



H. Huber H. Löffler V. Faber (Hrsg.)

Methoden der diagnostischen Hämatologie

Mit 52 Abbildungen

Springer-Verlag
Berlin Heidelberg New York London Paris
Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest

Professor Dr. HEINZ HUBER
Universität Wien
Universitätsklinik für Innere Medizin I
Währinger Gürtel 18–20
A-1090 Wien, Österreich

Professor Dr. med. HELMUT LÖFFLER
Universität Kiel
II. Medizinische Klinik & Poliklinik der Universität Kiel
Chemnitzstraße 33
D-24116 Kiel, BRD

Med.-techn. Analyt. VIKTORIA FABER
Universität Wien
Geblergasse 55/10
A-1170 Wien, Österreich

ISBN-13:978-3-642-78672-3 e-ISBN-13:978-3-642-78671-6
DOI: 10.1007/978-3-642-78671-6

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme
Methoden der diagnostischen Hämatologie / H. Huber ...
(Hrsg.). – Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo; Hong Kong; Barcelona; Budapest: Springer, 1994
(Springer-Labor)
ISBN-13:978-3-642-78672-3
NE: Huber, Heinz [Hrsg.]

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1994
Softcover reprint of the hardcover 1st edition 1994

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Satz: K+V Fotosatz GmbH, Beerfelden
39/3130-5 4 3 2 1 0 – Gedruckt auf säurefreiem Papier

Vorwort

Dieser Band ist eine Ergänzung der „Diagnostischen Hämatologie“ (Huber, Löffler und Pastner 1992) und stellt den Methodenteil dar. Es werden Standarduntersuchungen zur Diagnose der verschiedenen Formen hämolytischer Anämien, von malignen Lymphomen und monoklonalen Gammopathien, leukämischen Erkrankungen und Immundefekten dargestellt. Zusätzlich werden Neuentwicklungen, wie die Durchflußzytometrie an Blut- und Knochenmarkzellen und neuere molekularbiologische Methoden besprochen. Die Darstellung erfolgt in praxisnaher Weise und soll Hilfestellung für die Abklärung hämatologischer und onkologischer Erkrankungen sein, wie sie sich in Referenzlaboratorien bewährt haben.

Unser besonderer Dank gilt dem Herausgeberteam des Springer-Verlages, der uns bei der Fertigstellung des Buches und der raschen Drucklegung besondere Hilfe und Unterstützung gegeben hat.

Wien, Juli 1994

H. HUBER

Inhaltsverzeichnis

I Allgemeine Methoden bei hämolytischen Anämien

D. PASTNER and V. FABER	1
1 Osmotische Resistenz der Erythrozyten	1
1.1 Osmotische Resistenz aus frisch entnommenem Blut	1
1.1.1 Normalbereich	2
1.1.2 Bewertung und Besprechung	2
1.1.3 Hinweise und Fehlerquellen	2
1.2 Osmotische Resistenz nach 24 Stunden Inkubation	3
1.2.1 Normalbereich	3
1.2.2 Bewertung und Besprechung	4
2 Plasmahämoglobin	4
2.1 Bestimmung des Plasmahämoglobins mittels Spektrofotometer	4
2.1.1 Normalwerte: unter 1,0 mg/100 ml	5
2.1.2 Besprechung	5
2.1.3 Hinweise und Fehlerquellen	5
2.2 Weitere Methoden	5
2.2.1 Benzidinmethode	5
2.2.2 Bestimmung von freiem Hämoglobin in Heparinplasma und Serum ..	5
3 Heinz-Körper-Test	6
3.1 Normalwerte	7
3.2 Besprechung	7
4 Screening-Tests bei paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie	7
4.1 Sucrose-Hämolyse-Test	7
4.1.1 Besprechung	8
4.2 Säure-Serum-Test (Ham-Test)	9
4.2.1 Besprechung	10
Literatur	11

II Erythrozytenenzymdefekte als Ursache angeborener hämolytischer Anämien

A. PEKRUN und W. SCHRÖTER	13
1 Einleitung	13
2 Blutprobengewinnung, Erythrozytenreinigung	15
3 Hämolysatherstellung	15
Literatur	24

III Defekte der Erythrozytenmembran als Ursache angeborener hämolytischer Anämien

A. PEKRUN und W. SCHRÖTER	27
1 Einleitung	27
2 Blutprobengewinnung, Erythrozytenreinigung	29
3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
4 Spektrin- und Ankyrin-Quantifizierung mittels ELISA	32
5 Strukturuntersuchung des Ankyrins	33
6 Strukturuntersuchung des Spektrins	33
7 Intraerythrozytäre Kalium- und Natrium-Konzentration	34
Literatur	34

IV Anämien aufgrund von Störungen der Hämoglobinsynthese und -Struktur

A. PERKRUN und W. SCHRÖTER	37
1 Einleitung	37
2 Hämoglobinelektrophorese	37
2.1 Zellulose-Azetat-Elektrophorese	38
2.2 Stärkegelelektrophorese	40
2.3 Zitrat-Agar-Gelelektrophorese	41
3 Hämoglobinstabilitäts-Tests	41
3.1 Methyl-Violett-Test	42
3.2 Brillant-Kresylblau-Test	42
3.3 Isopropanol-Test	43
3.4 Hitzestabilitäts-Test	43
4 Säulenchromatographie zur Hämoglobinanalyse	44
5 Hämoglobin F	44
5.1 Alkalidenaturierung	45
5.2 Säure-Elution	45
6 Hämoglobin A ₂	46
6.1 Hämoglobin A ₂ -Messung	46
7 Hämoglobin S	47
7.1 Hämoglobin S-Löslichkeitstest	47
7.2 Sichelzelltest	48
Literatur	49

V Serologische Methoden für die Diagnose medikamenteninduzierter und autoimmunhämolytischer Anämien

LAWRENCE D. PETZ (Übersetzer R. GREIL)	51
1 Einleitung	51
2 Direkter Antiglobulin-(Coombs)-Test (DAT)	51
3 Methoden zur Charakterisierung von Antikörpern in Serum und Eluat	55
3.1 Enzymbehandelte Erythrozyten	56
3.2 Lösungen mit niedriger NaCl-Ionen-Konzentration (LISS)	58

3.3	Herstellung von Eluaten aus Patientenerythrozyten	59
3.4	Screening-Untersuchungen für Serumantikörper	61
3.5	Spezifische Diagnostests bei autoimmunhämolytischer Anämie	63
3.6	Medikamentös induzierte immunhämolytische Anämien	73
	Literatur	83

VI Untersuchungen bei monoklonalen Gammopathien und immunologischen Defektzuständen

MANFRED HEROLD	85	
1	Biologische Bedeutung von monoklonalen Immunglobulinen	85
2	Nachweis von M-Gradienten in Serum und Harn	89
2.1	Probenvorbereitung	89
2.2	Proteinelektrophorese	90
2.3	Immunelektrophorese	91
2.4	Immunfixation	95
2.5	Berechnung eines monoklonalen Anteils aus quantitativen Immunglobulinbestimmungen	96
2.6	Nachweis und Differenzierung von Kryoglobulinen	98
3	Monoklonale Gammopathie unbekannter Signifikanz (MGUS)	99
	Literatur	100

VII Zytogenetische Diagnostik

CH. FONATSCH	103	
1	Einleitung	103
2	Möglichkeiten und Perspektiven der Tumorzytogenetik	103
3	Probenmaterial	104
4	Zellkultivierung und Herstellung der Chromosomenpräparate	105
4.1	Direktpräparation der Chromosomen	105
4.2	Kurzzeitkultivierung verschiedener Gewebe und zytogenetische Präparation	106
4.3	Langzeitkultivierung	107
4.4	Chromosomenfärbungen	108
4.4.1	Giensa-Bandenfärbung mit 2X SSC-Vorbehandlung (GAG)	108
4.4.2	Fluoreszenz-Bandenfärbung mit Quinacrin-Mustard (QFQ)	108
4.4.3	C-Bandenfärbung mit Barium-Hydroxyd-Vorbehandlungen (CBG) ...	109
4.4.4	Silberfärbung der aktiven Nukleolus-Organisation-Regionen an akrozentrischen Chromosomen (= Ag-NOR-Färbung)	109
5	Auswertung	110
6	Zytogenetische Terminologie	110
7	Chromosomenanomalien und ihre Bezeichnung	112
7.1	Numerische Chromosomenanomalien	112
7.2	Strukturelle Chromosomenanomalien	113
	Literatur	118

VIII Interphasenzytogenetik mittels Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)

J. DRACH	119
1 Einleitung	119
2 Methodik	120
3 Anwendungen von FISH und Ausblick	122
Literatur	123

IX Zytochemische Methoden

H. LÖFFLER	125
1 Einleitung	125
2 Substanznachweismethoden	126
2.1 Eisen (Berliner Blau-Reaktion)	126
2.2 PAS (Periodic Acid-Schiff)-Reaktion	127
2.3 Metachromasie-Nachweis mit Toluidinblau	129
2.4 Sudan-Schwarz-B-Färbung	129
3 Enzymnachweismethoden	130
3.1 Peroxidase-Reaktion (POX)	130
3.2 Hydrolasen	130
3.2.1 Alkalische Phosphatase	131
3.2.2 Saure Phosphatase-Reaktion (SPh)	131
3.2.3 Esterasenachweis mit Naphtylacetat oder Naphtylbutyrat („neutrale Esterase“)	132
3.2.4 Saure Esterase-Reaktion (SEst)	133
3.2.5 Chloracetat-Esterase	133
3.2.6 Dipeptidylaminopeptidase IV (DAP IV)-Methode	134
3.3 TDT (Terminale Deoxynucleotidyltransferase) Immunfluoreszenztechnik	135
4 Anhang	135
4.1 Fixierung (geeignet für: Esterase, saure Phosphatase, DAP IV)	135
4.2 Natriumnitritlösung, 4%	136
4.3 Pararosanilinlösung, 4%	136

X Immunzytologie und Knochenmarkimmunhistologie

W. EISTERER, W. HILBE, H. HUBER und J. THALER	137
1 Einleitung	137
2 Präparationsmethoden	138
2.1 Untersuchungsmaterial	138
2.1.1 Knochenmark	138
2.1.2 Zytopräparate	139
2.2 Färbungen	139
3 Diagnostik immunhistologischer Knochenmarkbiopsien	142
3.1 Zellularität	142
3.2 Verteilung der hämatopoetischen Zellen im normalen Knochenmark	143
3.3 Infiltrationsmuster	143

3.4	Fibrose und Sklerose	143
3.5	Reaktionsmuster mit applizierten Antikörpern	144
4	Anwendungsgebiete	145
4.1	Lymphome	145
4.2	Therapiemonitoring am Beispiel der Haarzelleukämie	147
4.3	Akute Leukämie	149
4.4	Seltene Indikationen	149
5	Ausblick	149
	Literatur	150

XI Durchflußzytometrie

W. HILBE, W. EISTERER, H. HUBER, and J. THALER	153	
1	Einleitung	153
2	Aufbau des Durchflußzytometers	153
2.1	Probenezuführung	153
2.2	Messung der Lichtstreuung	153
2.3	Messung der Fluoreszenz	154
2.4	Signalverarbeitung und Messung	155
3	Präparationsmethoden	157
3.1	Peripheres Blut/Knochenmarkspirat (PB/KMA)	157
3.2	Untersuchung von Bronchiallavagen, Punktaten und Lymphknoten ..	158
3.3	Oberflächentest	159
3.3.1	Oberflächenfärbung mit direkt markierten Antikörpern	159
3.3.2	Arbeit mit indirekten Antikörpern	160
3.4	Fixierung und Einfrieren von Proben	160
3.5	Nukleäre Antigene	161
3.5.1	Ki67	161
3.5.2	Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)	161
3.6	Intrazelluläre Antigene am Beispiel der Myeloperoxidase (MPO)	162
3.7	Messung des DNA Gehalts	162
3.7.1	Durchflußzytometrische Beurteilung der DNA	162
3.7.2	Präparation von Zellen zur DNA Bestimmung	164
3.7.3	DNA-Messung	165
3.8	Messung des Rhodamin Effluxes (MDR)	165
3.9	Respiratory Burst/Phagozytenaktivität	167
3.10	Andere Präparationsmethoden	168
4	Analyse	168
4.1	Charakterisierung des normalen Knochenmarks	168
4.1.1	Erythroide Reihe	169
4.1.2	Lymphoide Zellen	169
4.1.3	Myelomonozytäre Linie	173
4.2	Durchflußzytometrische Charakterisierung des peripheren Blutes	173
4.3	Pathologische Veränderungen	173
4.3.1	Leukämien	173
4.3.2	Lymphome	175
4.3.3	Myeloproliferative Erkrankungen	175

4.3.4 AIDS-Monitoring	175
Literatur	177

XII In situ-Hybridisierung

R. GREIL	183
1 Einleitung	183
2 Arbeitsgrundlagen	188
3 Wahl der Probe	189
3.1 DNA- und RNA-Sonden	189
3.2 Radioaktive Nachweismöglichkeiten für DNA und RNA	190
3.3 Nicht-radioaktive Proben	190
3.4 Labeling der Proben	190
3.5 Determination der Probengröße und der Reinigung der Proben	195
3.6 Einfluß der Probenlänge auf die Hybridisierungseffizienz	195
4 Detektionssysteme für nicht radioaktive Methoden	196
5 Präparation der Objektträger	196
5.1 Anmerkungen	201
6 Zellgewinnung von Zytopräparaten und Schnitten	201
6.1 Zell- und Gewebsaufbereitung von Blut bzw. Knochenmark	201
6.2 Präparatherstellung	202
6.2.1 Zytospin von Zellsuspensionen	202
7 Permeabilisierung der Zellen	202
8 Prähybridisierung (RNA-Nachweis)	203
9 Denaturierung der Target DNA bei DNA/DNA in situ Hybridisierungen	203
10 Hybridisierung	204
10.1 Anmerkungen	205
11 Posthybridisierung	206
11.1 Waschen der Präparate	206
11.2 RNase-Nachverdau	206
11.3 Dehydrieren	206
11.4 Befilmen	206
11.5 Exposition	207
11.6 Entwicklung	207
11.7 Gegenfärbung	207
11.8 Eindecken	207
12 Spezifitätskontrollen	207
13 Quantitative Analytik (semiquantitativ versus automatisiert)	209
Literatur	210

XIII Molekularbiologie in der medizinischen Diagnostik

CHRISTINE MANNHALTER	215
1 Einleitung	215
2 Allgemeine Grundlagen der Molekularbiologie	215
2.1 Chemischer Aufbau der Nukleinsäuren	215
2.2 Basenpaarung und Komplementarität	217

2.3	Spaltbarkeit der Nukleinsäuren	218
2.4	Aufbau der Gene	219
3	Untersuchung von Nukleinsäuren	220
3.1	Isolierung der Nukleinsäuren	221
3.1.1	DNA Isolierung	221
3.1.2	RNA Isolierung	223
3.2	Ausbeutebestimmung und analytische Überprüfung der Nukleinsäuren	225
3.2.1	Messung der optischen Dichte	225
3.2.2	Gelelektrophoresen	225
3.3	Blotverfahren	232
3.3.1	Dot oder Slot Blot	232
3.3.2	Southern Blot	233
3.3.3	Northern Blot	238
3.4	Hybridisierungsverfahren	238
3.4.1	Markierung von Gensonden	239
3.4.2	Durchführung von Hybridisierungen	241
3.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	242
3.5.1	Prinzip der PCR	243
3.5.2	Durchführung einer PCR	244
3.5.3	PCR Amplifikation von RNA nach reverser Transkription (RT-PCR) .	247
4	Diagnostische Anwendungsmöglichkeiten	250
4.1	Anwendung des Southern Blots	250
4.1.1	Erkennung von Punktmutationen	250
4.1.2	Nachweis von DNA Polymorphismen	250
4.1.3	Untersuchung von Translokationen und Rearrangements	252
4.2	Anwendungsbeispiele der PCR	256
4.2.1	Identifikation von Mutationen	256
4.2.2	Detektion von Translokationen	258
4.2.3	Amplifikation hochvariabler Regionen in humanen Genen	259
4.2.4	Amplifikationen von DNA in intakten Zellen	260
	Literatur	261

XIV Methoden zum Nachweis und Monitoring einer HIV-Infektion

G. GASTL	263
1 Einleitung	263
2 Primäre Untersuchungen zur Feststellung der Seropositivität	263
2.1 Herstellung der Antigene	263
2.2 HIV ELISA	264
2.3 Bestätigungstestverfahren	266
2.3.1 HIV-Westernblot	266
2.3.2 Immunfluoreszenz	268
2.3.3 Radioimmunpräzipitationsassay (RIPA)	269
3 Immunologisches Monitoring bei HIV-Infektion	269
3.1 p24 Antigentest	269
3.2 Neopterin	270

4	Methoden zum direkten Virusnachweis	271
4.1	Viruskultur	271
4.2	Polymerase chain reaction (PCR)	272
	Literatur	274
	Sachverzeichnis	277

Autorenverzeichnis

Dr. J. DRACH
Allgemeines Krankenhaus Wien
Universitätsklinik für Innere Medizin I
Abt. für Onkologie
Währinger Gürtel 18–20
A-1090 Wien

W. EISTERER
Universitätsklinik für Innere Medizin
Immunbiologie
Anichstraße 35
A-6020 Innsbruck

VIKTORIA FABER
Geblergasse 55/10
A-1170 Wien

Professor Dr. CHRISTA FONATSCH
Med. Universität zu Lübeck
Arbeitsgruppe Tumorcytogenetik
Inst. für Humangenetik
Ratzeburger Allee 160
D-23538 Lübeck

Prof. Dr. G. GASTL
Klinik für Tumorbologie an der
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Postfach 1120
D-79011 Freiburg i. Br.

Doz. Dr. R. GREIL
Abt. für Onkologie und Hämatologie
Universitätsklinik für Innere Medizin
Anichstraße 35
A-6020 Innsbruck

Doz. Dr. M. HEROLD
Universitätsklinik für Innere Medizin
Hauptlabor
Anichstraße 35
A-6020 Innsbruck

Dr. W. HILBE
Universitätsklinik für Innere Medizin
Immunbiologie
Anichstraße 35
A-6020 Innsbruck

Professor Dr. H. HUBER
Universitätsklinik für Innere Medizin
Währinger Gürtel 18–20
A-1090 Wien

Professor Dr. med. H. LÖFFLER
Universität Kiel
II. Medizinische Klinik & Poliklinik
Chemnitzstraße 33
D-24116 Kiel

Professor Dr. CHRISTINE MANNHALTER
Klinisches Institut für Medizinische und
Chemische Labordiagnostik
Währinger Gürtel 18–20
A-1090 Wien

D. PASTNER
Kaiser Josef Straße 15
A-6020 Innsbruck

Dr. A. PEKRUN
Abt. Kinderheilkunde
Universitäts-Kinderklinik
Robert-Koch-Straße 40
D-37075 Göttingen

Dr. LAWRENCE D. PETZ
Director of Transfusion Medicine
UCLA Medical Center
Laboratory Medicine
10833 LeConte Avenue
Los Angeles, CA 90024-1713
USA

Professor Dr. med. W. SCHRÖTER
Direktor der Universitäts-
Kinderklinik
Robert-Koch-Straße 40
D-37075 Göttingen

Doz. Dr. J. THALER
Universitätsklinik für Innere Medizin
Immunbiologie
Anichstraße 35
A-6020 Innsbruck