine höhere Leukozytenzahl (24).

Tabelle 5: Vergleich der Hämoglobinkonzentration von RaucherInnen und NichtraucherInnen

Studie	Hämoglobinkonzentration [g/dL]	
	NichtraucherInnen	RaucherInnen
Shah et al. 2013 ⁽²¹⁾	12,37 ± 2,36	14,14 ± 1,3
Sunil et al. 2013 ⁽²²⁾	12,9 ± 0,7	15,2 ± 1 ^a 16,3 ± 0,63 ^b
Nadia et al. 2015 ⁽²³⁾	13,68 ± 1,01	14,61 ± 1,11 ^c 15,05 ± 0,92 ^d
Malenica et al. 2017 ⁽²⁴⁾	13,9 (12,715 – 15,130)	14,7 (13,26 - 15,7)

^a“light smoker, ^b“heavy smoker”, ^cZigarettenraucherInnen, ^dShisharaucherInnen

Auch die WHO sah sich veranlasst eine Adjustierung der Hämoglobin Werte vorzuschlagen. In Tabelle 6 wurde aufgelistet, wie der gemessene Hb je nach Rauchanamnese angepasst werden sollte (18).

Tabelle 6: Adjustierung des gemessenen Hb nach Rauchanamnese

Rauchverhalten	Korrektur des gemessenen Hb [g/dL]
NichtraucherInnen	0
RaucherInnen (Alle)	-0,3
0,5 – 1 Schachtel/Tag	-0,3
1 – 2 Schachteln/Tag	-0,5
≥2 Schachteln/Tag	-0,7

Die WHO schlägt eine Korrektur des gemessenen Hb nach Rauchanamnese vor und geht dabei auch auf die Menge des Konsums ein.

WHO, Iron deficiency anaemia : assessment, prevention, and control : a guide for programme managers⁽¹⁸⁾

Die Ursache für den Hb Anstieg wird dadurch erklärt, dass sich das Kohlenmonoxid aus dem Tabakrauch mit dem Hämoglobin zu CO-Hb formt. CO-Hb hat keine Sauerstoffbindungskapazität und es kommt außerdem zu einer Linksverschiebung der

Hämoglobindissoziationskurve, woraus eine geringere Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff resultiert. Dieser Trigger erhöht den EPO Spiegel und dadurch wird die Erythropoese stimuliert (22).

In der Schwangerschaft steigt das Plasmavolumen physiologisch aufgrund von gesteigerter RAAS Aktivität mit gleichzeitigem Abfall von atrialen natriuretischen Peptiden (25-27). Da aber der Plasmaanstieg die ebenfalls vermehrte Erythrozyten Bildung überwiegt kommt es durch Verdünnung zu verminderten gemessenen Hämoglobinkonzentration (28). Die Grenzwerte der WHO und des Center for Disease Control and Prevention (CDC) ähneln sich. Die WHO schlägt für die gesamte Schwangerschaft einen unteren Grenzwert von < 11 g/dL oder ein Hämatokrit von $< 33\%$ vor. Das CDC unterteilt unter anderem nach Trimestern und gibt für das Zweite Trimester eine untere Grenze von $< 10,5$ g/dL bzw. $< 32\%$ Hämatokrit an (18, 29).

Auch wenn die unteren Grenzwerte der Hämoglobinkonzentration viel diskutiert werden darf man nicht vergessen, dass es auch wichtig ist ein Auge auf die obere Grenze zu werfen. So haben beispielsweise PatientInnen mit chronischen Nierenerkrankungen oder malignen Erkrankungen ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse, wenn die Hb-Konzentration von 12,0 g/dl überschritten wird (30-33).

3.1.2 Klassifizierung

Es gibt im Wesentlichen zwei mögliche Klassifizierungsmöglichkeiten für Anämien. Zum einen kann man die Anämie nach dem Entstehungsmechanismus einteilen. So kommen als mögliche Ursachen entweder die verminderte Produktion, der erhöhte Verbrauch von Erythrozyten oder der Verlust von Blut in Frage.

Die Produktion kann eingeschränkt sein, weil das Knochenmark nicht adäquat funktioniert und zu wenige Erythrozyten Vorläuferzellen produziert. Anhand des Retikulozytenproduktionsindex (RPI) lässt sich ermitteln ob die Regeneration ausreichend ist. Der RPI wurde entwickelt um zu ermitteln ob bei einer Anämie die Regeneration adäquat ist. Mit einem sinkenden Hkt steigt die Reifungszeit der Retikulozyten im peripheren Blut. Je nach Hämatokrit muss man daher den entsprechenden Wert einsetzen.

Ein RPI >2 zeigt einen adäquaten Anstieg, ein RPI <2 spricht für eine inadäquate Reaktion (34, 35).

$$RPI = \frac{\text{Retikulozyten (\%)} \times \text{Hkt (\%)}}{\text{Reifungszeit} \times 45}$$

Reifungszeit (in Tagen)	
Hkt ≥ 40%	1
Hkt 30 – 39,9%	1,5
Hkt 20 – 29,9%	2
Hkt < 20%	2,5

*Abbildung 1: Retikulozytenproduktionsindex
abgewandelt nach Hutchinson et al. und Hillman et al. (34, 35)*

Nährstoffmangel, Knochenmarksuppression oder -erkrankungen, Inflammation oder EPO Mangel sind nur einige der möglichen Gründe für eine verminderte Produktion.

Die Erythropoese kann aber nicht nur zu gering sein, sondern auch ineffektiv, wie zum Beispiel bei Myelodysplastischen Syndromen oder Thalassämien. Dies zählt ebenso zu einer verminderten Herstellung.

Wenn die Lebensspanne eines roten Blutkörperchens unter 100 Tagen liegt, haben wir es mit einem erhöhten Verbrauch zu tun. Verschiedene Formen der Hämolyse tragen dazu bei.

Am häufigsten liegt aber der Verlust von Erythrozyten als Ursache der Anämie vor. So kommt es nach Blutentnahmen zu Nachblutungen oder bei chirurgischen Eingriffen oder Traumen zu Blutverlust. Nicht zu vernachlässigen sind auch okkulte Blutungen oder eine sehr starke Menstruation.

Die häufiger angewandte, und auch hier verwendete, Klassifizierung ist die Einteilung nach Morphologie.

Es werden das Aussehen oder die Größe bzw. das Volumen der Erythrozyten beurteilt um eine Abgrenzung zu schaffen. Ein normales mittleres Zellvolumen (MCV) eines Erythrozyten liegt bei 80-96 fL und der normale Durchmesser beträgt 6-8,5 µm (36).

Eingeteilt wird also in mikrozytär, makrozytär oder normozytär.

Automatische Zellzähler können sogar die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) angeben, also ob die Blutkörperchen unterschiedliche Größe haben oder ungefähr gleich groß sind.

Beim Erwachsenen liegt der Referenzbereich bei $< 16\%$ (37). Hierdurch alleine lassen sich keine direkten Diagnosen ableiten, aber durch einen ergänzenden Blutausstrich bei Anisozytose können weitere Informationen gewonnen werden.

Eine mikrozytäre Anämie ($MCV < 80$ fL) wird häufig begleitet von einem niedrigen MCH. Meistens sind Eisenmangel, Hämsynthesestörungen, Globinsynthesestörungen oder Inflammation bzw. chronische Erkrankungen dafür verantwortlich.

Von einer makrozytären Anämie spricht man beim Erwachsenen, wenn das MCV über 96 fL beträgt. Zu beachten ist, dass die Normwerte für das MCV mit einem Konfidenzintervall von 95% festgelegt sind. Das heißt es können circa 2,5% der Gesunden ein MCV über dem oberen festgelegten Referenzwert von 96 fL haben und weniger als 0,5% haben ein MCV von über 100 fL. Ursachen einer makrozytären Anämie können unter Anderem Vitamin B₁₂- oder Folsäuremangel, Probleme der Erythropoese, wie eine akute Leukämie, oder Alkoholismus, Lebererkrankungen oder Hypothyreose sein.

Normozytäre Anämien umfassen eine große Gruppe, so kann es hilfreich sein durch einen Blutausstrich eine weitere Eingrenzung zu schaffen. Hierdurch lässt sich eventuell ermitteln ob es sich möglicherweise um Frühstadien einer mikro- oder makrozytären Anämie handelt. Zudem lassen sich Anomalien in der Struktur finden, welche wegweisend zu einer bestimmten Diagnose sind. Nicht selten werden Systemerkrankungen von normozytären Anämien begleitet und weitere diagnostische Verfahren und Laborwerte helfen auf den richtigen Pfad zu kommen.

Die klassische morphologische Einteilung nach MCV könnte bei älteren Populationen nicht ganz akkurat sein und es ist Vorsicht geboten. So stellte sich in einer Studie heraus, dass das mittlere korpuskuläre Volumen nicht wie bei jüngeren PatientInnen mit den typischen Ätiologien der Anämien übereinstimmten. Nur 27,5% der älteren PatientInnen mit Eisenmangel wiesen eine Mikrozytose und nur 7,4% mit Folsäure- oder Vitamin B₁₂-Mangel wiesen eine Makrozytose auf (38).

3.2 Mikrozytär

3.2.1 Überblick

Die häufigsten Ursachen einer mikrozytären Anämie sind Eisenmangel, Thalassämien und Anämie bei chronischen Erkrankungen, auch wenn letztere meist normochrom und normozytär sind (37, 39). Sehr seltene Ursachen sind eine Bleiintoxikation, Vitamin B₆-Mangel oder Kupfermangel (40).

Thalassämien sind Erbkrankheiten bei welchen es je nach Variante zu verminderter Produktion von α - oder β -Globinketten kommt und somit die Hämoglobinsynthese gestört ist. Weltweit tragen etwa 24% der Bevölkerung eine genetische Variante in sich. Die α -Thalassämie kommt meist in Südostasien, im Mittelmeerraum, in Afrika und dem mittleren Osten vor. Die β -Thalassämie ist im Mittelmeerraum neben der Eisenmangelanämie sogar eine der häufigsten Ursachen hypochromer Anämien und die schweren Formen sind klinisch am signifikantesten von allen Thalassämien (6, 41-43).

Die Anämie bei chronischen Erkrankungen wird im Englischen auch „anemia of chronic disease“ (ACD) oder „anemia of inflammation“ (AI) genannt. Ursachen hierfür sind eine durch proinflammatorische Zytokine unterdrückte renale EPO Produktion und eine verringerte Eisenverfügbarkeit wodurch es zu einer verminderten Erythropoese kommt (44). Der Eisenmangel wird durch das akute Phase Protein Hepcidin vermittelt. Es kommt zu einer gestörten Absorption und gleichzeitig auch zu einer verringerten Freisetzung von Eisen aus den Speichern (45).

Auslöser für die ACD können zum Beispiel Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Diabetes mellitus oder auch maligne Erkrankungen sein.

Eisenmangel ist die häufigste Ursache der Anämien überhaupt. Vor allem Schwangere bzw. auch Frauen allgemein sowie AthletInnen, Übergewichtige oder PatientInnen nach einer Operation haben ein erhöhtes Risiko an einem Eisenmangel zu leiden (39).

Die Ätiologie des Eisenmangels ist vielfältig. So kann es zum absoluten Eisenmangel durch unzureichende Resorption (Zöliakie, Magenresektion, CED, etc.) oder Eisenverlust durch Blutungen kommen. Aber auch eine mangelhafte Zufuhr (Säuglinge, Kinder, manche Vegetarier) oder erhöhter Bedarf, wie im Wachstum, in der Schwangerschaft und

Stillzeit oder bei HochleistungssportlerInnen, sind Ursachen eines absoluten Eisenmangels. Ist ausreichend Speichereisen vorhanden aber nicht für die Erythropoese verfügbar, spricht man von einem funktionellen Eisenmangel. Dieser kommt zum Beispiel bei der ACD oder beim hereditären eisenrefraktären Eisenmangelsyndrom (IRIDA) vor.

Eisenmangel lässt sich unterteilen in Stadien. So besteht anfangs nur ein latenter Eisenmangel, bei welchem das Speichereisen zwar verringert ist aber die Erythropoese noch intakt und keine Anämie oder Blutbildveränderungen vorhanden sind. Dann wird der Mangel manifest und später kommt es zu einer eisendefizitären Erythropoese. Diese macht sich durch einen größeren Anteil an mikrozytären Erythrozyten (%HYPO) in der Durchflusszytometrie und einem verminderten Retikulozytenhämoglobingehalt (RetHb) bemerkbar. Schließlich kommt es dann zu einem Abfall des Hb, Hkt und Erythrozyten (6, 37).

3.2.2 Diagnostik, konventionelle und neue Laborparameter

3.2.2.1 Überblick

Die Ursache einer mikrozytären Anämie zu finden und Differentialdiagnosen auszuschließen ist nicht immer ganz einfach. In dieser Gruppe gilt es im Wesentlichen die Eisenmangelanämie von der ACD und der Thalassämie zu differenzieren.

Hinweise können schon das Ausmaß der Verminderung des MCV geben. So kommt es selten vor, dass eine ACD ein MCV von unter 70 fL zeigt. Natürlich reicht dies für eine Diagnose nicht aus und es gibt einige Laborparameter, welche spezifischer sind. Zudem kann es sein, dass eine Mikrozytose auch schon durch Begleiterkrankungen, etwa die Leber betreffend, verschleiert wird (39).

3.2.2.2 Eisenmangelanämie

Bei unkompliziertem Eisenmangel reichen das Blutbild und die Ferritin-Bestimmung aus. Serum-Ferritin ist bislang noch der kostengünstigste und beste Parameter für die Begutachtung der Eisenspeicher. Ein Wert von unter 10-30 µg/L zeigt immer eine Verminderung des Speichereisens an (39, 46). Als Akute Phase Protein wird Ferritin bei Entzündung allerdings hochreguliert und kann so leere Eisenspeicher verschleiern. Jedoch

ist zu beachten, dass dabei zunächst die Transkription der Ferritin mRNA hochreguliert wird, aber die Synthese von Ferritin trotzdem noch vom Eisengehalt der Zellen abhängig ist. Posttranskriptionell wird bei Eisenmangel nämlich durch zytoplasmatische regulatorische Proteine die Translation der Ferritin mRNA inhibiert (47). So kommt es selten vor, dass PatientInnen mit Eisenmangel trotz Inflammation einen Ferritin Wert von über 100 µg/L erreichen (39). Im Blut wird das Eisen an Transferrin gebunden und so zwischen Enterozyten, Speicherkompartimenten und Erythroblasten ausgetauscht. Ist das Serumtransferrin nicht ausreichend mit Eisen gesättigt, bedeutet dies eine mangelnde Eisenversorgung der Erythropoese. Aber auch die Transferrinsättigung (TSAT) wird von chronischen Erkrankungen beeinflusst, da Transferrin ein negatives akute Phase Protein ist und somit bei einer akuten Phase Reaktion unabhängig vom Eisenstoffwechsel sinkt. Zusätzlich geht die unzuverlässige Serumeisenkonzentration in die Berechnung der TSAT ein (46). Außerdem kann es sein, dass Transferrin bei hohen Östrogen- oder Progesteronspiegeln, wie es bei der Einnahme mancher Kontrazeptiva zum Beispiel der Fall ist, auch unabhängig vom Eisenhaushalt steigt (48). Die Bestimmung des Serumeisens wird schon länger nicht mehr als diagnostischer Test empfohlen und trotzdem wird sie immer wieder angefordert, dabei könnten in Deutschland jährlich 4-10 Millionen Euro eingespart werden ohne dass die Qualität der Diagnostik darunter leidet. Das Serumeisen hat nicht nur eine sehr große Schwankungsbreite des Referenzbereiches, sondern ist auch im Tagesverlauf und von Tag zu Tag verschieden hoch. Außerdem wird es von der Nahrung beeinflusst und es findet auch hier eine Verminderung bei systemischer Entzündung statt (2).

Bei Kombination mit akuten oder chronischen Entzündungen lässt sich der Eisenmangel also nicht mehr so leicht diagnostizieren und neuere Parameter sollen hier helfen. In Tabelle 7 sind die verschiedenen Parameter des Eisenstoffwechsel und ihre Aussagekraft bei Inflammation angegeben.

Hauptsächlich auf den Vorläuferzellen der Erythropoese befinden sich Transferrinrezeptoren, deren Aufgabe es ist, das Eisen vom Transferrin aufzunehmen und in die Zelle zu befördern. Bekommt die Zelle unzureichend Eisen werden die Rezeptoren hochreguliert. Diese lösen sich auch fortlaufend von der Zellmembran und gelangen ins Plasma, wo sie dann als lösliche Transferrinrezeptoren (sTfR) messbar sind. Vorteil bei der Bestimmung der sTfR im Serum ist, dass sie nicht von Entzündung beeinflusst werden und somit gut anzeigen, ob die Erythropoese ausreichend mit Eisen versorgt wird. Wenn eine

hyperproliferative Erythropoese stattfindet, wie es etwa bei Polyzythämien, Thalassämien aber auch hämolytischen Anämien der Fall ist, steigt die sTfR Konzentration auch ohne Eisenmangel. Gegenteiliges lässt sich demnach auch bei verringerter Bildung von roten Blutkörperchen, wie der aplastischen oder renalen Anämie feststellen (39, 46, 49). Leider gibt es verschiedene Referenzbereiche für die sTfR, je nachdem welcher Hersteller der Immunoassays gewählt wird. Das NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control) hat in Zusammenarbeit mit der WHO allerdings ein Referenzreagenz entwickelt, welches durch die Hersteller verwendet werden soll um einheitliche Kits herzustellen (50, 51).

Tabelle 7: Eisenstoffwechselfparameter bei Inflammation

Relevant beeinflusst	Nicht relevant beeinflusst
Ferritin	sTfR
Transferrin	
Serumeisen	
TSAT	

Außer der sTfR-Konzentration werden die meisten Eisenstoffwechselfparameter signifikant von Zuständen der Inflammation beeinflusst (2, 39, 46).

Nimmt man den Quotienten aus sTfR und dem Logarithmus von Ferritin bekommt man den Ferritinindex. Diese Kombination zeigt mangelnde Eisenspeicher zuverlässiger an als Ferritin oder sTfR alleine (52-54). Der Ferritinindex kann sehr hilfreich sein um eine Eisenmangelanämie von einer ACD abzugrenzen (55).

Moderne Durchflusszytometer ermöglichen die Messung der Fraktion pathologisch kleiner bzw. hämoglobinarmer Erythrozyten (%HYPO). Wie beim Blutaussstrich lässt sich daran ein funktioneller Eisenmangel schon im Anfangsstadium erkennen bevor es zu Veränderungen des MCV oder MCH kommt (56).

Ebenfalls als gut zur Früherkennung von funktionellem Eisenmangel hat sich der Retikulozyten-Hb-Wert (RetHb oder CHr) erwiesen. Die Retikulozyten zirkulieren nur etwa 24h im Blut und zeigen damit viel schneller einer verringerte Eisenversorgung der

Erythropoese an als die Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (57). Ein CHR von <28 pg wird als Indikator für einen funktionellen Eisenmangel verwendet (58).

Im Jahre 2002 untersuchten zwei Frankfurter Wissenschaftler, die beide auf den Namen Thomas hören, biochemische Marker wie den sTfR und den Ferritinindex auf ihre Tauglichkeit in der Diagnose des funktionellen Eisenmangels. Sie fanden heraus, dass nur schwache Korrelationen zwischen dem CHR und dem sTfR oder Ferritinindex bestanden und letztere demnach nicht optimal für die Diagnose geeignet sind. Außerdem stellten sie ein Tool vor, welches es leichter machen sollte, einen Eisenmangel bei einer akuten Phase Reaktion zu detektieren. Dieses diagnostische Diagramm kombiniert den Ferritinindex (sTfR/logFerritin) und das Retikulozytenhämoglobin und ist auch unter dem Namen „Thomas Plot“ bekannt. In Abbildung 2 ist die Einteilung in die vier Quadranten dargestellt. Befindet sich der Messpunkt im ersten Quadranten, besteht eine normale (oder vermehrte) Speichereisenreserve und die Erythropoese wird ausreichend mit Eisen versorgt. Dies ist bei niedrigem Hb typisch für die ACD. Der zweite Quadrant zeigt einen verminderten Eisenspeicher aber noch keinen funktionellen Eisenmangel, wie bei latentem Eisenmangel im Wachstumsschub, bei starker Menstruation, bei Schwangeren, AthletInnen oder häufigen BlutspenderInnen. Hingegen im dritten Quadranten ist sowohl ein funktioneller als auch ein Speichereisenmangel zu finden, der für eine Eisenmangelanämie spricht. Fällt der Datenpunkt in den vierten Quadranten, besteht zwar ein funktioneller Eisenmangel aber die Eisenspeicher sind nicht vermindert. Hier fallen etwa 20% der ACDs rein aber auch PatientInnen ohne funktionellen Eisenmangel, die an Thalassämie oder einer anderen Störung der Hämoglobinbildung leiden. Wie bereits erwähnt sind die Referenzwerte für den Ferritinindex abhängig vom jeweils verwendeten sTfR-Reagenz. Die in der Abbildung angegebenen Werte gelten bei der Verwendung des sTfR-Assays von Roche-Diagnostics. Der Cut-off Wert liegt dann bei 3,2 (bzw. 2,0 bei einem CRP > 5 mg/L). Auch wenn die Referenzwerte von Ferritin Geschlechtsunterschiede zeigen, wurde dies nicht beim Ferritinindex beobachtet (46, 58).

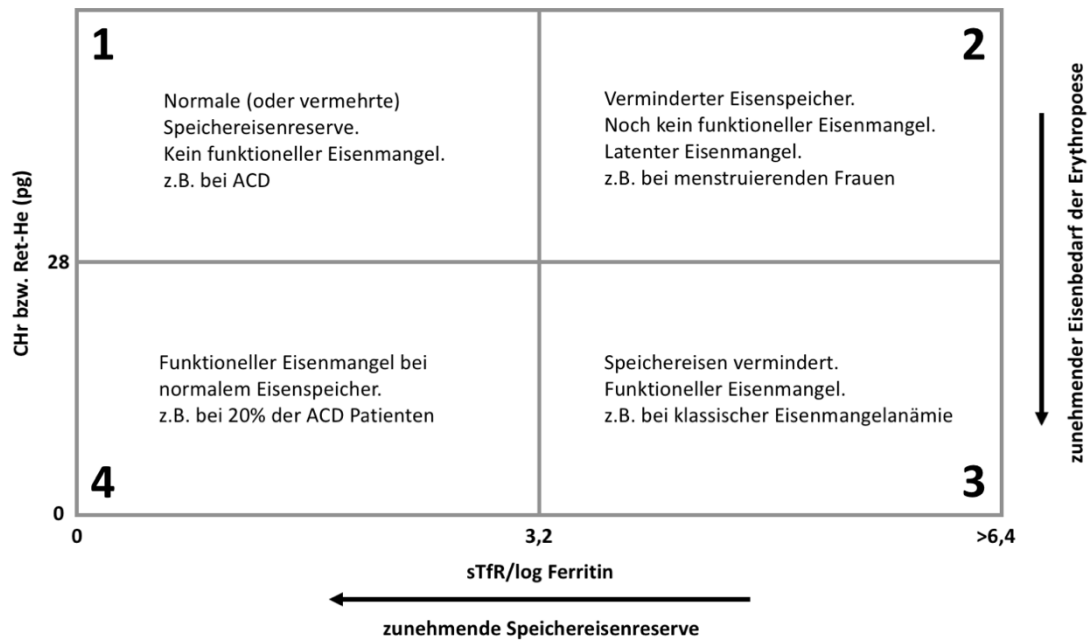


Abbildung 2: Thomas Plot
 nach Thomas et al., *Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency*(58)

Ferritin bleibt in der alltäglichen Diagnostik immer noch ein essentieller Laborparameter, doch bei komplizierteren Anämien, zum Beispiel wenn eine gleichzeitige Inflammation vorliegt, ist es zu empfehlen auch ergänzend den Thomas Plot in der klinischen Routine einzubringen (59).

Hepcidin im Kontext ACD mit Eisenmangel als Biomarker zu verwenden wurde diskutiert, jedoch eindeutig positive Ergebnisse in der klinischen Praxis brachte dieser Parameter bislang nicht hervor. Zwar korreliert Hepcidin-25 mit CRP und zeigt auch die höchsten Werte bei PatientInnen die nach dem Thomas Plot im vierten Quadranten einzuordnen wären, doch der Thomas Plot und der sTfR hatten einen besseren positiven Vorhersagewert für funktionellen Eisenmangel. Sie sind sowohl bei PatientInnen mit akuter Phase Reaktion (CRP >0,5 mg/dL) als auch ohne dem Hepcidin-25 überlegen (60, 61).

Auch der Tryptophanstoffwechsel im Zusammenhang mit Anämien wurde untersucht, da die Verfügbarkeit von Tryptophan auch wesentlich für die Proteinbiosynthese, Zellwachstum und damit auch für die Erythropoese ist. Es fand sich, dass Probanden mit Anämie, Eisenmangel oder ACD niedrigere Serum Tryptophankonzentrationen aufwiesen als gesunde Kontrollgruppen. Zudem besteht eine gering bis moderate positive Korrelation zwischen Hämoglobin und Tryptophan-Indikatoren. In diesem Gebiet braucht es jedoch noch mehr Forschung die Kausalität und Anwendbarkeit als Biomarker betreffend (62, 63).

3.2.2.3 Thalassämie

Auch bei den Thalassämien kann es zur mikrozytären Anämien kommen.

Beim Gesunden gibt es im Wesentlichen drei Hämoglobinkonstellationen, welche in Tabelle 8 dargestellt sind.

Tabelle 8: Hämoglobinkonstellation der normalen Erythrozyten

Hämoglobin	Neugeborene	Erwachsene
HbA ($\alpha\alpha/\beta\beta$)	ca. 20%	97%
HbA ₂ ($\alpha\alpha/\delta\delta$)	ca. 0,25%	2,5%
HbF ($\alpha\alpha/\gamma\gamma$)	ca. 80%	<0,5%

aus Herold, Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung, 2019⁽⁶⁾

Die Gene für die α - und γ -Ketten liegen doppelt vor, wohingegen die β -Globinkette nur durch einen einzelnen Genort codiert wird (64).

Daraus lassen sich auch die verschiedenen Ausprägungen der Thalassämieformen ableiten.

Bei der α -Thalassaemia minima ist nur eine Genkopie ($-\alpha/\alpha\alpha$ oder $\alpha\alpha^{ND1}/\alpha\alpha$) betroffen und sie ist klinisch und hämatologisch unauffällig. Es kommt allenfalls zu einer leichten Mikrozytose und möglicherweise sind beim Neonaten 1-3% Hb Bart's ($\gamma\gamma/\gamma\gamma$) vorhanden.

Sind 2 Genkopien ($—/\alpha\alpha$) beeinträchtigt, handelt es sich um eine α -Thalassaemia minor, welche mit milder hypochromer, mikrozytärer Anämie und Anisopoikilozytose einhergeht.

Das HbA₂ ist vermindert bis niedrig normal (1,5-2,5%). Beide dieser Diagnosen müssen differentialdiagnostisch von einer Eisenmangelanämie abgegrenzt werden. Es sollte nach einer Eisensubstitution reevaluiert werden, ob die hämatologischen Auffälligkeiten verschwinden.

Die HbH-Krankheit, bei der nur mehr eine Genkopie ($-\alpha/—$ oder $\alpha\alpha^{ND1}/—$)

intakt ist, ist charakterisiert durch HbH ($\beta\beta/\beta\beta$) Mengen zwischen 3 und 30%. Die

¹ ND = nondeletion Mutation

Instabilität von HbH führt zu Heinz-Innenkörperchen in den Erythrozyten. Es kommt zu einer mikrozytären oder normozytären Anämie und Hämolyse mit Bilirubin Anstieg. Beide Eltern sind Träger einer α -Thalassämievariante. Die schwerwiegendste α -Thalassämieform ist die Hb-Bart's-Krankheit, bei welcher alle α -Globin Genkopien (---/---) defekt sind und das fetale Blut fast ausschließlich Hb Bart's enthält. Es kommt ohne frühzeitige Therapie zum Hydrops fetalis weshalb sie in einer Pränataldiagnostik bei Eltern, die Träger sind, erfasst werden sollte (64, 65).

Die definitive Diagnose von den ersten beiden α -Thalassämien (minima und minor) kann nur durch DNA Analyse erfolgen. Hinweisend sind PatientInnen mit Mikrozytose und milder oder keiner Anämie bei welchen ein Eisenmangel ausgeschlossen ist (39, 64).

Die Messung des Hb Bart's Levels ist früher für einen sensitiven α -Thalassämie marker gehalten worden, es hat sich jedoch herausgestellt, dass einige Thalassämieträger nicht ermittelt wurden und diese Methode somit nicht geeignet ist (66).

Bei der β -Thalassämie kommt es durch Mutationen des β -Globin Gens zur verringerten (β^+) oder vollständig fehlenden (β^0) Produktion. Grundsätzlich kann eine β -Thalassaemia minor (Heterozygotie), intermedia (gemischt heterozygot oder mild homozygot) und major (Homozygotie) unterschieden werden. Ausbreitungsgebiete sind neben den mediterranen Regionen unter anderem auch Afrika, der mittlere Osten, der indische Subkontinent und Südostasien. Stärkere Formen fallen meist auf, wenn das fetale Hämoglobin zurückgeht und das erwachsene HbA nicht adäquat ansteigt (43).

Dadurch, dass die Synthese von HbA gestört ist, kommt es kompensatorisch zu einem HbA₂ ($\alpha\alpha/\delta\delta$) und HbF Anstieg ($\alpha\alpha/\gamma\gamma$). Der normale HbA₂ Gehalt liegt bei 2,4 - 3,2%, bei β -Thalassämieträgern ist er typischerweise zwischen 3,6 und 7%. Brancaleoni et al. beschreiben die HbA₂ Quantifizierung als den entscheidenden Test um eine β -Thalassämie zu detektieren. Es gibt aber auch Träger mit einem borderline HbA₂ Level zwischen 3,2 und 3,6% und einer gleichzeitigen MCV und MCH Erniedrigung. Dies kann entweder bei einer sehr mild ausgeprägten Form oder einer Kombination mit δ - oder α -Thalassämie vorkommen. Eine genauere Familienuntersuchung und molekulare Analysen können hier helfen (65).

Es gibt Befürchtungen, dass bei einer β -Thalassaemia minor mit gleichzeitigem Eisenmangel ein HbA₂ Anstieg verringert sein könnte, deshalb keine pathologische Erhöhung festgestellt werden kann und somit die Thalassämie unentdeckt bleibt. Bei Eisenmangel mit einem Cut-off von 30 $\mu\text{g/L}$ Ferritin stellten Passarello et al. keinen signifikanten Unterschied in den HbA₂ Levels fest. Daher konkludierten sie, dass Eisenmangel keinen wesentlichen Einfluss auf die Detektion einer β -Thalassämie habe. Jedoch gaben sie an, dass in ausgewählten Fällen bei einem niedrigeren Ferritin Spiegel eventuell eine erneute HbA₂ Bestimmung, nach Therapie des Eisenmangels, sinnvoll sein könnte (67).

Thalassämie-Erkrankte haben ein erniedrigtes MCV und MCH, wobei letzteres in diesem Fall verlässlicher ist. Sehr milde β -Mutationen können ohne hämatologisch erkennbare Veränderungen einhergehen. Im Blutausstrich lässt sich bei den meisten β -Thalassämie-Trägern eine Mikrozytose, Hypochromie, Anisopoikilozytose und seltener auch eine basophile Stippelung und Target-Zellen finden (68).

Die Majorform der β -Thalassämie wird meist zwischen dem 6. - 24. Lebensmonat manifest. Es zeigen sich neben erniedrigtem Hb <7 g/dl und MCH <20 pg im peripheren Blutausstrich teardrop-cells, target-cells und zahlreiche Erythroblasten. Der HbF Anteil steigt je nach Genotyp auf 70-95%. Die β -Thalassaemia intermedia wird in höherem Alter auffällig mit ähnlichen, aber mildereren Befunden (65).

In Abbildung 3 ist ein Flussdiagramm dargestellt, welches dabei helfen soll eine Thalassämie zu diagnostizieren und klassifizieren.

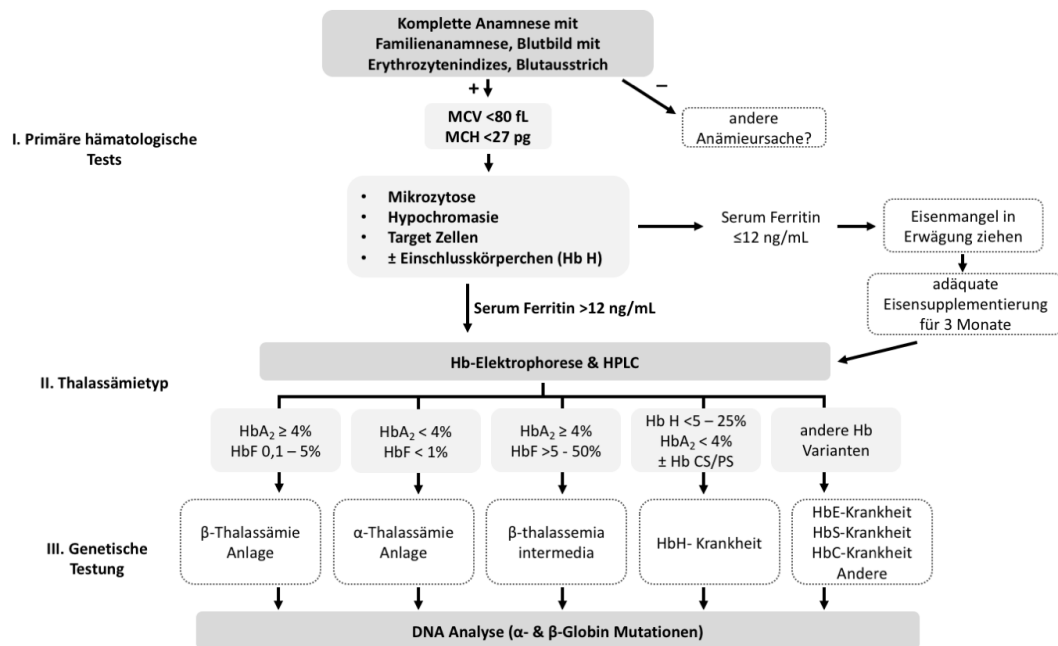


Abbildung 3: Flowchart zur Identifikation von Thalassämie-Träger nach Brancaleoni et al., Laboratory diagnosis of thalassemia(65)

Schwere Thalassämien führen zu einem unausgeglichenerem α -/ β -Globin Ketten Verhältnis. Dies zieht eine ineffektive Erythropoese nach sich. Es kommt zu Hämolyse, Anämie und Splenomegalie. In weiterer Folge führt die erhöhte Erythropoetinsynthese zu Knochenmarksexpansion. Daraufhin können sich skelettale Deformitäten und Osteopenie entwickeln sowie eine erhöhte Eisenabsorption zu einer Eisenüberladung führen (43, 65). Neben der Einteilung in minor, intermedia und major gibt es noch eine klinisch orientierte Einteilung je nach Transfusionsbedarf. Abbildung 4 zeigt die Einteilung in NTDT (Non-transfusion-dependent thalassemiias) und TDT (Transfusion-dependent thalassemiias). NTDT PatientInnen benötigen normalerweise keine regelmäßigen Transfusionen um zu überleben. Es ist aber möglich, dass gelegentlich Blutprodukte verabreicht werden müssen. Dies ist etwa der Fall bei Infektionen oder Schwangerschaft oder bei Komplikationen im Alter (69).

Personen, die hingegen an einer TDT erkrankt sind, würden ohne regelmäßige Bluttransfusionen schwere Komplikationen oder sogar den Tod erleiden. Dazu gehören unter anderem die β -Thalassaemia major und die schwere Formen der α -Thalassämie (70).

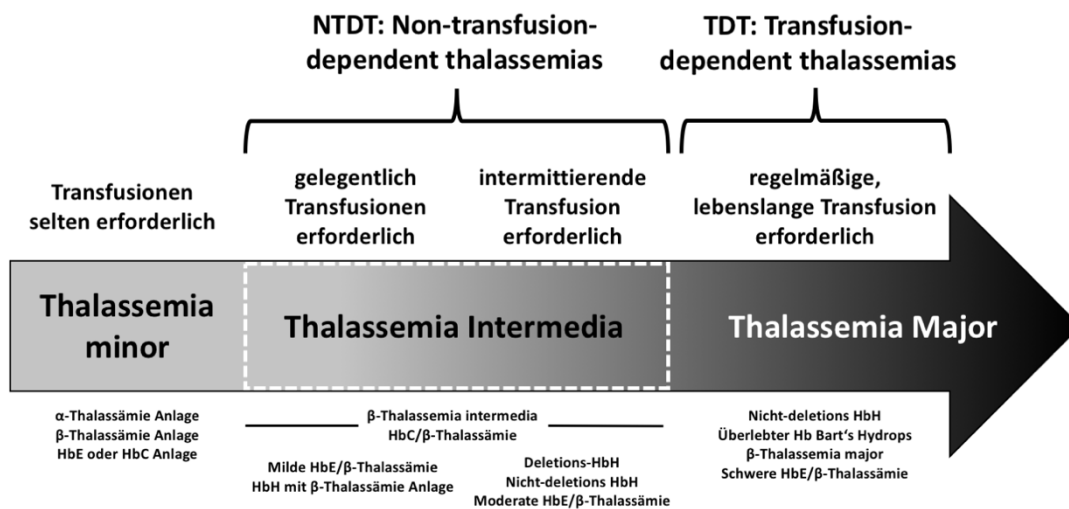


Abbildung 4: Klinische Einteilung der Thalassämien in NTDT und TDT
 Der Pfeil zeigt das Spektrum von oligosymptomatischen Thalassämie-Trägern bis zur schweren Thalassämie-Erkrankung und die Einteilung in nicht-transfusionsabhängige Thalassämie (NTDT) und transfusionsabhängige Thalassämie (TDT) nach Viprakasit et al., *Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia*(71)

Es wurden zahlreiche Thalassämie Indices entwickelt um eine Eisenmangelanämie von einer Thalassämie besser abzugrenzen. In Tabelle 9 sind verschiedene Indices und deren Cut-off Werte sowie die Spezifität und Sensitivität aus einer Studie von Plengsuee et al. abgebildet. Zu beachten ist, dass sich die Daten auf erwachsene ThailänderInnen beziehen. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass die Funktionalität dieser Formeln sehr variiert, je nachdem in welchem Land sie angewendet werden. Dies kann darin begründet liegen, dass es teils große Unterschiede im Spektrum der Thalassämien und in der Ausprägung der Eisenmangelanämien in verschiedenen Nationen gibt. Somit bleibt die Hb Analyse, insbesondere HbA₂ und HbF, entscheidend für eine Diagnose, zum Beispiel im Rahmen des Schemas in Abbildung 3 (65, 72, 73).

Tabelle 9: Vergleich verschiedener Thalassämie Indices

Index	Thalassämie	Eisenmangel	Sensitivität	Spezifität
Mentzer: MCV/ RBC	<13	≥13	82,35	79,69
Green and King: (MCV ² × RDW)/ (Hb × 100)	<65	≥65	83,33	85,94
Shine and Lal: MCV ² × (MCH/100)	<1530	≥1530	98,04	31,25
Srivastava: MCH/RBC	<3,8	≥3,8	71,57	76,56
RDW-Index: (MCV × RDW)/RBC	<220	≥220	91,18	76,69
Sirdah: MCV - RBC -3 × Hb	<27	≥27	66,67	81,25
England and Fraser: MCV - RBC - (5 × Hb) -3,4	<0	≥0	61,76	87,50
Ehsani: MCV - (10 × RBC)	<15	≥15	79,41	76,56
RDW/RBC	<3,3	≥3,3	91,18	100,00

Die Sensitivität und Spezifität beziehen sich hier auf die thailändische Studienpopulation. MCV = mittleres korpuskuläres Volumen, RBC = Erythrozyten, RDW = Erythrozytenverteilungsbreite, MCH = mittleres korpuskuläres Hämoglobin. Modifiziert nach Plengsuree et al., Red Cell Indices and Formulas Used in Differentiation of β -Thalassemia Trait from Iron Deficiency in Thai Adults⁽⁷²⁾

3.3 Makrozytär

3.3.1 Überblick

Eine Makrozytose tritt am häufigsten als Folge von Alkoholkonsum, Medikamentennebenwirkung und Vitamin B₁₂- oder Folsäuremangel auf. Seltener kommen als Ursache noch eine Retikulozytose, Lebererkrankungen, eine Hypothyreose oder primäre Knochenmarkserkrankungen in Frage (74).

Zu beachten ist, dass bei Kindern andere Grenzwerte verwendet werden müssen. So ist ein MCV >100 fL für Neugeborene und Säuglinge normal. Auch in der Schwangerschaft ist eine leichte MCV Erhöhung physiologisch (75, 76).

Alkoholiker haben bei bestehender Mangelernährung oft einen Folsäuremangel. Doch auch ohne Vitamin B₁₂- oder Folsäuremangel kommt es durch den regelmäßigen Alkoholkonsum alleine schon zu einer Erhöhung des MCV. Alkoholabusus ist sogar eine häufige Ursache für einen solchen Befund, weshalb die Frage nach dem Konsum unbedingt in der Anamnese erfragt werden muss (77).

Auch bei nicht-alkoholischer Lebererkrankung kann es zu Makrozytose kommen. So wird in die Lipiddoppelschicht der Erythrozytenmembran vermehrt Cholesterol eingebaut und es kommt zu einer Volumenzunahme der roten Blutkörperchen. Vor allem sieht man dies im Stadium der Leberzirrhose. Allgemein hängt das Ausmaß mit der Schwere der Leberdysfunktion zusammen (78, 79).

Es gibt zahlreiche Medikamente, die zu einer megaloblastären Anämie führen können. Eine Auswahl Solcher ist in Tabelle 10 gelistet. Grundsätzlich sind es Pharmaka, die in den Purin bzw. Pyrimidin Metabolismus eingreifen oder den Folsäure und Vitamin B₁₂ Stoffwechsel behindern. So kommt es entweder zur verringerten Aufnahme, erhöhten Ausscheidung oder kompetitiven Hemmung bis hin zu Zerstörung von Folsäure bzw. Vitamin B₁₂ (80).

Tabelle 10: Medikamente und megaloblastäre Anämie

Gruppe	Medikament
Chemotherapeutika	Mercaptopurin, Methotrexat, Hydroxyurea
Urikostatikum	Allopurinol
Hormone	Östrogen, orale Kontrazeptiva
Antibiotika, Harnwegstherapeutika	Ampicillin und andere Penicilline, Trimethoprim, Nitrofurantoin
Antikonvulsiva	Phenytoin, Phenobarbital
Antidiabetikum	Metformin
Narkosegas	Distickstoffmonoxid (N ₂ O)

Eine Auswahl an Medikamenten, welche häufig eingesetzt werden und zu einer megaloblastären Anämie führen können (80).

Im Rahmen einer Hämolyse oder nach Blutverlust sowie in der Erholungsphase einer Chemotherapie oder Stammzelltransplantation kommt es zu einer Retikulozytose. Ebenso beobachtet man dies bei einer erhöhten Erythropoese nach Erythropoetingabe oder Behandlung eines Eisen-, Vitamin B₁₂- oder Folsäuremangels. Retikulozyten haben ein größeres Volumen als Erythrozyten und durch die vermehrte Freisetzung in die Peripherie kommt es zur Makrozytose (74).

3.3.2 Diagnostik, konventionelle und neue Laborparameter

3.3.2.1 Vitamin B₁₂

Vitamin B₁₂ wird proteingebunden mit der Nahrung aufgenommen und durch Magensäure und Pepsin freigesetzt. Das mit dem Speichel sezernierte Haptocorrin bindet an das Cobalamin. Diesen Vitamin B₁₂-Haptocorrin-Komplex bezeichnet man auch als Holohaptocorrin (HoloHC). Im Duodenum kommt es durch pankreatische Proteasen zur Abspaltung vom Haptocorrin. Die Parietalzellen des Magens produzieren den Intrinsic Factor (IF), an welchen das Vitamin B₁₂ bindet. Schließlich kann im Ileum dieser Komplex

über bestimmte Rezeptoren (cubilin-amnionless receptor, „Cubam-Rezeptor“) der Enterozyten aufgenommen werden. Anschließend gelangt Vitamin B₁₂ in den Blutstrom, wo es an Transcobalamin gebunden vorliegt. Dieser Komplex wiederum wird Holotranscobalamin (HoloTC) genannt und kann von verschiedenen Zellen aufgenommen werden. Insgesamt 70-90% des zirkulierenden Vitamin B₁₂ liegen im Blut als für die Zelle nicht verfügbares HoloHC und etwa 10-30% als funktionelles HoloTC vor. Vitamin B₁₂ spielt eine wesentliche Rolle im Methylmalonsäure (MMA) und Homocystein (Hcy) Stoffwechsel wodurch sich im Folgenden die Pathologien und labortechnischen Überlegungen erklären lassen (81).

Ursachen eines Cobalaminmangels lassen sich teilweise aus der Physiologie ableiten. So kommt es selbstverständlich bei zu geringer Zufuhr, wie zum Beispiel bei veganer Ernährung ohne Substitution, zu einem Mangel. Ebenso besteht die Möglichkeit der gestörten Aufnahme, etwa bei Magen- oder Ileumresektion. Durch eine Autoimmungastritis und folgenden IF Mangel kommt es zur perniziösen Anämie. Aber auch bei einer Helicobacter pylori Gastritis ist eine Maldigestion möglich. Ist die exokrine Funktion des Pankreas gestört kann Vitamin B₁₂ nicht mehr aus der Bindung mit Haptocorrin gelöst werden und in Folge dessen wird die weitere Verarbeitung gestört. Als seltener Ursachen sind noch der Fischbandwurm und genetische Erkrankungen zu nennen. Letztere können etwa Störungen des IFs, Cubam-Rezeptors oder Transcobalamin sein (6, 81).

Im Rahmen der Labordiagnostik ist es nun essentiell zu wissen, welche Parameter bestimmt werden und welche Aussagekraft hinter den einzelnen Biomarkern steckt. Das gesamte Vitamin B₁₂ teilt sich, wie oben beschrieben, in zwei Fraktionen auf: das inaktive HoloHC und das aktive HoloTC. So sollte bei der Interpretation unterschieden werden, ob das gesamte Vitamin B₁₂, wie früher üblich, oder nur der aktive Anteil vom Labor bestimmt wurde. HoloTC gilt als spezifischer Marker für einen Vitamin B₁₂ Mangel. Bei grenzwertigem HoloTC kann die Bestimmung der MMA Klarheit bringen (40). Es wird viel darüber diskutiert, welcher Laborwert nun als am besten geeignet für die Diagnostik ist. In Diskussion sind das gesamte Vitamin B₁₂ und HoloTC als direkte Marker sowie MMA und Homocystein als metabolische Marker. Außerdem taucht noch 4cB₁₂ als

ein relativ neuer Parameter auf. Dieser ist im Prinzip eine Kombination aus den vier zuvor genannten. Analog dazu wurden auch $3cB_{12}$ und $2cB_{12}$ untersucht.

Das gesamte Vitamin B_{12} ist der kostengünstigste Parameter. Jedoch gehen hier zu etwa 80% das nicht aktive HoloHC ein und somit kann der zelluläre Vitamin B_{12} Gehalt nur schwer beurteilt werden. Es wurde in einigen Studien beschrieben, dass die Sensitivität und Spezifität einen Vitamin B_{12} Mangel zu detektieren geringer im Vergleich mit den anderen Laborwerten ist und daher die alleinige Bestimmung nicht verlässlich ist (40, 81-85).

HoloTC findet große Zustimmung in der Studienlandschaft. Vor allem in der frühzeitigen Erkennung eines Vitamin B_{12} Mangels zeigt es seine Stärken. Zudem gilt es als spezifischer Marker. Einige Autoren sehen die Nutzung als first-line Parameter gerechtfertigt (40, 81, 83, 86).

MMA und Hcy sind sensitive Indikatoren für einen Vitamin B_{12} Mangel haben aber den Nachteil, dass sie auch von anderen Prozessen beeinflusst werden, unabhängig vom Vitamin B_{12} Status. So steigen beide Parameter auch bei Niereninsuffizienz. Hcy ist zudem ebenfalls bei Folsäure oder Vitamin B6 Mangel erhöht (40, 81, 85, 86).

Großer Konsens besteht darin, dass es keinen einzelnen Laborwert gibt, der alleine am besten geeignet ist. So werden oft eine Stufendiagnostik oder eine Kombination von verschiedenen Biomarkern empfohlen (81, 83, 84, 87-89).

Hermann und Obeid sind bekannte Vertreter des Zweistufenmodells mittels first-line Bestimmung von Holotranscobalamin und anschließend im Zweifelsfall MMA. Bei dieser Methode werden weniger Patienten mit einem Vitamin B_{12} Mangel übersehen, die später potentiell irreversible neurologische Beeinträchtigungen erleiden könnten. In Abbildung 5 ist das Stufenmodell veranschaulicht. Auch Harrington beschreibt ein solches Modell mit leicht abweichenden Cut-off Werten (83, 89).

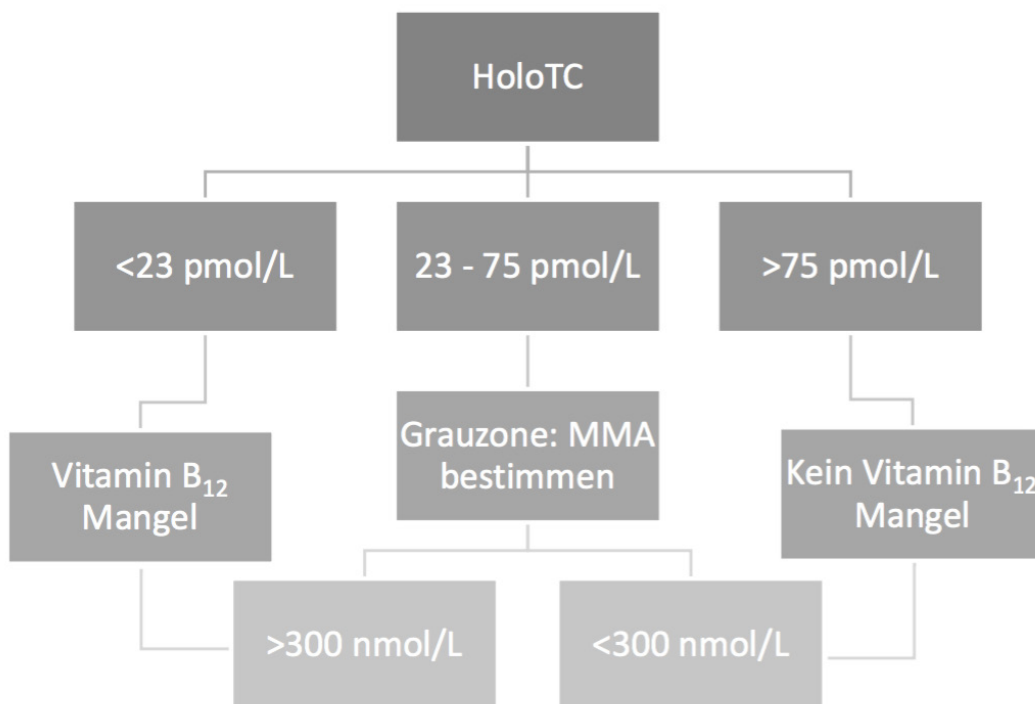


Abbildung 5: Stufenmodell zur Bestimmung des Vitamin B₁₂Mangels nach Herrmann und Obeid

Holotranscobalamin wird als first-line Parameter verwendet. In der Grauzone zwischen 23 und 75 pmol/L wird die Bestimmung der Methylmalonsäure empfohlen. Ist der Wert über 300 nmol/L liegt ein Vitamin B₁₂ Mangel vor. Adaptiert nach Wolfgang Herrmann und Rima Obeid in "Utility and limitations of biochemical markers of vitamin B₁₂ deficiency"(83).

Fedosov et al. beschreiben die Verwendung von Kombinationsmodellen. Es wurde gezeigt, dass eine Zusammenschau mehrerer Marker einen erheblichen diagnostischen Vorteil brachte. Die Verwendung aller vier Parameter (4cB₁₂ oder früher auch „wellness score“) ist natürlich die akkurateste aber auch kostenintensivste Methode. Auch Ansätze mit nur drei bzw. zwei Werten lieferten gute Ergebnisse. So wird für den 3cB₁₂ eine Kombination von Vitamin B₁₂, HoloTC und MMA und für den 2cB₁₂ HoloTC mit MMA empfohlen (82, 87).

3.3.2.2 Folsäure

Folsäure kommt in der Nahrung, in reduzierter Form als Polyglutamat, vor allem in Leber und dunklem Blattgemüse vor. Im Dünndarm werden die Polyglutamate dann zu Monoglutamaten dekonjugiert und im Jejunum aufgenommen. Dies geschieht hauptsächlich aktiv über Transportvermittler (Carrier) aber auch passiv. Folsäure muss

reduziert vorliegen um im C1-Stoffwechsel teilzunehmen. Dieser ist in weiterer Folge wichtig für die Nukleotid-, DNA- und RNA-Synthese. Daher wird sie zu Dihydrofolsäure und anschließend zu Tetrahydrofolsäure (THF) reduziert (90, 91).

Ursachen für einen Folsäuremangel können eine verringerte Aufnahme über die Nahrung, Absorptionsstörungen, erhöhter Verlust oder gesteigerter Bedarf sein. So kann exzessives Kochen der Nahrung die Folsäure zerstören und auch beim chronischem Alkoholismus kommt es zu einem Mangel. Weiter können die Zöliakie und tropische Sprue sowie andere intestinale Defekte die Aufnahme verringern. Ein gesteigerter Bedarf besteht zum Beispiel in der Schwangerschaft, bei der Laktation oder bei Erkrankungen mit einer erhöhten Zellproliferation. Dazu zählen zum Beispiel chronisch hämolytische Anämien und die chronisch exfoliative Dermatitis. Außerdem gibt es noch genetische Störungen, welche die Schlüsselenzyme oder Transporter betreffen und zu einem Mangel führen. Nicht zu vernachlässigen sind auch Medikamente, die mit dem Folsäurestoffwechsel interagieren. Methotrexat inhibiert zum Beispiel die Dihydrofolatreduktase (DHFR). Trimethoprim soll eigentlich nur die mikrobielle DHFR hemmen, ist aber in der Lage einen grenzwertig niedrigen Folsäurestatus zu verschlimmern (92).

Initial sollte zur Feststellung eines Folsäuremangels die Serum- oder Plasmafolsäure bestimmt werden. Sie spiegelt bei den meisten Patienten den Folsäurestatus wieder. Jedoch wird sie von der Nahrungsaufnahme beeinflusst. So steigt der Spiegel bis zu zwei Stunden nach der Einnahme von folsäurehaltiger Nahrung, fällt dann aber rasch wieder auf die Baseline zurück. Anzustreben ist also eine Abnahme beim nüchternen Patienten (92-95). Folsäure ist zu ungefähr 95% in den Erythrozyten lokalisiert, woraus sich der nächste Parameter ergibt, die Folsäure in Erythrozyten oder das sogenannte RBC-Folat (40). Es ist unbeeinflusst von der aktuellen Zufuhr und reflektiert den Folsäurestatus über die Dauer eines Erythrozytenlebens, also etwa 3-4 Monate. Niedrige Werte sprechen sehr aussagekräftig für einen Mangel. Nachteile sind, dass es länger dauert, bis man Veränderungen sieht und die Bestimmung kostspieliger ist. Außerdem wird im Falle einer vorangegangenen Bluttransfusion der Folsäurestatus des Spenders miterfasst und es kann keine sichere Aussage über den Status des Empfängers getroffen werden (92, 94, 95). Zu beachten ist, dass 5-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF) zunächst durch die Methionin-Synthase in die aktive THF Form umgewandelt werden muss. Die Methionin-Synthase ist ein Vitamin B₁₂ abhängiges Enzym. Somit kommt es bei schwerem Vitamin B₁₂ Mangel nicht zu der oben genannten Reaktion und die Folsäure akkumuliert als 5-MTHF. Die

Folsäurewerte im Plasma sind in diesem Fall normal oder hoch obwohl ein funktioneller Mangel besteht. Daher sollte ein Vitamin B₁₂ Status bestimmt werden (90, 94).

Homocystein ist ein sehr sensitiver Parameter für einen Folsäuremangel, die Spezifität hingegen ist gering, da es von einigen Faktoren beeinflusst wird. Dies wurde bereits im Kapitel zum Vitamin B₁₂ Mangel genauer erläutert. Es wurden auch einige Assays entwickelt mit denen es möglich ist, individuelle Formen von Folsäure zu bestimmen. Dies wird noch recht selten angewendet aber findet zum Beispiel in der Diagnose des zerebralen Folatmangels Anwendung (94).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Bestimmung von Folsäure im Plasma als Mittel der ersten Wahl für die Diagnose eines Folsäuremangels herangezogen werden sollte. Eine Routinebestimmung der Folsäure in Erythrozyten ist meist nicht notwendig kann aber in einige Fällen hilfreich sein. Sie kann, ähnlich wie der HbA_{1c}-Wert beim Diabetes, Aussage zum Folsäurestatus über die Zeitspanne eines Erythrozytenlebens bringen. Die Folsäurebestimmung aus Plasma muss natürlich immer im klinischen Kontext bewertet werden. Faktoren wie der Vitamin B₁₂ Status, Nüchternheit oder Schwangerschaft müssen also in die Überlegungen mit eingehen. Ein niedriger Folsäurewert im Plasma und klinische Symptome deuten verlässlich auf einen Folsäuremangel hin (93, 94).

3.4 Normozytär

3.4.1 Überblick

Normozytäre Anämien stellen gewissermaßen eine Herausforderung dar, da es zahlreiche Ursachen geben kann. Es scheint gerade in dieser Gruppe einige Probleme zu geben eine passende Diagnose und konsequenterweise auch Therapie zu finden. Dies zeigt sich nicht zuletzt daran, dass häufig PatientInnen mit einer bestehenden normozytären, normochromen Anämie aus Gesundheitseinrichtungen entlassen werden (4, 5).

Die normozytären Anämien lassen sich weiter unterteilen in hypo- und hyperregenerative Formen. Ursachen für eine Anämie mit einer erhöhten Retikulozytenzahl sind meist eine akute Blutung oder intravasale Hämolyse. Hingegen kommen bei der hyporegenerativen Form unter anderem die Blutbildung supprimierende Erkrankungen, wie die aplastische Anämie, sowie Nieren- oder Lebererkrankungen in Frage. Auch eine ACD, welche bereits im Kapitel der mikrozytären Anämien erwähnt wurde, kann dieser Gruppe zugeordnet werden (37, 61).

Bei älteren Menschen stellt die normozytäre Anämie die häufigste Form dar. In einer Studie, in welcher eine große Kohorte über 65-jähriger untersucht wurde, lag meist ein Eisenmangel oder eine ACD als Ätiologie vor oder die Patienten waren Träger einer Thalassämieerkrankung. Interessant ist dabei, dass bei Älteren offensichtlich das MCV für die Ursachenfindung nicht immer wegweisend ist. So würde man sich bei dem hohen Anteil an Eisenmangelanämien und Thalassämieträgern in dieser Gruppe einen höheren Prozentsatz an mikrozytären Anämien erwarten. Dies zeigt ebenfalls, dass bei Älteren auch bei untypischem MCV an eine Mangelanämie gedacht werden sollte. Zudem wurden etwa 26% als „unexplained anemia of the elderly“ (UAE) klassifiziert, wovon einige mit myelodysplastischen Syndromen vereinbar wären (61, 96).

Trotz ausgiebiger Forschung bleibt diese relativ große Gruppe der UAE bei älteren Menschen. Sie hat sich mittlerweile schon zu einer anerkannten Entität entwickelt. In einigen Studien, in denen auch ein peripherer Blutausstrich gemacht wurde haben sich einige dieser Anämien als myelodysplasieverdächtig herausgestellt. Blutausstriche sollten daher angefertigt werden um eventuelle Hinweise auf ein myelodysplastisches Syndrom zu geben. Die UAE ist wahrscheinlich multifaktoriell bedingt, mit variablen Anteilen von renaler oder endokriner Insuffizienz, chronischer Entzündung, Androgenmangel und möglicherweise beginnender Myelodysplasie. Therapeutische Intervention mit

Erythropoetin, Testosteron-Ersatz sowie Nahrungsergänzung und antiinflammatorischer Therapeutika werden untersucht (97).

Der Blutaussstrich kann bei normozytären Anämien dabei helfen zwischen Blutverlust, Knochenmarksdepression und Hämolyse zu unterscheiden. Weiter kann bei einer Hämolyse die Ursache durch die Morphologie eingegrenzt werden. Während sich bei Blutverlust eine unspektakuläre Morphologie zeigt, können bei der Hämolyse beispielsweise Sichelzellen oder Elliptozyten auf eine spezifische Ätiologie hinweisen oder zumindest das weitere diagnostische Vorgehen eingrenzen (98).

3.4.2 Hämolytische Anämien

3.4.2.1 Überblick

Die Hämolyse ist definiert durch einen gesteigerten Abbau von Erythrozyten und eine verkürzte Erythrozytenüberlebenszeit, welche normalerweise um die 120 Tage beträgt. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten die hämolytischen Anämien weiter zu klassifizieren. So kann man zwischen korpuskulären oder extrakorpuskulären hämolytischen Anämien unterscheiden. Außerdem wird zwischen akut und chronisch, angeboren oder erworben sowie intra- und extravasal differenziert (99).

Bei Ikterus, Hämaturie und gleichzeitiger Anämie sollte unbedingt an eine Hämolyse gedacht werden. Labordiagnostisch sollte die Untersuchung eines Blutbildes mit Retikulozyten sowie LDH, Haptoglobin, unkonjugiertem Bilirubin und eine Urinanalyse erfolgen. Bestätigt sich die Hämolyse, so sollte zunächst ein Coombs-Test zum Ausschluss einer immunhämolytischen Anämie durchgeführt werden. Anschließend sollte eine morphologische Abklärung mittels Blutaussstrich erfolgen. Führt dies nicht zur Diagnose sollte weiter in Richtung Enzymdefekte, Hämoglobinopathien, mechanische und andere Ursachen exploriert werden (37, 99).

3.4.2.2 Laborparameter

Zur Abklärung einer Hämolyse kann man einige Laborparameter verwenden.

Kommt es zur Zerstörung von Erythrozyten zirkuliert dadurch mehr freies Hb. Ein Spiegel von $<2\text{mg/dL}$ im Plasma schließt eine intravasale Hämolyse aus. Dieser Parameter ist empfindlicher als LDH kann aber auch bei in-vitro-Hämolyse erhöht sein (37).

LDH ist ein hauptsächlich intrazellulär vorkommendes Enzym. Die Konzentration im Erythrozyten ist ca. 300-mal so hoch wie im Plasma, daher kommt es bei Untergang von Zellen wie Erythrozyten zu einem messbaren Anstieg im Plasma. Wie erwähnt kommt die Laktatdehydrogenase auch in anderen Zellen vor, in großer Menge zum Beispiel in Hepatozyten. Um nun grob zwischen Leber- bzw. Gallenwegserkrankungen und Hämolyse zu unterscheiden kann man den LDH/AST- bzw. LDH/GOT-Quotienten bilden. Kommt es zu einem deutlich höheren LDH-Anstieg (Quotient >12) macht dies eine Hämolyse wahrscheinlicher. Es besteht die Möglichkeit die LDH Isoenzyme zu bestimmen. So kommen im Erythrozyten vor allem LDH-1 und LDH-2 vor. Allgemein ist jedoch zu erwähnen, dass ein LDH-Anstieg bei vielen Erkrankungen mit Nekrose oder erhöhtem Zellumsatz vorkommen kann (37, 99, 100).

Haptoglobin ist ein Transportprotein, welches die Aufgabe hat freies Hb aufzufangen und wieder zur Leber zu transportieren. So wird es nicht renal über die Niere ausgeschieden und das enthaltene Eisen kann wiederverwendet werden. Die Halbwertszeit im mit Hb beladenen Zustand ist sehr viel kürzer, weshalb es bei einem erhöhten Vorkommen von freiem Hb rasch zum Abfall der Haptoglobinkonzentration kommt. Eine starke Verminderung ist kennzeichnend für eine Hämolyse. Das detektieren leichter Hämolysen bzw. die Abschätzung des Schweregrades sind ohne genauere Phänotypbestimmungen allerdings nicht immer möglich. So bindet der Phänotyp HP 1-1 am besten an freies Hämoglobin wohingegen HP 2-2 am wenigsten aktiv ist. Das Glykoprotein wird vorwiegend in der Leber synthetisiert und so kann es bei Leberparenchymschäden oder Malnutrition ebenfalls erniedrigt sein. Außerdem kann es genetische Ursachen, wie die kongenitale Hypohaptoglobinämie, für eine niedrige Konzentration des Hämoglobinfängers geben. Da Haptoglobin auch ein akute Phase Protein ist kann es bei einer akuten Phase Reaktion zu einer Maskierung einer Hämolyse kommen. Hier kann es hilfreich sein das CRP mitzubestimmen. Bei starker Hämolyse fällt nach dem Haptoglobin zusätzlich das Hämopexin, welches eine hohe Affinität zu Häm hat, ab. So lässt sich das

Ausmaß der intravasalen Hämolyse abschätzen. Wird die Kapazität von Haptoglobin überschritten, kommt es zu Hämoglobinurie und später zu Hämosiderinurie (6, 37, 99-101).

Hauptsächlich beim Abbau von Häm entsteht unkonjugiertes (indirektes) Bilirubin, welches dann durch die Leber zum direkten Bilirubin glukuronidiert wird. Kommt es zur Hämolyse, übersteigt dies die Eliminationskapazität der Leber und das indirekte Bilirubin im Plasma steigt an (6, 99, 100).

Der direkte Coombs-Test (in englischer Literatur DAT) dient zum Nachweis einer immunhämolytischen Anämie. Dabei werden Erythrozyten mit dem so genannten Coombs-Serum versetzt. Dieses enthält Antihumanglobulin (Anti-IgG und Anti-C3d), welches zur Agglutination führt, sofern die Erythrozyten in-vivo mit Immunglobulinen beladen worden sind. Bei Verdacht einer Autoimmunhämolyse sollten auch spezifische Coombs-Seren (v. a. Anti-IgM, Anti-IgA) zum Einsatz kommen (100, 102).

3.4.2.3 Formen

Die autoimmunhämolytische Anämie entsteht durch eine Autoantikörper-mediierte Zerstörung der Erythrozyten. Wie oben erwähnt kommt es zur Agglutination im direkten Coombs-Test. Sie wird je nach Antikörpertyp in AIHA mit Wärmeautoantikörper und AIHA durch Kälteagglutinine unterteilt. Seltener kommt auch ein gemischter Typ mit beiden Agglutininformen vor. Oft kann keine spezifische Ätiologie festgemacht werden. Warme AIHA wird durch IgG Antikörper verursacht und ist die häufigere Variante. Auslöser können beispielsweise Autoimmunerkrankungen oder Non-Hodgkin Lymphome sein. Bei der kalten AIHA sind IgM Antikörper maßgeblich involviert. Diese Reaktion wird vor allem durch Infektionen mit Mykoplasmen oder dem Epstein-Barr-Virus ausgelöst. Bei warmen Autoantikörpern kommt es vorwiegend zu extravaskulärer Hämolyse, wohingegen die IgM-mediierte Reaktion zu intravaskulärer und extravaskulärer Hämolyse führt. Es gibt auch eine AIHA durch bithermische Hämolsine (Donath-Landsteiner Antikörper). Dabei fixiert sich Komplement (C1) bei kalten Temperaturen, bei höheren Temperaturen kommt es schließlich zur Hämolyse. Dies tritt sehr oft akut nach Virusinfekten auf und betrifft hauptsächlich Kinder. Im Donath-Landsteiner Test werden

Proben bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (zwischen 0-4°C und bei 37°C) und nach der oben beschriebenen Dynamik gesucht, um die paroxysmale Kältehäoglobinurie nachzuweisen. Zu bedenken ist, dass der DAT sowohl bei einer AIHA als auch bei einer Hämolyse durch Alloantikörper positiv ist. Die Unterscheidung ist daher nicht immer ganz einfach und es muss weiterführende Diagnostik betrieben werden. So kommen Autoadsorption und Antigenphenotypisierung zum Einsatz. Bei der Autoadsorption versucht man die Autoantikörper rauszufiltern um danach eventuelle Alloantikörper in erneuter Testung nachzuweisen. Die Abgrenzung zu einer Transfusionsreaktion ist allerdings trotz hohem Aufwand nicht immer möglich. Eine immunhämolytische Anämie kann auch durch Medikamente ausgelöst werden. Dabei kommt es entweder zu medikamentös induzierten Autoantikörpern, die direkt mit Erythrozyten oder mit medikamenten-beladenen Blutkörperchen (Hapten-Typ oder Neoantigen-Typ) reagieren. Im letzten Fall lässt sich eine in-vitro Hämolyse nur bei Zugabe des entsprechenden Pharmakons auslösen (102-104).

Hauptvertreter der mikroangiopathischen hämolytischen Anämien sind die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) und das hämolytisch urämische Syndrom (HUS). Bei Schwangeren muss auch an ein HELLP Syndrom (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count) gedacht werden.

Die TTP ist ausgelöst durch einen Defekt oder das Fehlen des ADAMTS13 Enzyms, welches normalerweise von-Willebrand-Faktor Multimere teilt. Durch diese Anhäufung der Multimere kommt es zu Endothelschäden in der Endstrombahn und in weiterer Folge zur Mikrothrombenbildung und mechanischer Erythrozytenzerstörung. Meistens ist eine spontane Antikörperbildung gegen ADAMTS13 die Ursache, selten ein hereditärer Mangel. Der Nachweis der Enzymaktivität ist beweisend, dauert aber lange. Deshalb muss schon vorher bei einem Verdacht behandelt werden. Der PLASMIC score (Platelet count; combined hemoLysis variable; absence of Active cancer; absence of Stem-cell or solid-organ transplant; MCV; INR; Creatinine) kann die Diagnosestellung erleichtern (siehe Tabelle 11). Bei einer hämolytischen Anämie mit negativem Coombs-Test, Thrombopenie und Fragmentozyten im Blutausschlag muss dringend der Verdacht auf TTP gestellt werden. Plasma sollte vor der Therapie für den Aktivitätsnachweis asserviert werden (99, 103, 105).

Tabelle 11: PLASMIC Score zur Abschätzung des TTP-Risikos

Parameter	Punkte
Thrombozyten $<30 \times 10^9/l$	1
Hämolyseparameter positiv*	1
Keine aktive Malignität	1
Keine Transplantation in Historie	1
MCV <90 fl	1
INR $<1,5$	1
Kreatinin <2 mg/dl	1

0-4 Punkte bedeuten ein niedriges Risiko eines schweren ADAMTS13-Mangels, 5 Punkte ein intermediäres Risiko und 6-7 Punkte ein hohes Risiko.

PLASMIC steht für die 7 angeführten Parameter: **P**latelet count; **c**ombined hemo**L**ysis variable; **a**bsence of **A**ctive cancer; **a**bsence of **S**tem-cell or solid-organ transplant; **M**CV; **I**NR; **C**reatinine.

TTP = thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

*Retikulozyten $>2,5\%$ oder Haptoglobin nicht messbar oder indirektes Bilirubin $>2\text{mg/dl}$.

Nach Bendapudi et al., Derivation and external validation of the PLASMIC score for rapid assessment of adults with thrombotic microangiopathies: a cohort study (105)

Beim HUS zeigen sich auch mikroangiopathische Symptome. Es gehen Episoden blutiger Diarrhoen voraus und kommt häufig zu Nierenversagen. Ausgelöst wird dieses Krankheitsbild meist durch Shiga-toxin-bildende E.coli Stämme (STEC). Hiervon sind hauptsächlich Kinder betroffen. Bei STEC-Harnwegsinfekten kann es auch ohne Diarrhoe zu einem HUS kommen. Selten waren hämolytische urämische Syndrome auch mit Streptokokkus pneumoniae, HIV und Influenza assoziiert. Beim atypischen HUS (aHUS) ist die Ursache nichtinfektiöser immunlogischer Natur. Es kann durch Atemwegsinfekte getriggert werden kann (99, 103).

Wichtig bei den hämolytischen Anämien sind auch die Membranopathien und Enzymdefekte sowie die Hämoglobinopathien. Bei letzterem sollte man vor allem an die

Sichelzellanämie sowie die Thalassämien denken, welche in vorigen Kapiteln schon behandelt wurden.

Der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel (G6PD-Mangel) und der Pyruvatkinasemangel (PK-Mangel) sind Enzymmangelzustände, bei denen es zur Hämolyse kommt. Bei Patienten mit einem G6PD-Mangel werden hämolytische Krisen meist durch Medikamente, Infekte, oxidativen Stress oder, namensgebend für den Favismus, durch Fava-Bohnen, ausgelöst. Im Internet finden sich einige Webseiten auf denen Medikamente gelistet sind, welche bei diesen PatientInnen vermieden werden sollten. Beim Nachweis der Erkrankung ist zu beachten, dass in der akuten hämolytischen Krise die Erythrozyten, welche eine niedrige Enzymaktivität aufweisen, hämolysiert sind und solche mit einer fast normalen Aktivität, bestehen bleiben. Dieser Umstand kann zu einem falsch negativen Ergebnis führen. Während der G6PD-Mangel X-chromosomal rezessiv vererbt wird, erfolgt die Vererbung beim Pyruvatkinasemangel autosomal rezessiv. Zu einer hämolytischen Anämie kommt es demnach nur bei homozygot Erkrankten. Im Rahmen der Diagnose des PK-Mangels sollten die Enzymaktivität sowie genetische Testung verwendet werden (6, 99, 103, 106, 107).

Bei Membrandefekten kommt es zu Veränderungen, die zu einer erhöhten Phagozytose der Erythrozyten in der Milz oder zu einem unzureichenden Schutz vor dem Komplementsystem führen. Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine erworbenen Membranopathie durch eine somatische Mutation des PIG-A Gens. Dies führt zu einem Defekt der GPI-verankerten Proteine, wozu auch komplementregulierende Proteine gehören. Fehlen nun die komplement-hemmenden Proteine CD55 und CD59, kommt es zu einer chronischen komplement-medierten Hämolyse sowie Aktivierung von Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten. Klinisch fallen diese Patienten durch eine Trias aus Hämolyse, Thromboembolien und Zytopenien auf. Thrombosen treten unter anderem an ungewöhnlichen Lokalisationen wie Pfortader- oder Lebervenen auf. Durch eine durchflusszytometrische Bestimmung der GPI-verankerten Membranantigene wird die Diagnose gesichert. Hierbei muss ein schwerer Mangel oder Fehlen von GPI-verankerten Proteinen mindestens zwei verschiedener Zelllinien vorliegen. Diese Testung sollte bei jeder erworbenen Coombs-negativen Hämolyse erfolgen (6, 103, 108).

Die Sphärozytose ist ein angeborener Membrandefekt welcher asymptomatisch verlaufen kann aber auch bei manchen Individuen zu schweren hämolytischen Krisen führt. Das primäre Problem bei der hereditären Kugelzellanämie ist der Verlust der

Membranoberfläche. Dies führt aufgrund von Defekten in den Membranproteinen Ankyrin, Band 3-Protein, α/β -Spektrin oder Protein 4.2 zu einer reduzierten Verformbarkeit und hat zur Folge, dass diese kugelförmigen Erythrozyten in der Milz zerstört werden. Klinisch zeigen sich durch den erhöhten Zellumsatz der roten Blutkörperchen bei einigen PatientInnen eine milde Splenomegalie sowie eine chronische Hyperbilirubinämie und das Auftreten von Bilirubin-Gallensteinen. Zu schwereren hämolytischen Krisen kann es zum Beispiel aufgrund einer Parvovirus-B 19 Infektion kommen. Diese zieht eine Depression des Knochenmarks nach sich. Damit fällt die normalerweise gesteigerte Regeneration der Erythrozyten aus. Aufmerksam sollte man werden, wenn eine normochrome hämolytische Anämie mit einem negativen Coombs-Test sowie Kugelzellen mit verminderter osmotischer Resistenz vorliegen. Eine erhöhte MCHC kann schon im Routineblutbild einen Hinweis geben. Erythrozyten von Patienten mit hereditärer Sphärozytose verlieren nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C schneller an Membranoberfläche als gesunde Zellen. Daher gilt der inkubierte osmotische Fragilitätstest als Goldstandard für die Diagnose der hereditären Sphärozytose, insbesondere bei PatientInnen nordeuropäischer Abstammung oder bei Personen mit einer positiven Familienanamnese. Die durchflusszytometrische Analyse von an Erythrozyten gebundenem Eosin-5-Maleimid (EMA-Test) zeigt eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Diagnose der Sphärozytose (6, 103, 109).

3.4.2.4 Blutausstrich

Wie oben beschreiben kann die Erythrozytenmorphologie im peripheren Blutausstrich weniger auf eine einzige Diagnose hindeuten als vielmehr auf mehrere relevante Möglichkeiten für die klinische und labortechnische Folgediagnostik. Viele hämolytische Anämien weisen multiple Poikilozyten auf. Dieses Problem ist besonders bei Neugeborenen zu beachten, bei denen die üblichen hämolytischen Morphologien möglicherweise nicht klar erkennbar sind. Daher kann man sich nicht auf die bekannten Muster wie bei Erwachsenen verlassen (98).

Bei oxidativen Hämolysen, wie dem G6PD-Mangel, sieht man klassischerweise Degmazyten (bite cells/Bisszellen) oder Blisterzellen. Weniger prominent können aber auch Schistozyten und Sphärozyten vorkommen (98, 99).

Schistozyten spiegeln im Allgemeinen eine intravaskuläre Hämolyse wider. Bei Auftreten in Kombination mit einer Thrombozytopenie, deuten dies auf eine mikroangiopathische hämolytische Anämie wie die TTP, ein HUS oder disseminierte intravasale Gerinnung hin. Die Morphologie ist allerdings nicht hilfreich bei der Unterscheidung zwischen diesen Zuständen oder der Vorhersage des Schweregrades. Es gibt zudem weitere Ursachen für das Auftreten von Schistozyten, wie zum Beispiel Vaskulitis, intrakardiale Hämolyse, thermische Verbrennungen, Marschhämoglobinurie oder das HELLP-Syndrom. Bei all diesen kommt es zu einer extrinsischen mechanischen Verletzung der roten Blutkörperchen (98, 99, 103).

Dominieren Akanthozyten bei einem hämolytischen Individuum, kann dies auf einen Pyruvatkinase-Mangel hinweisen. Akanthozyten werden aber auch häufiger bei Menschen mit Lebererkrankungen, Hyposplenismus, Dyslipidämien und Anorexia nervosa beobachtet (98).

Finden sich Sphärozyten im Blutausstrich, hat dies zwei häufige Ursachen: immunvermittelte Hämolyse und hereditäre Sphärozytose. Einige Patienten mit hereditärer Sphärozytose zeigen gelegentlich pilzförmige Zellvarianten (s.g. Mushroom Cells): Diese Zellen ähneln Sphärozyten mit spiegelbildlichen Einbuchtungen, was zum Aussehen ähnlich einem Knollenpilz führt. Allein durch die Morphologie lässt sich die Unterscheidung von Immunchämolyse und hereditärer Sphärozytose nicht bewältigen und weitere Tests, wie DAT und Durchflusszytometrie, können erforderlich sein. Es ist zu beachten, dass eine Sphärozytose auch bei Neugeborenen mit gramnegativer Sepsis und bei Patienten mit thermischen Verbrennungen sowie bei anderen hämolytischen Anämien auftreten kann (98, 99).

Sichelzellen deuten auf die Diagnose einer Sichelzellerkrankung hin. In den Blutausstrichen dieser PatientInnen finden sich fast immer auch Hinweise auf Hyposplenismus wie Targetzellen, Akanthozyten und Howell-Jolly-Körperchen (98).

3.5 Flowcharts/Stufendiagnostik für den klinischen Alltag

3.5.1 Mikrozytäre Anämie

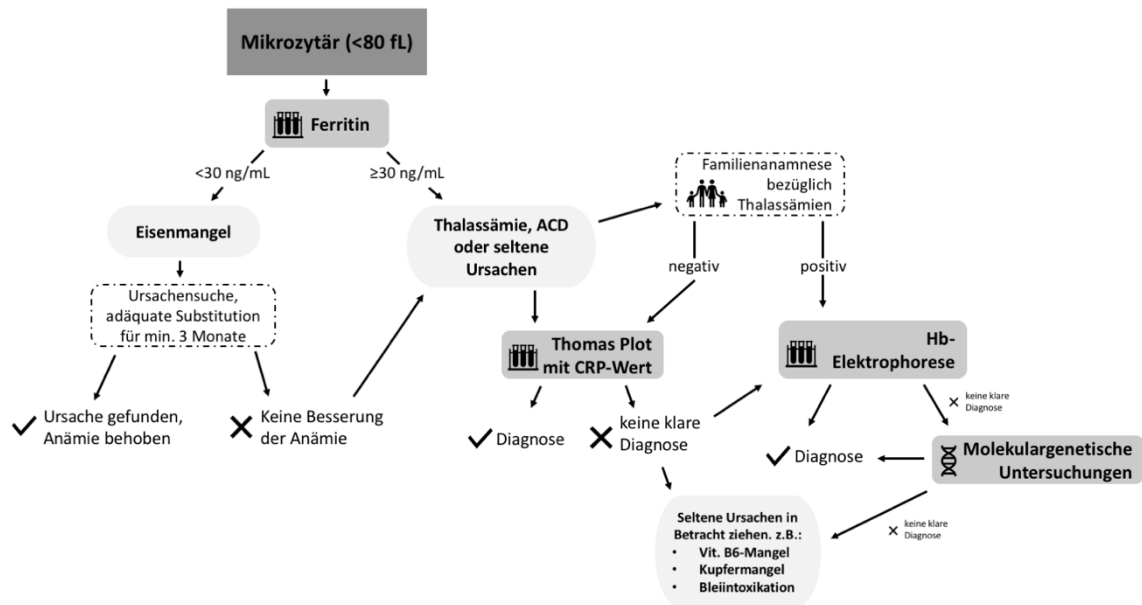


Abbildung 6: Flowchart mikrozytäre Anämie

Bei einer mikrozytären Anämie wird zunächst Ferritin bestimmt. Liegt der Wert unter 30 ng/mL handelt es sich um einen Eisenmangel (39, 46). In weiterer Folge sollte die Ursache dafür ermittelt werden und eine adäquate Substitution erfolgen. Wenn nach 3 Monaten Eisengabe keine Besserung der Anämie eintritt, sollte man unter anderem an eine Thalassämie oder ACD denken (65). Gleiches gilt, wenn der Ferritinwert von Anfang an über 30 ng/mL war. Wichtig ist nun die Familienanamnese bezüglich Thalassämien. Außerdem hilft der Thomas Plot mit dem CRP zur Unterscheidung zwischen Eisenmangelzuständen und ACD. Ist die Familienanamnese auffällig oder haben die übrigen Untersuchungen kein klares Ergebnis geliefert, kann eine Hb-Elektrophorese oder molekulargenetische Untersuchung bezüglich Thalassämien die Diagnose liefern. Andere seltene Gründe für eine mikrozytäre Anämie sind zum Beispiel ein Vitamin B6-Mangel, Kupfermangel oder eine Bleiintoxikation (40).

3.5.2 Makrozytäre Anämie

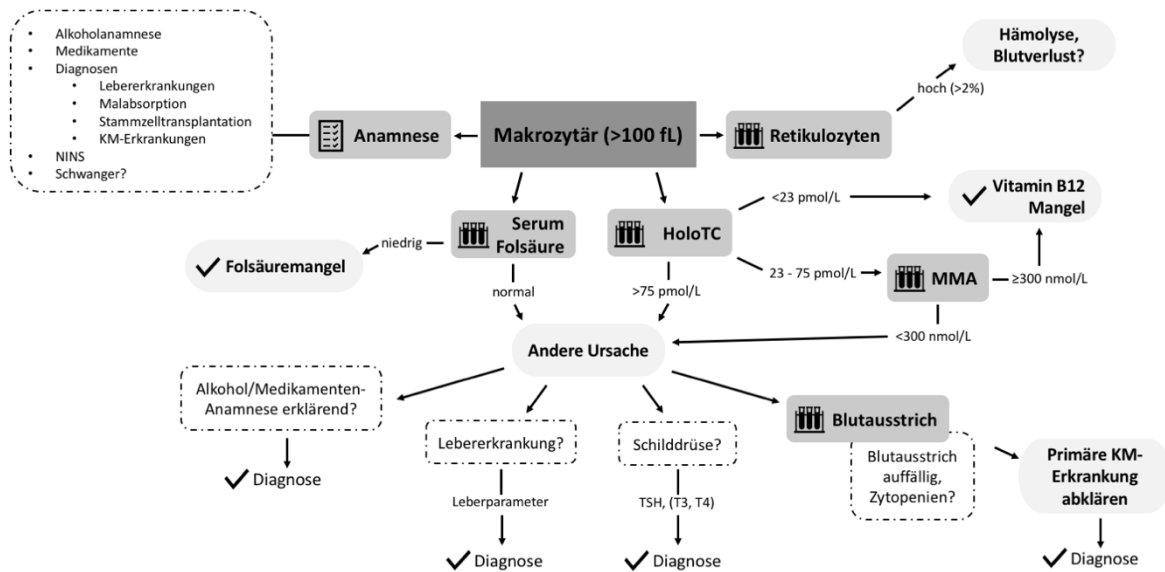


Abbildung 7: Flowchart makrozytäre Anämie
MMA = Methylmalonsäure; HoloTC = Holotranscobalamin

Bei einer makrozytären Anämie sind in der Anamnese der Alkoholkonsum, die Medikation, eventuelle Vordiagnosen wie Lebererkrankungen, Malabsorptionsstörungen, Knochenmarkserkrankungen sowie Stammzelltransplantationen oder Niereninsuffizienz. Bei jungen Frauen muss man auch an eine Schwangerschaft denken. In diesem Flowchart steht die Bestimmung der Serum Folsäure und des HoloTC im Mittelpunkt. Außerdem wird mitberücksichtigt, ob die Makrozytose eventuell durch eine Retikulozytose bedingt ist. Bei der Abklärung des Vitamin B12-Mangels deckt sich diese Flowchart im Wesentlichen mit dem Stufenmodell nach Herrmann und Obeid (siehe Abbildung 5) (83). Besteht weder ein Folsäure- noch ein Vitamin B12-Mangel sollten andere Ursachen wie Leber-, Schilddrüsen- oder primäre Knochenmarkserkrankungen abgeklärt werden. Hilfreich hierbei sind die Leberparameter, TSH, T3 und T4 sowie ein Blutausstrich. An diesem Punkt stellt sich auch wieder die Frage nach Alkoholkonsum und den eingenommenen Medikamenten. Eine Liste von Medikamenten, die zu einer megaloblastären Anämie führen können findet sich in Tabelle 10.

3.5.3 Normozytäre Anämie

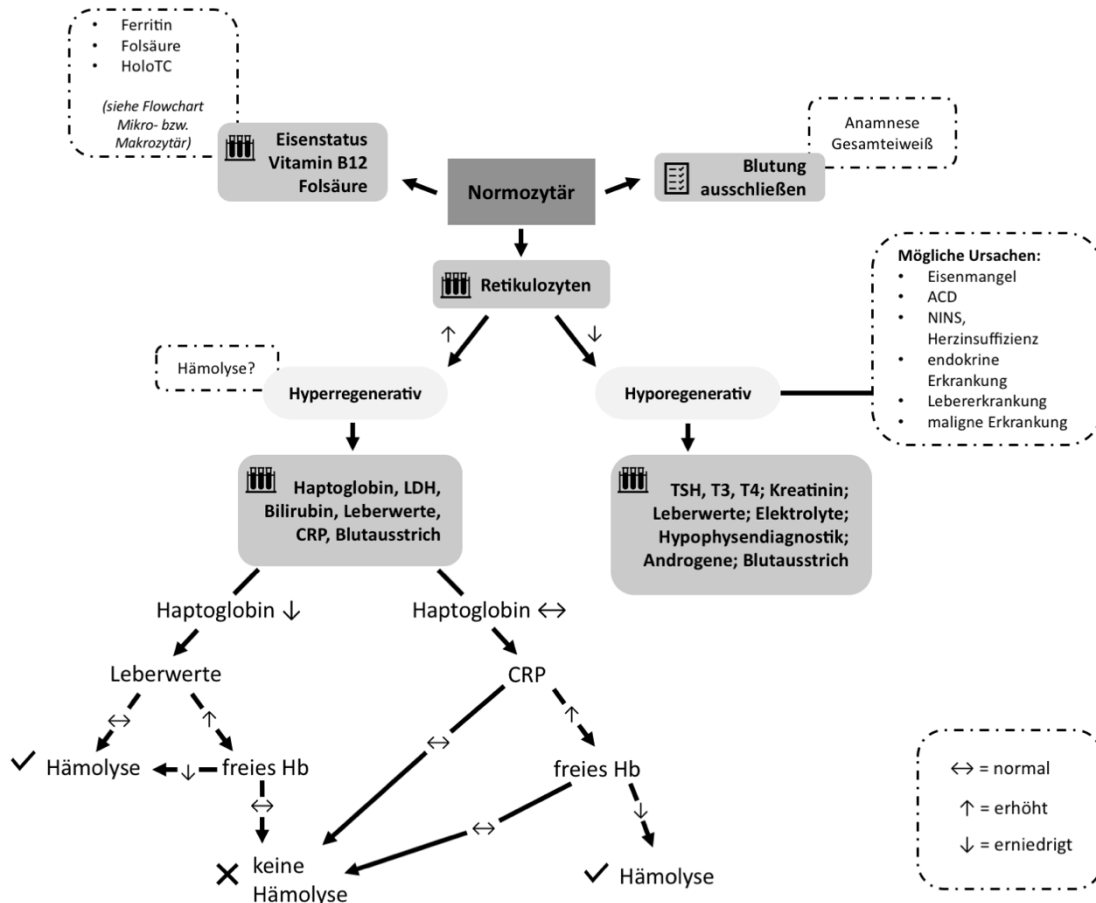


Abbildung 8: Flowchart normozytäre Anämie
 HoloTC = Holotranscobalamin; ACD = anemia of chronic disease; NINS = Niereninsuffizienz

Bei der normozytären Anämie sollte zunächst eine Blutung ausgeschlossen werden. Ein stark vermindertes Gesamteiweiß bei noch normalem Hb kann auf eine akute Blutung hinweisen, ebenso die Anamnese (37). Wie im Kapitel 3.4 oben beschrieben sollte man, vor allem bei älteren Menschen, auch an Mangelanämien denken und diese entsprechend abklären. In diesem Flowchart erfolgt die Unterteilung in hyperregenerative und hyporegenerative normozytäre Anämien je nachdem ob die Retikulozyten hoch oder niedrig sind. An dieser Stelle kann auch der Retikulozytenproduktionsindex, welcher in Abbildung 1 beschrieben ist, hilfreich sein. Handelt es sich nun um eine hyporegenerative normozytäre Anämie können diverse Ursachen der Grund dafür sein. Eine Auflistung

dieser ist in der Abbildung zu sehen. Folgt man dem Pfad zu den hyperregenerativen normozytären Anämien stellt sich vor allem die Frage, ob eine Hämolyse vorliegt. Hierfür bietet sich das Haptoglobin als Primärparameter an. Zu beachten ist, dass es in der Leber synthetisiert wird und daher bei Leberparenchymstörungen von vornerein vermindert sein kann. Als akute Phase Protein ist es bei Inflammationszuständen erhöht und eine Hämolyse kann so maskiert werden (99, 100). In diesen Fällen kann auf das freie Hämoglobin mit anderen Hämolyseparametern wie zum Beispiel der LDH und dem indirekten Bilirubin zurückgegriffen werden.

4 Diskussion

Es existiert eine sehr große Fülle an wissenschaftlicher Literatur zum Thema Anämiediagnostik, welche im Rahmen einer Diplomarbeit nur schwer vollständig abzubilden ist. Daher wurden in dieser Arbeit nur die Bereiche genauer beleuchtet, welche entweder oft im klinischen Alltag behandelt werden oder solche, bei denen es offensichtlich noch Unklarheiten zu geben scheint. Ein gutes Beispiel für beides ist die Eisenmangelanämie. Sie wird extrem häufig abgeklärt und die Literatur sowie persönliche Erfahrung haben gezeigt, dass entweder unnötige Laborparameter („Eisenstoffwechselprofil“) angefordert oder die Ergebnisse nicht korrekt interpretiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem hämolytische Anämien und deren Abklärung greifbarer zu machen sowie den Stellenwert des Blutausstriches darzustellen. Außerdem soll ein Einblick gegeben werden, wie schwierig es überhaupt ist allgemeingültige Grenzwerte festzulegen und welche Rolle die WHO in diesem Zusammenhang spielt. Nicht zuletzt wird deutlich das neben den Laborparametern auch eine gründliche Anamnese oft wichtig für die Diagnosestellung ist. Der Thomas Plot, als für einige neues Tool, wird vorgestellt und es soll ein Denkanstoß zum Thema unexplained anemia of the elderly gegeben werden.

Es sei jedoch erwähnt, dass nicht in jedem Labor alle Parameter bestimmbar sind, vor allem in kleineren Häusern oder im niedergelassenen Bereich. So kann nicht jeder Kliniker im Alltag statt des Vitamin B12 das Holotranscobalamin anfordern, wie es in dieser Arbeit vorgeschlagen wird.

Oft werden in der Klinik Routinelabore bzw. Laborprofile bestellt. Das schrittweise Vorgehen in den Flowcharts ist daher auch mehr als gedankliches Stufenmodell zu sehen und nicht unbedingt immer als zeitlich getrennte Prozessreihenfolge. Dies wäre zwar durchaus wirtschaftlicher aber in der Praxis muss man auch bedenken, dass jeder Laborparameter für die Auswertung eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt. Würde man nun die Bestimmungen Schritt für Schritt durchführen, wäre mit enormen Zeitverzögerungen im klinischen Alltag zu rechnen.

Spannend könnte in zukünftigen Arbeiten auch eine Auseinandersetzung mit dem Thema Tryptophanstoffwechsel sowie Heparin in der Anämiediagnostik sein, welches hier nur marginal behandelt wurde.

5 Literaturverzeichnis

1. Blanc B. Nutritional anemias. Report of a WHO Scientific Group. WHO Tech Rep Ser. 1968;405:1-40.
2. Heimpel H, Riedel M, Wennauer R, Thomas L. Die Plasmaeisenbestimmung – nützlich, unnötig oder irreführend? Medizinische Klinik. 2003;98(2):104-7.
3. Beutler E, Waalen J. The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration? Blood. 2006;107(5):1747-50.
4. Koch CG, Li L, Sun Z, Hixson ED, Tang A, Chagin K, et al. Magnitude of Anemia at Discharge Increases 30-Day Hospital Readmissions. Journal of Patient Safety. 2017;13(4):202-6.
5. Walsh TS, Saleh E-E-D, Lee RJ, McClelland DB. The prevalence and characteristics of anaemia at discharge home after intensive care. Intensive Care Medicine. 2006;32(8):1206-13.
6. Höchsmann B, Röth A, Müller B, Cerma A, Distelmaier L, Doss M, et al. HÄMATOLOGIE. In: Herold G, editor. Innere Medizin : Eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2019 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2019. p. 28-152.
7. Beutler E, West C. Hematologic differences between African-Americans and whites: the roles of iron deficiency and alpha-thalassemia on hemoglobin levels and mean corpuscular volume. Blood. 2005;106(2):740-5.
8. Rushton DH. Why should women have lower reference limits for haemoglobin and ferritin concentrations than men? BMJ. 2001;322(7298):1355-7.
9. Murphy WG. The sex difference in haemoglobin levels in adults — Mechanisms, causes, and consequences. Blood Reviews. 2014;28(2):41-7.
10. Penninx BWJH, Pahor M, Woodman RC, Guralnik JM. Anemia in Old Age Is Associated With Increased Mortality and Hospitalization. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences. 2006;61(5):474-9.
11. Culleton BF, Manns BJ, Zhang J, Tonelli M, Klarenbach S, Hemmelgarn BR. Impact of anemia on hospitalization and mortality in older adults. Blood. 2006;107(10):3841-6.
12. Denny SD, Kuchibhatla MN, Cohen HJ. Impact of anemia on mortality, cognition, and function in community-dwelling elderly. Am J Med. 2006;119(4):327-34.

13. Chaves PH, Xue QL, Guralnik JM, Ferrucci L, Volpato S, Fried LP. What constitutes normal hemoglobin concentration in community-dwelling disabled older women? *J Am Geriatr Soc.* 2004;52(11):1811-6.
14. Patel KV, Harris TB, Faulhaber M, Angleman SB, Connelly S, Bauer DC, et al. Racial variation in the relationship of anemia with mortality and mobility disability among older adults. *Blood.* 2007;109(11):4663-70.
15. Martinsson A, Andersson C, Andell P, Koul S, Engstrom G, Smith JG. Anemia in the general population: prevalence, clinical correlates and prognostic impact. *Eur J Epidemiol.* 2014;29(7):489-98.
16. Röhrig G, Becker I, Gutensohn K, Nebe T. Red blood cell counts and indices in the elderly German population. *LaboratoriumsMedizin.* 2018;42(4):131-9.
17. Cappellini MD, Motta I. Anemia in Clinical Practice-Definition and Classification: Does Hemoglobin Change With Aging? *Seminars in Hematology.* 2015;52(4):261-9.
18. World Health Organisation, UNICEF, United Nations University. Iron deficiency anaemia : assessment, prevention, and control : a guide for programme managers. Geneva: WHO; 2001.
19. Gonzales GF, Tapia V, Gasco M. Correcting haemoglobin cut-offs to define anaemia in high-altitude pregnant women in Peru reduces adverse perinatal outcomes. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;290(1):65-74.
20. Gonzales GF, Rubín De Celis V, Begazo J, Del Rosario Hinojosa M, Yucra S, Zevallos-Concha A, et al. Correcting the cut-off point of hemoglobin at high altitude favors misclassification of anemia, erythrocytosis and excessive erythrocytosis. *American Journal of Hematology.* 2018;93(1):E12-E6.
21. Shah B, Nepal A, Agrawal M, Sinha A. The effects of cigarette smoking on hemoglobin levels compared between smokers and non-smokers. *Sunsari Technical College Journal.* 2013;1(1):42-4.
22. Sunil KJ, Kanhu CP, Akshaya KM. Effect of Chronic Smoking on Hematological Parameters. *International Journal of Current Research.* 2013;5(2):279-82.
23. Nadia MM, Shamseldein HA, Sara AS. Effects of Cigarette and Shisha Smoking on Hematological Parameters: An analytic case-control study. *International Multispecialty Journal of Health.* 2015;1(10):44-51.

24. Malenica M, Prnjavorac B, Bego T, Dujic T, Semiz S, Skrbo S, et al. Effect of Cigarette Smoking on Haematological Parameters in Healthy Population. *Medical Archives*. 2017;71(2):132.
25. Schrier RW. Pathogenesis of sodium and water retention in high-output and low-output cardiac failure, nephrotic syndrome, cirrhosis, and pregnancy. *N Engl J Med*. 1988;319(17):1127-34.
26. Whittaker PG, Lind T. The intravascular mass of albumin during human pregnancy: a serial study in normal and diabetic women. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993;100(6):587-92.
27. Bernstein IM, Ziegler W, Badger GJ. Plasma volume expansion in early pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2001;97(5 Pt 1):669-72.
28. Whittaker PG, Macphail S, Lind T. Serial hematologic changes and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol*. 1996;88(1):33-9.
29. Centers for Disease Control and Prevention. CDC criteria for anemia in children and childbearing-aged women. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1989;38(22):400-4.
30. Strippoli GF, Craig JC, Manno C, Schena FP. Hemoglobin targets for the anemia of chronic kidney disease: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):3154-65.
31. Dicato M. Venous thromboembolic events and erythropoiesis-stimulating agents: an update. *Oncologist*. 2008;13 Suppl 3:11-5.
32. Pirker R. Erythropoiesis-stimulating agents in patients with cancer: update on safety issues. *Expert Opin Drug Saf*. 2009;8(5):515-22.
33. Al Diab AI. Cancer-related venous thromboembolism: insight into underestimated risk factors. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2010;3(4):191-5.
34. Hutchinson R, Davey F. Hematopoiesis. In: Henry JB, editor. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 19th edition. 19 ed: W.B. Saunders; 1996.
35. Hillman RS. Characteristics of marrow production and reticulocyte maturation in normal man in response to anemia. *J Clin Invest*. 1969;48(3):443-53.
36. Löffler H, Bruhn H, Schrader C, Kneba M. Hämatologische Untersuchungsmethoden. In: Bruhn H, Schäfer H, Junker R, Schreiber S, editors. *Labormedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte Pathophysiologie und Klinik*. 3 ed. Stuttgart: Schattauer Verlag (Thieme); 2011. p. 392-410.

37. Tiran B. Hämatologische Labordiagnostik: Grundlagen, Erythrozyten, Thrombozyten. In: Halwachs-Baumann G, editor. *Labormedizin: Klinik – Praxis – Fallbeispiele*. 2. ed. Wien: Springer-Verlag Wien; 2011. p. 207-32.
38. Petrosyan I, Blaison G, Andres E, Federici L. Anaemia in the elderly: an aetiologic profile of a prospective cohort of 95 hospitalised patients. *Eur J Intern Med*. 2012;23(6):524-8.
39. DeLoughery TG. Microcytic Anemia. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(14):1324-31.
40. Hallbach J. *Klinische Chemie und Hämatologie*. 4. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019.
41. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol*. 2010;149(1):35-49.
42. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ*. 2008;86(6):480-7.
43. Olivieri NF. The beta-thalassemyias. *N Engl J Med*. 1999;341(2):99-109.
44. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005;352(10):1011-23.
45. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med*. 2011;62:347-60.
46. Thomas L, Thomas C, Heimpel H. Neue Parameter zur Diagnostik von Eisenmangelzuständen: Retikulozytenhämoglobin und löslicher Transferrinrezeptor. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2005;102(9):A-580.
47. Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*. 2012;51(29):5705-24.
48. Coyne D. Iron indices: what do they really mean? *Kidney Int Suppl*. 2006(101):S4-8.
49. Jalali MT, Mohseni A, Keikhaei B, Latifi M. Evaluation of diagnostic efficacy of serum sTfR assay in iron-deficiency anemia and Beta-thalassaemia trait in Shafa hospital, Ahvaz, Iran 2010. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16(10):1441-5.
50. World Health Organisation. Serum transferrin receptor levels for the assessment of iron status and iron deficiency in populations. *Vitamin and Mineral Nutrition Information System*. 2014.

51. Thorpe SJ, Heath A, Sharp G, Cook J, Ellis R, Worwood M. A WHO reference reagent for the Serum Transferrin Receptor (sTfR): international collaborative study to evaluate a recombinant soluble transferrin receptor preparation. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(6):815-20.
52. Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood*. 1997;89(3):1052-7.
53. Suominen P, Punnonen K, Rajamaki A, Irjala K. Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits. *Blood*. 1998;92(8):2934-9.
54. Nadeem S, Shah S, Iqbal T, Iqbal Z, Hanif E. Serum transferrin receptor, serum ferritin and serum transferrin receptor-ferritin index in adults with iron deficiency anaemia. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2011;23(3):44-6.
55. Skikne BS, Punnonen K, Caldron PH, Bennett MT, Rehu M, Gasior GH, et al. Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: a prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor and the sTfR/log ferritin index. *Am J Hematol*. 2011;86(11):923-7.
56. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Erythrocyte and reticulocyte indices in the assessment of erythropoiesis activity and iron availability. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2013;35(2):144-9.
57. Brugnara C. Reticulocyte Cellular Indices: A New Approach in the Diagnosis of Anemias and Monitoring of Erythropoietic Function. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2000;37(2):93-130.
58. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*. 2002;48(7):1066-76.
59. Enko D, Wagner H, Kriegshauser G, Kimbacher C, Stolba R, Halwachs-Baumann G. Assessment of human iron status: A cross-sectional study comparing the clinical utility of different laboratory biomarkers and definitions of iron deficiency in daily practice. *Clin Biochem*. 2015;48(13-14):891-6.
60. Enko D, Wagner H, Kriegshauser G, Kimbacher C, Stolba R, Worf E, et al. Hepcidin-25 vs. conventional clinical biomarkers in the diagnosis of functional iron deficiency. *Eur J Haematol*. 2015;95(6):507-13.
61. Halwachs-Baumann G. Diagnosis of anaemia: old things rearranged. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2012;162(21):478-88.

62. Wenninger J, Meinitzer A, Holasek S, Schnedl WJ, Zelzer S, Mangge H, et al. Associations between tryptophan and iron metabolism observed in individuals with and without iron deficiency. *Sci Rep*. 2019;9(1):14548.
63. Weiss G, Schroecksnadel K, Mattle V, Winkler C, Konwalinka G, Fuchs D. Possible role of cytokine-induced tryptophan degradation in anaemia of inflammation. *Eur J Haematol*. 2004;72(2):130-4.
64. Piel FB, Weatherall DJ. The alpha-thalasseмии. *N Engl J Med*. 2014;371(20):1908-16.
65. Brancaleoni V, Di Pierro E, Motta I, Cappellini MD. Laboratory diagnosis of thalassemia. *Int J Lab Hematol*. 2016;38 Suppl 1:32-40.
66. Weatherall DJ, Clegg JB, Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Olivieri NF, et al. The thalassaemia syndromes. 4. ed. Oxford; Malden, MA: Blackwell Science; 2001.
67. Passarello C, Giambona A, Cannata M, Vinciguerra M, Renda D, Maggio A. Iron deficiency does not compromise the diagnosis of high HbA2 thalassemia trait. *Haematologica*. 2012;97(3):472-3.
68. Old J, Harteveld CL, Traeger-Synodinos J, Petrou M, Angastiniotis M, Galanello R. Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders: Volume 2: Laboratory Protocols. *Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders: Volume 2: Laboratory Protocols*. Nicosia (Cyprus): Thalassaemia International Federation © 2012 Thalassaemia International Federation.; 2012.
69. Weatherall DJ. The definition and epidemiology of non-transfusion-dependent thalassemia. *Blood Reviews*. 2012;26:S3-S6.
70. Viprakasit V, Origa R, Fucharoen S. GENETIC BASIS, PATHOPHYSIOLOGY AND DIAGNOSIS. In: Cappellini MD, Cohen A, Porter J, Taher A, Viprakasit V, editors. *Guidelines for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia (TDT)*. Nicosia (CY): Thalassaemia International Federation © 2014 Thalassaemia International Federation.; 2014.
71. Viprakasit V, Ekwattanakit S. Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2018;32(2):193-211.
72. Plengsuree S, Punyamung M, Yanola J, Nanta S, Jaiping K, Maneewong K, et al. Red Cell Indices and Formulas Used in Differentiation of β -Thalassemia Trait from Iron Deficiency in Thai Adults. *Hemoglobin*. 2015;39(4):235-9.

73. Lafferty JD, Crowther MA, Ali MA, Levine M. The Evaluation of Various Mathematical RBC Indices and Their Efficacy in Discriminating Between Thalassemic and Non-Thalassemic Microcytosis. *American Journal of Clinical Pathology*. 1996;106(2):201-5.
74. Kaferle J, Strzoda CE. Evaluation of macrocytosis. *Am Fam Physician*. 2009;79(3):203-8.
75. Haram K, Nilsen ST, Ulvik RJ. Iron supplementation in pregnancy--evidence and controversies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001;80(8):683-8.
76. Janus J, Moerschel SK. Evaluation of anemia in children. *Am Fam Physician*. 2010;81(12):1462-71.
77. Seppä K, Laippala P, Saarni M. Macrocytosis as a consequence of alcohol abuse among patients in general practice. *Alcohol Clin Exp Res*. 1991;15(5):871-6.
78. Maruyama S, Hirayama C, Yamamoto S, Koda M, Udagawa A, Kadowaki Y, et al. Red blood cell status in alcoholic and non-alcoholic liver disease. *J Lab Clin Med*. 2001;138(5):332-7.
79. Hoffbrand V, Provan D. ABC of clinical haematology: Macrocytic anaemias. *BMJ*. 1997;314(7078):430-.
80. Hesdorffer CS, Longo DL. Drug-Induced Megaloblastic Anemia. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(17):1649-58.
81. Green R. Vitamin B12 deficiency from the perspective of a practicing hematologist. *Blood*. 2017;129(19):2603-11.
82. Fragasso A, Mannarella C, Ciancio A, Sacco A. Functional vitamin B12 deficiency in alcoholics: an intriguing finding in a retrospective study of megaloblastic anemic patients. *Eur J Intern Med*. 2010;21(2):97-100.
83. Herrmann W, Obeid R. Utility and limitations of biochemical markers of vitamin B12 deficiency. *Eur J Clin Invest*. 2013;43(3):231-7.
84. Hannibal L, Lysne V, Bjørke-Monsen A-L, Behringer S, Grünert SC, Spiekerkoetter U, et al. Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2016;3.
85. Jarquin Campos A, Risch L, Nydegger U, Wiesner J, Vazquez Van Dyck M, Renz H, et al. Diagnostic Accuracy of Holotranscobalamin, Vitamin B12, Methylmalonic Acid, and Homocysteine in Detecting B12 Deficiency in a Large, Mixed Patient Population. *Dis Markers*. 2020;2020:7468506-.

86. Valente E, Scott JM, Ueland P-M, Cunningham C, Casey M, Molloy AM. Diagnostic Accuracy of Holotranscobalamin, Methylmalonic Acid, Serum Cobalamin, and Other Indicators of Tissue Vitamin B12 Status in the Elderly. *Clinical Chemistry*. 2011;57(6):856-63.
87. Fedosov SN. Metabolic signs of vitamin B(12) deficiency in humans: computational model and its implications for diagnostics. *Metabolism*. 2010;59(8):1124-38.
88. Fedosov SN, Brito A, Miller JW, Green R, Allen LH. Combined indicator of vitamin B12 status: modification for missing biomarkers and folate status and recommendations for revised cut-points. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(8):1215-25.
89. Harrington DJ. Laboratory assessment of vitamin B12 status. *Journal of Clinical Pathology*. 2017;70(2):168-73.
90. Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica*. 2014;44(5):480-8.
91. Reynolds EH. The neurology of folic acid deficiency. *Handb Clin Neurol*. 2014;120:927-43.
92. Green R, Datta Mitra A. Megaloblastic Anemias: Nutritional and Other Causes. *Med Clin North Am*. 2017;101(2):297-317.
93. Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *British Journal of Haematology*. 2014;166(4):496-513.
94. Sobczyńska-Malefora A, Harrington DJ. Laboratory assessment of folate (vitamin B(9)) status. *J Clin Pathol*. 2018;71(11):949-56.
95. Socha DS, Desouza SI, Flagg A, Sekeres M, Rogers HJ. Severe megaloblastic anemia: Vitamin deficiency and other causes. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2020;87(3):153-64.
96. Tettamanti M, Lucca U, Gandini F, Recchia A, Mosconi P, Apolone G, et al. Prevalence, incidence and types of mild anemia in the elderly: the "Health and Anemia" population-based study. *Haematologica*. 2010;95(11):1849-56.
97. Ershler WB. Unexplained Anemia in the Elderly. *Clin Geriatr Med*. 2019;35(3):295-305.
98. Ford J. Red blood cell morphology. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2013;35(3):351-7.

99. Phillips J, Henderson AC. Hemolytic Anemia: Evaluation and Differential Diagnosis. *Am Fam Physician*. 2018;98(6):354-61.
100. Barcellini W, Fattizzo B. Clinical Applications of Hemolytic Markers in the Differential Diagnosis and Management of Hemolytic Anemia. *Dis Markers*. 2015;2015:635670-.
101. Sadrzadeh SM, Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders. *Am J Clin Pathol*. 2004;121 Suppl:S97-104.
102. Gehrs BC, Friedberg RC. Autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol*. 2002;69(4):258-71.
103. Müller A, Zimmermann R, Krause SW. Hemolytic anemias in adults. *Dtsch Med Wochenschr*. 2011;136(45):2308-12.
104. Petz LD. A physician's guide to transfusion in autoimmune haemolytic anaemia. *Br J Haematol*. 2004;124(6):712-6.
105. Bendapudi PK, Hurwitz S, Fry A, Marques MB, Waldo SW, Li A, et al. Derivation and external validation of the PLASMIC score for rapid assessment of adults with thrombotic microangiopathies: a cohort study. *Lancet Haematol*. 2017;4(4):e157-e64.
106. Grace RF, Barcellini W. Management of pyruvate kinase deficiency in children and adults. *Blood*. 2020;136(11):1241-9.
107. Frank JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. *Am Fam Physician*. 2005;72(7):1277-82.
108. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014;124(18):2804-11.
109. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet*. 2008;372(9647):1411-26.