

Aus dem
CharitéCentrum 5 für diagnostische und präventive Labormedizin
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie
Direktor: Professor Dr. med. Rudolf Tauber

Habilitationsschrift

Neue zellbasierte Biomarker in der automatisierten hämatologischen Labordiagnostik

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Laboratoriumsmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

**Herrn Dr. med. Mathias Zimmermann
geboren in Göttingen**

Eingereicht:	12/2015
Dekan:	Prof. Dr. med. Axel Radlach Pries
1. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Gabriele Siegert
2. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Michael Neumaier

"Willst du dich am Ganzen erquicken, so musst du das Ganze im Kleinsten erblicken."

Johann Wolfgang von Goethe

für Moritz Zimmermann

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Automatisierte Blutbildanalytik in der Laboratoriumsmedizin	5
1.1.1	Der Granulationsindex (GI-Index)	7
1.1.2	Delta-Hämoglobinäquivalent als Marker für entzündliche Reaktionen	9
1.1.3	Der <u>I</u> ntensive <u>C</u> are <u>I</u> nfection <u>S</u> core (ICIS-Score)	11
1.1.4	Einsatz des Häma-Plots in der labormedizinischen <i>Theragnostik</i>	13
1.1.5	Die Bedeutung hochfluoreszierender Zellen (HFC) in der Liquordiagnostik	17
1.2	Zielsetzung	19
2	Relevante Originalarbeiten	
2.1	<u>Publikation 1</u>	20
	Zimmermann M* , Cremer M*, Hoffmann C, Weimann K, Weimann A. Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases, <i>Clin Chem Lab Med</i> , 2011;49:1193-1198	
	*geteilte Erstautorenschaft	
2.2	<u>Publikation 2</u>	27
	Zimmermann M , Steenhuis P, Linssen J, Weimann A. Detection and Quantification of Hypo- and Hypergranulated Neutrophils on the New Sysmex XN Hematology Analyzer: Establishment of an Adapted Reference Interval for the Neutrophil-Granularity-Intensity Compared to XE-Technology in Adult Patients. <i>Clin Lab</i> , 2015;61:235-241	
2.3	<u>Publikation 3</u>	35
	Hoffmann C, Hoffmann P, Zimmermann M . Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers. <i>Clin Chem Lab Med</i> , 2015;53(4):541-547	
2.4	<u>Publikation 4</u>	43
	Weimann K, Zimmermann M , Spies CD, Wernecke KD, Vicherek O, Nachtigall I, Tafelski S, Weimann A. Intensive Care Infection Score - A new approach to distinguish between infectious and noninfectious processes in intensive care and medicosurgical patients. <i>J Int Med Res</i> , 2015;43(3):435-451	

2.5	<u>Publikation 5</u>	61
	Weimann A, Cremer M, Hernaiz-Driever P, Zimmermann M . Delta-He, Ret-He and a new diagnostic plot for differential diagnosis and therapy monitoring of patients suffering from various disease-specific types of anemia. <i>Clin Lab</i> , 2015 (accepted)	
2.6	<u>Publikation 6</u>	73
	Zimmermann M , Otto C, Gonzalez JG, Prokop S, Ruprecht K. Cellular origin and diagnostic significance of high-fluorescent cells in cerebrospinal fluid detected by the XE-5000 hematology analyzer. <i>Int Jnl Lab Hem</i> , 2013;35:580-588	
3	Diskussion und Ausblick	
3.1	Der Granulationsindex: ersetzt eine automatisierte Methode die Mikroskopie?	83
3.2	Der Granulationsindexim Methodenvergleich: Etablierung eines Referenzbereichs für die XN-Serie	84
3.3	Differentialdiagnostik entzündlicher Erkrankungen mit Hilfe des Delta-He	86
3.4	Monitoring mit dem <i><u>I</u>ntensive <u>C</u>are <u>I</u>nfection <u>S</u>core</i>	88
3.5	<i>Theragnostik</i> mittels Häma-Plot	91
3.6	HFC: Möglichkeiten und Grenzen der automatisierten Liquordiagnostik	94
4	Zusammenfassung	96
5	Literaturverzeichnis	98
6	Danksagung	105
7	Erklärung	106

1 Einleitung

1.1 Automatisierte Blutbildanalytik in der Laboratoriumsmedizin

Ein modernes Hämatologieanalytiksystem, das in der laboratoriumsmedizinischen Routinediagnostik Anwendung findet, verfügt über zwei verschiedene Messprinzipien zur Zählung und Charakterisierung der einzelnen Blutzellklassen: die Impedanzmessung („Widerstandsmessprinzip“) zur Quantifizierung der Erythrozyten und Thrombozyten sowie die Fluoreszenz-Flowzytometrie zur Detektion und Differenzierung der Leukozyten. Beim Impedanzverfahren kommt es zur Auslösung eines Messimpulses, sobald ein korpuskuläres Element (Erythrozyt oder Thrombozyt) die Detektionskammer durchtritt und sich hierbei der angelegte Widerstand ändert (sog. „Coulter-Prinzip“) (1-5). Mit Hilfe der Fluoreszenz-Flowzytometrie können intrazelluläre und intranukleäre Bestandteile (Nukleinsäuren, Granula) lebender Leukozyten, Retikulozyten und Thrombozyten im Blut sehr spezifisch und mit hoher Geschwindigkeit angefärbt und quantifiziert werden (6). Das Vorwärtsstreulicht (FSC: *forward-scattered light*) gibt hierbei Aufschluss über die Zellgröße, die Seitwärtsfluoreszenz (SFL: *side-fluorescence light*) über den Gehalt an RNA/DNA und das Seitwärtsstreulicht (SSC: *side-scattered light*) über die Granularität der Zelle. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt durch Scattergramme und Histogramme, so dass sich Retikulozyten, Thrombozyten und Leukozyten sowie deren Vorstufen im Hinblick auf Art und Menge exakt bestimmen lassen. Moderne Hämatologieautomaten sind in der Lage, die Blutprobe eines Patienten automatisch zu aliquotieren. Damit die oben erwähnten Untersuchungsmethoden durchgeführt werden können, wird die Probe anschließend vollautomatisiert mit den nötigen Fluoreszenzfarbstoffen und Reagenzien inkubiert, so dass unmittelbar im Anschluss der Messprozess in den verschiedenen Messkanälen stattfinden kann (7). Sind in einer einzelnen Blutprobe Zellvolumen (Impedanzmessung) sowie die optischen Parameter (Fluoreszenz-Flowzytometrie) mittels Absorption, Streulicht und Fluoreszenz gemessen, so werden über 70 weitere Parameter reportiert, die eine exakte weiterführende Differenzierung und Charakterisierung der Leukozyten erlauben (1, 6-11). Die wissenschaftliche Evaluation einiger dieser neuen und zellbasierten hämatologischen Parameter ist Gegenstand der vorliegenden Habilitationsschrift.

Die neuesten Gerätegenerationen an Hämatologieautomaten verfügen über eine „optimierte“ Messpräzision, insbesondere im niedrigen Zellzahlbereich, sowie über eine „verbesserte“ Spezifität des *Flagging-Modus* (8). Folgende Messkanäle sind verfügbar: WDF (*white cell differentiation channel*), WNR (*white cell nucleated channel*), WPC (*white cell precursor channel*) und PLT-F (*fluorescent platelet channel*). Der WDF Kanal erlaubt die Differenzierung von Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen, Basophilen sowie von unreifen

Granulozyten (IG: *immature granulocytes*). Der WPC Kanal kommt für Reflex-Tests bei „Blastenalarm“ (=Verdacht des Gerätes auf das Vorhandensein von Blasten in der Blutprobe) oder aufgrund der Präsenz von atypischen Lymphozyten zum Einsatz. Im PLT-F Kanal werden gezielt Thrombozyten mit einem hochspezifischen Oxazin-Farbstoff angefärbt und quantifiziert (8, 9). Im PLT-F Kanal erfolgt zusätzlich die Bestimmung der IPF (*immature platelet fraction*: Fraktion der unreifen Thrombozyten), die einen unmittelbaren Rückschluss auf die Knochenmarkfunktion (Megakaryopoese) erlaubt und unter anderem zur Therapie- und Verlaufskontrolle von Patienten vor und nach Thrombozytentransfusionen eingesetzt wird (10, 11). Zusätzlich verfügen moderne Hämatologieautomaten über einen speziellen Modus für Proben mit niedriger Leukozytenzahl ($<0,5 \times 10^9/L$) sowie über einen *Body Fluid* Modus, in welchem die Zellzahl diverser Körperflüssigkeiten bestimmt werden kann, inklusive einer Prädifferenzierung in polymorphnukleäre Zellen (PMN: Neutrophile) und mononukleäre Zellen (MN: Monozyten und Lymphozyten).

Das Differentialblutbild, das heute vollautomatisch bestimmt wird, stellt eine der am häufigsten angeforderten medizinischen Laboruntersuchungen im klinischen Alltag dar (1, 2). Hämatologische Analysesysteme haben in der Laboratoriumsmedizin innerhalb der vergangenen Jahrzehnte eine rasante Entwicklung vollzogen. Neben der großen Messgenauigkeit und dem hohen Probendurchsatz zeichnen sich moderne Hämatologieautomaten auch durch eine umfangreiche technische Erweiterbarkeit aus. So lassen sie sich mit vollautomatisierten Ausstreichautomaten, Digital-Mikroskopen oder Archivsystemen für Probengefäße in einer sogenannten „Analytik-Strasse“ koppeln. Hierdurch verringert sich die *turn-around time* (TAT) bis zur Vorlage des vollständigen Untersuchungsergebnisses (3).

Im Hinblick des Erkennens atypischer Zellen (z.B. Tumorzellen) stoßen Hämatologieautomaten trotz hochspezialisierter Regelwerke mitunter noch an die Grenzen der technischen Leistungsfähigkeit, so dass die digitalmikroskopische (Nach-)Untersuchung eines Blutausstrichs durch technisches und ärztliches Laborpersonal mit Hilfe eines automatisierten Mikroskops notwendig wird (4). Ein in die Analytik-Strasse integrierter Ausstreicher fertigt in diesen Fällen das Blutausstrichpräparat inklusive der notwendigen Färbung an. Die Regelwerke für die automatisierte Messung eines Differentialblutbildes, die entsprechend der Bedürfnisse des jeweiligen Labors angepasst werden können, sind Teil eines sogenannten *workarea managers* (WAM). Die Konfiguration eines solchen Regelwerks wird unter anderem durch die medizinischen Strukturen der Einsender und die Schwere der Erkrankungen der Patienten in der jeweiligen labormedizinisch zu versorgenden Einheit beeinflusst (Universitätsklinikum, Krankenhaus der Maximalversorgung, Ambulanz, medizinisches Versorgungszentrum, niedergelassene Arztpraxis, etc.). Orientierend lässt sich feststellen,

dass mit steigender Schwere und Komplexität der Erkrankungen auch das zu hinterlegende Regelwerk an Umfang zunimmt.

1.1.1 Der Granulationsindex (GI-Index)

Im Jahr 1932 beschrieben Kugel & Rosenthal erstmals das Auftreten einer sogenannten „toxischen Granulation“ der Neutrophilen (*toxic granulated neutrophils*: TGNs) im Blut von Patienten mit schweren entzündlichen Erkrankungen (12). Den beiden Autoren fielen große, dunkle, unregelmäßig konfigurierte, basophile Granula im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten Schwerstkranker auf, die sich deutlich von der normalerweise feinen Zytoarchitektur der Neutrophilen im Blut gesunder Patienten unterschieden (12). Kugel und Rosenthal leiteten aus der mikroskopisch ausgezählten Menge dieser TGNs einen „*degenerative index*“ ab (0-100%), der sich, wenn die Präsenz von TGNs zwischen 90% bis 100% im Blut der Patienten lag, als signifikanter prognostischer Mortalitätsmarker bestätigen ließ (12). Patienten mit milderen oder lokalisierten entzündlichen Erkrankungen wiesen in der Studie von Kugel und Rosenthal hingegen keine TGNs auf. Arbeiten von Schofield et al. aus dem Jahr 1983 konnten die Ergebnisse von Kugel und Rosenthal im Hinblick auf das Vorhandensein einer ausgeprägten toxischen Granulation Neutrophiler im Blut von Patienten mit schweren entzündlichen Erkrankungen oder einer Sepsis verifizieren (13). Dennoch ist zum einen die exakte pathophysiologische Funktion dieser toxischen Granulation neutrophiler Granulozyten, zum anderen ihre klinische, diagnostische, prognostische und therapeutische Nutzbarkeit bis heute weitgehend unklar.

Das Vorhandensein von TGNs wurde bislang mit Hilfe der manuellen Phasenkontrast-Mikroskopie mit nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Blutaussstrichen semiquantitativ (mittels Auszählung) bestimmt. Die Ergebnisangabe erfolgte nach folgendem semiquantitativen Schema: „normal“, „+“, „++“ oder „+++“. Das Vorhandensein von TGNs kann den behandelnden Ärzten erste und wichtige Hinweise auf das potentielle Vorliegen einer inflammatorischen Erkrankung liefern. Die manuelle Mikroskopie und das hiermit verbundene semiquantitative Nachweisverfahren sind allerdings kostenintensiv, zeitaufwändig und zeigen einen hohen Variationskoeffizienten zwischen einzelnen Untersuchern (bis zu 36%) (14).

Hämatologieautomaten sind in der Lage, TGNs schnell, exakt und zuverlässig zu quantifizieren (14). Hierbei kommt die weiter oben beschriebene Nachweisteknik der Fluoreszenz-Flowzytometrie zum Einsatz. Durch Inkorporation spezifischer Farbstoffe in die Zellen der weißen Reihe werden zytoplasmatische und intranukleäre Proteine und Nukleinsäuren (DNA und RNA) angefärbt und nach Anregung mit einem Laserstrahl

($\lambda=633\text{nm}$) die Fluoreszenz bestimmt. Das Seitwärts-Fluoreszenz-Streulicht (NEUT-Y) erlaubt Aussagen über den DNA-/RNA-Gehalt der Neutrophilen und damit über deren Aktivierungszustand. Das Seitwärtsstreulicht (SSC: *side-scattered light*) hingegen detektiert und quantifiziert die Granularität der Zellen (NEUT-X). Wird eine Patientenprobe am Hämatologieautomaten gemessen, so wird das Messergebnis des Seitwärtsstreulichts dieser Probe in Bezug zu einer Referenzkohorte gesetzt und hieraus der sogenannte Granulationsindex (kurz: GI-Index) berechnet. Ergibt der GI-Index der Probe als Messergebnis eine „0“, so liegt dieses Ergebnis innerhalb einer Standardabweichung des Mittelwertes dieser Referenzkohorte. Liegt der Messwert für den GI-Index innerhalb von bis zu zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der Referenzkohorte entfernt, so ergibt sich ein GI-Index von +1 oder -1. Wichtig zu erwähnen ist, dass positive Messwerte für den GI-Index eine Hypergranulation der Neutrophilen, negative Messwerte eine Hypogranulation anzeigen. Von allen Blutzellen weisen neutrophile und eosinophile Granulozyten die höchste Seitwärtsstreulicht-Stärke auf (14-16). Der Granulationsindex ist ein hochdynamischer Parameter. So belegen Daten einer eigenen *in-vitro*- und *in-vivo*-Forschungsarbeit, die Bestandteil dieser Habilitationsschrift ist, dass es während einer simulierten entzündlichen Reaktion *in-vitro* (die Einleitung einer Entzündungsreaktion in der Patientenprobe erfolgte durch den Zusatz von Lipopolysaccharid) innerhalb weniger Minuten zur Degranulation der Neutrophilen kommt, mit einer sich anschließenden, zeitlich etwas langsamer verlaufenden Phase der Hypergranulation (14). Die Zeitdauer bis zum Eintritt der Hypergranulation der neutrophilen Granulozyten betrug 3 Stunden (14).

Ausserdem ist der GI-Index als eine schnelle Screeningmethode im Hinblick auf das mögliche Vorliegen eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) einsetzbar (15, 16). Liegt bei einem Patienten eine isolierte Anämie vor in Kombination mit einem GI-Index kleiner als -1, so besteht der Verdacht auf das Vorliegen einer Myelodysplasie und es stellt sich die Indikation zu einer weiterführenden Knochenmarksdiagnostik (16).

Eine eigene Arbeit beschreibt die notwendige Adaption der Referenzbereiche für den neuen Parameter NEUT-GI und den hieraus berechneten GI-Index im Vergleich zum NEUT-X und dem hieraus kalkulierten GI-Index der vorherigen Gerätegeneration an einem Kollektiv bestehend aus „Blut-gesunden“ Kontrollpatienten und schwerkranken Patienten einer Intensivstationen mit signifikant pathologisch veränderten GI-Indizes (17). Die Erstellung eines neuen Referenzbereiches wurde nötig, da der Gerätehersteller die zur Fluoreszenz-Flowzytometrie eingesetzten Reagenzien modifiziert und die für die Analytik notwendigen mathematischen Algorithmen adaptiert hat. Durch diesen Entwicklungsprozess konnte eine optimierte Separierung der jeweiligen leukozytären Zellen in den einzelnen Scattergrammen und Histogrammen erreicht werden.

1.1.2 Delta-Hämoglobinäquivalent als Marker für entzündliche Reaktionen

Hämatologieautomaten können eine Vielzahl an Retikulozytenparametern des roten Blutbildes zuverlässig detektieren und quantifizieren. Diese Analyte sind hilfreich für die Differentialdiagnostik verschiedener Anämieformen. Einer dieser Parameter ist das Retikulozytenhämoglobinäquivalent (Ret-He: Hämoglobingehalt der Retikulozyten), welcher die aktuelle Eisenversorgung der Erythropoese widerspiegelt und nicht nur bei der klassischen Eisenmangelanämie, sondern auch bei akuten oder chronischen Entzündungen erniedrigt sein kann (19). Die Quantifikation des Ret-He (Einheit: pg) erlaubt bereits eine Aussage zur Eisenversorgung der Erythropoese noch bevor andere klinisch-chemische Marker des Eisenstoffwechsels (Ferritin, Transferrinsättigung, etc.) pathologisch verändert sind (19). Ausserdem kann mit Hilfe der Bestimmung von Ret-He die Therapie- und Verlaufskontrolle z.B. von Dialysepatienten unter Erythropoietin (EPO) durchgeführt werden (20, 21).

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass entzündliche Prozesse den Eisenhaushalt und folglich auch Parameter des roten Blutbildes unmittelbar beeinflussen können. Diese Prozesse gelten im Hinblick auf die Änderung der Messwerte Retikulozyten-basierter Parameter als hochdynamisch und vielversprechend im Sinne einer Nutzung neuer zellbasierter Biomarker zur Differentialdiagnostik von Anämien und Anämie-auslösenden Erkrankungen (18-25). Einer dieser neuen retikulozytären Biomarker ist das Delta-Hämoglobinäquivalent (kurz: Delta-He; Einheit: pg), welches die Differenz des Hämoglobingehalts neu gebildeter Retikulozyten im Verhältnis zu reifen Erythrozyten (red blood cell: RBC) widerspiegelt (Ret-He - RBC-He) (22-25). Der Referenzbereich von Delta-He liegt beim gesunden Erwachsenen zwischen +2pg und +8pg und ist folglich immer positiv, da Retikulozyten quantitativ mehr Hämoglobin enthalten als Erythrozyten. Neugeborene hingegen haben physiologischerweise in den ersten Lebenswochen ein negatives Delta-He. Der genaue Grund hierfür ist bislang nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise führt die Umstellung vom fetalen Hämoglobin (HbF) zum adulten Hämoglobin (HbA) im Blut Neugeborener zu einer Negativierung des Delta-He, da die neu gebildeten Retikulozyten zunächst temporär quantitativ niedriger hämoglobiniert werden, als die ausgereiften Erythrozyten (25).

Bei Erwachsenen negativiert sich das Delta-He im Rahmen akut- oder chronisch-entzündlicher Prozesse (z.B. Sepsis, maligne Tumorerkrankungen, rheumatische oder autoimmun-bedingte Erkrankungen, etc.) innerhalb weniger Stunden als Ausdruck einer „Minderhämoglobinisierung“ der neu gebildeten Retikulozyten im Verhältnis zu den reifen Erythrozyten (22-25). Nach erfolgreicher Therapie bzw. einem Ausheilen der (entzündlichen) Grunderkrankung übersteigt der Hämoglobinisierungsgrad der Retikulozyten in kurzer Zeit wieder denjenigen der reifen Erythrozyten und das Delta-He wird wieder positiv und liegt im

Referenzbereich. Die pathobiochemische Ursache für die verminderte Hämoglobinisierung der Retikulozyten liegt in der vermehrten Expression des Akute Phase Proteins Hepcidin-25, welchem eine zentrale Rolle in der Eisenhomöostase zukommt (18, 26, 27). Hepcidin-25 ist ein kleines Peptid, das aus 25 Aminosäuren besteht und nach vorhergehender Stimulation durch Interleukin-6 im Rahmen von Inflammationsprozessen hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird (18, 26, 28, 29). Die gesteigerte Expression von Hepcidin-25 führt zur Endozytose der Ferroportine, spezialisierter, auf der Zelloberfläche gelegener Eisentransportsysteme, die für die Aufnahme von Eisen in die Körperzellen verantwortlich sind. Als Konsequenz kann aus dem Darm kein Eisen mehr absorbiert werden und es erfolgt ebenso keine Freisetzung von Eisen aus den Zellen des retikulo-endothelialen Systems (Milz, Leber, Knochenmark und Makrophagen). Folglich obliegt dem Hepcidin-25 die Kontrolle über den Influx und Efflux von Eisen im Körper und es resultiert bei Anstieg des Hepcidin-25 eine Eisenumverteilung mit Eisenverarmung im Blut und Eisenanreicherung im retikulo-endothelialen System (18, 28, 29). Dies ist der Grund, warum sich Retikulozyten-basierte Laborparameter wie Delta-He und Ret-He hervorragend zur schnellen, zuverlässigen und kosteneffektiven Differentialdiagnostik von Anämien und Anämie-auslösenden Erkrankungen eignen (19-25). Zusätzlich ist mit beiden Analyten auch eine Therapie- und Verlaufskontrolle mit Hilfe des sogenannten Häma-Plots sowie die Überprüfung der Patientencompliance möglich (siehe Folgekapitel) (25). Im Gegensatz zum negativierten Delta-He bei einer Anämie bei chronischer Erkrankung (ACD: *anemia of chronic disease*) liegt der Delta-He Messwert bei einer latenten oder manifesten Eisenmangelanämie immer im positiven Bereich. Patienten mit qualitativen oder quantitativen Erkrankungen des Hämoglobins im Sinne einer Hämoglobinopathie oder Thalassämie haben ebenfalls positive Messwerte für Delta-He (25).

Hepcidin-25 ist mittlerweile ebenfalls messbar. Allerdings sind die herkömmlichen immunologischen Methoden noch nicht ausreichend standardisiert und komplexere Nachweisverfahren, wie beispielsweise massenspektrometrische Methoden, sind derzeit noch zu kostenintensiv und zu aufwändig, so dass diese aktuell nicht als routinetaugliche Testverfahren im klinisch-diagnostischen Labor einsetzbar sind (27).

In einer eigenen wissenschaftlichen Arbeit zu neuen Biomarkern für hochgradig entzündliche Prozesse wurde ein interessantes Phänomen an Patienten mit einer bereits länger bestehenden ACD beschrieben, die z.B. durch Versagen einer anti-entzündlichen Therapie auftreten kann. Hier gelang der Nachweis, dass im Blut von Patienten mit prolongierter ACD vermehrt hypochrome Retikulozyten auftreten und konsekutiv auch vermehrt hypochrome Erythrozyten. Eine Negativierung des Delta-He kann in solchen Fällen nicht mehr stattfinden, da sich hier die Differenz zwischen Ret-He und RBC-He aufgrund der Hypochromasie in beiden Zellklassen annähernd ausgleicht (22). In solchen speziellen Fällen ließe sich ein Therapiemonitoring nur mit der Hilfe von zusätzlichen Biomarkern durchführen.

Nach Abklingen der Entzündungsreaktion (z.B. durch suffiziente anti-inflammatorische Therapie) ist ein Anstieg des Delta-He in den Normbereich zu erwarten, da es zur Normalisierung des Hämoglobingehalts der Retikulozyten und konsekutiv auch der Erythrozyten kommt. Dies ließ sich auch am untersuchten Patientenkollektiv bestätigen. Die erwähnte eigene Forschungsarbeit zeigte, dass im untersuchten Patientenkollektiv die ACD in vielen Fällen schon über längere Zeit bestand (Ursache: temporäres Therapieversagen) und dass das Delta-He in solchen Fällen ein besserer Biomarker für das Abklingen einer hochgradigen Entzündungsreaktion war (Umstellung auf eine suffiziente Therapie; Positivierung des Messwertes für Delta-He), als für deren Entstehung (22).

1.1.3 Der Intensive Care Infection Score (ICIS-Score)

Sepsis ist eine häufige und gefürchtete Komplikation, die insbesondere bei schwerstkranken Patienten auf Intensivstationen auftritt und mit einer hohen Mortalität assoziiert ist (30, 31). Aktuell steigt die Prävalenz der Sepsis weltweit an (32, 33). Die Differentialdiagnostik zwischen einer „echten“ Sepsis im Sinne einer systemischen Entzündungsreaktion mit nachgewiesener Infektion und einer nicht-infektiösen systemischen Entzündungsreaktion (SIRS: systemic inflammatory response syndrome), die in mehr als 50% der Patienten einer Intensivstation vorhanden ist, stellt nach wie vor eine klinisch-diagnostische Herausforderung dar (34, 35). Der Anspruch an die Laboratoriumsmedizin ist die Bereitstellung von Biomarkern, die die schnelle und zuverlässige Diagnose einer systemischen Infektion erlauben. Idealerweise sind diese Analysemethoden kostengünstig, verfügen über eine kurze *turn-around time* (TAT) und haben eine Verfügbarkeit von 24 Stunden pro Tag.

Neutrophile Granulozyten bilden mit ca. 50%-60% die Hauptzellklasse der Leukozyten und repräsentieren die erste Abwehrstrategie der angeborenen Immunabwehr (36). Sie sind in der Lage, eindringende Pathogene durch Phagozytose und konsekutive Produktion und Freisetzung von toxischen Metaboliten (beispielsweise Sauerstoffradikale) zu bekämpfen (36, 37). Hierbei kann es zu intrazytoplasmatischen morphologischen Veränderungen kommen (z.B. Hypergranulation aufgrund vermehrter Expression toxischer Proteine), die mit Hilfe der Fluoreszenz-Flowzytometrie an Hämatologieautomaten durch Quantifikation der SSC messbar sind. Durch Synthese und Sekretion verschiedener Cytokine (z.B. MIP-1: *macrophage inflammatory protein 1*) werden weitere immunkompetente Zellen angezogen, wie etwa Monozyten und Makrophagen (38). Dieser Inflamationsprozess bewirkt eine vermehrte Ausschüttung von Interleukin-6, welches die Synthese von Hecidin-25 in der Leber induziert. Hecidin-25 führt zu einer Eisenumverteilung im Körper, es resultiert ein negatives Delta-He.

Dies geschieht durch die bereits im Kapitel 1.3. beschriebenen pathobiochemischen Prozesse. Ein negatives Delta-He kann im hier beschriebenen immunologischen Zusammenhang als Indikator einer Aktivierung des Monozyten-Makrophagen Systems betrachtet werden (39).

Plasmazellen und lymphoplasmozytoide Zellen bilden eine weitere Komponente der frühzeitigen Infektionsabwehr. Beide Zellklassen sind im Blut gesunder Menschen nicht nachweisbar, treten aber im Rahmen von Akute Phase Reaktionen bei Infektionen auf (40, 41). Zusätzlich setzt das Knochenmark bei einer systemischen Infektion unreife Vorstufen der neutrophilen Granulozyten frei (IGs: *immature granulocytes*), die durch Hämatologieautomaten präzise quantifiziert werden können. Der Quotient unreife Granulozyten zur Gesamtzahl von Granulozyten steigt bei systemischen Infektionen signifikant an und korreliert mit dem Vorliegen einer Sepsis (42). Zusammenfassend kann man feststellen, dass es zur Erfassung und Beurteilung der komplexen pathophysiologischen Vorgänge bei systemischen Infektionen bzw. einer Sepsis nicht „den einen“ spezifischen und zuverlässigen Biomarker gibt, der zur sicheren Diagnosestellung führt oder auch ein therapeutisches Monitoring ermöglicht. Vielmehr erscheint es als wahrscheinlich, dass durch Kombination mehrerer Laborparameter im Sinne eines diagnostischen Scores bessere Sensitivitäten und Spezifitäten erreicht werden können, als dies durch Nutzung von einzelnen Analyten möglich wäre (42).

Nierhaus et al. (40) konnten nachweisen, dass die diskriminative Wertigkeit der Kombination mehrerer zell-basierter Blutbildparameter zu einem diagnostischen „ICIS-Score“ (ICIS-Score: *Intensive Care Infection Score*) den momentan etablierten Markern für Akute Phase Reaktionen wie CRP, IL-6, EPO (Erythropoietin), LBP (Lectin-bindendes Protein) oder TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) im Hinblick auf die Differenzierung eines SIRIS von einer Sepsis deutlich überlegen war, insbesondere in den ersten 48 Stunden nach Auftreten der klinischen Symptomatik. Der positive (PPV: 79,7%) und der negative (NPV: 74,5%) prädiktive Wert des ICIS-Score übertraf die prädiktiven Werte der oben erwähnten Inflammationsmarker für eine Infektions-assoziierte systemische Inflammation und verdeutlicht, dass der ICIS-Score ein vielversprechendes diagnostisches Hilfsmittel zur schnellen und zuverlässigen Diskrimination zwischen SIRS und Sepsis sein kann (40).

In einer retrospektiven Observationsstudie gelang Weimann et al. an insgesamt 172 Intensivpatienten (72 Patienten waren postoperativ) der Nachweis, dass der ICIS-Score bei einem cut-off Wert von 3.0 zeitnah eine Infektion insbesondere in unmittelbar postoperativen Patienten mit einer Sensitivität von 82,9% und einer Spezifität von 75,1% vorhersagen konnte. Der ICIS-Score war damit im direkten Vergleich den momentan in der Laborroutine eingesetzten Laborparametern CRP, Procalcitonin sowie der Gesamtleukozytenzahl deutlich überlegen (23). Die Autoren stellten weiterhin fest, dass der ICIS-Score, wenn er im klinischen

Kontext des Patienten betrachtet wird, eine neue diagnostische Entscheidungshilfe für die rechtzeitige und gezielte Einleitung einer antibiotischen Therapie ist (23). Verglichen mit den Laborparametern CRP, Procalcitonin und Gesamtleukozytenzahl ließ sich die Menge an unnötig verabreichten bzw. nicht indizierten Antibiotika-Therapien deutlich reduzieren (23).

Die Bestimmung des ICIS-Scores erfolgt mit Hilfe von fünf verschiedenen zellbasierten Parametern der Blutbildanalytik, die alle eng mit der angeborenen Immunität des menschlichen Immunsystems assoziiert sind: **1.** Fluoreszenzintensität (=Aktivierungszustand) reifer (segmentierter) Neutrophiler, **2.** Delta-He (Hämoglobingehalt der neu gebildeten Retikulozyten im Vergleich zu reifen Erythrozyten), **3.** Gesamtzahl an Neutrophilen, **4.** Fluoreszenzintensität (=Aktivierungszustand) Antikörper-sezernierender Lymphozyten (diese entsprechen HFLC: *high fluorescent lymphocytes*), **5.** Anzahl an unreifen Granulozyten (*immature granulocytes*).

Diese fünf zellbasierten Parameter sind innerhalb von ca. 1 Minute mittels Messung der Probe auf einem modernen Hämatologieautomaten quantifizierbar und stehen im hämatologischen Routinelabor rund um die Uhr zur Verfügung. Eine spezielle Vorbereitung der EDTA-Blutproben ist nicht erforderlich. Die Bestimmung des Blutbildes findet in Echtzeit („real-time“) statt und ist unabhängig von interindividuellen Varianzen zwischen einzelnen Untersuchern, wie dies beispielsweise für die manuelle Mikroskopie beschrieben ist (43, 78). Alle fünf aufgeführten Parameter spielen eine wichtige Rolle in der Frühphase einer (infektionsbedingten) Inflammationsreaktion und lassen zusätzlich unmittelbare Rückschlüsse auf die Knochenmarkfunktion zu (Fähigkeit des Knochenmarks zur Freisetzung von Vorläuferzellen der angeborenen Immunantwort, Hämoglobingehalt der Retikulozyten im Verhältnis zu reifen Erythrozyten, etc.) (40).

1.1.4 Einsatz des Häma-Plots in der laboratoriumsmedizinischen Theragnostik

Eisenmangel ist weltweit der häufigste Grund für die Entwicklung einer Anämie (44). Leere Eisenspeicher behindern die Erythropoiese und führen zu einer verminderten Hämoglobinisierung von Retikulozyten und Erythrozyten (19, 45). Zur Erfassung der Erythropoieserate im Knochenmark und zur Einschätzung der Eisenhomöostase reicht ein einzelner Biomarker nicht aus. Die zweithäufigste Anämieform ist die *anemia of chronic disease* (ACD), an deren pathobiochemischer Entstehung entscheidend die über Interleukin-6 induzierte erhöhte Expression von Hepcidin-25 beteiligt ist (siehe hierzu Kapitel 1.3.) (18, 26-29).

Um den Status des Eisenstoffwechsels sensitiv zu erfassen und die Anämiediagnostik zu optimieren, etablierten Thomas et al. im Jahr 2002 den sogenannten *Ferritin Index Plot* (Synonym: „*Thomas-Plot*“) (46). Hierbei wird in einem vierfeldrigen Diagramm das Ret-He (y-Achse) gegen den Ferritin-Index (x-Achse) aufgetragen, wobei sich letzterer aus dem Quotienten des löslichen Transferrinrezeptors dividiert durch den logarithmierten Ferritinmesswert ergibt. Normale oder erhöhte CRP-Konzentrationen finden im Thomas-Plot ebenfalls Berücksichtigung, da Ferritin ein Akute Phase Protein ist, das bei Entzündungen vermehrt exprimiert wird. Das Ret-He spiegelt im Thomas-Plot die Eisenversorgung der Erythropoese wider, während der Ferritin-Index Auskunft über die Versorgung mit Speichereisen liefert (46). Man ist aufgrund des vierfeldrigen Plots und eines darin abgebildeten Punktes, der den Messwerten des Patienten entspricht, sofort in der Lage, auf einen Blick Aussagen zum Status des Eisenstoffwechsels des jeweiligen Patienten zu treffen. Mit Hilfe des Thomas-Plots kann auch eine Therapie-/Verlaufskontrolle von Patienten erfolgen, etwa bei Eisen- und/oder Erythropoietin-Substitution (46). Bis eine Änderung des Ferritin-Index auf der x-Achse des Plots eintritt, vergehen allerdings mehrere Tage (27, 46).

Um die Differentialdiagnostik von Anämien weiter zu verbessern, publizierten Thomas et al. im Jahr 2011 den *Hepcidin-25 Plot*, welcher die Messwerte für Hepcidin-25 auf der x-Achse und diejenigen des Ret-He auf der y-Achse darstellt (27). Hepcidin-25 ist ein zentraler Regulator des Eisenstoffwechsels und insbesondere für die Differentialdiagnostik einer Anämie bei chronischer Erkrankung (ACD) essentiell (siehe hierzu auch 1.1.2). Hier lag auch der Vorteil der erwähnten Studie: den Autoren gelang mit Hilfe des Hepcidin-25 Plots im Vergleich zum klassischen Thomas-Plot eine bessere Diskrimination von Patienten mit ACD sowie der Mischform aus ACD und Eisenmangelanämie (27). Einschränkend muss jedoch festgestellt werden, dass die immunologischen Nachweismethoden für Hepcidin-25 bis heute noch nicht ausreichend standardisiert und die komplexeren Nachweisverfahren (z.B. massenspektrometrische Methoden) aktuell noch zu teuer und aufwändig sind, um in die laboratoriumsmedizinische Routinediagnostik eingeführt zu werden (27).

Hämatologieautomaten können mit Hilfe der Fluoreszenz-Flowzytometrie neben dem Ret-He auch das Delta-He bestimmen, welches innerhalb von Stunden (23) durch die pathobiochemischen Auswirkungen einer erhöhten Expression von Hepcidin-25 dahingehend beeinflusst wird, als dass sich die Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten im Vergleich zu reifen Erythrozyten vermindert. Die Folge ist ein negatives Delta-He (siehe Kapitel 1.3.). Der von Weimann et al. 2015 vorgestellte „*Häma-Plot*“ (25) vereint in einer neunfeldrigen Graphik auf der x-Achse das Delta-He und auf der y-Achse das Ret-He und liefert inhaltlich ähnlich dem Hepcidin-25 Plot eine diagnostisch sinnvolle Erweiterung des klassischen Thomas-Plots: hier wird neben einem bereits gut etablierten Marker für die Eisenversorgung der Erythropoese (Ret-He) ein dynamischer und zellbasierter Biomarker für entzündliche

Prozesse dargestellt (Delta-He), der im Gegensatz zum Heparin-25 innerhalb von einer Minute hochstandardisiert, präzise und kosteneffektiv bestimmt werden kann und rund um die Uhr zur Verfügung steht (25). Der Häma-Plot ist in der Lage, aufgrund der Messwerte für Ret-He und Delta-He verschiedene Anämietypen voneinander zu differenzieren und diese speziellen Quadranten (Quadrant 1-9) zuzuordnen, so dass analog zum Thomas- und Heparin-25 Plot eine erste Einschätzung der Messwerte auf einen Blick erfolgen kann. Quadrant 5 entspricht hierbei dem Referenzquadranten gesunder Erwachsener, repräsentiert durch die Normwerte von Ret-He (28pg - 36pg) und Delta-He (+2pg - +8pg) (25). Gesunde Neugeborene weisen physiologischerweise negative Messwerte für Delta-He auf und finden sich in Quadrant 4. Der Häma-Plot erlaubt die Abgrenzung von Patienten mit einer ACD oder schweren Entzündung/Sepsis (Quadrant 7; negatives Delta-He) von Patienten mit einer Eisenmangelanämie oder Hämoglobinopathie/Thalassämie (Quadrant 8; positives Delta-He) bzw. von Patienten mit einem Mangel an Vitamin B12/Folsäure (Quadrant 3; positives Delta-He). Zusätzlich werden Mischformen aus ACD und Eisenmangelanämie anhand der Messwerte für Delta-He von einer reinen Eisenmangelanämie abgrenzbar: Patienten mit einer Mischform aus ACD und Eisenmangelanämie weisen ein negatives Delta-He auf, während Patienten mit einer reinen Eisenmangelanämie immer ein positives Delta-He zeigen (25).

Wird ein Patient mit einer ACD suffizient therapiert, so ändern sich bereits innerhalb weniger Stunden durch Abnahme der Inflammation (sinkende Konzentration an Interleukin-6 und Heparin-25) das Ret-He und insbesondere das Delta-He im Sinne einer verbesserten Hämoglobinisierung der Retikulozyten im Vergleich zu den reifen Erythrozyten. Ein solcher Patient verändert seine Lage im Häma-Plot in Richtung Quadrant 5 (Normbereich). Der umgekehrte Fall ist ebenfalls denkbar: verliert die medizinische Therapie der ACD an Effizienz (z.B. falsche oder fehlende Pharmakotherapie, Resistenzentwicklung der Erreger gegen die antiinfektiöse Chemotherapie bei einer Sepsis), so verschieben sich die „Messergebnisse des Patienten“ im Häma-Plot zunehmend in Richtung Quadrant 7 aufgrund der steigenden Inflammation (Delta-He negativiert sich, Ret-He fällt ab) (25).

Aus den dargestellten Beobachtungen lässt sich der Häma-Plot als ein kostengünstiges und valides Theragnostikwerkzeug charakterisieren. Aufgrund der Dynamik der beiden dem Häma-Plot zugrundeliegenden zellbasierten Biomarker Delta-He und Ret-He ist dieser neben der Differentialdiagnostik von Anämien insbesondere auch zur Detektion von inflammationsbasierten Erkrankungen geeignet (z.B. Entzündung, Sepsis, Tumor). Weiterhin eignet sich der Häma-Plot zur medizinischen Therapie-/und Verlaufskontrolle (Suffizienz einer anti-Inflammations-/anti-Tumortherapie, Eisen-/Erythropoietin-Therapie, Vitamin B12-/Folsäure-Substitution, etc.) und zur Überprüfung der Patient compliance. Die Messwerte des Patienten werden als einzelner, markierter Punkt zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt innerhalb der neun Quadranten des Häma-Plots dargestellt. Erfolgen im Nachhinein weitere

Messungen desselben Patienten, so kann der Arzt/die Ärztin diese zur Beurteilung des gesamten Krankheits-/Therapieverlaufs in einem einzigen Häma-Plot einsehen und beurteilen.

Zusammenfassend eröffnen sich mit Hilfe des Häma-Plots die folgenden klinisch-diagnostischen Möglichkeiten (25):

1. schnelle, standardisierte, kostengünstige und immer verfügbare Anämiediagnostik
2. Therapie-/Verlaufsmonitoring auf einen Blick durch graphische Aufbereitung der Messwerte
3. Überprüfung der Patientencompliance unter Therapie

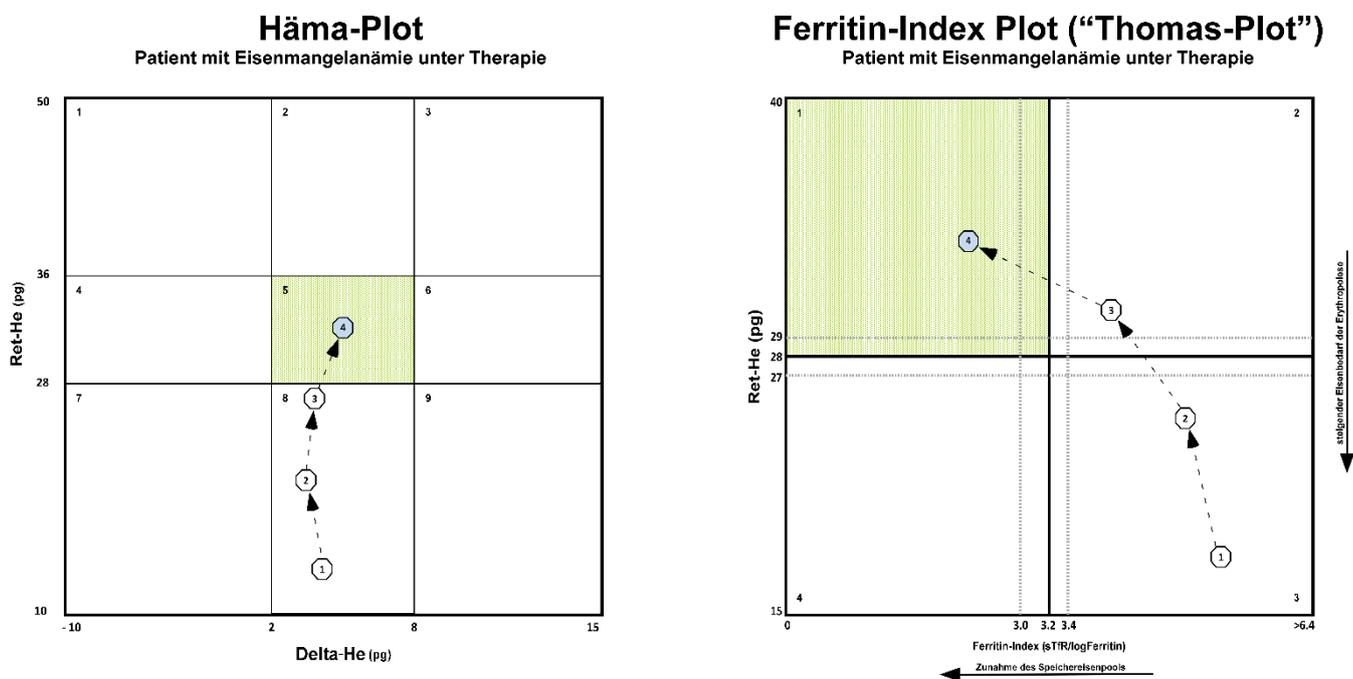


Abbildung 1: Graphische Darstellung des Häma-Plots und des Ferritin-Index Plots, modifiziert nach Weimann et al., 2016 (25) und Thomas & Thomas, 2002 (46).

1.1.5 Die Bedeutung hochfluoreszierender Zellen (HFC) in der Liquordiagnostik

Die Metastasierung maligner Tumore in das zentrale Nervensystem (ZNS) ist eine häufige klinische Komplikation onkologischer Patienten und erfordert neben der klinisch-chemischen Standarduntersuchung im Routinelabor auch eine differenzierte zytologische Untersuchung des Liquors einschließlich des Nachweises von Tumorzellen für diagnostische Zwecke sowie für die Therapie- und Verlaufskontrolle. Dies geschieht gewöhnlich mit Hilfe der manuellen Mikroskopie und ggf. durch den zusätzlichen Einsatz immunhistologischer Spezialfärbungen. In selteneren Fällen können auch molekularbiologische Untersuchungstechniken zum Einsatz kommen, etwa um genetische Mutationen oder bestimmte DNA-/RNA-Sequenzen in den Tumorzellen nachzuweisen.

Die neoplastische Meningitis ist eine häufige Manifestationsform hervorgerufen durch das Vorhandensein von Tumorzellen im Zentralnervensystem, wobei die malignen Zellen in den Leptomeningen, im Subarachnoidalraum oder im Liquor selbst nachgewiesen werden können (47, 48). Neben der klinischen Untersuchung des Patienten und der bildgebenden Diagnostik mit Hilfe des MRT (MRT: Magnetresonanztomographie) ist der labormedizinisch Goldstandard zum Nachweis einer neoplastischen Meningitis die mikroskopische Untersuchung von Liquorproben mit Hilfe sogenannter Zytospinpräparate (49). Der Nachweis intrathekaler Tumorzellen dient bei Patienten mit bekannter neoplastischer Meningitis zum Monitoring der Krankheitsaktivität und lässt ebenso Rückschlüsse auf das Therapieansprechen des Patienten zu (47).

Vollautomatisierte Hämatologieautomaten verfügen über einen sogenannten Body Fluid Modus, in welchem diverse Körperflüssigkeiten (z.B. Liquor) innerhalb von ca. 1 Minute mit Hilfe der Fluoreszenz-Flowzytometrie auf ihre Zellzahl hin untersucht werden können. Dieser Modus erlaubt auch eine Prädifferenzierung der Zellen mittels *forward-scattered light* (FSC: Größe der Zelle), *side-scattered light* (SSC: Granularität der Zelle) und *side-fluorescence light* (SFL: DNA-/RNA-Gehalt der Zelle) in polymorphnukleäre Zellen (PMN: Neutrophile), mononukleäre Zellen (MN: Monozyten und Lymphozyten) sowie in hochfluoreszierende Zellen (HFC: high fluorescent cells), so dass insbesondere bei hochakuten und dringlichen Verdachtsdiagnosen schnell ein erster und wichtiger Hinweis auf das Vorliegen einer bakteriellen Meningitis vorliegt (=Vorliegen von polymorphnukleären Zellen im Liquor) und noch in der Rettungsstelle eine entsprechende antibiotische Therapie verordnet werden kann (50-53).

Hochfluoreszierende Zellen wurden im peripheren Blut bereits als CD138-positive, T-zellunabhängig aktivierte B-Lymphozyten (Plasmazellen) des marginalen Pools charakterisiert

und gelten im Blut als sensitive Biomarker für infektiöse Erkrankungen einschließlich einer Sepsis (54). De Jonge et al. konnten nachweisen, dass es sich bei HFC in Pleurapunktaten zum Teil ebenfalls um B-Lymphozyten handelt, zum Teil allerdings auch um Mesothelien der Pleura sowie um ortsständige Makrophagen (51). Das zytologische Korrelat hochfluoreszierender Zellen im Liquor war bislang nicht bekannt, wenngleich es einen ersten Hinweis gab, dass automatisierte Hämatologieautomaten möglicherweise in der Lage sein könnten, mit Hilfe dieses Parameters intrathekale Tumorzellen mit ausreichender Sensitivität und Spezifität zu detektieren (55).

In einer eigenen Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass der Hämatologieautomat in der Lage ist, intrathekale Tumorzellen zu detektieren. Der Hämatologieautomat zeigte in 51 von 65 Tumorzell-positiven Liquores das Vorliegen von HFC an, in 126 Tumorzell-negativen Liquores traten bei 33 Proben dennoch HFC in Erscheinung. Dies entspricht einer Sensitivität von 78,5% und einer Spezifität von 73,8%, um intrathekale Tumorzellen mit Hilfe des zellbasierten Biomarkers HFC durch einen Hämatologieautomaten zu detektieren (56). Als Goldstandard zum Tumorzellnachweis oder -ausschluss diente in allen Fällen die manuelle Mikroskopie von Zytospinpräparaten.

Der Hämatologieautomat war insbesondere bei Liquorproben mit einer geringen Tumorzellzahl nicht in der Lage, diese mit ausreichender Verlässlichkeit zu detektieren. Umgekehrt wurden durch den Hämatologieautomaten Nukleinsäure-reiche Zellen als HFC klassifiziert, bei denen es sich nicht um Tumorzellen handelte: diese Zellen entsprachen neben Lymphozyten und Monozyten vor allem Makrophagen, Plasmazellen (als einzige Zellklasse statistisch signifikant), Hämosiderophagen und aktivierten Lymphozyten (56).

Im Rahmen der hier beschriebenen wissenschaftlichen Arbeit konnte resümiert werden, dass zwar das prädominierende morphologische Korrelat der HFC im Liquor Tumorzellen gewesen sind, die erreichten Sensitivitäten und Spezifitäten jedoch nicht ausreichten, um aus klinischer Sicht einen sicheren Tumorzellnachweis oder -ausschluss mit Hilfe des Parameters HFC am Hämatologieautomaten durchzuführen (56). Vielmehr sollte bei inzidentellem Nachweis von HFC in einer Liquorprobe ohne routinemäßige Anforderung einer zytologischen Diagnostik durch das Laborinformationssystem (LIS) automatisch die Anfertigung eines Zytospinpräparates ausgelöst werden, um das Präparat zeitnah mikroskopisch auf das tatsächliche Vorhandensein von Tumorzellen hin zu überprüfen (56).

1.2 Zielsetzung

Ziel der in der vorliegenden Habilitationsschrift zusammengefassten wissenschaftlichen Arbeiten war es, das Verständnis für die vorgestellten neuen und zellbasierten hämatologischen Laborparameter und die Scores und Plots im Hinblick auf den klinisch-diagnostischen Einsatz zu vertiefen. Die untersuchten Analyte, der Häma-Plot und der ICIS-Score wurden im Rahmen der Laborroutine mit Hilfe eines vollautomatisierten Hämatologieautomaten bestimmt und durch eine angeschlossene Middleware berechnet und schließlich in das LIS übertragen. Als zentrale Untersuchungstechnik kam die Fluoreszenz-Flowzytometrie zum Einsatz.

Zum einen erfolgte die Charakterisierung einzelner Laborparameter hinsichtlich des Einsatzes in der zellbasierten Entzündungs- und Tumorzell Diagnostik (z.B. GI-Index Kap. 1.1.1, Delta-Hämoglobin Kap. 1.1.2, HFC Kap. 1.1.5). Zum anderen bildete die Kombination mehrerer zellbasierter hämatologischer Biomarker im Sinne einer Multiparameter-Analytik einen weiteren Forschungsschwerpunkt. In diesem Fokus wurde ein neuer diagnostischer Plot (Häma-Plot Kap. 1.5) zur Anämiediagnostik vorgestellt, sowie ein intensivmedizinischer Score zur Detektion einer infektiös-systemischen Entzündung (ICIS-Score Kap. 1.4).

Der Häma-Plot und der ICIS-Score liefern im Rahmen der Blutbildanalytik wichtige diagnostische und therapeutische Informationen. Die folgenden Originalpublikationen bilden eine kumulative Habilitationsschrift. Eine abschließende Diskussion und Zusammenfassung der Ergebnisse stellt den thematischen Zusammenhang der einzelnen Arbeiten dar.

2 Relevante Originalarbeiten

2.1 Publikation 1

Zimmermann M*, Cremer M*, Hoffmann C, Weimann K, Weimann A. Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases, *Clin Chem Lab Med*, 2011;49:1193-1198; <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2011.188>

*geteilte Erstautorenschaft

Hintergrund: Bereits seit einigen Jahrzehnten ist bekannt, dass es im Zytoplasma von Neutrophilen Granulozyten im Blut von Patienten mit bakteriell induzierten entzündlichen Erkrankungen zum Phänomen der sogenannten „toxischen Granulation“ (*toxic granulated neutrophils* = TGNs) kommen kann. Hierbei handelt es sich um dunkel violett gefärbte Granula nach entsprechender Färbung und Fixierung des Blutausstrichs. In den vergangenen Jahrzehnten wurde diese toxische Granulation in medizinischen Laboratorien mittels manueller Mikroskopie von Blutausstrichen semiquantitativ erfasst. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Flowzytometrie kann der Sysmex XE-5000, ein vollautomatisierter Hämatologieautomat, die toxische Granulation von Neutrophilen mittels Messung des Seitwärts-Streulichts in Form des Granulations-Index (GI-Index) quantitativ, reliabel und standardisiert bestimmen.

Methoden: Im Rahmen der vorliegenden wissenschaftlichen Studie wurde an 158 Patienten sowie an 100 weiteren Patienten einer Intensivstation die toxische Granulation von Neutrophilen mit Hilfe der manuellen Mikroskopie bestimmt, gleichzeitig wurde in allen mikroskopisch untersuchten Blutproben auch der GI-Index und das C-reaktive Protein (CRP) gemessen. Um die Kinetik des GI-Index *in-vitro* analysieren zu können wurden weiterführende Untersuchungen im EDTA-Blut von 40 „Blut-gesunden“ Patienten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden diese Blutproben mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert und anschließend quantifizierte der XE-5000 mittels Fluoreszenz-Flowzytometrie über einen mehrstündigen Zeitverlauf den GI-Index.

Ergebnisse: Die Ergebnisse der oben beschriebenen Untersuchungen zeigten, dass der mit Hilfe des XE-5000 bestimmte GI-Index signifikant mit der manuell-mikroskopischen Bestimmung der toxischen Granulation der Neutrophilen korrelierte ($n=158$; $r_s=0.839$; $p<0.0001$). Wurden EDTA-Blutproben von Blut-gesunden Patienten ($n=40$) mit LPS *in-vitro* inkubiert, so kam es innerhalb von 30 Minuten nach der Inkubation mit LPS zu einer Hypogranulation und 90 Minuten danach zu einer Hypergranulation der Neutrophilen Granulozyten mit einem punctum maximum nach 180 Minuten. Die Messwerte für CRP und den neuen zellbasierten Biomarker GI-Index korrelierten an $n=100$ Patienten einer Intensivstation in Abhängigkeit von der Ursache (bakteriell, viral, andere Ursachen) und dem Ausmaß der jeweiligen Infektion ($n=158$; $r_s=0.836$) ($n=100$; $r=0.177$). Da hier neben bakteriellen Infektionen auch anderweitig ausgelöste Akute Phase Reaktionen auftreten, war die Korrelation gering.

Schlussfolgerung: Mit Hilfe der Fluoreszenz-Flowzytometrie am XE-5000 kann die toxische Granulation Neutrophiler Granulozyten in Form des GI-Index vollautomatisch und standardisiert quantifiziert werden. Der GI-Index bietet das Potential, die manuell-mikroskopische Methode zu ersetzen.

2.2 Publikation 2

Zimmermann M, Steenhuis P, Linssen J, Weimann A. Detection and Quantification of Hypo- and Hypergranulated Neutrophils on the New Sysmex XN Hematology Analyzer: Establishment of an Adapted Reference Interval for the Neutrophil-Granularity-Intensity Compared to XE-Technology in Adult Patients. *Clin Lab*, 2015;61:235-241; <http://dx.doi.org/10.7754/Clin.Lab.2014.140704>

Hintergrund: Markteinführungen neuer Analysegeräte machen in der Laboratoriumsmedizin regelmäßig Vergleichsmessungen zwischen verschiedenen Geräte-Generationen sowie die Etablierung neuer Referenzbereiche notwendig, damit die Methoden-Konstanz gewährleistet bleibt. Dies betrifft auch die Blutbildanalytik, die im medizinischen Routinelabor mit Hilfe eines Hämatologieautomaten durchgeführt wird. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Parameter der neuen XN-Serie der Firma Sysmex (Kobe, Japan) mit der bereits seit Jahren auf dem Markt befindlichen und gut etablierten XE-Serie desselben Herstellers verglichen. Ein Parameter war die *Neutrophil-Granularity-Intensity* (kurz: NEUT-GI) der XN-Serie, die mit dem korrespondierenden Parameter „NEUT-X“ der XE-Serie verglichen wurde. Sowohl aus NEUT-GI (XN-1000), als auch aus NEUT-X (XE-5000), kann der Granulationsindex berechnet werden, mit dessen Hilfe hypo- oder hypergranulierte Neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden können, die während einer Myelodysplasie oder bei entzündlichen Erkrankungen auftreten können.

Methoden: Insgesamt 789 Blutproben wurden zunächst auf einem Sysmex XE-5000 und unmittelbar anschließend auf einem Sysmex XN-1000 Hämatologieautomaten gemessen und jeweils die Parameter NEUT-X und NEUT-GI bestimmt (n=543 Blutproben stammten von verschiedenen Intensivstationen für Erwachsene; n=246 Blutproben stammten von erwachsenen und „Blut-gesunden“ Kontrollpatienten) sowie die korrespondierenden GI-Indizes für alle Proben für den XE-5000 und für den XN-1000 berechnet.

Ergebnisse: Die Ergebnisse der vorliegenden Studie verdeutlichten die dringliche Tatsache, dass die bisherigen Referenzintervalle für NEUT-X, die auf der XE-Hämatologieautomatengeneration im Einsatz waren, nicht mehr für die Bestimmung des NEUT-GI auf der XN-Gerätegeneration angewendet werden dürfen. In den vorgestellten Untersuchungen korrelierten die neuen (NEUT-GI) und die alten (NEUT-X) zellbasierten hämatologischen Parameter statistisch signifikant miteinander (r^2 : 0.6512; $p < 0.0001$), wobei die Messwerte für NEUT-GI im Vergleich zu NEUT-X sowohl in der Blut-gesunden Kontrollgruppe ($p < 0.0001$) als auch in den Patienten der Intensivstationen ($p < 0.0001$) statistisch signifikant höher waren. Die aus NEUT-GI bzw. aus NEUT-X berechneten GI-Indizes wiesen in beiden weiter oben beschriebenen Patientenkohorten und auf beiden Geräteplattformen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Hier ließ sich lediglich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Granulations-Indizes in der Gruppe der Patienten der Intensivstationen im Vergleich zur Blut-gesunden Kontrollkohorte ($p < 0.0001$) feststellen, mit statistisch signifikant höheren Messwerten des GI-Index für die Intensiv-Patienten. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den GI-Indizes beider Geräteplattformen bestand nicht.

Schlussfolgerung: Die vorliegende Studie hat die Wichtigkeit der Etablierung eines eigenen Referenzintervalls für den neuen zellbasierten Biomarker NEUT-GI auf einem Hämatologieautomaten der XN-Serie gezeigt: das 95% Referenzintervall betrug 140.91 - 160.46 channels für NEUT-GI und 129.20 - 142.33 channels für NEUT-X. Die aus NEUT-GI und NEUT-X berechneten GI-Indizes zeigten auf den beiden Geräte-Plattformen und in beiden weiter oben beschriebenen Kohorten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

2.3 Publikation 3

Hoffmann C, Hoffmann P, **Zimmermann M**. Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers. *Clin Chem Lab Med*, 2015;53(4):541-547; <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2014-0482>

Hintergrund: Der schnelle und valide Nachweis einer hochgradigen Entzündungsreaktion stellt nach wie vor eine große laboratoriumsmedizinische und klinisch-diagnostische Herausforderung dar. Die komplexen molekularen Prozesse, die sich während Akuter Phase Reaktionen abspielen, bieten eine Reihe an Möglichkeiten, um neue diagnostisch geeignetere Biomarker auf ihren Einsatz in der Laborroutine hin zu untersuchen. Eine zeitnahe Diagnosestellung führt zu einer frühzeitig einsetzenden Therapie und dies ist insbesondere bei Patienten mit schweren Entzündungsreaktionen essentiell für den weiteren Erkrankungsverlauf und die Prognose. In der vorliegenden Studie wurde die Dynamik von vier etablierten und zwei neuen zellbasierten hämatologischen Biomarkern während des Beginns und des Abklingens einer hochgradigen Entzündungsreaktion untersucht.

Methoden: In der hier vorliegenden retrospektiven Studie wurden die Konzentrationen der beiden klassischen Akute Phase Proteine C-reaktives Protein (CRP) und Procalcitonin (PCT), die absoluten Leukozyten- und Thrombozytenzahlen sowie die beiden neuen und zellbasierten Biomarker Granulationsindex (GI-Index) und Delta-Hämoglobin (Delta-He) im Blut von Patienten, bei denen eine Entzündungsdiagnostik durchgeführt wurde, bestimmt. Die Größe des Ausgangspatientenkollektivs umfasste insgesamt Daten von 53968 Patienten. Die Messwertverläufe der sechs oben beschriebenen Laborparameter wurden in dieser Studie zu Beginn und während des Abklingens einer hochgradigen Entzündungsreaktion mit Hilfe der sogenannten „*locally weighted scatter plot smoothing method*“ berechnet.

Ergebnisse: Obwohl sehr häufig klinische Entscheidungen an die Höhe der Gesamt-Leukozytenzahl geknüpft werden, überschritt die absolute Leukozytenzahl während des gesamten Messzeitraums zu keiner Zeit einer hochgradigen Entzündungsreaktion den entsprechenden Referenzbereich. Hingegen fiel die absolute Thrombozytenzahl wenige Stunden nach Entstehung einer schweren Akute Phase Reaktion unter den unteren Referenzbereich ab. Der neue zellbasierte Biomarker GI-Index überschritt wenige Stunden nach Beginn einer hochgradigen Entzündungsreaktion den oberen Grenzbereich. Das Delta-Hämoglobin erschien insgesamt besser geeignet zur Detektion des Abklingens einer hochgradigen Entzündungsreaktion als für deren Entstehung.

Schlussfolgerung: In der vorliegenden Studie konnten die Messwertverläufe von vier klassischen und zwei zellbasierten neuen Biomarkern zur Diagnostik einer hochgradigen Entzündungsreaktion untersucht werden. Hierbei war es möglich, die einzelnen Parameter vom frühesten Zeitpunkt ab Diagnosestellung bis hin zu einem *follow-up* von 168 Stunden nachzuverfolgen. Neben den etablierten labormedizinischen Entzündungsanalyten wie PCT, CRP, der Gesamt-Leukozytenzahl und der absoluten Thrombozytenzahl lieferten die beiden neuen zellbasierten Marker GI-Index und Delta-Hämoglobin wichtige und zusätzliche Information zur Entstehung, Ausbreitung, Prognose und zum Abklingen einer hochgradigen Entzündungsreaktion im peripheren Blut.

2.4 Publikation 4

Weimann K, Zimmermann M, Spies CD, Wernecke KD, Vicherek O, Nachtigall I, Tafelski S, Weimann A. Intensive Care Infection Score - A new approach to distinguish between infectious and noninfectious processes in intensive care and medicosurgical patients. *J Int Med Res*, 2015;43(3):435-451; <http://dx.doi.org/10.1177/0300060514557711>

Hintergrund: Das rechtzeitige und zuverlässige Erkennen einer Sepsis stellt eine interdisziplinäre und große diagnostische Herausforderung für alle Arztgruppen dar. Bedingt durch den Mangel an geeigneten singulären Biomarkern sowie spezifischen klinischen Untersuchungsverfahren erfolgt die Diagnosestellung „Sepsis“ häufig erst mit einer deutlichen zeitlichen Verzögerung, was für den betroffenen Patienten schnell lebensbedrohlich werden kann, da dies konsekutiv auch die (dann verspätete) Einleitung entsprechender therapeutischer Interventionen (z.B. Antibiose) betraf. Die vorliegende Studie untersuchte die Fähigkeit des *Intensive Care Infection Score* (ICIS-Score), einer neuen zellbasierten Multiplex-Analytik mittels eines Hämatologieautomaten, zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Prozessen im peripheren Patientenblut zu unterscheiden. Aus den gesammelten Daten war es retrospektiv möglich, den Sinn und Nutzen der jeweils verabreichten antibiotischen Therapie entsprechend der *actual best practice* des beteiligten Krankenhauses (Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin) sowie die diagnostische *Power* der entsprechend untersuchten Laborparameter zur Sepsisdiagnostik (PCT, CRP, Differentialblutbild mit Retikulozytenzahl und hieraus berechneter *ICIS-Score*) rational zu beurteilen.

Methoden: Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine retrospektive Observationsstudie, die an Patienten einer Intensivstation der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt wurde. An den in dieser Studie eingeschlossenen Patienten wurden dreimal täglich zum einen klinisch-symptomatische Daten (Puls, Blutdruck, Temperatur, Atemfrequenz, etc.) erhoben, zum anderen wurde Blut abgenommen (ebenfalls dreimal täglich) zur Bestimmung von Laborparametern für die Diagnostik und Verlaufskontrolle einer schweren Akute Phase Reaktion/systemischen Infektion (CRP, PCT sowie ein Differentialblutbild einschließlich Bestimmung der Retikulozytenzahl und Berechnung des *ICIS-Score*). Die in dieser retrospektiven Observationsstudie untersuchte Studienkohorte wurde in eine infizierte und in eine nicht-infizierte Patientengruppe unterteilt.

Ergebnisse: In dieser Studie wurde ein neuer zellbasierter Multiplexparameter (*ICIS-Score*) mit bereits etablierten Biomarkern (CRP, PCT, Gesamt-Leukozytenzahl) zur Diagnose einer Sepsis sowie zum therapeutischen Monitoring einer antibiotischen Therapie an 172 Patienten (72 dieser Patienten waren unmittelbar postoperativ) einer Intensivstation verglichen. Im untersuchten Patientenkollektiv hatte der *ICIS-Score* innerhalb der ersten 5 Tage den höchsten prädiktiven Wert für die Vorhersage einer Infektion in „allen Patienten“ und in den „postoperativen Patienten“. Bei einem cut-off Wert von 3.0 betrug die Sensitivität und die Spezifität des *ICIS-Scores* für die Diagnose einer Infektion in postoperativen Patienten 82,9% bzw. 75,1%.

Schlussfolgerung: Der *ICIS-Score* ist im Hinblick auf die Sensitivitäten und Spezifitäten zur Diagnostik einer Infektion in den postoperativen Patienten einer Intensivstation den herkömmlichen Entzündungsmarkern PCT, CRP und der Gesamt-Leukozytenzahl überlegen. Zusätzlich ist es mit Hilfe des *ICIS-Scores* möglich, Antibiotikagaben zu rationalisieren. Betrachtet man die Messwerte des *ICIS-Score*, so ist die Rate an nicht indizierten Antibiosen in nicht-infektiösen Patienten bzw. fälschlicherweise unterlassenen Antibiosen in septischen postoperativen Patienten im Vergleich zum CRP, PCT und der Gesamt-Leukozytenzahl am geringsten.

2.5 Publikation 5

Weimann A, Cremer M, Hernaiz-Driever P, **Zimmermann M**. Delta-He, Ret-He and a new diagnostic plot for differential diagnosis and therapy monitoring of patients suffering from various disease-specific types of anemia. *Clin Lab*, 2016;62(4):667-677; <http://dx.doi.org/10.7754/Clin.Lab.2015.150830>

Hintergrund: Das sogenannte Delta-Hämoglobinäquivalent (Delta-He) ist ein neuer und zellbasierter hämatologischer Biomarker der roten Zellreihe, der eine verminderte Hämoglobinisierung neu gebildeter Retikulozyten im Vergleich zu ausgereiften Erythrozyten anzeigt und seinen Einsatz unter anderem in der Anämiediagnostik findet. Eine verminderte Hämoglobinisierung neu gebildeter Retikulozyten kann u.a. bei (nicht therapierten) inflammatorischen Prozessen im Rahmen von onkologischen, rheumatisch-entzündlichen oder infektiösen Erkrankungen vorkommen. In dieser Studie wurde das Konzept eines neuen labordiagnostischen Plots (der sog. „Häma-Plot“) vorgestellt. Der Häma-Plot stellt auf der y-Achse das Retikulozytenhämoglobinäquivalent (Ret-He) als Marker der funktionellen Eisenversorgung des Körpers dar und auf der x-Achse das Delta-He. Die Messwerte für beide Parameter werden graphisch als Punkt im Häma-Plot dargestellt. Da beide Analyte über eine relativ rasche Kinetik verfügen, ist der Häma-Plot gut für das therapeutische Monitoring, für eine Compliance- und Therapiesuffizienzprüfung, aber auch für die Differentialdiagnostik von Anämien geeignet.

Methoden: Für diese Studie wurde von insgesamt 345 Patienten am Sysmex XN-9000 ein Blutbild inklusive Retikulozytenzahlbestimmung angefertigt. Abgesehen von zwei „Blut-gesunden“ Kontrollkohorten wies das untersuchte Patientenkollektiv verschiedene erkrankungsspezifische Anämieformen auf: „Blut-gesunde“ Neugeborene (n=23) und „Blut-gesunde“ Erwachsene (n=30) (jeweils als gesunde Kontrollkohorte), Patienten mit einer Anämie bei chronischer Erkrankung (anemia of chronic disease = ACD) bedingt durch unterschiedliche onkologische oder chronisch-entzündliche Erkrankungen (insgesamt n=138), davon waren n=65 unter erkrankungsspezifischer Therapie sowie n=73 ohne Therapie (Primärdiagnose), Patienten mit Thalassämie und/oder Hämoglobinopathie n=18, Patienten mit Eisenmangelanämie (Eisenmangelanämie = IDA) n=35, Patienten mit einer Kombination aus ACD und IDA (n=17), sowie Patienten mit Sepsis (insgesamt n=83), die entweder therapiert n=32 wurden oder noch keine Therapie n=51 erhalten hatten (Primärdiagnose). Für die einzelnen Patientengruppen wurden jeweils die Messwerte für Ret-He, Delta-He und das C-reaktive Protein (CRP) bestimmt und statistisch miteinander verglichen.

Ergebnisse: Die Analyse der Messwerte für das Delta-He ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kontrollkohorten der Blut-gesunden Neugeborenen und der Blut-gesunden Erwachsenen ($p < 0.05$). Für die Messergebnisse des Delta-He zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der ACD- und der ACD/IDA-Kohorte gegenüber der IDA-Kohorte ($p < 0.05$). Die ACD-Kohorten können mittels Delta-He von der IDA-Kohorte separiert werden. Zusätzlich zeigten alle drei untersuchten Biomarker statistisch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Patientengruppen mit und ohne Therapie, die an einer ACD, ACD/IDA oder an einer Sepsis erkrankt waren ($p < 0.05$).

Schlussfolgerungen: Das Delta-He ist der erste zellbasierte Biomarker der roten Zellreihe, der in der Lage ist, eine ACD bzw. ACD/IDA von einer normalen IDA abzugrenzen. Mit Hilfe des Delta-He lassen sich folglich insbesondere inflammationsbasierte Anämieformen sensitiver diagnostizieren. Der Häma-Plot erlaubt die Differentialdiagnostik verschiedener Anämieformen, insbesondere von entzündlich bedingten Anämien. Zusätzlich eröffnet sich mit dem Häma-Plot neben dem bereits etablierten Ferritin-Index Plot eine weitere Option zur Therapie-/Verlaufskontrolle und zur Überprüfung der Patienten-Compliance bzw. Therapie-Suffizienz.

2.6 Publikation 6

Zimmermann M, Otto C, Gonzalez JG, Prokop S, Ruprecht K. Cellular origin and diagnostic significance of high-fluorescent cells in cerebrospinal fluid detected by the XE-5000 hematology analyzer. *Int Jnl Lab Hem*, 2013;35:580-588; <http://dx.doi.org/10.1111/ijlh.12090>

Hintergrund: Moderne Hämatologieautomaten zählen und prädiffenzieren neben dem eigentlichen Blutbild mittlerweile auch Zellen in diversen Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Liquor, Aszites, Pleura- oder Gelenkpunktaten. Hierbei kommt als Messmethode die Fluoreszenz-Flowzytometrie zum Einsatz. Der XE-5000 ist ein entsprechender Hämatologieautomat und es werden im Rahmen der Zellzählung bzw. der zellulären Prädiffenzierung von Körperflüssigkeiten neben der Gesamt-Leukozytenzahl im untersuchten Material polymorphnukleäre (PMN), mononukleäre (MN) und hochfluoreszierende (HFC) Zellen unterschieden und quantifiziert (absolut und relativ). Bislang war das morphologische zelluläre Korrelat der HFC im Liquor unbekannt. Ein Charakteristikum hochfluoreszierender Zellen ist ihr hoher Gehalt an Nukleinsäuren. Hieraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass mit Hilfe des neuen und zellbasierten Parameters HFC möglicherweise vollautomatisch intrathekale Tumorzellen nachgewiesen werden könnten. In der vorliegenden Studie wurden Liquores auf die prädominierende Zellklasse der HFC hin untersucht, um Aussagen zur diagnostischen Signifikanz des Auftretens von hochfluoreszierenden Zellen im Liquor tätigen zu können.

Methoden: Als national und international akzeptierter Goldstandard für den Nachweis intrathekaler Tumorzellen zählt die manuelle Mikroskopie von Zytospinpräparaten. Auf diese Weise können sehr sensitiv und spezifisch Tumorzellen in Liquorpräparaten nachgewiesen werden. Die Messergebnisse von Liquoruntersuchungen des XE-5000 wurden im Hinblick auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit von HFC mit den Ergebnissen der manuellen Mikroskopie von Zytospinpräparaten in 65 tumorzell-positiven und 126 tumorzell-negativen Liquores miteinander verglichen.

Ergebnisse: Mit Hilfe des Hämatologieautomaten XE-5000 konnten HFC in 51 von 65 wirklich tumorzell-positiven sowie in 33 von 126 wirklich tumorzell-negativen Liquorproben nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Sensitivität von 78,5% und einer Spezifität von 73,8% (positive likelihood ratio: 3.0, negative likelihood ratio: 0.29). Die Prozentzahlen von hochfluoreszierenden Zellen, gemessen durch den XE-5000, und Tumorzellen, nachgewiesen in der manuellen Mikroskopie, korrelierten im Liquor ($r^2 = 0.41$, $P < 0.0001$). Der XE-5000 war insbesondere in Liquores mit einer sehr geringen Anzahl an Tumorzellen nicht in der Lage, diese suffizient nachzuweisen.

Schlussfolgerung: Das ganz überwiegende morphologisch-zelluläre Korrelat der HFC im Liquor sind in der Tat Tumorzellen. Klar einschränkend muss jedoch betont werden, dass die für den XE-5000 erreichte Sensitivität und Spezifität darauf schließen lässt, dass der neue und zellbasierte Biomarker HFC kein geeigneter Analyt ist, um sicher und valide das Vorhandensein von Tumorzellen in Liquorproben nachzuweisen oder auszuschließen. Sollten mittels XE-5000 inzidentell HFC in einer Liquorprobe nachgewiesen werden und es ist explizit keine zusätzliche zytomorphologische Untersuchung von Zytospinpräparaten dieser Probe angefordert, so sollte sich zwingend eine mikroskopische liquorzytologische Analytik anschließen. Die Anfertigung von Zytospinpräparaten kann hierbei mit Hilfe spezieller Algorithmen direkt aus dem Laborinformationssystem heraus ausgelöst werden, sofern genügend Material und medizinisch-technische Fachkenntnisse vorhanden sind.

3. Diskussion

3.1 Der Granulationsindex: ersetzt eine automatisierte Methode die Mikroskopie?

Der Nachweis und die Quantifikation von toxisch granulierten Neutrophilen (TGNs) im Blutaussstrich mit Hilfe der manuellen Mikroskopie sind subjektiv, da dieses Verfahren u.a. vom Erfahrungsschatz des Untersuchers und der Qualität von Ausstrich und Färbung abhängt. Folglich ist bei dieser Untersuchungsmethode mit einer hohen interindividuellen Varianz zu rechnen. Im Rahmen der in dieser Habilitationsschrift vorgestellten eigenen Forschungsarbeit fiel auf, dass insbesondere die semiquantitative Differenzierung zwischen „++“ („stark positiv“) und „+++“ („sehr stark positiv“) größere Schwierigkeiten bereitete, so dass auch bei mikroskopischer Nachweis von „vielen“ toxisch granulierten Neutrophilen tendenziell eher ein „++“ angegeben wurde (14). Im Gegensatz zur semiquantitativen Analytikmethode der manuellen Mikroskopie ist die Bestimmung des Granulationsindex ein objektiver, standardisierter und vollautomatischer Messprozess mit Hilfe der Hämatologieautomaten der XE- und XN-Serie der Firma Sysmex. Der Nachweis von hypergranulierten Neutrophilen mit Hilfe des Hämatologieautomaten korreliert ausgesprochen gut mit dem Auftreten von TGNs im Blut bzw. im Blutaussstrich. Diese Beobachtung spiegelte sich auch in den ROC-Kurven des GI-Index wider, die im Vergleich zur manuell-mikroskopischen Methode eine bessere Sensitivität und Spezifität aufwiesen (14).

Um Aussagen zur Kinetik des GI-Index treffen zu können, wurden Blutproben von n=40 „Blutgesunden“ Patienten *in-vitro* mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) inkubiert, um auf diese Weise eine bakterielle Infektion zu simulieren. Diese *in-vitro* Experimente ließen eine rasche Änderung der Granulation von TGNs innerhalb von 30 Minuten nach Inkubation der Blutproben mit LPS erkennen. Bedingt durch den Effekt des zugesetzten LPS kam es initial zu einer Degranulation der Neutrophilen durch Freisetzung der Inhalte der Granula mit einem nachfolgenden Abfall des GI-Index in den negativen Bereich. Nach 90 Minuten waren die zytosolischen Reserven der Neutrophilen mit toxischen Granulationen wieder aufgefüllt, nach 180 Minuten stellte sich sogar eine *Hypergranulation* der Neutrophilen ein mit positiven Messwerten des GI-Index von +1. *In-vivo* zeigte der GI-Index etwa einen Tag früher Änderungen des „entzündlichen Status“ bei Patienten mit einer bakteriellen Infektion an als der etablierte Entzündungsmarker CRP (14). Die Daten der hier vorgestellten Forschungsarbeit belegen, dass der GI-Index insgesamt über einen „dynamischeren“ Verlauf und früheren Anstieg als das CRP verfügt. CRP steigt *in-vivo* im Rahmen einer Inflammation erst innerhalb von 24-48 Stunden signifikant an (57).

Den beiden Erstbeschreibern des Phänomens der toxischen Granulation von Neutrophilen, Kugel & Rosenthal, fiel auf, dass TGNs nur bei bakteriellen Infektionen im Blut auftraten (12).

Interessanterweise fanden sich in unserer Studie keine TGNs im Blut von Patienten mit SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), folglich ist bei diesen Patienten auch der GI-Index nicht erhöht, sondern liegt im Normbereich. Hieraus kann gefolgert werden, dass, abgesehen von der unterschiedlichen zeitlichen Latenz, mit der die CRP-Konzentration und der GI-Index bei inflammatorischen Prozessen ansteigen, nicht bei allen Erkrankungen mit einer Erhöhung des GI-Indexes zu rechnen ist, die einen CRP-Anstieg bedingen. Ob die Messwerte für CRP und den GI-Index korrelieren, hängt entscheidend von der Zusammensetzung der gewählten Kohorte ab: in einer zufällig gewählten Patientengruppe mit einem hohen Anteil an bakteriellen Infektionen bzw. einer Sepsis betrug die Korrelation zwischen GI-Index und CRP $r_s=0.836$, während die Korrelation beider Laborparameter in einer Gruppe postoperativer Patienten einer Intensivstation mit gemischten inflammatorischen Erkrankungen nur bei $r_s=0.177$ lag.

Zusammengefasst ist der GI-Index in der Lage, die toxische Granulation von Neutrophilen im Blut von Patienten mit inflammatorischen bzw. bakteriell induzierten Erkrankungen sensitiv zu detektieren und zu quantifizieren. Hierbei korreliert der GI-Index mit dem Auftreten von TGNs im Blutaussstrich von Patienten mit bakteriell induzierten, entzündlichen Erkrankungen. Im Gegensatz zur semiquantitativen manuell-mikroskopischen Bestimmung von TGNs handelt es sich beim GI-Index um einen standardisierten und mittels Hämatologieautomat vollautomatisch bestimmten, zellbasierten Laborparameter, der täglich rund um die Uhr sehr schnell als Bestandteil eines Differentialblutbildes bestimmt werden kann (innerhalb von einer Minute). Der GI-Index verfügt über das Potential, in der Differentialdiagnostik entzündlicher Erkrankungen eingesetzt zu werden und kann die arbeits-intensive, semiquantitative und subjektive manuell-mikroskopische Quantifikation von TGNs im Blutaussstrich ablösen (14).

3.2 Der GI-Index im Methodenvergleich: Etablierung eines Referenzbereichs für die XN-Serie

Die Neueinführung von Analytikgeräten in der Laboratoriumsmedizin bedingt umfangreichere Vergleichsmessungen zwischen alten und neuen Automatengenerationen, um auch weiterhin eine Methoden-/Analytik Konstanz für die Diagnostik zu gewährleisten. In den Hämatologieautomaten der neuen XN-Generation der Firma Sysmex kommen im Gegensatz zur älteren XE-Serie Reagenzien und Algorithmen zum Einsatz, die optimiert wurden, um eine verbesserte Separierung der einzelnen leukozytären Zellpopulationen im WDF (*white differential*) Scattergramm zu erreichen. Aus diesem Grund stellte sich die Frage nach der Vergleichbarkeit eines zellbasierten und Neutrophilen-assoziierten Blutbild-Parameters, der auf beiden Geräte-Plattformen gemessen werden kann (NEUT-GI auf dem XN: *Neutrophil-*

Granularity-Intensity / NEUT-X auf dem XE-5000: *Neutrophil X*, bzw. des aus beiden Analyten auf beiden Plattformen berechneten GI-Index). Aus diesem Grund wurde für den Analyten NEUT-GI am XN-Hämatologieautomaten ein Methodenvergleich mit einem Analytikgerät der XE-Serie durchgeführt, um NEUT-X und NEUT-GI in einem gesunden Kontrollkollektiv (n=246) sowie in einem Kollektiv schwerstkranker Patienten einer Intensivstation (n=543) miteinander zu vergleichen und einen eigenständigen Referenzbereich für NEUT-GI auf dem XN zu etablieren. Zusätzlich wurde aus den Messwerten für NEUT-X und NEUT-GI der jeweilige GI-Index berechnet, um auch mit der neuen XN-Plattform präzise und valide Testresultate für den GI-Index anbieten zu können.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte lineare Regressionanalyse der Messwerte zeigte zwar eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern NEUT-GI und NEUT-X, allerdings ließ die moderate Korrelation (r^2 : 0.6512) analytisch bedingte Unterschiede zwischen beiden Parametern vermuten. Die Messwerte für NEUT-GI auf dem XN waren sowohl in der gesunden Kontrollgruppe, als auch in der Kohorte der schwerstkranken Patienten der Intensivstation signifikant höher im Vergleich zu den Messwerten für NEUT-X auf dem XE-5000. Die höheren Messwerte für NEUT-GI auf der XN-Plattform liessen sich durch die höhere Menge des aufgefangenen Seitwärts-Streulichts (SSC: *side-scattered light*) der Neutrophilen-Population im WDF Scattergramm des XN erklären, aus denen der NEUT-GI berechnet wird. Diese wiederum können durch die optimierten Reagenzien erklärt werden, die eine präzisere Trennung der einzelnen weißen Zellpopulationen der Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen auf dem XN erlauben. Die dargestellten Differenzen zwischen NEUT-X und NEUT-GI stützen die Hypothese, dass sich die Nachweismethoden mittels SSC auf beiden Geräteplattformen deutlicher voneinander unterscheiden und unterstreichen den Bedarf eines eigenen Referenzbereichs für NEUT-GI auf der XN-Plattform. Das 95% Referenzintervall lag für NEUT-GI bei 140,91 - 160,46 channels und für NEUT-X bei 129,20 - 142,33 channels. Die in unserer Studie detektierten Normwerte für NEUT-X entsprachen bereits früher publizierten Werten (15, 16). Der Grund, dass sich die Messwerte für NEUT-X und NEUT-GI insbesondere in der Kohorte der schwerkranken Patienten (Intensivstation) deutlicher voneinander unterschieden war vermutlich der, dass hier Patienten sowohl mit hypo- als auch mit hypergranulierten Neutrophilen vorhanden waren.

Aus den erhobenen Messwerten für NEUT-X und NEUT-GI wurde der jeweilig korrespondierende GI-Index berechnet, welcher für den klinisch-diagnostischen Umgang leichter zu nutzen ist (Messwerte des GI-Index unterhalb von -2,0 bedeuten hierbei *Hypogranulation* bzw. niedrige intrazelluläre Granularität, Messwerte oberhalb von +2,0 bedeuten *Hypergranulation* bzw. hohe intrazelluläre Granularität). Im Gegensatz zu den Messwerten für NEUT-X und NEUT-GI entsprachen die berechneten GI-Indizes für beide Patienten-Kohorten auf beiden Geräteplattformen einander. Interessanterweise zeigten rund

80% der schwerkranken Patienten „normale“ GI-Indizes im Bereich zwischen -2,0 und +2,0. Zu vermuten ist, dass diese Patienten weder unter einer bakteriell induzierten Infektion litten, noch an einer Myelodysplasie erkrankt waren (GI-Index größer 2,0 in der Kontrollgruppe: 3.2%; in der Intensivkohorte: 17%; GI-Index kleiner -2,0 in der Kontrollgruppe: 2.4%; in der Intensivkohorte: 2.9%). Beide in dieser Arbeit untersuchten Hämatologieautomaten berechneten für die GI-Indizes in der Kohorte mit den schwerkranken Patienten statistisch signifikant höhere Werte als für die gesunden Patienten in der Kontrollgruppe ($p < 0.0001$). Dieses Phänomen ist bereits in einer anderen, eigenen wissenschaftlichen Arbeit von uns beschrieben worden und möglicherweise dadurch zu erklären, dass schwerkranke Patienten einer Intensivstation häufiger an entzündlichen Erkrankungen bzw. an einer Akute Phase Reaktion leiden, die potentiell zu einer Hypergranulation der Neutrophilen führen kann, und die sich somit von der anderen, „gesünderen“ Patientengruppe unterscheiden (14).

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnte ein neuer und eigener Referenzbereich für NEUT-GI auf der XN-Serie bestimmt werden, so dass der GI-Index auch zukünftig auf der neuen hämatologischen Geräteplattform eine schnelle und präzise Quantifikation dysplastischer oder inflammatorischer Prozesse im hämatologischen Routinelabor erlaubt.

3.3 Differentialdiagnostik entzündlicher Erkrankungen mit Hilfe des Delta-He

Die hier vorgestellte wissenschaftliche Arbeit beschäftigte sich mit der Dynamik von vier bereits etablierten Markern zur Entzündungsdiagnostik sowie von zwei neuen zellbasierten Biomarkern, die ebenfalls im Rahmen einer Entzündungs- und Anämiediagnostik zum Einsatz kommen. Mit Hilfe einer umfangreichen Datenextraktion aus dem Laborinformationssystem war es möglich, die Verläufe der sechs Biomarker über eine Zeitspanne von bis zu 168 Stunden zu verfolgen. Die CRP-Konzentrationen dienten mit Hilfe der einschlägig publizierten Referenzbereiche sowohl als Einschlusskriterium für diese Studie, als auch zur Charakterisierung des „Inflammationsstatus“ der Patienten. Die Zeitverläufe für Procalcitonin (PCT) zeigten im Blut von Patienten mit einer Entzündungsreaktion ähnliche Ergebnisse, wie sie bereits in anderen publizierten Studien nachgewiesen werden konnten (58, 59): in diesem Zusammenhang ist festzustellen, dass die Sensitivität und die Spezifität von Procalcitonin zur Detektion insbesondere einer bakteriellen Infektion, einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks derjenigen des CRP überlegen ist. Betrachtete man das hier untersuchte Studienkollektiv aus der Charité - Universitätsmedizin Berlin, so fiel auf, dass der Analyt Procalcitonin deutlich seltener angefordert wurde als das CRP. Die Gründe hierfür sind vermutlich die höheren Analytikskosten für die PCT-Bestimmung.

Neben der Anforderung von CRP enthielten alle im Rahmen dieser Studie betrachteten Laboranforderungen auch ein Differentialblutbild mit Retikulozytenmessung, damit waren auch die Messwerte der beiden neuen zellbasierten Biomarker Delta-He und GI-Index verfügbar. Weiterhin ist die Kenntnis der Thrombozyten- und Leukozytenzahlen von Interesse, da es ein bekanntes Phänomen ist, dass es bei einer hochgradigen Entzündung zu einer Thrombozytopenie im Blut kommen kann. Diese ist u.a. bedingt durch eine gesteigerte Aktivierung der Gerinnung im Rahmen pro-inflammatorischer Prozesse sowie durch die mögliche Freisetzung von Enzymen bei einer gesteigerten Zell-Lyse sowie einer erhöhten *Clearance* von Thrombozyten mit Hilfe des *Ashwell* Rezeptors auf Hepatozyten (60, 61).

Bereits mehrfach wurde publiziert, dass es sich beim Vorliegen einer Leukozytose oder einer Leukopenie um sehr unspezifische Befunde handelt, dennoch gelten beide Phänomene allgemein hin als wichtiges diagnostisches Kriterium für eine hochgradige Entzündungsreaktion (62). In der vorliegenden Forschungsarbeit trat die diagnostische Limitation einer Bestimmung der Leukozytenzahl deutlich hervor: eine große Anzahl der untersuchten Patienten mit einer hochgradigen Entzündungsreaktion wies Leukozytenzahlen innerhalb des Referenzbereichs auf. Ähnliches konnten Bates et al. feststellen und publizieren: mit Hilfe einer schrittweisen logistischen Regressionsanalyse gelang diesen Kollegen der Nachweis, dass weder eine Leukozytose, noch eine Leukopenie das unabhängige hämatologische Laborkorrelat einer richtig-positiven Blutkultur mit Nachweis einer bakteriellen Erregers war (63). Eine andere Arbeitsgruppe um Jekarl et al. bestimmten eine AUC im Rahmen einer ROC-Analyse von 0.62 für die Leukozytenzahl zur Diagnostik einer bakteriellen Infektion und 0.54 zur Diagnostik einer schweren Sepsis bzw. eines septischen Schocks (64).

Hierdurch entstand die Idee zu prüfen, ob nicht anstatt der absoluten Leukozytenzahl vielmehr die Leukozytenfunktion ein besserer Parameter zur Detektion einer hochgradigen Entzündungsreaktion sein könnte. Aus diesem Grund erfolgte die Datenanalyse für die Messwerte des Granulationsindex in der o.g. Patientenkohorte. *In-vitro* Experimente zur Kinetik des GI-Index haben in einer anderen, eigenen Arbeit gezeigt, dass es unmittelbar nach einer Stimulation mit LPS zunächst zu einer Degranulation der Neutrophilen kam, gefolgt von einer Hypergranulation nach 180 Minuten (14). Die Beobachtungen aus den *in-vitro* Experimenten wurden durch die *in-vivo* Befunde an den Patienten der vorliegenden Studie gestützt: innerhalb der ersten Stunden nach Einsetzen einer hochgradigen Entzündungsreaktion (=Anstieg des CRP, klinische Symptomatik) und nach Beginn des Monitorings im Routinelabor überschritt der GI-Index den oberen Referenzbereich (14).

Das Delta-Hämoglobin, das als zellbasierter Biomarker der Retikulozyten den Hämoglobinierungsgrad neu gebildeter Retikulozyten im Vergleich zu reifen Erythrozyten darstellt, zeigte in der untersuchten Patientenkohorte im Verlauf eine etwas langsamere

Kinetik als der GI-Index. Bevor es zu einer Änderung des Delta-Hämoglobins kam, wurde zunächst die Hämoglobinsynthese durch die entzündungsinduzierte Eisensequestration vermindert. Erst dann führte die langsam wachsende Population von hypochromen Retikulozyten gegenüber den normochromen Erythrozyten zu einer Negativierung des Delta-Hämoglobins (22). Sollten sowohl die Retikulozyten als auch die Erythrozyten bereits hypochrom sein, wie es beispielsweise bei einer für längere Zeit persistierenden und nicht therapierten ACD der Fall sein kann, so kann keine statistisch signifikante Abnahme des Delta-Hämoglobins mehr erfolgen. In der Tat zeigten Patienten mit einer bereits länger bestehenden inflammationsbasierten und untherapierten ACD im untersuchten Patientenkollektiv keine signifikanten Änderungen des Delta-Hämoglobins mehr. Es könnte sein, dass genau diese Patienten mit protrahierter ACD möglicherweise medizinisch insuffizient therapiert wurden (z.B. Resistenz/Therapieversagen bei Antibiose und hierdurch protrahierte Aufrechterhaltung der Akute Phase Reaktion). Der neue zellbasierte Biomarker Delta-Hämoglobin erschien an dieser speziellen Patientengruppe folglich als geeigneterer Marker zur Erfassung des Abklingens einer hochgradigen Entzündungsreaktion als für deren Beginn (22).

Zusammengefasst liefern die neuen und zellbasierten Biomarker Delta-Hämoglobin und GI-Index wichtige und zusätzliche Informationen bei Patienten mit einer hochgradigen Entzündungsreaktion, wobei der GI-Index bei Überschreitung des oberen Referenzwertes eine Hypergranulation der Neutrophilen anzeigte, die charakteristischerweise bei bakteriellen Infektionen auftritt und das Delta-He insbesondere geeignet war, um das Abklingen einer Akute Phase Reaktion zu erfassen. Da die Diagnosestellung und das Therapie-/Verlaufsmonitoring von Patienten mit einer hochgradigen Entzündungsreaktionen häufig eine hochfrequente und parallele Bestimmung einer Vielzahl an Markern erforderlich macht, könnten die beiden neuen Analyte Delta-Hämoglobin und GI-Index, die sehr schnell und kosteneffektiv im Rahmen der Blutbildanalytik bestimmt und quantifiziert werden können, in das notwendige Untersuchungspanel integriert werden.

3.4 Monitoring mit dem *Intensive Care Infection Score (ICIS-Score)*

Die schnelle und präzise Diagnostik einer systemischen bakteriellen Infektion (Sepsis) zählt zu den großen Herausforderungen für alle ärztlichen Fachbereiche (65). Retrospektiv betrachtet existieren viele Studien, die diverse Biomarker auf ihre diagnostische Tauglichkeit hin untersucht haben. Momentan erfüllt allerdings kein einzelner Biomarker das nötige Maß an Sensitivität und Spezifität, um eine sichere, reliable und definitive Sepsis-Diagnose stellen zu können (66). In diesem Zusammenhang liegt die Vermutung nahe, dass die Bestimmung mehrerer Analyte in einer einzigen Untersuchung (eine sogenannte „Multiparameter-

Diagnostik“) zielführender sein könnte. Kürzlich wurde erstmals der *Intensive Care Infection Score* (ICIS-Score) beschrieben und publiziert, bei dem es sich um einen zellbasierten Multiplex-Parameter handelt (67). Die Einzelanalyte, aus denen sich der ICIS-Score zusammensetzt, repräsentieren sowohl Zellen und Funktionen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems und bilden die erste Immunantwort des menschlichen Organismus bei Entzündungen oder Infektionen. Die untersuchten Parameter setzen sich aus der Quantifikation der Aktivierung von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten im Rahmen Akuter Phase Reaktionen zusammen, sowie aus der Bestimmung von Aktivitätsmarkern des Knochenmarks im Hinblick auf die Produktion und Freisetzung unreifer Vorläuferzellen (z.B. unreife Granulozyten) und reifer Abwehrzellen (z.B. Neutrophile, HFLC, etc.) (67).

Es ist ein bereits bekanntes Phänomen, dass es nach einem chirurgischen Eingriff zu einem Anstieg der Messwerte von CRP sowie der Gesamt-Leukozytenzahl kommt, wobei insbesondere das CRP erst nach 48 Stunden sein Maximum erreicht (68-70). Zweifelsfrei spielt das C-reaktive Protein eine wichtige Rolle im Therapie- und Verlaufsmoitoring von Patienten mit Infektionen spielt. Die CRP-Konzentration korrelieren allerdings zumindest innerhalb der ersten drei Tage nach einem chirurgischen Eingriff *nicht* mit dem Auftreten einer Infektion, so dass der Routineeinsatz einer CRP-Bestimmung innerhalb dieses Zeitfensters an post-operativen Patienten nicht empfohlen werden kann, es sei denn, hierfür besteht eine ganz besondere klinische Indikation (71). Erhöhte Konzentrationen an Procalcitonin korrelierten in früheren Studien mit dem Auftreten einer systemischen Inflammation ohne Anzeichen einer Infektion (72, 73). Betrachtet man die Verlaufskinetik von Procalcitonin, so zeigte sich nach chirurgischen Eingriffen ein Anstieg mit einem Maximum nach 24-48 Stunden, ähnlich dem des CRP, allerdings erfolgte der Abfall der Procalcitonin-Messwerte in den Normbereich schneller als beim CRP (74).

Neben den „klassischen“ Entzündungsmarkern CRP, PCT und der Gesamt-Leukozytenzahl wurde in der vorliegenden wissenschaftlichen Studie auch der zellbasierte ICIS-Score als „Monitoring-Parameter“ dreimal täglich bestimmt. Der Vorteil der ICIS-Score Bestimmung liegt darin, dass es sich um eine schnell und einfach durchzuführende Laboranalytik handelt, für die lediglich 150µL EDTA-Blut benötigt werden. Das Ergebnis liegt innerhalb von etwa einer Minute vor und ist zudem deutlich kostengünstiger als die Bestimmung von CRP oder PCT (67). Der Nachweis von CRP und Procalcitonin dauert, bedingt durch ihre entsprechenden Nachweismethoden, länger (bis zu 20 Minuten). Durch die vorliegende Forschungsarbeit konnte nachgewiesen werden, dass der ICIS-Score, der mit Hilfe eines vollautomatisierten Hämatologieautomaten bestimmt wurde (XE-5000), hinsichtlich der Diskrimination zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Patienten einer Intensivstation den momentan zur Diagnostik von entzündlichen/infektiösen Erkrankungen routinemäßig eingesetzten Laborparametern CRP, Procalcitonin und der Gesamt-Leukozytenzahl statistisch signifikant überlegen war.

Innerhalb der ersten fünf Tage auf der Intensivstation war der ICIS-Score in post-operativen Patienten der präziseste Marker zur Detektion einer lokalen bakteriellen Infektion und einer Sepsis im Vergleich mit CRP, Procalcitonin und der Gesamt-Leukozytenzahl. In dieser retrospektiven Observationsstudie gelang außerdem der Nachweis, dass der ICIS-Score in der Lage ist, die antibiotische Therapie von Intensivpatienten besser zu rationalisieren: in einer Kohorte nicht-infektiöser post-operativer Patienten hatte der ICIS-Score die niedrigste Rate an unnötig verabreichten (=nicht notwendigen) antiinfektiven Therapien. Umgekehrt war auch die Rate der nicht notwendigen, weil tatsächlich keine systemische Infektion vorlag, aber dennoch verabreichten Antibiosen in der (vermeintlich infektiösen) Kohorte, die mittels ICIS-Score überwacht wurde, am geringsten.

Ein detaillierter Vergleich der jeweiligen Gründe für die klinischen Entscheidungen *pro* oder *contra* einer antibiotische Therapie war in dieser Studie limitiert: es wurde entsprechend der Ergebnisse der mikrobiologischen Kultur, des klinischen Erscheinungsbildes und/oder der Ergebnisse der bildgebenden Diagnostik (Röntgenuntersuchung) therapiert, entsprechend der *best actual practice* der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Auf diese Weise waren mitunter Verzögerungen in der Diagnostik von bis zu 48 Stunden möglich. Außerdem befanden sich in den untersuchten Studienkohorten keine Fälle, in denen die Eradikation der pathogenen Erreger kompliziert war (resistente Keime, etc.), bzw. die eine verlängerte antibiotische Therapie benötigten. Ausserdem befanden sich in den untersuchten Patienten-Kollektiven keine immunsupprimierten Patienten.

Zusätzlich war diese Studie limitiert durch die Tatsache, dass die genaue Ursache einer jeweils aufgetretenen inflammatorischen Reaktion bzw. einer Sepsis nicht in allen Patienten der untersuchten Kohorten exakt aufzuklären war. Dies wurde u.a. durch die oben genannten Gründe für oder gegen eine antibiotische Therapie bedingt. Möglich ist auch, dass es falsch-positive Resultate der mikrobiologischen Kultur durch eine bakterielle Kontamination gegeben hat, wodurch anschließend eine Fehlklassifikation der Patienten entstanden sein könnte. Nicht zuletzt auch aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Patienten ist die vorliegende Studie als *Pilotstudie* für die Implementierung des ICIS-Score als neuen und zellbasierten Biomarker für Infektionen in der intensivmedizinischen Diagnostik speziell von post-operativen Patienten einzustufen. An den untersuchten Patientengruppen konnten geeignete cut-off Werte für den ICIS-Score etabliert werden, um mit ausreichender diagnostischer Sicherheit infektiöse von nicht-infektiösen Patienten unterscheiden zu können. Große, multizentrische und prospektive klinische Studien müssen nun nachweisen, ob die frühzeitige Bestimmung des ICIS-Scores die Prognose von Intensivpatienten signifikant verbessert und ob mit Hilfe des ICIS-Scores tatsächlich indizierte antibiotische Therapien früher eingeleitet werden können, um den Einsatz von Antibiotika rationaler zu gestalten, potentielle Nebenwirkungen zu senken und der Entwicklung von multi-resistenten Erregern entgegenzuwirken.

3.5 Theragnostik mittels Häma-Plot

Die Differentialdiagnostik von Anämien ist eine tägliche medizinische Herausforderung. Insbesondere Entzündungsreaktionen oder weitere Erkrankungen des Blutes können die Interpretation von Laborbefunden und klinischer Symptomatik erschweren, so dass ein Bedarf an geeigneten Biomarkern besteht, um die Diagnostik von unterschiedlichen Anämieformen zu verbessern. In der hier diskutierten Forschungsarbeit wurden die beiden neuen zellbasierten, retikulozytären Biomarker Delta-He und Ret-He in verschiedenen Patientengruppen (n=345) quantifiziert, welche an unterschiedlichen Anämie-verursachenden Erkrankungen litten (z.B. ACD bei chronisch-entzündlichen oder Tumorerkrankungen n=138, Eisenmangel (n=35), Thalassämie/Hämoglobinopathie (n=18), ACD/IDA n=17, Sepsis (n=83). In einigen der oben aufgezählten Patientengruppen wurden beide Biomarker vor und nach einer medizinischen Therapie bestimmt, um Therapie-abhängige Änderungen in der Marker-Konzentration erfassen zu können. Zusätzlich wurden Delta-He und Ret-He in zwei Kontrollgruppen gemessen, bestehend aus „Blut-gesunden“ Neugeborenen (n=23) und „Blut-gesunden“ Erwachsenen (n=31). Untersucht wurde die Rolle von Delta-He und Ret-He für die Differentialdiagnostik verschiedener Anämieformen und zur Etablierung eines neuen diagnostischen Plots, dem sogenannten „Häma-Plot“. Der Häma-Plot besteht aus neun Feldern, wobei die Messwerte für Ret-He auf der y-Achse und die Messwerte für das Delta-He auf der x-Achse aufgetragen werden. Mit Hilfe der jeweiligen Referenzbereiche (Delta-He: +2pg - +6pg; Ret-He: 28pg - 36pg) lassen sich neun Felder voneinander unterscheiden, die, beginnend von oben links nach unten rechts, mit den Zahlen 1-9 durchnummeriert werden. Der Häma-Plot ermöglicht quasi „auf einen Blick“ die Differentialdiagnose verschiedener Anämieformen und erlaubt ebenfalls ein therapeutisches Monitoring von Patienten (anti-entzündliche Therapie, Eisensubstitutionstherapie, Substitution von Vitamin B12, etc.) sowie eine Überprüfung der Patientencompliance und der Therapiesuffizienz bei den oben dargestellten Erkrankungen (25).

Während akuter oder chronisch-entzündlicher Prozesse kommt es durch erhöhte Konzentrationen an IL-6 zu einer steigenden Expression von Hepcidin-25, dem zentralen Regulatorprotein der Eisenhomöostase im Körper. Hieraus resultiert die Endozytose der Eisentransportproteine (Ferroportine) auf der Zelloberfläche der Enterozyten im Darm mit einer nachfolgenden Eisenverarmung im Blut und einer Eisenanreicherung im retikulo-endothelialen System (Leber, Milz, Makrophagen und Knochenmark). Zusätzlich wird aus dem retikulo-endothelialen System kein Eisen mehr freigesetzt. Je höher die Konzentration an Hepcidin-25 im Blut ansteigt, umso weniger Eisen steht der Erythropoese zur Verfügung. Hierdurch fallen das Ret-He und vor allem das Delta-He innerhalb weniger Stunden deutlich ab. Auf diese

Weise beeinflusst die Konzentration an Hepcidin-25 die Hämoglobinisierung der Retikulozyten, so dass die Messung des großen Blutbildes inklusive einer Retikulozytenbestimmung sehr gut geeignet ist, indirekte aber valide Aussagen zur Funktionalität des Erythrins zu erlangen (18, 25-27).

Neue, zellbasierte und retikulozytäre Biomarker wie Delta-He oder Ret-He scheinen folglich vielversprechende Kandidaten zu sein, um verschiedene, insbesondere inflammatorisch bedingte, Anämieformen voneinander abzugrenzen sowie um entzündliche Erkrankungen, die entsprechend der oben geschilderten pathophysiologischen Zusammenhänge innerhalb weniger Stunden zu einer veränderten Hämoglobinisierung der Retikulozyten führen, zu monitoren. Zusätzlich sind diese Parameter quantifizier- und standardisierbar und liefern Aussagen zum Krankheitsverlauf in „Echtzeit“ (19, 23, 27). Im Gegensatz hierzu ist die direkte Bestimmung von Hepcidin-25 momentan noch zu zeitaufwändig, zu kostenintensiv und die zur Verfügung stehenden Immunoassays sind nicht ausreichend standardisiert (27).

An einem Patientenkollektiv, das insbesondere Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen enthielt (Sepsis, ACD), konnte erst kürzlich die Dynamik der Konzentrationsänderung von Delta-He nachgewiesen werden (23). Nach Applikation einer suffizienten antibiotischen Therapie bei septischen Patienten mit zunächst negativem Delta-He kam es innerhalb weniger Stunden zu signifikanten Änderungen der Messwerte dieses Parameters vom negativen in den positiven Bereich im Sinne einer abnehmenden Entzündungsreaktion, die nachfolgend auch zu ansteigenden Eisenkonzentrationen im Blut führte (abnehmende Expression von Hepcidin-25) und auf diese Weise mit einer verbesserten Hämoglobinisierung der Retikulozyten einherging (23). Das Delta-He wurde in dieser Studie in Form einer Multiplex-Analytik (*ICIS-Score*) zusammen mit weiteren zellulären Biomarkern der angeborenen und erworbenen Immunität sowie der Knochenmarksfunktion bestimmt.

Die hier diskutierte wissenschaftliche Arbeit zeigt weiterhin, dass Blut-gesunde Neugeborene negative Messwerte für das Delta-He aufwiesen, während Blut-gesunde Erwachsene positive Werte zeigten (statistisch signifikant: $p < 0.05$). Der Grund für dieses Phänomen ist bis jetzt noch nicht vollständig verstanden. Eine mögliche Ursache könnte die Umstellung vom fetalen Hämoglobin (HbF) zur adulten Form des Hämoglobins (HbA) im Blut der Neugeborenen sein. Hierdurch entsteht, möglicherweise passager, eine quantitativ erniedrigte Konzentration an Hämoglobin in den neu gebildeten Retikulozyten im Vergleich zu den reifen Erythrozyten.

In der vorliegenden eigenen Arbeit konnte mit Hilfe des Delta-He signifikant zwischen Patientengruppen mit einer ACD oder Sepsis vor und nach einer medikamentösen Therapie unterschieden werden ($p < 0.05$) (25). Ebenso waren die Messwerte für Delta-He signifikant unterschiedlich zwischen Patienten mit einer ACD/IDA und blutgesunden Erwachsenen bzw. Patienten mit einer reinen Eisenmangelanämie (IDA) ($p < 0.05$). Zwischen gesunden

Erwachsenen und Patienten mit einer normalen IDA gab es hingegen keine signifikanten Unterschiede in den Delta-He Konzentrationen. Dies unterstreicht die Erkenntnisse, dass Delta-He ein vielversprechender Biomarker zur Differenzierung entzündlich bedingter Anämieformen wie ACD oder ACD/IDA ist und diese statistisch signifikant abgrenzt von einer reinen IDA oder einer Thalassämie/Hämoglobinopathie. Das Ret-He unterschied sich ebenfalls signifikant zwischen den Patientenkohorten mit ACD und Sepsis vor und nach medizinischer Therapie sowie zwischen blutgesunden erwachsenen Kontrollpatienten und Patienten mit IDA und ACD/IDA ($p \leq 0.05$). Die alleinige Bestimmung von Ret-He war jedoch nicht in der Lage, zwischen ACD und ACD/IDA zu differenzieren. Der Grund liegt in der Tatsache, dass Ret-He nicht in der Lage ist, eine Akute Phase Reaktion bei entzündlich bedingten Anämieformen (ACD) anzuzeigen, wie dies beim Delta-He der Fall ist.

Die kombinierte Bestimmung von Ret-He und Delta-He sowie deren graphische Darstellung in Form des Häma-Plots liefern wichtige zusätzliche Informationen zur besseren Interpretation des bereits in der laboratoriumsmedizinischen Diagnostik fest etablierten Ferritin Index Plots („*Thomas-Plot*“). Neben der weiter oben ausführlich erläuterten Funktion als zellbasierter Biomarker in der Signalkaskade *downstream* von Heparin-25 ist Delta-He als dessen zellbasiertes Korrelat im Routinelabor schnell, kosteneffektiv und präzise messbar – und zwar 24 Stunden am Tag. Je nach Grad der Entzündungsstärke steigt oder fällt die Konzentration an Heparin-25, korrelierend hierzu steigt oder sinkt die Eisensequestration im Körper und damit ändert sich der Messwert des Delta-He innerhalb von wenigen Stunden (23). Während der klassische Ferritin Index Plot Auskunft über den Eisenspeicher und die Eisenversorgung der Erythropoese anzeigt und signifikante Änderungen auf der x-Achse (Ferritin-Index) erst nach mehreren Tagen sichtbar werden, zeigt der Häma-Plot eine größere Dynamik, da sich die Messwerte für Delta-He mitunter bereits innerhalb weniger Stunden ändern können. Ergänzend zum Ferritin Index Plot erlaubt der Häma-Plot Aussagen über: **a.)** die Grundlage verschiedener erkrankungsspezifischer Anämieformen (chronische Entzündung, ACD, Eisenmangel, Vitamin B12-Mangel, etc.), **b.)** ein individuelles Therapiemonitoring (z.B. erfolgreiche/nicht erfolgreiche Immunsuppression bei entzündlichen Erkrankungen, erfolgreiche/nicht erfolgreiche antimikrobielle Therapie bei Sepsis, erfolgreiche/nicht erfolgreiche Eisen- oder Vitamin B12-Substitution), **c.)** die Patienten-Compliance (25).

Der Häma-Plot kann via Webclient als graphische Abbildung zusammen mit den numerischen Laborwerten sowie allen weiteren Scattergrammen und -plots in Form eines elektronisch-hämatologischen Laborbefunds übermittelt werden.

3.6 HFC: Möglichkeiten und Grenzen der automatisierten Liquordiagnostik

Nachdem sich die vorhergehenden Arbeiten mit neuen zellbasierten Biomarkern und diagnostischen Scores und Plots im EDTA-Blut auseinandergesetzt haben, wurde in der hier diskutierten wissenschaftlichen Arbeit das zelluläre Korrelat und die diagnostische Bedeutung sogenannter „hochfluoreszierender Zellen“ (HFC) im Liquor untersucht, die mit Hilfe des Hämatologieautomaten XE-5000 im *Body Fluid* Modus detektiert werden können. Nach Abschluss dieser Untersuchung gelang der Nachweis, dass dem Biomarker HFC intrathekale Tumorzellen entsprechen können. Diese Schlussfolgerung wurde durch die folgenden Beobachtungen bestärkt: **1.)** den tatsächlich deutlich häufigeren Nachweis von HFC in tumorzell-positiven als in tumorzell-negativen Liquores (78,5% vs. 26,2%), **2.)** die Korrelation der HFC im Liquor in Prozent verglichen mit den Prozentzahlen der Tumorzellen im gefärbten und manuell-mikroskopisch untersuchten Zytospinpräparat („Goldstandard“), **3.)** die Tatsache, dass HFC größere Mengen an intranukleären und zytosolischen Nukleinsäuren (DNA und RNA) enthalten, welches ein typisches Charakteristikum von Tumorzellen ist.

Die ermittelte Sensitivität des XE-5000 zur Detektion von Tumorzellen im Body Fluid Modus mittels des Analyten HFC war mit 78,5% vergleichsweise moderat. Besonders in Liquores mit einer niedrigen prozentualen Tumorzellzahl gelang es dem XE-5000 nicht mit ausreichender Sicherheit, die wenigen Tumorzellen adäquat zu detektieren. Im Gegensatz hierzu ist ein erfahrener Untersucher mit Hilfe der manuellen Mikroskopie von Zytospinpräparaten in der Lage, bei entsprechender methodischer Erfahrung, auch noch eine einzelne Tumorzelle vor einem Hintergrund von bis zu 500 normalen Liquorzellen aufzuspüren. Die Spezifität des Analyten HFC zur Detektion von intrathekalen Tumorzellen betrug 73,8%, was sich in einer größeren Anzahl an falsch tumorzell-positiv deklarierten Liquorproben widerspiegelte. Der prozentuale Anteil der HFC an allen Liquorzellen war in den falsch-positiven deutlich niedriger als in den richtig-positiven Liquores, so dass die diagnostische Signifikanz des Parameters HFC insbesondere in Liquorproben mit einer geringen Prozentzahl an HFC in Frage gestellt werden muss. Umgekehrt erscheint es natürlich auch möglich, dass der XE-5000 in den „falsch-positiven“ Liquores sehr wohl echte Tumorzellen gefunden haben könnte, die dann aber der mikroskopischen Untersuchung entgangen sind. Grund für diese Vermutung bietet nicht zuletzt die Tatsache, dass auch die mikroskopische Diagnostik einer neoplastischen Meningitis Schwächen hat im Hinblick auf den Nachweis von Tumorzellen. Da die 33 falsch tumorzell-positiven Fälle aus dem XE-5000 allerdings im klinischen und paraklinischen Patientenkontext keinen Verdacht auf das Vorliegen einer potentiellen neoplastischen Meningitis haben aufkommen lassen, erscheint dies als wenig plausibel (75, 76). Aus den in dieser Studie gewonnenen Daten ließ sich kein klarer cut-off Wert für HFC im Liquor ableiten, ab dem man sicher von einem Vorhandensein von Tumorzellen im Liquor ausgehen konnte.

Abgesehen von tatsächlich vorhandenen Tumorzellen fand sich ein weiteres zelluläres Korrelat im Liquor, das ebenfalls vom XE-5000 als HFC eingestuft wurde: Plasmazellen. Plasmazellen waren der einzige Zelltyp, der in HFC positiven Liquores signifikant häufiger anzutreffen war, als in HFC negativen Liquores. Im peripheren Blut wurden Plasmazellen bereits als entsprechendes Korrelat der HFC identifiziert (41). Möglicherweise könnten Plasmazellen auch die entsprechende zelluläre Entität in tumorzellfreien aber HFC positiven Liquores sein. Allerdings waren nur in 20% der HFC positiven aber tumorzellnegativen Liquores Plasmazellen nachweisbar. Folglich können nicht allein Plasmazellen die Zellklasse der HFC in tumorzellnegativen Liquores repräsentieren. Im Gegensatz zu den Daten einer anderen Arbeit konnten in der vorliegenden Studie Makrophagen als korrespondierende Zellklasse der HFC in tumorzellnegativen Liquores ausgeschlossen werden (77), ebenso eine hohe Gesamtzellzahl als Auslöser einer erhöhten Prozentzahl an HFC. Böer et al. wiesen interessanterweise in ventrikulären Liquorproben vermehrt HFC nach (in 76 von 88 Proben, 86%) (52). In keinem dieser Fälle konnten jedoch mikroskopisch Tumorzellen nachgewiesen werden. Ventrikuläre Liquores enthalten häufig vermehrt zellulären Debris. Dies konnten Böer et al. bestätigen: die in den ventrikulären Liquorproben signifikant gehäuft aufgetretenen HFC ließen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Präsenz von kaputten, aber noch nukleinsäurehaltigen Zellen, zurückführen.

Aus klinisch-praktischer Sicht empfiehlt sich bei Verdacht auf eine neoplastische Meningitis die manuell-mikroskopische Untersuchung der Liquorprobe mit Hilfe eines Zytospinpräparates. Sollte es im Rahmen der Routinediagnostik zum inzidentellen Nachweis von HFC in einer Liquorprobe kommen, bei der keine mikroskopische Liquordiagnostik angefordert wurde, so sollte in diesen Fällen mittels spezieller Algorithmen im Laborinformationssystem die automatische Anfertigung eines Zytospinpräparates zur mikroskopischen Diagnostik ausgelöst werden. Sind dann mittels manueller Mikroskopie keine Tumorzellen nachweisbar, ist das Vorliegen einer neoplastischen Meningitis sehr unwahrscheinlich. In diesen Fällen sind einige wenige nachgewiesene HFC am ehesten als unspezifischer Nebenbefund ohne klinische Relevanz zu betrachten.

Treten HFC im Liquor auf und es besteht zusätzlich der klinische Verdacht auf das Vorliegen einer neoplastischen Meningitis bei gleichzeitig mikroskopisch tumorzellfreiem Liquor, so ist ein weiteres Vorgehen entsprechend der klinischen Leitlinien für Patienten mit Verdacht auf neoplastische Meningitis zu empfehlen. Entscheidend sind hierbei wiederholt durchgeführte Lumbalpunktionen für die erneute mikroskopische Suche nach Tumorzellen (76).

4 Zusammenfassung

Vollautomatisierte Messverfahren haben in der Blutbildanalytik in den vergangenen Jahrzehnten das manuelle Differentialblutbild in der Laboratoriumsmedizin weitestgehend ersetzt und so neben präziseren Ergebnissen auch zu einer Reduktion der Kosten sowie zu einer deutlich schnelleren Bearbeitungszeit geführt. Durch stetig wachsende technische Fortschritte sind moderne Hämatologieautomaten in der Lage, nicht nur die Zellgruppen sämtlicher Zellreihen des menschlichen Blutes exakt zu quantifizieren und voneinander zu differenzieren, sondern auch deren „biologische Aktivität“ zu bestimmen. Dies geschieht mit Hilfe neuer zellbasierter Biomarker, von denen einige in dieser Arbeit näher charakterisiert wurden.

Publikation 1 zeigte den erfolgreichen Ersatz der manuell-mikroskopischen und semiquantitativen Methode zur Untersuchung einer Blutprobe auf das Vorhandensein von toxisch granulierten neutrophilen Granulozyten durch den automatisiert bestimmten GI-Index, der mittels Fluoreszenz-Flowzytometrie in einem Hämatologieautomaten quantifiziert wird. Das vollautomatisierte Messverfahren führte nicht nur zu einer deutlichen Beschleunigung und Präzisierung der Analytik, sondern auch zu einer verbesserten Standardisierung und Objektivierung der Nachweismethode.

In Publikation 2 wurden die Referenzbereiche von NEUT-GI und dem hieraus berechneten GI-Index für die neue Sysmex Hämatologiegerätegeneration XN an einem größeren Kollektiv gesunder und schwerkranker Patienten etabliert.

Das Delta-He repräsentiert die Differenz im Hämoglobingehalt zwischen jungen Retikulozyten und reifen Erythrozyten. Dieser dynamische und zellbasierte Parameter ist ein vielversprechender Biomarker zur Anämiediagnostik sowie zum Therapie- und Verlaufsmonitoring entzündlicher Prozesse bis hin zur Sepsis (Publikation 3, Publikation 4 und Publikation 5).

In Publikation 3 gelang der Nachweis, dass das Delta-He an einem Kollektiv schwerkranker Patienten insbesondere mit dem Abklingen einer hochgradigen Entzündung unter medizinischer Therapie eng korreliert ist.

Diese Beobachtung konnte in Publikation 4 in einer Studie zum ICIS-Score bestätigt werden. Im Vergleich zu den klassischen Entzündungsmarkern CRP, Procalcitonin und periphere Gesamtleukozytenzahl erlaubte der ICIS-Score in der vorliegenden Studie das frühzeitigere Erkennen einer systemischen Infektion bei Intensivpatienten sowie den rationaleren Einsatz von Antibiotika.

Publikation 5 wies die zentrale Rolle des Delta-He in der Differentialdiagnostik verschiedener Anämieformen nach. Ein zu diesem Zweck neu etablierter Häma-Plot stellt die beiden neuen und zellbasierten Biomarker Ret-He (y-Achse) und Delta-He (x-Achse) in einem neun-feldrigen Diagramm dar und ermöglicht so auf einen Blick medizinische Differentialdiagnosen, ein Therapie- und Verlaufsmonitoring sowie die Überprüfung der Patienten-Compliance und der Therapie-Suffizienz. Aufgrund der raschen Dynamik des Parameters Delta-He empfiehlt sich die Bestimmung insbesondere bei entzündlich bedingten Anämieformen (ACD bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Tumoren, Sepsis).

HFC können aufgrund des erhöhten Gehalts an Nukleinsäuren mit Hilfe eines Hämatologieautomaten im Blut sowie in diversen Körperflüssigkeiten valide detektiert und quantifiziert werden. In Publikation 6 wurde erstmals das entsprechende Korrelat der HFC im Liquor cerebrospinalis charakterisiert: hierbei handelte es sich zum überwiegenden Teil um intrathekale Tumorzellen. Jedoch reichte die nachgewiesene Sensitivität und Spezifität dieses neuen zellbasierten Biomarkers HFC zur sicheren Detektion von Tumorzellen im Liquor nicht aus, um auf den methodischen Goldstandard zum Nachweis einer Meningitis neoplastica, die Mikroskopie von Zytospinpräparaten, zu verzichten.

Fazit und Ausblick

Neue und zellbasierte Biomarker, die im Rahmen der automatisierten hämatologischen Blutbildanalytik mit Hilfe der Fluoreszenz-Flowzytometrie bestimmt werden, gewinnen in der ärztlichen Labordiagnostik zunehmend an Bedeutung. Abgesehen von der Tatsache, dass diese Marker im Labor schnell und kosteneffektiv bestimmt werden können, haben insbesondere der GI-Index und das Delta-He bereits Einzug in die tägliche Routinediagnostik gefunden. Beide Parameter sind im Differentialblutbild mit Retikulozytenzahl enthalten, das Delta-He ist darüber hinaus auch Bestandteil der weiter oben beschriebenen Multiplex-Analytik in Form des ICIS-Scores. Zusätzlich sind Ret-He und Delta-He Bestandteil des Häma-Plots und erleichtern die Differentialdiagnostik verschiedener, insbesondere entzündlich-basierter, Anämieformen. Mit Hilfe des Häma-Plots lassen sich auch Hinweise zur Anämie-auslösenden Grunderkrankung finden (Inflammation, Eisen- oder Vitamin B12-Mangel, Thalassämie/Hämoglobinopathie, etc.) und es besteht die Möglichkeit zum Therapie-/Verlaufsmonitoring sowie zur Überprüfung der Patienten-Compliance und der Therapie-Suffizienz. Zwar können HFC zum sicheren Nachweis intrathekaler Tumorzellen nicht die mikroskopische Untersuchung von Zytospinpräparaten ersetzen, sie können aber im Falle eines HFC-positiven Liquors ohne eine gesonderte liquorzytologische Anforderung die automatische Anfertigung eines Zytospinpräparates auslösen, so dass diese Probe gezielt mikroskopisch auf das Vorhandensein von Tumorzellen hin untersucht werden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol*, 2008;130(1):104-16
2. Hur M, Cho JH, Kim H, Hong MH, Moon HW, Yun YM, Kim JQ. Optimization of laboratory workflow in clinical hematology laboratory with reduced manual slide review: comparison between Sysmex XE-2100 and ABX Pentra DX120. *Int J Lab Hematol*, 2011;33(4): 434-440
3. Pratumvinit B, Wongkrajang P, Reesukumal K, Klinbua C, Niamjoy P. Validation and optimization of criteria for manual smear review following automated blood cell analysis in a large university hospital. *Arch Pathol Lab Med*, 2013;137(3):408-14
4. Ryan DH. Examination of the blood. In: Lichtman MABE, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT, eds. *Williams Hematology*. 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2006:11-19
5. Coulter WH. Means for counting particles suspended in a fluid", *U.S.P. Office*, 1953; No. 2656506
6. Fujimoto K. Principles of Measurement in Hematology Analyzers Manufactured by Sysmex Corporation. *Sysmex J Int*, 1999(9):31-44
7. Tanaka C, Nagai T, Nakamura M, Yamauchi Y, Noguchi K, Takimoto Y, Shigeta H, Murayama T. Automated Hematology Analyzer XE-5000 - Overview and Basic Performance. *Sysmex J Int*, 2007;17:Supplement 3
8. Seo JY, Lee ST, Kim SH. Performance evaluation of the new hematology analyzer Sysmex XN-series. *Int J Lab Hematol*, 2015;37(2):155-64
9. Briggs C, Longair I, Kumar P, Singh D, Machin SJ. Performance evaluation of the Sysmex haematology XN modular system. *J Clin Pathol*. 2012;65(11):1024-30
10. Cremer M, Paetzold J, Schmalisch G, Hammer H, Loui A, Dame C, Weimann A. Immature platelet fraction as novel laboratory parameter predicting the course of neonatal thrombocytopenia, *Br J Haematol*, 2009;144:619-621
11. Cremer M, Weimann A, Schmalisch G, Hammer H, Bühler C, Dame C. Immature platelet fraction reflects megakaryopoietic activity in neonatal earlyonset thrombocytopenia, *Thrombosis Haemostasis*, 2010;103:1016-1021
12. Kugel MA, Rosenthal N. Pathologic changes occurring in polymorphonuclear leukocytes during the progress of infections. *Am J Med Sci*, 1932;183:657-67

13. Schofield KP, Stone PC, Beddall AC, Stuart J. Quantitative cytochemistry of the toxic granulation blood neutrophil. *British J Hematol*, 1983;53:15-22
14. Zimmermann M*, Cremer M*, Hoffmann C, Weimann K, Weimann A. Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases, *Clin Chem Lab Med*, 2011;49:1193-1198
15. Furundarena JR, Araiz M, Uranga M, Sainz MR, Agirre A, Trassorras M, Uresandi N, Montes MC, Argoitia N. The utility of the Sysmex XE-2100 analyzer's NEUT-X and NEUT-Y parameters for detecting neutrophil dysplasia in myelodysplastic syndromes. *Int J Lab Hematol*, 2010;32:360-366
16. Le Roux G, Vlad A, Eclache V, Malanquin C, Collon JF, Gantier M, Schillinger F, Peltier JY, Savin B, Letestu R, Baran-Marszak F, Fenaux P, Ajchenbaum-Cymbalista F. Routine diagnostic procedures of myelodysplastic syndromes: value of a structural blood cell parameter (NEUT-X) determined by the Sysmex XE-2100™, *Int J Lab Hematol*, 2010;32:237-243
17. Zimmermann M, Steenhuis P, Linssen J, Weimann A. Detection and quantification of hypo- and hypergranulated Neutrophils on the new Sysmex XN hematology analyzer: establishment of an adapted reference interval for the Neutrophil-Granularity-Intensity compared to XE-technology. *Clin Lab*, 2015;61(3-4):235-41
18. Fleming ER. Iron and inflammation: cross-talk between pathways regulating hepcidin. *Journal of Molecular Medicine*, 2008;86:491-494
19. Urrechaga E, Borque L, Escanero JF. Biomarkers of hypochromia: the contemporary assessment of iron status and erythropoiesis. *Biomed Res Int*, 2013;2013:603-786
20. Brugnara C., Schiller B., Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (REThE) and assessment of iron-deficient states. *Clin Lab Haematol*, 2006;28:303-308
21. Ullrich C, Wu A, Armsby C., Rieber S., Wingerter S., Brugnara C., Shapiro D., Bernstein H. Screening healthy infants for iron deficiency using reticulocyte hemoglobin content. *JAMA*, 2005;294:924-930
22. Hoffmann C, Hoffmann P, Zimmermann M. Diagnostic testing for a high-grade inflammation: parameter dynamics and novel markers. *Clin Chem Lab Med*, 2015;53(4):541-547

23. Weimann K, Zimmermann M, Spies CD, Wernecke KD, Vicherek O, Nachtigall I, Tafelski S, Weimann A. Intensive Care Infection Score - A new approach to distinguish between infectious and noninfectious processes in intensive care and medicosurgical patients. *J Int Med Res*, 2015;43(3):435-451

24. Danielson K, Beshara S, Qureshi AR, Heimbürger O, Lindholm B, Hansson M, Hylander B, Germanis G, Stenvinkel P, Barany P. Delta-He: a novel marker of inflammation predicting mortality and ESA response in peritoneal dialysis patients. *Clin Kidney*, 2014;7:275-281

25. Weimann A, Cremer M, Hernaiz-Driever P, Zimmermann M. Delta-He, Ret-He and a new diagnostic plot for differential diagnosis and therapy monitoring of patients suffering from various disease-specific types of anemia. *Clin Lab*, 2016;62:xx-xx. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2015.150830. (epub ahead of print)

26. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematologica*, 2009;122:78-86

27. Thomas C, Kobold U, Balan S, Roeddiger R, Thomas L. Serum hepcidin-25 may replace the ferritin index in the Thomas plot in assessing iron status in anemic patients. *Int Jnl Lab Hem*, 2011;33:187-193

28. Means RT. Pathogenesis of the anemia of chronic disease: a cytokine-mediated anemia. *Stem Cells*, 1995;80:1639-1647

29. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*, 2005;352:1011-1023

30. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit. Care Med*, 2001;29(7 Suppl):S109-11

31. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 2007;33(4):606-618

32. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 2003;348(16):1546-155

33. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Med*, 2001;29(7):1303-1310

34. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM consensus conference committee. american college of chest physicians/society of critical care medicine. *Chest*, 1992;101(6):1644-165

35. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med*, 2000;26 (Suppl 1):S64-74
36. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a doubleedged sword. *J Leukoc Biol*, 1994;56(6):672-686
37. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi, AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun*, 2010;2(3):216-227
38. Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD, Kunkel SL. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med*, 1993;178(1):63-72
39. Franck S, Linssen J, Messinger M, Thomas L. Potential utility of Ret-Y in the diagnosis of iron-restricted erythropoiesis. *Clin Chem*, 2004;50(7):1240-1242
40. Nierhaus A, Linssen J, Wichmann D, Braune S, Kluge S. Use of a weighted, automated analysis of the differential blood count to differentiate sepsis from non-infectious systemic inflammation: the intensive care infection score (ICIS). *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012 Apr;11(2):109-15
41. Linssen J, Jennissen V, Hildmann J, Reisinger E, Schindler J, Malchau G, Nierhaus, A, Wielckens K. Identification and quantification of high fluorescence-stained lymphocytes as antibody synthesizing/secretory cells using the automated routine hematology analyzer XE-2100. *Cytome B Clin Cytom*, 2007;72(3):157-166
42. Bender L, Thaarup J, Varming K, Krarup H, Ellermann-Eriksen S, Ebbesen F. Early and late markers for the detection of early-onset neonatal sepsis. *Dan Med Bull*, 2008;55(4):219-223
43. Fernandes B, Hamaguchi Y. Automated enumeration of immature granulocytes. *Am J Clin Pathol*, 2007;128:454-63
44. Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Johnson CL. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA*, 1997;27:973-976
45. Thomas C, Kirschbaum A, Boehm, Thomas L. The Diagnostic Plot A Concept for Identifying Different States of Iron Deficiency and Monitoring the Response to Epoetin Therapy. *Med Oncol*, 2006;23(1):23-36
46. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem*, 2002;48:1066-1076
47. Gleissner B, Chamberlain MC. Neoplastic meningitis. *Lancet Neurol*, 2006;5:443-52
48. Mammoser AG, Groves MD. Biology and therapy of neoplastic meningitis. *Curr Oncol Rep*, 2010;12:41-9

49. Weston CL, Glantz MJ, Connor JR. Detection of cancer cells in the cerebrospinal fluid: current methods and future directions. *Fluids Barriers CNS*, 2011; 8:14

50. Zimmermann M, Ruprecht K, Kainzinger F, Heppner FL, Weimann A. Automated vs. manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber. *Int J Lab Hematol*, 2011;33:629-637

51. de Jonge R, Brouwer R, de Graaf MT, Luitwieler RL, Fleming C, de FrankrijkerMerkestijn M, Sillevius Smitt PA, Boonstra JG, Lindemans J. Evaluation of the new body fluid mode on the Sysmex XE-5000 for counting leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clin Chem Lab Med*, 2010;48:665-675

52. Boer K, Deufel T, Reinhoefer M. Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in cerebrospinal fluid. *Clin Biochem*, 2009;42:684-91

53. Labaere D, Boeckx N, Geerts I, Moens M, Van den Driessche M. Detection of malignant cells in serous body fluids by counting high-fluorescent cells on the Sysmex XN-2000 hematology analyzer. *Int J Lab Hematol*, 2015 Jun 13;doi: 10.1111/ijlh.12393. [Epub ahead of print]

54. Linssen J, Jennissen V, Hildemann J, Reisinger E, Schindler J, Malchau G, Nierhaus A, Wielckens K. Identification and quantification of high fluorescence-stained lymphocytes as antibody synthesizing/ secreting cells using the automated routine hematology analyzer XE-2100. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007;72:157-166

55. Takemura H, Tabe Y, Ishii K, Kobayashi Y, Kumo Y, Horii T, Miyake K, Miida T, Ohsaka A. Evaluation of capability of cell count and detection of tumor cells in cerebrospinal and body fluids by automated hematology analyzer. *Rinsho Byori*, 2010;58:559-64

56. Zimmermann M, Otto C, Gonzalez JB, Prokop S, Ruprecht K. Cellular origin and diagnostic significance of high-fluorescent cells in cerebrospinal fluid detected by the XE-5000 hematology analyzer. *Int J Lab Hematol*, 2013 Dec;35(6):580-588

57. Meisner M, Adina H, Schmidt J. Correlation of procalcitonin and C-reactive protein to inflammation, complications, and outcome during the intensive care unit course of multiple-trauma patients. *Crit Care*, 2006;10:R1

58. Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. Markers for sepsis diagnosis: what is useful ? *Crit Care Clin*, 2006;22:503-519:ix-x

59. Jekarl DW, Lee SY, Lee J, Park YJ, Kim Y, Park JH, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013;75:342-347

60. Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2013;369:840-851

61. Grewal PK, Uchiyama S, Ditto D, Varki N, Le DT, Nizet V, et al. The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis. *Nat Med*, 2008;14:648-655

62. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*, 2003;31:1250-1256
63. Bates DW, Cook EF, Goldman L, Lee TH. Predicting bacteremia in hospitalized patients. A prospectively validated model. *Ann Intern Med*, 1990;113:495-500
64. Jekarl DW, Lee SY, Lee J, Park YJ, Kim Y, Park JH, et al. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013;75:342-347
65. Moore LJ, Moore FA. Epidemiology of sepsis in surgical patients. *Surg Clin North Am*, 2012;92:1425-1443
66. Vincent J-L, Beumier M. Diagnostic and prognostic markers in sepsis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013;11:265-275
67. Nierhaus A, Linssen J, Wichmann D, et al. Use of a weighted, automated analysis of the differential blood count to differentiate sepsis from non-infectious systemic inflammation: the intensive care infection score (ICIS). *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2012;11:109-115
68. Colley CM, Fleck A, Goode AW, et al. Early time course of the acute phase protein response in man. *J Clin Pathol*, 1983;36:203-207
69. White J, Kelly M, Dunsmuir R. C-reactive protein level after total hip and total knee replacement. *J Bone Joint Surg Br*, 1998;80: 909-911
70. Lamm G, Auer J, Weber T, et al. Postoperative white blood cell count predicts atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2006;20:51-56
71. Cole DS, Watts A, Scott-Coombes D, et al. Clinical utility of peri-operative C-reactive protein testing in general surgery. *Ann R Coll Surg Engl*, 2008;90:317-321
72. Meisner M, Rauschmayer C, Schmidt J, et al. Early increase of procalcitonin after cardiovascular surgery in patients with postoperative complications. *Intensive Care Med*, 2002;28:1094-1102
73. Molter GP, Soltész S, Kottke R, et al. Procalcitonin plasma concentrations and systemic inflammatory response following different types of surgery. *Anaesthetist*, 2003;52:210-217. [in German, English abstract]
74. Meisner M, Adina H, Schmidt J. Correlation of procalcitonin and C-reactive protein to inflammation, complications, and outcome during the intensive care unit course of multiple-trauma patients. *Crit Care*, 2006;10:R1
75. Chamberlain MC, Glantz M, Groves MD, Wilson WH. Diagnostic tools for neoplastic meningitis: detecting disease, identifying patient risk, and determining benefit of treatment. *Semin Oncol*, 2009;36(4 Suppl 2):S35-45
76. Glantz MJ, Cole BF, Glantz LK, Cobb J, Mills P, Lekos A, Walters BC, Recht LD. Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. *Cancer*, 1998;82:733-739

77. Takemura H, Tabe Y, Ishii K, Kobayashi Y, Kumo Y, Horii T, Miyake K, Miida T, Ohsaka A. Evaluation of capability of cell count and detection of tumor cells in cerebrospinal and body fluids by automated hematology analyzer. *Rinsho Byori*, 2010;58:559-564.
78. Rumke CL. Statistical reflections on finding atypical cells. *Blood Cells*, 1985;11:141-144

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gern einigen Personen danken, die ganz wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Tauber für die vorbehaltlose Unterstützung meiner Arbeiten auf dem Gebiet neuer und zellbasierter hämatologischer Biomarker.

Ohne die große Hilfe zweier KollegInnen des Instituts für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie wäre diese Habilitationsschrift nicht möglich gewesen: ein ganz großer Dank gilt Frau Dr. rer. medic. Christina Hoffmann und Herrn Dipl.-Biochem. Peter Hoffmann, die mich stets mit unermüdlicher Arbeit und Unterstützung durch den Forscheralltag auf dem Weg zur Habilitation begleitet haben. Herrn PD Dr. med. Andreas Weimann danke ich für die intensive Einarbeitung in die komplexe Thematik der vollautomatisierten Hämatologie und Fluoreszenz-Flowzytometrie sowie für die freundschaftliche und kollegiale Begleitung bei meinen wissenschaftlichen Anfängen im Zentrallaboratorium der Charité. Prof. Dr. med. Kai Kappert gebührt Dank für viele konstruktive Gespräche und Anregungen im Rahmen meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten und einer Reihe weiterer akademischer und nicht-akademischer Angelegenheiten. PD Dr. med. Berthold Hoppe hat meinen wissenschaftlichen Werdegang und auch meinen laborärztlichen Berufsalltag mit kreativen Ideen, kritischen Diskursen und intellektuellem Ansporn bereichert, für den ich ihm ewig dankbar sein werde.

Den hämatologischen MTLA-Kolleginnen gilt ebenfalls mein Dank, da sie mit viel Sorgfalt eine Menge an Einzel- und Sondermessungen durchgeführt haben und ohne deren fundierte Fachkenntnis die Durchführung dieser Studien schlichtweg unmöglich gewesen wäre.

Danken möchte ich auch den Herren Dr. rer. nat. Michael Schäfer, Dr. rer. nat. Pieter Steenhuis und Dr. rer. nat. Joachim Linssen, die mir mit Ihrem überaus großen Wissens- und Erfahrungsschatz fundierte Kenntnisse im Bereich der automatisierten Hämatologie vermitteln konnten.

Ein ganz besonders lieber Dank gilt meinen Eltern Margot und Harro, die mir mit ihrer lebenslangen Unterstützung und der Ermöglichung meiner ärztlich-wissenschaftlichen Laufbahn den Weg zur Habilitation eröffneten.

Mein größter Dank gebührt meiner Frau Maike Zimmermann und meinem Sohn Moritz für die kompromisslose Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit, für das stets tapfere Ertragen meiner Launen und Eitelkeiten, für ihr Verständnis und den unerschütterlichen Rückhalt, den sie mir in allen Lebenslagen auf dem Weg zur Habilitation gegeben haben.

7 Erklärung

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift