

Allgemeine Diagnostik

Koordiniert durch M. Starck

M. Starck, K. Sotlar, S. Schneider, M. Hentrich, M. Subklewe, K. Spiekermann

Neben der Bewertung der klinischen Symptomatik, der körperlichen Untersuchung und den laborchemischen Veränderungen stellen die Beurteilung des peripheren Blutbilds inklusive des mikroskopischen Differenzialblutbilds und des Knochenmarks die entscheidenden Schritte in der Diagnostik und Differenzialdiagnostik von Leukämien, myelodysplastischen Syndromen und myeloproliferativen Neoplasien dar [1, 2].

Materialgewinnung und Aufbereitung

(M. Starck, M. Hentrich, K. Sotlar)

Verarbeitung von peripheren Blutaussstrichen

Basisuntersuchungen in der Diagnostik des peripheren Bluts sind das sog. kleine Blutbild (inklusive Thrombozyten) und das Differenzialblutbild.

Vor allem bei hämatologischen Erkrankungen können im EDTA-Blut Störfaktoren vorhanden sein, welche die weit verbreitete automatische Auswertung des Blutbilds in hämatologischen Analysatoren stören und falsche Ergebnisse verursachen. Einige wichtige Beispiele hierfür werden im Folgenden aufgeführt:

- Falsch hohe Hämoglobinkonzentrationen werden bei vielen Hämatologieautomaten im Falle hoher Leukozytenwerte ($> 100 \text{ G/l}$) gemessen.
- Falsch hohe Thrombozytenwerte können durch Fragmentozyten oder Zytoplasmaabspregungen von Blasten (z. B. bei AMLM4) ermittelt werden.
- Erniedrigte Thrombozytenkonzentrationen können durch Thrombozytenagglutinate hervorgerufen werden.

Auch Differenzialblutbilder werden zunehmend automatisch von hämatologischen Analysatoren erstellt. Dabei ist zu beachten, dass die Geräte schwerpunktmäßig auf eine Analyse normaler Blutbilder und die grobe Unterscheidung „normal“ versus „pathologisch“ eingestellt sind. Liegt eine pathologische Zellpopulation vor, wird von den Automaten ein Warnhinweis ausgegeben, der eine mikroskopische Beurteilung des Differenzialblutbilds erforderlich macht. Da die Automaten je nach technischem Stand mehr oder weniger zuverlässige Ergebnisse produzieren, ist bei jedem Verdacht oder zur Verlaufskontrolle hämatologischer Erkrankungen die mikroskopische Analyse des peripheren Bluts notwendig.

Beim Ausstreichen wird auf einen fettfreien und trockenen Objektträger ein kleiner Tropfen (zirka $10 \mu\text{l}$) der vorher gut gemischten Blutprobe gegeben. Beim Ausstreichen mit einem speziellen Ausstrichgläschen oder einem zweiten, geschliffenen Objektträger muss der „Ausstrichwinkel“ entsprechend dem Hämatokritwert (Hkt) verändert werden: Je höher der Hkt, desto kleiner der Winkel (das Ausstrichgläschen wird flach gehalten) und je kleiner der Hkt, desto größer der Winkel (das Ausstrichgläschen wird steil gehalten). Der Hämatokrit kann mit einiger Übung durch das Fließverhalten des Bluts im Röhrchen während der Mischung und/oder durch das Tropfverhalten beim Aufbringen des Bluttröpfens auf den Objektträger ermittelt werden. Ein ordnungsgemäß hergestellter Ausstrich bedeckt das mittlere Drittel des Objektträgers, zeigt auf einer Seite die Auftragsstelle und auf der gegenüberliegenden Seite die sog. Fahne. Ideal ist, wenn zum Ausstreichen ein spezielles Ausstrichgläschen verwendet wird, das schmaler ist als der Objektträger, wodurch eine scharfe „Randkante“ entsteht.

Nach einer mindestens zehnmütigen Trocknung bei Raumluft (besser > 2 Stunden) ist vor der Färbung eine Fixierung empfehlenswert (5–10 Minuten in reinem Äthanol oder Methanol). Anschließend wird eine standardisierte Pappenheim-Färbung mit gepufferten und „pH-eingestellten“ Färbelösungen durchgeführt. Die Kontrolle der Fixierung zeigt ein striemig-streifiges Chromatin der Granulozyten und ein scholliges Chromatin der Lymphozyten. Eine gute Färbung erkennt man an „lachsfarbenen“ Erythrozyten und am blauen Zytoplasma der Lymphozyten. Schlechte Ausstriche oder Färbungen mit „Farbstich“ sind extrem vorsichtig zu interpretieren und besser zu wiederholen.

Knochenmarkentnahme

Die Untersuchung des Knochenmarks gehört zur Basisdiagnostik hämatologischer Systemerkrankungen (unerklärte Anämie, Leukozytopenie und/oder Thrombozytopenie, Polyglobulie, Leukozytose und/oder Thrombozytose, Verdacht auf Leukämie). Ob bei akuten Leukämien eine Aspirationszytologie allein ausreichend oder eine zusätzliche Biopsie zur Gewinnung eines Knochenmarkszylinders für die histopathologische Untersuchung indiziert ist, wird zum Teil kontrovers diskutiert. Für die Beurteilung von Leukämiezellen sind qualitativ gute Ausstrichpräparate von Blut und Knochenmark zweifellos am besten geeignet. Die zusätzliche Beurteilung einer Knochenmarkbiopsie ist sicher bei erfolglosem Aspirationsversuch (Punctio sicca) angezeigt, sie ermöglicht aber eventuell in Zukunft auch neue diagnostische Ansätze, wie z. B. bei der Beurteilung der Gefäßdichte. Beurteilt werden jeweils die Zelldichte, die Ausreifung der Zellen und die Zellmorphologie.

Der Patient wird möglichst am Vortage mittels eines entsprechenden Aufklärungsbogens über den Eingriff und dessen Komplikationsrisiken aufgeklärt und muss schriftlich sein Einverständnis zur Untersuchung erklären. Aktuelle Laborwerte (INR, PTT, Thrombozytenzahl) sollten vor Punktion vorliegen, im Falle spezieller Blutgerinnungsstörungen ggf. eine erweiterte Blutgerinnungsdiagnostik.

Die einzigen *Kontraindikationen* zur Durchführung einer Knochenmarkpunktion sind schwere Störungen der plasmatischen Gerinnung (Hämophilie, disseminierte intravasale Gerinnung). Bei blutunggefährdeten Patienten ist im Einzelfalle, je nach spezi-

eller Situation, zu entscheiden, ob der Eingriff ambulant mit ausreichend langer Nachbeobachtungszeit erfolgen kann und ob eine Substitution mit Thrombozytenkonzentraten oder Gerinnungspräparaten im Vorfeld notwendig ist. Eine isolierte Thrombozytopenie stellt zwar keine Kontraindikation zur Knochenmarkuntersuchung dar, allerdings sollte eine Thrombozytenzahl über $20 \times 10^9/l$ vorliegen [3].

Bei äußerst sensiblen Patienten kann eine Prämedikation z. B. mit Lorazepam sinnvoll sein. Bei Kindern kann eine Kurznarkose in Absprache mit der Anästhesie erfolgen.

Entnahmeort

Die Entnahme der Proben erfolgt vorzugsweise am hinteren Beckenkamm (Spina iliaca posterior superior). Die Knochenmarkpunktion an dieser Stelle ist technisch einfacher, ungefährlicher und weniger schmerzhaft als die Sternalpunktion, welche heute nur noch in Ausnahmefällen durchgeführt wird und sich ausschließlich für die Aspiration eignet.

Das Os ilium ist mit zirka 3 cm am breitesten, Verletzungen lebenswichtiger Organe oder größerer Gefäße sind bei richtiger Technik praktisch ausgeschlossen. In Problemfällen – z. B. auf der Intensivstation oder während einer Operation in Rückenlage – kann zur Vermeidung einer Umlagerung des Patienten auch der vordere Beckenkamm (Spina iliaca anterior superior) punktiert werden.

Punktionen an vorbestrahlten Stellen sollten vermieden werden.

Knochenmarkbiopsie

Im Rahmen der Diagnostik von myelodysplastischen Syndromen und myeloproliferativen Neoplasien ist eine Biopsie zur Gewinnung eines Knochenmarkstanzylinders erforderlich. Gleiches gilt für die Diagnostik akuter Leukämien bei sehr zellarmen Knochenmarkaspiraten, einer Punctio sicca oder bei aleukämischen Patienten. Um Artefakte zu vermeiden, sollte die Knochenmarkbiopsie vor der Aspiration durchgeführt werden.

In Bauchlage wird nach gründlicher Desinfektion und steriler Abdeckung die Haut bis zum Periost der Spina iliaca posterior superior ausreichend mit einem entsprechenden Lokalanästhetikum anästhe-

siert. Der Zeitraum bis zu einer befriedigenden Anästhesie beträgt etwa 5 bis 10 Minuten.

Es sollten Biopsienadeln zur einmaligen Anwendung verwendet werden. Der scharfe Schliff einer neuen Nadel erleichtert den Eingriff, vermindert den Punktionschmerz erheblich und liefert artefaktfreies Material. Eine Nadelstärke von 11 Gauge hat sich besonders bewährt. Für sehr adipöse Patienten stehen besonders lange Nadeln zur Verfügung. Die Nadel wird auf die Mitte des hinteren Beckenkamms aufgesetzt und nach Entfernung des Mandrins durch die Kortikalis in Richtung auf die zumeist gut tastbare Spina iliaca anterior geführt. Hierdurch können Biopsien bis zu 5 cm Länge gewonnen werden. Neben der repräsentativen Beurteilung des Knochenmarks erlaubt eine große Biopsie zudem ein leichteres „Abdrehen“ und besseres Haften des gestanzten Knochenmarkzylinders in der Hohlnadel.

Verarbeitung von Knochenmarkbiopsien

Die Knochenmarkbiopsie erlaubt nicht nur eine Beurteilung der einzelnen zellulären Bestandteile des Knochenmarks, sondern auch eine quantitative Beurteilung des Zellgehalts, die Analyse der topographischen Verteilung der Zellen und des Eisengehalts sowie Aussagen zum Knochenmarkstroma und zu ossären Veränderungen. Der Stellenwert der Knochenmarkbiopsie (Histologie) in der Diagnostik hämatologischer Erkrankungen hängt eng mit der Fragestellung zusammen. Für die Diagnose eines Myelofibrose-Syndroms und der aplastischen Anämie ist sie unabdingbar. Bei anderen Erkrankungen, wie z. B. den akuten Leukämien, kann sie unter Umständen Zusatzinformationen liefern.

Vom Zylinder können gegebenenfalls Abrollpräparate gewonnen werden. Die Fixation der Biopsie erfolgt in neutral gepuffertem 4%igem Formalin. Nach ausreichender Fixierung wird das Trepanat in EDTA entkalkt und zur Anfertigung von Schnittpräparaten in Paraffin eingebettet. Eine Acrylat-basierte Einbettung muss heute als obsolet angesehen werden, da an diesem Material durch Degradation von Proteinen und Nukleinsäuren keine ergänzenden immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen mehr möglich sind.

Als *Standardfärbungen* werden an allen Biopsien Färbungen nach H&E, Giemsa (für zelluläre Details), PAS (für zelluläre Details und zum Nach-

weis von Speicherzellen), Gomori-Silber (Fasern) und Berliner Blau (Eisengehalt) sowie eine Naphthol-AS-D-Chlorazetat-Esterase-Reaktion (für Granulopoese und Mastzellen) durchgeführt. Immunhistologische Zusatzuntersuchungen erlauben eine subtilere Abgrenzung der hämatopoetischen Linien, insbesondere bei Vermehrung unreifer/blastärer Zellen. Der Einsatz molekularbiologischer Techniken kann zur Krankheitstypisierung und zur Abgrenzung von Neoplasien gegenüber reaktiven Zuständen eingesetzt werden.

Für den problemlosen Einsatz von Zusatzmethoden ist meist eine Entkalkung und Paraffineinbettung Voraussetzung. In erster Linie kommt hierbei die *Immunhistologie* zum Einsatz, bei der im Rahmen der Routine zur Eingrenzung hämatopoetischer Erkrankungen unter anderem folgende Antigene als immunhistologisches Grundpanel eingesetzt werden sollten: CD61 für die Megakaryopoese, E-Cadherin (alternativ auch Glycophorin – färbt allerdings auch Erythrozyten) für die Erythropoese, CD34 und CD117 für Progenitorzellen, Tryptase und CD117 für Mastzellen. In Abhängigkeit vom histomorphologischen Befund und der klinischen Fragestellung können weitere Antikörper, etwa zur Quantifizierung von Monozyten (CD14, CD163) oder zur Typisierung von Blasten (u. a. TdT, MPO, CD68, CD3, CD20, PAX5, CD10) eingesetzt werden [4].

Darüber hinaus kommen immunhistologische Untersuchungen vor allem bei der Charakterisierung lymphatischer Aggregate bzw. bei der Subtypisierung von Infiltraten maligner Lymphome und bei der Identifikation von Metastasen markfremder Tumorzellen zum Einsatz.

Knochenmarkaspiration

Nach der Biopsiegewinnung erfolgt die Aspiration des Knochenmarks. Verwendet werden zumeist Punktionsnadeln ohne Arretierung mit einer Nadelstärke von 15 Gauge, alternativ auch Biopsienadeln mit einer Nadelstärke von 13 Gauge. Aus hygienischen Gründen und wegen des schärferen Schliffs sollte Einmalnadeln der Vorzug gegeben werden. Punktiert wird durch die bereits erfolgte Hautinzision, ungefähr 1 cm entfernt von der Biopsiestelle und in schrägem Winkel zur Biopsierichtung. Vor der Aspiration sollte der Patient über das Auftreten eines kurzzeitigen Schmerzes informiert werden, der auch durch sorgfältige Lokalanästhesie nicht

verhindert werden kann. Man aspiriert kurz und kräftig mit einer 10-ml-Spritze bis zum vollen Hub (aufgrund der höheren Sogwirkung). Entnimmt man alle Proben aus einer Stelle, können die letzten Aspirate durch zunehmende Blutverdünnung eine andere Zellzusammensetzung als das erste Aspirat aufweisen.

Bei unbefriedigender Aspiration muss die Lage der Punktionsnadel durch Drehen oder durch nochmaliges Punktieren verändert werden. Bei *Punctio sicca* verhilft gelegentlich ein Drehen der Nadel im Knochen unter weiterer Aspiration doch noch zur Materialgewinnung. Bei weiterhin erfolgloser Punktion kann entweder die andere Seite (Regelfall) oder der vordere Beckenkamm nach entsprechender Anästhesie punktiert werden. Eine Sternalpunktion ist seltenen Ausnahmesituationen vorbehalten. In diesen Fällen muss aus Sicherheitsgründen der Tiefenstopper verwendet werden. Bei Säuglingen kommt im Ausnahmefall auch die Tibiavorderkante unterhalb des Ansatzes des *M. quadriceps* in Frage.

Insbesondere bei akuten lymphatischen Leukämien oder Knochenmark-fibrosierenden Erkrankungen kommt es nicht selten trotz korrekter Technik zur *Punctio sicca*, das heißt, es kann kein Knochenmarkaspirat gewonnen werden. In diesen Fällen können für die zytomorphologische Diagnostik Abrollpräparate angefertigt werden. Hierzu wird der gewonnene Knochenmarkszylinder zwischen zwei Objektträger gelegt und mit sanftem Druck abgerollt. Für zytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen sowie zur MRD-Messung kann auch ein Stanzzylinder in einer geringen Menge physiologischer Kochsalzlösung ins Labor geschickt werden.

Nach Anlegen eines Heftpflasterverbands wird die Punktionsstelle durch Liegen auf der entsprechenden Stelle, gegebenenfalls mithilfe eines Sandsacks komprimiert. Frühestens 30 Minuten später wird die Stelle auf eine Nachblutung hin kontrolliert. Ein steriler Pflasterverband sollte über 48 Stunden belassen und in diesem Zeitraum Baden oder Duschen unterlassen werden, um eine Wundinfektion zu vermeiden.

Probenaufbereitung und -verarbeitung

Routinemäßig werden folgende Aspirate (mit den angegebenen Zusätzen) gewonnen:

- *Zytomorphologie*: 0,5 ml EDTA oder Citrat, maximal ad 2 ml Knochenmarkaspirat

- *Immunzytologie*: 0,5 ml EDTA oder Heparin, maximal ad 5 ml Knochenmarkaspirat
- *Zytogenetik*: 0,5 ml Heparin, maximal ad 5–10 ml Knochenmarkaspirat
- *Molekularbiologie*: 0,5 ml EDTA oder Heparin, je nach gewünschter Diagnostik, maximal ad 5 ml Knochenmarkaspirat

Die Aspiration für die zytomorphologische Beurteilung (mit EDTA oder Citrat) sollte immer als erste erfolgen, da sonst eine Heparinkontamination durch den Spritzenkonus gravierende Färbefaktoren in der Pappenheim-Färbung verursachen und die Beurteilung der Einzelzellmorphologie erschweren oder gänzlich verhindern kann.

Sämtliche Spritzen müssen vor der Punktion entsprechend gekennzeichnet sein und danach umgehend in die jeweiligen Labore weitergeleitet werden. Generell gilt, je kleiner das Entnahmevermögen, desto geringer die Kontamination mit peripherem Blut, d. h. desto repräsentativer ist die Knochenmarkprobe.

Werden für die Immunzytologie heparinisierte Proben versendet, so sind zusätzlich noch ungefärbte EDTA-Ausstriche erforderlich; dies entfällt bei Versand von EDTA-Proben, die jedoch aufgrund der im Vergleich zu heparinisiertem Material geringeren Probenstabilität noch am gleichen Tage im Einsendelabor zur weiteren Verarbeitung eintreffen müssen.

Die diagnostische Wertigkeit hängt entscheidend von der weiteren Verarbeitung des gewonnenen Materials ab. Uneingeschränkte Probenqualität ist umso wesentlicher, je schwieriger die diagnostische Fragestellung ist (z. B. minimale residuelle Leukämie). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Methoden, wie sie im Rahmen der Diagnostik bei den jeweiligen Indikationen zum Einsatz kommen können.

Die besten *Ausstrichpräparate* erhält man, indem einige Knochenmarkbröckel auf eine Seite eines Objektträgers aufgebracht werden und ein zweiter Objektträger darauf gelegt wird. Ohne Ausübung von Druck werden dann beide Objektträger parallel gegensinnig auseinandergesogen (sog. „Quetschpräparat“) [1]. Das richtige Ausstreichen bedarf einiger Übung.

Die ausgestrichenen Knochenmarkpräparate werden mindestens eine halbe Stunde luftgetrocknet,

Tabelle 1. Vorschlag zur Auswahl der Methoden im Rahmen der Diagnostik und Prognoseeinschätzung.

	AML	ALL	Rezidiv AL	Verlaufs- kontrolle AL	MDS	MPN
Zytomorphologie	+	+	+	+	+	+
Zytochemie	+	+	+		+	
Immunphänotypisierung	+	+	+	(+)	(+)	(+)
Zytogenetik	+	+	+	(+)	+	+
Molekulargenetik	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
Histologie	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
+	obligat					
(+)	fakultativ oder bei besonderer Fragestellung					

die anschließende panoptische Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald/Giemsa) stellt die Standardmethode der färberischen Darstellung von Blut- und Knochenmarkzellen dar. Bei bestimmten Fragestellungen werden weitere zytochemische Färbungen angefertigt, so z. B. eine Berliner-Blau-Färbung zur Beurteilung des Speichereisengehalts und der Sideroblasten, eine Peroxidase-Färbung zur Beurteilung der Myeloperoxidase-Aktivität, eine Esterase-Färbung oder eine PAS-Färbung. Andere zytochemische Färbungen, wie die zur Bestimmung der alkalischen Leukozytenphosphatase, kommen heutzutage nur noch sehr selten zum Einsatz (s. u.).

Liquorpunktion

Wegen des häufigen meningealen Befalls sollte eine Liquorpunktion (LP) obligat bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) oder einem lymphatisch differenzierten Blastenschub einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) erfolgen. Bei akuter myeloischer Leukämie (AML) erfolgt die LP nur bei entsprechendem klinischem Verdacht oder nach Maßgabe des jeweiligen Studienprotokolls.

Nach Ausschluss von Hirndruckzeichen wird nach Desinfektion mit oder ohne Lokalanästhesie mit einer atraumatischen Punktionsnadel zwischen LWK4/5 oder LWK5/SWK1 in sitzender Haltung oder in Seitenlage des Patienten der Liquorraum punktiert und Liquor für eine klinisch-chemische, zytologische und gegebenenfalls immunzytologische Untersuchung gewonnen. Für die richtige Interpretation ist eine unblutige Punktion entscheidend. Oft wird mit der diagnostischen Punktion zugleich auch eine Gabe von Zytostatika verbunden

(siehe hierzu auch Kapitel „Akute lymphoblastische Leukämie bei Erwachsenen“). Ein zumindest einstündiges Liegen in Kopftieflage fördert die bessere Verteilung der Zytostatika nach kranial und wirkt einem postpunktionellen Syndrom entgegen.

Literatur

- 1 Löffler H, Rastetter J, Haferlach T (2004) Atlas der klinischen Hämatologie. Berlin: Springer
- 2 Thöml H, Diem H, Haferlach T (2002) Taschenatlas der Hämatologie. Stuttgart: Thieme
- 3 Eikelboom JW (2005) Bone marrow biopsy in thrombocytopenic or anticoagulated patients. *Br J Haematol* 129: 562–563
- 4 Valent P, Orazi A, Büsche G et al (2010) Standards and impact of hematopathology in myelodysplastic syndromes (MDS). *Oncotarget* 1: 483–496

Zytomorphologische Diagnostik

(M. Starck, M. Hentrich)

Aus peripherem Blut

Die Differenzierung beginnt mit einer Musterung des Blutaussstrichs unter dem Mikroskop mit einer kleinen Vergrößerung (100- bis 200-fach). In der Fahne wird unter anderem nach Thrombozytenagglutinaten gesucht. Die richtige Stelle zum Mikroskopieren liegt je nach Ausstrichlänge zirka 0,5–1 cm hinter der Fahne. Dort liegen die Erythrozyten locker nebeneinander und berühren sich teilweise. In diesem Areal wird die Konzentration der Leukozyten und der Thrombozyten geschätzt und mit den gemessenen Werten des kleinen Blutbilds verglichen.

Anschließend erfolgt mit einer höheren Vergrößerung (630- oder 1000-fach) je nach Fragestellung die Differenzierung von mindestens 100 Leukozyten. Normblasten und kernhaltige thrombozytäre Vorstufen werden numerisch auf 100 Leukozyten bezogen. Die Bewertung des Differenzialblutbilds schließt die morphologische Beurteilung des roten Blutbilds und der Thrombozyten mit ein.

Aus Knochenmark

Die morphologische Untersuchung des Knochenmarks sollte, wann immer möglich, mittels Aspiration und Biopsie erfolgen. Die zur Beurteilung geeigneten Ausstriche enthalten im Zentrum Knochenmarkbröckel und in der Peripherie Knochenmarkblut. Nach sorgfältiger Durchmusterung des gesamten Präparats mit einer schwachen Vergrößerung (100- bis 200-fach) lassen sich die Zellularität, unterschiedliche Verteilungsmuster oder auch bereits auffällige Zellansammlungen beurteilen. Daran schließt sich eine Einzelanalyse von mindestens 200 Zellen aus zwei repräsentativen Arealen an. Noch wichtiger als die reine Auszählung ist die Durchmusterung des Ausstrichs durch einen erfahrenen Untersucher nach folgenden Kriterien:

- Beurteilung der *Zelldichte*: Eine Verminderung kann abnahme- und ausstrichbedingt sein. Eine tatsächliche Verminderung der Zellularität darf nur angenommen werden, wenn Knochenmarkbröckel mit Fett- und Stromazellen sicher nachweisbar sind.
- Beurteilung der *Erythro- und Granulozytopenese* (EP und GP): Das normale Verhältnis von EP zu GP beträgt etwa 1 : 3 bis 1 : 4. Die Ausstrichzytologie erlaubt eine quantitative Beurteilung nur in relativer Form. Zur Frage der absoluten Zelldichte und der möglichen heterogenen Zellverteilung in den Markräumen muss das histologische Schnittpräparat hinzugezogen und quantitativ oder semiquantitativ ausgewertet werden. Beurteilt werden ferner die Verteilung der verschiedenen Reifungsstufen, insbesondere der Blasten, sowie Veränderungen von Zytoplasma und Zellkern. Zusätzlich wird der Anteil von Eosinophilen, Basophilen und Monozyten angegeben. Eine semiquantitative und qualitative Beurteilung der Megakaryozyten, Verteilung und Feinstruktur von Lymphozyten, Plasmazellen und Retikulumzellen ist nötig.

- *Speichereisen* in den Retikulumzellen sowie Quantifizierung von *Sideroblasten* und Ringsideroblasten (in der Berliner-Blau-Färbung)
- Beim Nachweis von *Blasten* werden zur weiteren morphologischen Differenzierung obligat folgende zytochemische Färbungen an Blut- und Knochenmark-Ausstrichen durchgeführt: Peroxidase (Hinweis auf Zugehörigkeit zur granulocytären Reihe), unspezifische Esterase (Hinweis auf Zugehörigkeit zur monocytären Reihe). Weitere, fakultative Untersuchungen sind PAS-Reaktion (Hinweis auf Zugehörigkeit zur lymphatischen, erythrocytären und megakaryocytären Reihe), saure Phosphatase (Hinweis auf T-Zell-Natur einer akuten lymphatischen Leukämie), Chlorazetat-Esterase oder Sudan-Schwarz (Hinweis auf Zugehörigkeit zur granulocytären Reihe).

Immunphänotypisierung

(M. Subklewe)

Die immunzytologische Diagnostik beruht auf der Markierung und damit Charakterisierung von Zelloberflächenantigenen sowie auch intrazytoplasmatischen Antigenstrukturen mittels monoklonaler Antikörper (MAK), seltener auch spezifizierter polyklonaler Antikörperpräparationen (z. B. gegen Immunglobulinfraktionen). Auf diese Weise können normale Zelltypen des hämatopoetischen Systems ebenso wie ihre malignen Äquivalente den unterschiedlichen Zelllinien (B- oder T-lymphatisch, myeloisch) und entsprechend ihrem Antigenexpressionsmuster dem jeweiligen Differenzierungsstadium zugeordnet werden.

Die Untersuchungen erfolgen mit direkter Immunfluoreszenzmarkierung und nachfolgender Auswertung im Durchflusszytometer. Die Anwendung direkter Immunfluoreszenz erlaubt eine Mehrfachmarkierung der Zellen mit Antikörpern unterschiedlicher Spezifität, die unterschiedliche Fluorochrome tragen und in überwiegend getrennten Spektralbereichen erfasst werden können. Es können auch immunenzymatische Untersuchungen an Zellausstrichpräparaten, Zytozentrifugenpräparaten, Kryostatanschnitten und Paraffinschnitten mittels Alkalischer-Phosphatase-Anti-Alkalischer-Phosphatase (APAAP)-Färbemethode erfolgen.

Der Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie oder APAAP-Methode liegt in der gleichzeitigen Darstellung von immunologischer Reaktivität und Zellmorphologie. Die computergesteuerte Durchflusszytometrie bietet hingegen den großen Vorteil, dass eine Vielzahl von Einzelzellen (> 10 000–100 000 Zellen) bei gleichzeitiger Erfassung mehrerer Fluoreszenzmarkierungen, der Zellgröße (forward scatter) sowie der Granularität (side scatter) in kurzer Zeit analysiert und die gewonnenen Daten gleich statistisch ausgewertet werden können.

Die Basis dieser Methode ist das Durchlaufen eines Laserstrahls durch einzelne in einem Flüssigkeitsstrom befindliche Zellen und die Detektion der dadurch verursachten Veränderungen des Laserstrahls. Diese Veränderungen sind einerseits bedingt durch die Struktureigenschaften der Zellen, andererseits durch an monoklonale Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe. Diese werden im Falle der Bindung des Antikörpers an die untersuchte Zelle vom Laserlicht angeregt und emittieren im orthogonalen Verlauf Licht einer spezifischen Wellenlänge, das mithilfe von Detektoren erfasst wird. Aufgrund unterschiedlicher Emissionsspektren können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zur Analyse eingesetzt werden. Die Detektion erfolgt über getrennte Kanäle und Detektoren. Hierdurch wird neben der Erfassung von Streulichteigenschaften die simultane Untersuchung von bis zu 10 Antigenen auf einzelnen Zellen ermöglicht [1].

Die Weiterentwicklung in der Technologie der Multi-Parameter-Durchflusszytometrie (MPFC) erlaubt mittels 3 Lasern die 10-Farb-Analyse in der Routinediagnostik [2]. Die hohen Flussgeschwindigkeiten und die hohe Sensitivität erlauben den Einsatz der Durchflusszytometrie auch bei der Untersuchung von Körperflüssigkeiten mit sehr geringen Zellzahlen (z. B. Liquor) und bei Verlaufskontrollen der minimalen Resterkrankung (MRD) bei akuten Leukämien, aber auch bei den verschiedenen Lymphomentitäten (z. B. multiples Myelom, CLL).

Die Differenzierung zwischen benignen und malignen Zellen gelingt in der Regel durch die Wertung von Zellgröße/Zellgranularität und Antigenexpressionsmuster. Myeloblasten zeichnen sich zum Beispiel in der Regel durch niedrige Seitwärts-Lichtstreuung (side scatter) sowie die Expression von Antigenen eines primitiven Differenzierungsstatus (CD34, CD117) aus, Antigene reiferer myeloischer

Zellen (z. B. CD15, CD16) fehlen. Blastäre lymphopoetische Zellen exprimieren oftmals CD34 und TdT, reife Marker T- oder B-lymphatischer Zellen (CD20, sCD3, membrangebundene Immunglobuline) sind nicht vorhanden. Gemeinsam ist diesen primitiven Zellen die schwache Expression von CD45, welches inzwischen routinemäßig für die Gating-Strategie verwendet wird.

Untersuchungsmaterialien

Untersuchungsmaterialien sind peripheres Blut, Knochenmark und Aspirate von Körperflüssigkeiten (Liquor, Pleura, Aszites, Perikard etc). Es lassen sich auch Zellen aus Lymphknotenmaterial (als aufgeschwemmte Einzelzellsuspension) analysieren.

Präferenziell werden 10–20 ml EDTA-Vollblut bzw. 3–6 ml EDTA-Knochenmarkblut verwendet (1,5–2 ml 1,1 % EDTA + 3–3,5 ml Knochenmarkblut). Alternativ ist die Messung aus heparinisiertem Blut oder Knochenmark möglich (Zusatz von 1 % stabilisatorfreiem Heparin). Der einzige Vorteil heparinisierter Proben liegt in einer längeren Haltbarkeit des Zellmaterials (bei Versand in ein auswärtiges Labor deshalb dringend anzuraten). Eine gleichzeitige morphologische Begutachtung ist jedoch nur aus EDTA-Material möglich, sodass bei heparinisierten Proben entsprechende Ausstrichpräparate mitgesendet werden müssen.

Die Proben sollten spätestens 24 Stunden nach Entnahme im Untersuchungslabor eingehen (eventuell Versand per Eilboten; Probenaufbewahrung bei Raumtemperatur). Exakte Angaben über die Personalien, die Verdachtsdiagnose, klinische Daten wie Lymphknotenstatus, Leber- und Milzgröße, die laufende Therapie sowie Angaben zum aktuellen Blutbild, Differenzialblutbild (eventuell ungefärbter Ausstrich) und Vermerk über eventuelle weitere auffällige Laborparameter sind für eine Befunderstellung unerlässlich.

Indikationen und Befunde

Zwingend ist die Indikation für eine immunzytologische Untersuchung bei jeder Erstdiagnose oder dem Verdacht auf ein Rezidiv einer akuten Leukämie gegeben, bei der Myeloperoxidase (POX/MPO) als einziges sicheres konventionelles Kriterium myeloischer Differenzierung nicht nachweis-

bar ist. Hierzu gehören alle *akuten lymphatischen Leukämien* (ALL) mit dem Ziel der Linienzuordnung zur B- oder T-Zell-Reihe sowie der prognostisch wichtigen Subtypisierung bezüglich des Differenzierungsgrads (Näheres siehe Kapitel „Akute lymphoblastische Leukämie bei Erwachsenen“).

Bei der Diagnostik der *akuten myeloischen Leukämien* (AML) stellt die Immunzytologie eine Ergänzung der diagnostischen Möglichkeiten dar. Insbesondere bei der therapeutisch wichtigen Abgrenzung unreifer AML (FAB M0 und M1) gegenüber unreifen Lymphoblastenleukämien ist mithilfe des Nachweises linienspezifischer myeloischer Antigene eine eindeutige Zuordnung zur myeloischen Zellreihe möglich. Des Weiteren ist die Immunphänotypisierung mit Nachweis thrombozytärer Glykoproteine (wie CD41, CD61) nötig in der Diagnostik einer akuten Megakaryoblastenleukämie (AML FAB M7). Zusätzlich lässt sich bei einigen zytogenetisch definierten AML-Subtypen häufig ein charakteristischer Immunphänotyp nachweisen (siehe Abschnitt „Klassifikation“ im Kapitel „Akute myeloische Leukämie“).

Durch sorgfältige Auswahl der zu untersuchenden Antigene kann bei vielen Patienten bei Erstdiagnose ein individueller *Leukämie-assoziiertes aberrantes Immunphänotyp* (LAIP) identifiziert werden, der auf Zellen des normalen Knochenmarks nicht vorkommt und zur MRD-Diagnostik verwendet werden kann. Für die Detektion eines LAIP ist jedoch insbesondere bei AML ein umfangreiches Panel notwendig, um auch seltene LAIP zu erfassen. Die prognostische Relevanz der MRD-Diagnostik mittels Immunphänotypisierung wurde in den letzten Jahren in einer Vielzahl von Arbeiten beschrieben [3, 4]. Aktuell wird die Wertigkeit der MRD-Flow-Diagnostik in der Therapie der AML prospektiv evaluiert. Die MRD-Flow-Diagnostik bei der ALL ist in vielen Studiengruppen als etabliertes Verfahren implementiert [5–7], es fehlt jedoch eine internationale Standardisierung und Harmonisierung der Methodik.

Leukämische Zellen sowohl der myeloischen als auch der lymphatischen Linie weisen häufig eine aberrante Expression von Antigenen der jeweils anderen hämatopoetischen Reihe auf (Cross-Lineage-Antigenexpression). Bei der AML findet sich häufig eine aberrante Expression von CD7, CD56, CD2 oder CD19, während bei ALL die

Expression (unter Umständen mehrerer) myeloischer Antigene ebenfalls nicht selten ist. Bei ausgeprägter Cross-Lineage-Antigenexpression oder beim Verlust von Antigenen kann eine eindeutige Zuordnung zur myeloischen oder lymphatischen Reihe schwierig sein. Hilfreich ist hier das von der *European Group for the Immunological Characterisation of Leukemias* (EGIL) vorgeschlagene Score-System, das der unterschiedlichen Wertigkeit verschiedener myeloischer und lymphatischer Antigene Rechnung trägt und ein standardisiertes Vorgehen zur Diagnose einer biphenotypischen akuten Leukämie (BAL) erlaubt (siehe Kapitel zur ALL, Unterkapitel „Differenzialdiagnose“). Allerdings ist die Praktikabilität insofern eingeschränkt, als die EGIL-Klassifikation keine Gewichtung der Expressionsstärke eines Antigens vorsieht und weniger Marker umfasst, als heute in der Standarddiagnostik üblich sind. Entsprechend sind auch die Guidelines der WHO 2008 zur Klassifizierung der „mixed phenotype acute leukemia“ (MPAL) zu berücksichtigen, die in ihre Wertung deutlich weniger Marker einbeziehen [8]. Darüber hinaus lässt sich aus der Diagnose einer BAL/MPAL in der Regel kein eindeutiges therapeutisches Konzept ableiten, sodass anhand zusätzlicher zytogenetischer oder molekulargenetischer Informationen eine Gewichtung in entweder AML oder ALL angestrebt werden sollte.

Obwohl sie bei den *myelodysplastischen Syndromen* derzeit nicht zum allgemeinen diagnostischen Standard gehört, kann die multiparametrische Durchflusszytometrie (MPFC) durch Identifizierung aberranter Antigenexpression (z. B. für CD56), Antigenverlust (z. B. für CD33) und veränderter Seitwärtsstreuung (abnorme Granulierung) myeloischer Zellen einen ergänzenden Beitrag zur Diagnosestellung und Prognoseabschätzung, aber insbesondere auch zur Abgrenzung nicht neoplastischer Hämatopoiesestörungen leisten. Eine veränderte Intensität der Expression physiologischer myeloischer und monozytärer Antigene oder eine aberrante Antigenexpression (häufig von CD7) kann in Fällen, in denen ein zyto- oder molekulargenetisch definierter Klon nicht vorhanden ist, hilfreich sein. Obwohl einige dieser immunphänotypischen Eigenschaften mit dem IPSS-Score korrelieren, wird die klinisch-prognostische Aussagekraft der Durchflusszytometrie bei MDS noch nicht einheitlich beurteilt und muss noch in weiteren Studien geprüft werden [9–13].

Die Bestimmung des Blastenteils in einer Probe zur Differenzierung zwischen MDS und AML ist durchflusszytometrisch zwar prinzipiell möglich, bleibt jedoch die Domäne der Zytomorphologie und Histologie. Der durchflusszytometrisch bestimmte Blastenteil weicht vom morphologischen Blastenteil häufig ab, da bei der Aufbereitung des Präparats für die Durchflusszytometrie zellreiche Markbröckel verloren gehen; umgekehrt reduziert die für die Durchflusszytometrie erforderliche Ery-

throzytenlyse den Anteil kernhaltiger erythroider Vorläuferzellen, sodass die Relation blastäre/kernhaltige Zellen verschoben wird.

Eine immunzytologische Diagnostik bei *myeloproliferativen Neoplasien*, insbesondere der chronischen myeloischen Leukämie (CML), ist bei Übergang in eine akzelerierte Phase oder den Blastenschub vor allem zur Linienzuordnung der Blasten in Analogie zu den akuten Leukämien indiziert (siehe

Table 2. Auswahl diagnostisch wichtiger humaner (geclusterter) Antigene mit ihrer physiologischen Expression.

CD	Physiologische Expression
CD1	Kortikale Thymozyten, Langerhans-Zellen, Subset dendritischer Zellen und B-Lymphozyten
CD2	T-Lymphozyten, NK-Zellen
CD3	Reife T-Lymphozyten (Oberflächenexpression), T-Vorläuferzellen (zytoplasmatische Expression)
CD4	T-Lymphozyten vom „T-Helfer-Typ“, schwache Expression auf Monozyten und myeloischen Vorläuferzellen
CD5	Reife T-Lymphozyten, Thymozyten, Subset reifer B-Lymphozyten
CD7	T-Lymphozyten, NK-Zellen, Subset unreifer myeloischer Zellen
CD8	T-Lymphozyten vom „T-Suppressor-Typ“, zytotoxische T-Lymphozyten, Subset von NK-Zellen
CD10	B- und T-lymphatische Vorläuferzellen, Prä-B-Zellen, Subset neutrophiler Granulozyten
CD13	Myelomonozytäre Vorläuferzellen, Monozyten, neutrophile, eosinophile, basophile Granulozyten
CD14	Monozyten, Makrophagen, schwache Expression auf neutrophilen Granulozyten
CD15	Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Eosinophile
CD16	NK-Zellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten
CD19	Vorläufer-B-Zellen, reife B-Lymphozyten
CD20	Reife B-Lymphozyten, Subset Vorläufer-B-Zellen
CD22	B-Lymphozyten (Oberflächenexpression), frühe B-Vorläuferzellen (zytoplasmatische Expression)
CD24	B-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten
CD33	Monozyten, myelomonozytäre Vorläuferzellen, neutrophile Granulozyten
CD34	Myeloische und lymphatische Vorläuferzellen
CD38	Aktivierte B- und T-Lymphozyten, Subset von B-Zellen, Plasmazellen
CD41	Thrombozyten, Megakaryozyten
CD45	Alle Leukozyten
CD56	NK-Zellen, Subset zytotoxischer T-Lymphozyten
CD61	Thrombozyten, Megakaryozyten
CD64	Monozyten, Makrophagen, Promyelozyten
CD65	Neutrophile Granulozyten, Subset von Monozyten und myeloischen Vorläuferzellen
CD117	Myeloische Vorläuferzellen
CD133	Unreife hämatopoetische Stammzellen, endotheliale Vorläuferzellen

auch Kapitel „Akute lymphoblastische Leukämie bei Erwachsenen“ und „Akute myeloische Leukämie“).

Nach der HLDA (Human Leukocyte Differentiation Antigens)-Konferenz im Jahr 2004 umfasste die CD (Cluster of differentiation)-Nomenklatur über 300 verschiedene Cluster. Eine Auswahl diagnostisch wichtiger humaner Antigene mit ihrer physiologischen Expression zeigen Tabelle 2 (geclustert) und Tabelle 3 (nicht geclustert).

Tabelle 3. Auswahl diagnostisch wichtiger humaner (nicht geclustertes) Antigene mit ihrer physiologischen Expression.

Nicht geclusterte Antigene	Physiologische Expression
Glykophorin A	Reife Erythrozyten, Erythroblasten, Proerythroblasten, Retikulozyten
HLA-DR	B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten, Monozyten, myeloische und lymphatische Vorläuferzellen
IgM- (Schwerkette)	Reife B-Lymphozyten (Oberflächenexpression), Prä-B-Zellen (zytoplasmatische Expression)
Kappa-Leichtkette	Reife B-Lymphozyten (Oberflächenexpression), Plasmazellen (zytoplasmatische Expression)
Lambda-Leichtkette	Reife B-Lymphozyten (Oberflächenexpression), Plasmazellen (zytoplasmatische Expression)
TCR α/β	T-Zell-Rezeptor α/β exprimieren > 80 % der reifen T-Lymphozyten
TCR γ/δ	T-Zell-Rezeptor γ/δ exprimieren < 20 % der reifen T-Lymphozyten
MPO	Myeloperoxidase: zytoplasmatische Expression in neutrophilen Granulozyten, Monozyten, myeloischen Vorläuferzellen
TdT	Terminale Desoxy nukleotidyltransferase: nukleäre Expression in lymphatischen Vorläuferzellen
NG2-Antigen (Ak 7.1)	Expression auf lymphatischen und myeloischen Vorläuferzellen mit chromosomalem 11q23-Rearrangement, keine Expression auf normalen hämatopoetischen Zellen

Literatur

- Sack U, Tarnok A, Rothe G (2007) Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflußzytometrie. Basel: Karger: 27–70
- van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S et al (2012) EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 26: 1908–1975
- San Miguel JF, Vidrales MB, Orfao A (2001) Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 98: 1746–1751
- Köhnke T, Sauter D, Ringel K et al (2015) Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse. *Leukemia* 29: 377–386
- Brüggemann M, Schrauder A, Raff T et al (2010) Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia* 24: 521–525
- Holowiecki J, Krawczyk-Kulis M, Giebel S et al (2008) Status of minimal residual disease after induction predicts outcome in both standard and high-risk Ph-negative adult acute lymphoblastic leukaemia. The Polish Adult Leukemia Group ALL 4-2002 MRD Study. *Br J Haematol* 142: 227–237
- Bassan R, Spinelli O, Oldani E et al (2009) Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 113: 4153–4162
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al (eds) (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press
- Maynadie M, Picard F, Husson B et al (2002) Immunophenotypic clustering of myelodysplastic syndromes. *Blood* 100: 2349–2356
- Wells DA, Benesch M, Loken MR et al (2003) Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 102: 394–403
- Stetler-Stevenson M, Arthur DC, Jabbour N et al (2001) Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 98: 979–987
- Del Canizo MC, Fernandez ME, Lopez A et al (2003) Immunophenotypic analysis of myelodysplastic syndromes. *Hematologica* 88: 402–407
- Kern W, Bacher U, Haferlach C (2015) Multiparameter flow cytometry provides independent prognostic information in patients with suspected MDS: a study on 804 pts. *Cytometry B Clin Cytom*: doi: 10.1002/cyto.b.21224 [Epub vor Drucklegung]