

INFEKTION/ ENTZÜNDUNG

Neue hämatologische Parameter zur schnellen Überwachung der Immunantwort

Patienten mit entzündlichen Erkrankungen sind im Krankenhaus ein alltägliches Vorkommnis. Wenn der Verdacht einer Entzündung besteht, ist es wichtig, diese schnell weiter zu charakterisieren, um zwischen mehreren möglichen Krankheitsbildern unterscheiden zu können. Insbesondere muss festgestellt werden, ob die Entzündung durch eine Infektion hervorgerufen wurde oder nicht, und wenn ja, was das ursächliche Pathogen ist und wie der Status der Immunantwort des Patienten ist. Danach muss der behandelnde Arzt die indizierte Therapie bestimmen und eine unangebrachte Gabe von Antibiotika vermeiden.

Die korrekte Stufendiagnostik bei Verdacht auf Entzündung und Infektion durch klinische Untersuchungen, biochemische Marker und mikrobiologische Blutkulturen ist zeit- und kostenintensiv. Ein schneller Hinweis zu Beginn der Diagnostik, in welche Richtung die Erkrankung deutet, wäre enorm hilfreich. So können schnell die weiteren korrekten Tests veranlasst, unnötige Folgeuntersuchungen vermieden und die Therapie früher begonnen oder angepasst werden. Hämatologische Entzündungsparameter aus dem Routine-Blutbild des XN-20-Analysesystems von Sysmex können

quantitative Informationen über die Entzündungsreaktion des Immunsystems des Patienten liefern.

Nutzen hämatologischer Entzündungsparameter

Der Nutzen hämatologischer Entzündungsparameter (Extended Inflammation Parameter; EIP) bei der Versorgung entzündlicher Erkrankungen liegt in der Möglichkeit den Aktivierungsstatus der Neutrophilen (NEUT-RI, NEUT-GI), aktivierte Lymphozyten (RE-LYMP, AS-LYMP) sowie den Anteil der unreifen Granulozyten (IG) zu bestimmen.

Das angeborene Immunsystem ist eine erste unspezifische Verteidigungslinie gegen Pathogene. Seine Hauptfunktion liegt darin, Fremdstoffen durch spezialisierte Leukozyten zu identifizieren und zu entfernen, um dann das adaptive (erworbene) Immunsystem durch einen Prozess zu aktivieren, bei dem das Antigen des Pathogens zur Erkennung präsentiert wird. In dieser Phase sind typischerweise aktivierte Neutrophile (erhöhtes NEUT-RI, erhöhtes NEUT-GI), unreife Granulozyten (IG) und reaktive Lymphozyten (RE-LYMP) sowie T-Zell-unabhängig aktivierte Plasmazellen

(AS-LYMP) zu beobachten. Die spezifische Änderung im Wert dieser Parameter hängt im Allgemeinen von der Natur des Entzündungsreizes sowie der Schwere und dem Stadium der Infektion ab. Das adaptive Immunsystem wird durch das angeborene Immunsystem aktiviert. Es wird in zwei Bereiche unterteilt: Eine frühe, zell-basierte Immunantwort, die durch einen Anstieg der aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen charakterisiert wird, und eine humorale Immunantwort, für die aktivierte B-Lymphozyten (Plasmazellen) kennzeichnend sind. Aktivierte B-Lymphozyten können mit dem Parameter AS-LYMP (antikörperbildende Lymphozyten) gezählt werden. Die Gesamtheit der aktivierten Lymphozyten (einschließlich der Plasmazellen) wird durch den Parameter RE-LYMP (gesamte reaktive Lymphozyten) erfasst.

Die Kombination der Parameter RE-LYMP und AS-LYMP erschließt zusätzliche Informationen über die zelluläre Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Erhöhte Fluoreszenzwerte für diese Zellpopulationen in der Messung kennzeichnen eine erhöhte Aktivität und Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellmembran und erlauben dadurch Rückschlüsse, ob die Immunantwort zellulär oder humoral vermittelt wird. Dies erlaubt Hinweise zur Differenzierung von viralen und bakteriellen Infektionen sowie akuten und abklingenden Infektionen,

oder ob der entzündlichen Erkrankung überhaupt keine Infektion zugrunde liegt. Tabelle 1 fasst die hämatologischen Entzündungsparameter mit ihren jeweiligen Einheiten zusammen. Die Parameter erlauben die Quantifizierung

- der aktivierten Lymphozyten
- der unreifen Granulozyten
- des Aktivierungsstatus der Neutrophilen.

Mehrere veröffentlichte Studien konnten zeigen, dass diese Parameter wertvolle Beiträge zur Erkennung und Beobachtung von Infektionen und Entzündungen leisten [1 – 8]. Die strukturellen Neutrophilen-Parameter NEUT-RI und NEUT-GI der XN-Serie konnten das Auftreten von unreifen Granulozyten vorhersagen. Dies legt nahe, dass diese Neutrophilen-Parameter das Vorliegen einer frühen bakteriellen Infektion anzeigen können [1]. Darüber hinaus fand eine laufende Studie, dass sowohl RE-LYMP als auch AS-LYMP schwerpunktmäßig bei viralen Infektionen erhöht sind [2]. RE-LYMP war bei bakteriellen Infektionen nur in Einzelfällen erhöht und AS-LYMP war in Fällen bakterieller Infektionen stets nur mäßig erhöht, was vermutlich auf unspezifische, nicht-T-Zell-aktivierte Plasmazellen zurück zu führen ist.

Tabelle 1 Eine Zusammenfassung hämatologischer Entzündungsparameter mit ihrer jeweiligen immunologischen Interpretation, ihrer Einheit und ihrem Referenzintervall.

Zellpopulationen und/oder ihre Eigenschaften	Beschreibung	Immunologische Interpretation	Parameter	Einheit	Referenzintervall
Gesamtzahl der reaktiven Lymphozyten	Dies schließt aktivierte B- und T-Lymphozyten ein, die verglichen mit den anderen Lymphozyten durch eine erhöhte Intensität der Fluoreszenzfärbung gekennzeichnet sind.	Erhöht bei angeborener und zellbasierter adaptiver Immunantwort	RE-LYMP#	Zellen/L	0 – 0,5 x 10 ⁹ /L
			RE-LYMP% ⁱ	%	0 – 5%
Antikörper-bildende Lymphozytenⁱⁱ	Dies sind aktivierte B-Lymphozyten, die durch die deutlich erhöhte Fluoreszenzfärbung von anderen Lymphozyten unterschieden werden können.	Erhöht bei angeborener und humoraler adaptiver Immunantwort	AS-LYMP#	Zellen/L	0 Zellen/L
			AS-LYMP% ⁱ	%	0%
Granularität der Neutrophilen	Ein Maß der zytoplasmatischen Granularität der Neutrophilen, was ihre Antwort auf die Entzündungsvorgänge widerspiegelt.	Erhöht bei früher angeborener Immunantwort	NEUT-GI: Intensität der Neutrophilen-Granularität	Streu-Intensität (SI)	142,8 – 159,3 SI [1]
Reaktivität der Neutrophilen	Ein Maß der Fluoreszenzintensität der Neutrophilen-Population, was ihre metabolische Aktivität widerspiegelt.	Erhöht bei früher angeborener Immunantwort	NEUT-RI: Intensität der Neutrophilen-Reaktivität	Fluoreszenz-Intensität (FI)	39,8 – 51,0 FI [1]
Unreife Granulozyten	Die Gesamtzahl der Metamyelozyten, Myelozyten und Promyelozyten, als eine gemeinsame Population; separat von »Neutrophilen« erfasst.	Zeigt die Schwere einer frühen angeborenen Immunantwort an	IG# IG% ⁱ	Zellen/L %	0 – 0,06 x 10 ⁹ /L 0 – 0,6% [9]

ⁱ Als prozentualer Anteil an allen WBC

ⁱⁱ Im Fall eines Auftretens von antikörper-bildenden Lymphozyten (AS-LYMP) werden diese auch in der Anzahl aller reaktiven Lymphozyten (RE-LYMP) erfasst.

Eine weitere Studie, die Kinder unter fünf Jahren untersuchte, fand heraus, dass bei Patienten mit bakteriellen Infektionen NEUT-RI gegenüber Kontrollen erhöht war [6], während nur RE-LYMP und AS-LYMP bei Patienten mit viralen Infektionen signifikant höher als bei Patienten mit bakteriellen Infektionen war. Zusätzlich konnte AS-LYMP in der Studie die gleiche Trennschärfe zwischen viralen und bakteriellen Infektionen zeigen wie Procalcitonin. Stiel *et al.* (2016) zeigten, dass der NEUT-RI-Parameter eine hohe Sensitivität und Spezifität bei der Diagnose einer disseminierten intravasalen Koagulopathie bei Patienten mit septischem Schock aufwies [7]. Oehadian *et al.* (2015) untersuchten die differentialdiagnostischen Möglichkeiten, die die Forschungsparameter zu atypischen Lymphozyten, von denen RE-LYMP und AS-LYMP abgeleitet wurden, eröffneten. Sie fanden dabei heraus, dass diese bei der

Unterscheidung von Dengue-Fieber von Leptospirose und enterischem Fieber (Typhus) helfen [8].

Fallbeispiel: Frühe angeborene Immunantwort auf intrazelluläre Bakterien

Fallgeschichte

Ein 23-jähriger Mann mit intermittierendem Fieber suchte drei Tage nach dem ersten Auftreten des Fiebers seinen Arzt auf. Der Mann berichtete die folgenden Symptome: Kurzatmigkeit, Husten mit Auswurf, Schmerzen im Unterleib, Durchfall, nächtliche Schweißausbrüche sowie generelles Unwohlsein. Angesichts der Symptome vermutete der Arzt eine Lungenentzündung und verordnete die Messung eines Differenzialblutbilds, um die Ursache der Infektion abzuklären.

Laborergebnisse

Tabelle 2 Ein Überblick über die Messergebnisse des Sysmex XN Hämatologie-Analysesystems.

WBC-Parameter	Daten	RBC-Parameter	Daten	PLT-Parameter	Daten
WBC (10 ⁹ /L)	2,98	RBC (10 ¹² /L)	3,96	PLT-I (10 ⁹ /L)	244
NEUT# (10 ⁹ /L)	2,50*	HGB (g/L)	102	PLT-F (10 ⁹ /L)	231
LYMPH# (10 ⁹ /L)	0,29*	HCT (L/L)	0,312	PDW (fL)	11,4
MONO# (10 ⁹ /L)	0,17*	MCV (fL)	78,8	MPV (fL)	11,2
EO# (10 ⁹ /L)	0,01*	MCH (pg)	25,8	P-LCR (%)	30,7
BASO# (10 ⁹ /L)	0,01	MCHC (g/L)	327	PCT (L/L)	0,0027
IG# (10 ⁹ /L)	0,02*	RDW-SD (fL)	42,2	IPF# (10 ⁹ /L)	4,2
RE-LYMP# (10 ⁹ /L)	0,03	RDW-CV (%)	14,6	IPF (%)	1,8
AS-LYMP# (10 ⁹ /L)	0,02	NRBC# (10 ⁹ /L)	0,00		
NEUT%	84,0*	NRBC%	0,0	WBC-Flag(s)	
LYMPH%	9,7*	MicroR (%)	8,3	Lymphopenie	
MONO%	5,7*	MacroR (%)	3,3	Left Shift?	
EO%	0,3*	HYPO-H _e (%)	1,6	Atypical Lympho?	
BASO%	0,3	HYPER-H _e (%)	0,3		
IG%	0,7*	RET# (10 ⁹ /L)	22,6		
RE-LYMP%	1,0	RET%	0,57		
AS-LYMP%	0,6	IRF (%)	5,1		
NEUT-GI (SI)	145,5	RET-H _e (pg)	29,8		
NEUT-RI (FI)	60,7	Delta-H _e (pg)	3,8		
		FRC# (10 ¹² /L) [§]	0,0851		
		FRC% [§]	2,15		

* Ergebnis als unzuverlässig gekennzeichnet
[§] Forschungsparameter

Interpretation des Falles

Die XN-Analyseergebnisse des jungen Mannes mit Fieber und der klinischen Fragestellung der Abklärung einer Lungenentzündung zeigten eine Leukopenie mit relativem Anstieg der Neutrophilen (NEUT/LYMPH=8,5).

Die Neutrophilen wiesen einen leicht gesteigerten Aktivierungsstatus auf – NEUT-RI=60,7 FI. Zusammen mit der niedrigen Konzentration AS-LYMP (0,6%) deuten diese Ergebnisse auf eine frühe Antwort des angeborenen Immunsystems auf intrazelluläre Bakterien hin.

Die Differentialdiagnose der Lungenentzündung zielt darauf ab, die zugrundeliegende Ursache abzuklären, die entweder extra- oder intrazelluläre Bakterien, eine virale Infektion oder eine Entzündung durch nichtpathogene Auslöser sein kann. Die hier beobachteten Resultate zeigten eine Verringerung der absoluten Neutrophilen-Konzentration. Die aktivierten Neutrophilen und die Verringerung sowohl der absoluten Lymphozyten-Konzentration als auch ihres prozentualen Anteils, erlaubten es, eine virale Infektion auszuschließen. Wenn eine Lungenentzündung durch extrazelluläre Bakterien verursacht wird, so wird gewöhnlich ein Anstieg der Konzentration der Neutrophilen beobachtet (zusammen mit einem Anstieg der unreifen Granulozyten, IG) sowie eine Verringerung der Monozyten. Dies würde auf eine Infektion in der Akutphase hinweisen und einhergehen mit einer Thrombozytopenie, die hier nicht beobachtet wurde. Eine Entzündung ohne Infektion würde eine Neutrophilie bedingen, bei der die Neutrophilen nicht aktiviert werden. Bei den in geringer Konzentration beobachteten AS-LYMP im Differenzialblutbild handelt es sich um T-Zell unabhängig aktivierte Plasmazellen, die nach direkter Aktivierung durch Lipopolysaccharide unspezifische Antikörper

bilden. Lipopolysaccharide lösen sich von der Zellwand mancher Bakterien und binden an B-Zell-Rezeptoren.

Im Gesamtbild kann so eine extrazelluläre bakterielle Infektion ausgeschlossen werden, genauso wie eine nichtpathogene Entzündung oder eine virale Infektion. Die Diagnose eines Verdachts auf Tuberkulose beruhte dann auf einem positiven Befund im Thorax-Röntgenbild. Vier Wochen nach dem ursprünglichen Blutbild und des Beginns einer Antibiotika-Therapie konnte diese Diagnose einer durch *M. tuberculosis* ausgelösten Tuberkulose anhand einer positiven Ziehl-Neelsen-Färbung für »säurefeste« Bakterien in einer Sputumkultur letztendlich bestätigt werden.

Zusammenfassung

Die in diesem White Paper beschriebenen diagnostischen Parameter helfen Ärzten, Patienten mit entzündlichen Erkrankungen zu diagnostizieren, zu behandeln und zu überwachen. Die hämatologischen Entzündungsparameter liefern zusätzliche Informationen über die Aktivierung der Immunantwort. Sie unterstützen die Unterscheidung zwischen Entzündung und Infektion, verschiedenen pathogenen Ursachen einer Infektion (viral oder bakteriell) und unterschiedlichen Arten der Immunantwort: früher angeborener, zellulärer oder humoraler Immunantwort. Diese Parameter erlauben eine quantitative Beurteilung des Aktivierungsstatus der Neutrophilen (NEUT-RI, NEUT-GI), der unreifen Granulozyten (IG) und der aktivierten Lymphozyten (RE-LYMP, AS-LYMP). Sie sind jederzeit im Rahmen der hämatologischen Routine-Labordiagnostik verfügbar, zusammen mit dem großen Blutbild.

Literatur

- [1] **Cornet E et al.** (2015): Contribution of the new XN-1000 parameters NEUT-RI and NEUT-WY for managing patients with immature granulocytes. *Int J Lab Hematol.* 37(5): e123–6.
- [2] **Van der Ven A et al.:** Manuscript in preparation.
- [3] **Park SH et al.** (2015): Sepsis affects most routine and cell population data (CPD) obtained using the Sysmex XN-2000 blood cell analyzer: neutrophil-related CPD NE-SFL and NE-WY provide useful information for detecting sepsis. *Int J Lab Hematol.* 37(2): 190–8.
- [4] **Luo Y et al.** (2013): Utility of neut-X, neut-Y and neut-Z parameters for rapidly assessing sepsis in tumor patients. *Clin Chim Acta.* 422: 5–9.
- [5] **Linssen J et al.** (2008): Automation and validation of a rapid method to assess neutrophil and monocyte activation by routine fluorescence flow cytometry *in vitro*. *Cytometry B Clin Cytom.* 74(5): 295–309.
- [6] **Henriot I et al.** (2016): New parameters on the hematology analyzer XN-10 (Sysmex™) allow to distinguish childhood bacterial and viral infections. *Int J Lab Hematol.* 39(1): 14–20.
- [7] **Stiel L et al.** (2016): Neutrophil Fluorescence: A New Indicator of Cell Activation During Septic Shock-Induced Disseminated Intravascular Coagulation. *Crit Care Med.* 44(11): e1132–36.
- [8] **Oehadian A et al.** (2015): New parameters available on Sysmex XE-5000 hematology analyzers contribute to differentiating dengue from leptospirosis and enteric fever. *Int J Lab Hematol.* 37(6):861.
- [9] **Pekelharing JM et al.** (2010): Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. *Sysmex Journal International.* 20(1): Online only.

Weitere White Paper stehen Ihnen auf unserer Website zur freien Verfügung unter
www.sysmex.de/whitepaper
www.sysmex.ch/whitepaper
www.sysmex.at/whitepaper

Wie können diese Parameter auf Hämatologie-Analysesystemen gemessen werden?

Diese hämatologischen Entzündungsparameter können mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie auf dem Analysesystemen XN-20 der XN-Serie bestimmt werden. Sie werden (hier im Beispiel in Abb. 1) in Form sogenannter »Scattergramme« angezeigt, die während der Messung angelegt werden.

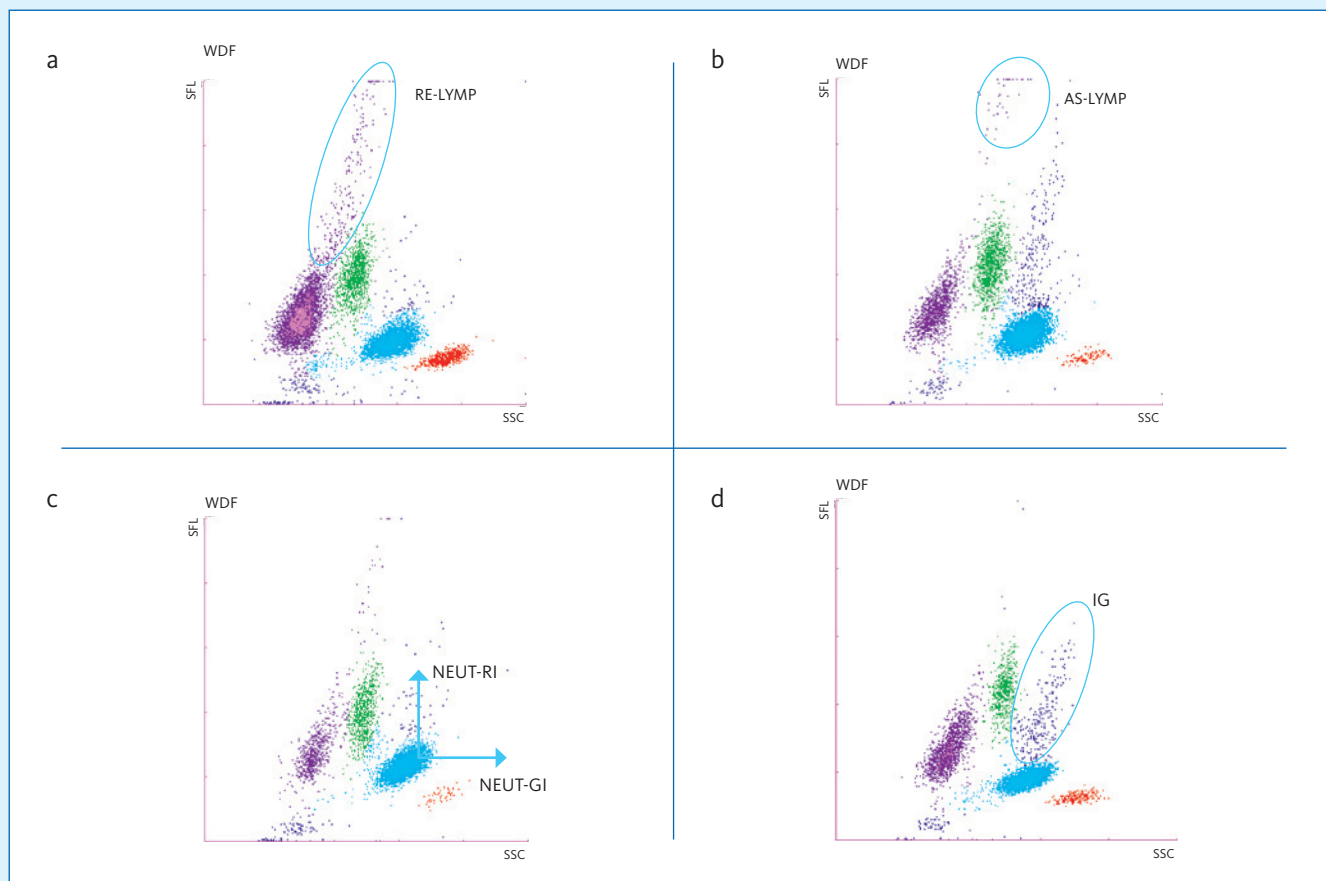


Abb. 1 Hämatologische Entzündungsparameter, die die aktivierten Zellpopulationen beschreiben, die im Verlauf einer Immunantwort beobachtet werden. Die Scattergramme werden angelegt, indem die intrazelluläre Struktur (Seitwärtsstreuung: SSC) auf der X-Achse gegen die Menge an bioaktivem Material (Seitwärts-Fluoreszenzlicht: SFL) auf der Y-Achse aufgetragen wird. Jeder Punkt stellt eine Zelle dar. a: Reaktive Lymphozyten; b: antikörper-bildende Lymphozyten; c: aktivierte Neutrophile; d: unreife Granulozyten.

Im Scattergramm des beschriebenen Falls (Abb. 2) wurden die folgenden Beobachtungen gemacht: Aktivierte Neutrophile (NEUT-RI, angezeigt durch erhöhte Fluoreszenz-Intensität, hellblau) und Monozyten (grün). Außerdem wurde das Auftreten einiger Plasmazellen (AS-LYMP) beobachtet.

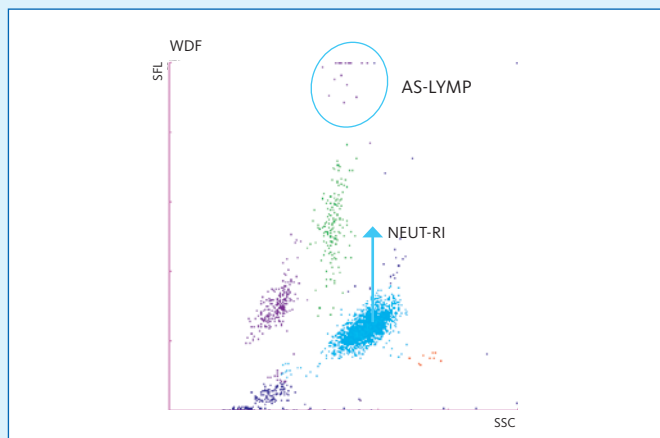


Abb. 2 Scattergramm des obigen Fallbeispiels