

# Der Fall des Halbjahres: Der XE-2100 mit IG-Master in Kombination mit IMI und NRBC für eine frühe Detektion der neonatalen bakteriellen Infektion

## Einleitung

Neugeborene Patienten sind eine besondere Herausforderung für die Klinik. Zu keinem späteren Lebensabschnitt sind Patienten verletzlicher als in den ersten 30 Lebenstagen. Gründe dafür sind vor allem das (physiologisch) unreife Immunsystem und die geringen physischen Reserven. Somit ist die Inzidenz der neonatalen bakteriellen Infektion hoch. Der extreme Verlauf der NBI (neonatalen bakteriellen Infektion), die Sepsis, ist weltweit die häufigste Erkrankung der Neugeborenenperiode und stellt eines der Hauptprobleme in der Neonatologie dar.

Schwierig ist vor allem die frühzeitige Diagnosestellung, bedingt durch das Fehlen spezifischer klinischer Marker, und damit das rechtzeitige Einleiten einer verlaufsentscheidenden Therapie. Dass hier die hämatologischen Laborparameter IG (unreife Granulozyten), IMI (unreife myeloische Information) und NRBC (Erythroblast), gemessen am XE-2100, hilfreich unterstützen können, zeigt der Fall des Halbjahres aus der Universität Tübingen.

## Information zur NBI <sup>(1)</sup>

Unter der neonatalen bakteriellen Infektion (im Extremfall: neonatale Sepsis) versteht man eine disseminierte mikrobielle Erkrankung, die durch die klinischen Symptome einer systemischen Infektion und die Septikämie charakterisiert ist. Als Septikämie wird der kulturelle Nachweis pathogener Erreger in der Blutkultur und/oder der Liquorkultur bezeichnet.

Hier treten schon die ersten diagnostischen Schwierigkeiten auf, da ein Erregernachweis häufig nicht gelingt und somit die Blutkultur im neonatalen Bereich eine geringe Sensitivität aufweist. Ursachen dafür sind:

- Perinatale Antibiotikatherapie
- Bakteriämien können intermittierend sein

Die NBI wird in zwei Verlaufsformen unterteilt:

Die früh beginnende Form (early-onset bacterial infection – EOBI) und die spät beginnende Form (late-onset bacterial infection – LOBI). Der Fall des Halbjahres zeigt eine EOBI.

Die EOBI-Form beginnt innerhalb der ersten 72 Lebensstunden und geht dementsprechend auf eine prä- oder perinatale Infektion zurück. Der Verlauf ist in der Regel plötzlich beginnend und schnell fortschreitend (häufig bis zur Sepsis und zum septischen Schock mit Multiorganversagen). Das typische Erregerspektrum stammt aus der mütterlichen Vaginalflora. Die Mortalitätsrate kann, abhängig vom Therapiebeginn, dem Gestationsalter und dem Geburtsgewicht bis zu 75% betragen.

Die LOBI-Form beginnt dementsprechend nach 72 h und ist in der Regel nosokomialer Genese. Die Keime stammen also meistens aus dem postnatalen Umfeld. Die Häufigkeit dieser Krankheitsformen hat in den letzten Jahren zugenommen. Hauptgrund hierfür ist der Umstand, dass die Infektionsrate bei Frühgeborenen im Vergleich zu reifen Neugeborenen überproportional hoch ist und mittlerweile extrem kleine Frühgeborene mit hohem Risiko durch intensivmedizinische Maßnahmen überleben. »Ausschluss einer Sepsis« stellt somit eine der häufigsten Differentialdiagnosen auf neonatalen Intensivstationen dar. Frühzeitiges Erkennen steht hier in engem Zusammenhang mit einer erfolgreichen Therapie – oder anders ausgedrückt: »Es zählt jede Minute«. Daher gibt es schon lange die Forderung nach sensitiven und spezifischen Laborparametern.

## Parameterübersicht

### Derzeit häufig genutzte Parameter:

- Interleukin 8: körpereigener Botenstoff, der im Rahmen von Entzündungen die neutrophilen Granulozyten aktiviert.
- Interleukin 6: körpereigener Botenstoff, B-Zellen-Reifungsfaktor. Fördert die Differenzierung der B-Zellen zu Ig-produzierenden Zellen, stimuliert die CRP-Produktion in der Leber.
- CRP: ein Akute-Phase-Protein, fördert die Verknüpfung zwischen Phagozyten und Bakterienzellen oder anderen Mikroorganismen (Komplementsystem).

### Bewertung:

Diese bereits etablierten Tests haben eine hohe Sensitivität und Spezifität – allerdings nur in einem begrenzten Zeitfenster. Dadurch entsteht ein limitierter Nutzen: Interleukin 6 und Interleukin 8 zeigen nur in den ersten 12 h einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen Gesunden und Kranken. Ein deutlicher CRP-Anstieg ist bei Neugeborenen allerdings erst nach ca. 24 h zu erwarten. Somit ergibt sich ein Zeitfenster, das diagnostisch durchaus von hohem Interesse sein kann, in dem allerdings unter Umständen keiner der Parameter den Cut-Off überschreitet.

- Lipopolysaccharid-Bindendes Protein – ein Akute-Phase-Protein, das sich an die bakteriellen Lipopolysaccharidstrukturen bindet; dadurch ist eine Wechselwirkung mit Makrophagen möglich.
- Procalcitonin – Vorstufe des Hormons Calcitonin – bakterielle Endotoxine sorgen für eine gesteigerte Produktion von PCT.

Bewertung:

Beide Parameter zeigen für die Detektion einer EOBI keine Vorteile gegenüber Interleukin 8 bzw. CRP.<sup>7/8</sup>

Um nun die diagnostische Lücke zwischen Abfall der Immunmediatoren unter den Cut-Off-Wert und Anstieg der Akute-Phase-Proteine über den Cut-Off-Wert zu schließen, bietet sich an, auf die durch IL-8 stimulierte Zellreihe zu blicken – die Neutrophilen Granulozyten (insbesondere die unreifen Formen).

- I/T-Quotient: Verhältnis zwischen unreifen Granulozyten zur Gesamtheit der Neutrophilen Zellen. Diese Daten werden in der Regel durch eine mikroskopische Auszählung von Blutzellen erhoben.

Bewertung:

Limitierter klinischer Nutzen aus folgenden Gründen <sup>2/3</sup>:

- Statistische Genauigkeit der Zählung ist gering (in der Regel werden 100 Zellen ausgezählt – siehe Rümketabelle Abb.1)
- Zahl der stabkernigen Granulozyten variiert durch subjektive Bewertung
- Ungleichmäßige Zellverteilung bei manuellen Blutausstrichen insbesondere bei hohem oder niedrigem Hämatokrit

a	n=100	n=200	n=500	n=1.000	n=10.000
0	0 – 3,6	0 – 1,8	0 – 0,7	0 – 0,4	0 – 0,1
1	0,0 – 5,4	0,1 – 3,6	0,3 – 2,3	0,5 – 1,8	0,8 – 1,3
5	1,6 – 11,3	2,4 – 9,0	3,3 – 7,3	3,7 – 6,5	4,5 – 5,5
10	4,9 – 17,6	6,2 – 15,0	7,5 – 13,0	8,2 – 12,0	9,4 – 10,7
15	8,6 – 23,5	10,4 – 20,7	12,0 – 18,4	12,8 – 17,4	14,3 – 15,8
20	12,7 – 29,2	14,7 – 26,2	16,6 – 23,8	17,6 – 22,6	19,2 – 20,8
30	21,2 – 40,0	23,7 – 36,9	26,0 – 34,2	27,2 – 32,9	29,1 – 31,0
40	30,3 – 50,3	33,2 – 47,1	35,7 – 44,4	36,9 – 43,1	39,0 – 41,0
50	39,8 – 60,2	42,9 – 57,1	45,5 – 54,5	46,9 – 53,1	49,0 – 51,0
70	60,0 – 78,8	63,1 – 76,3	65,8 – 74,0	67,1 – 72,8	69,0 – 70,9
80	70,8 – 87,3	73,8 – 85,3	76,2 – 83,4	77,4 – 82,4	79,2 – 80,8
90	82,4 – 95,1	85,0 – 93,8	87,0 – 92,5	88,0 – 91,8	89,3 – 90,6
100	96,4 – 100	98,2 – 100	99,3 – 100	99,6 – 100	99,9 – 100

**Abb. 1:** Rümketabelle – zeigt die statistische Ungenauigkeit, die sich beim Auszählen einer definierten Anzahl (n) ergibt. So kann z. B. die Zahl der Stäbe in einem Ausstrich zwischen 4,9 und 17,6 variieren, wenn 100 Zellen ausgezählt werden und tatsächlich 10 Stäbe vorhanden sind. (Die Variation der Zahl durch subjektive Bewertung ist hier nicht berücksichtigt)

## Parameter des XE-2100

### ■ IG (automatisiert am XE-2100):

Gesamtheit der unreifen Granulozyten (Metamyelozyt, Myelozyt, Promyelozyt – blaue Population in Abb.2) ohne stabkernige Neutrophile Granulozyten. Das Prinzip der Zählung basiert auf durch flusszytometrischer Analyse nach RNA/DNA – Anfärbung der Zellen.

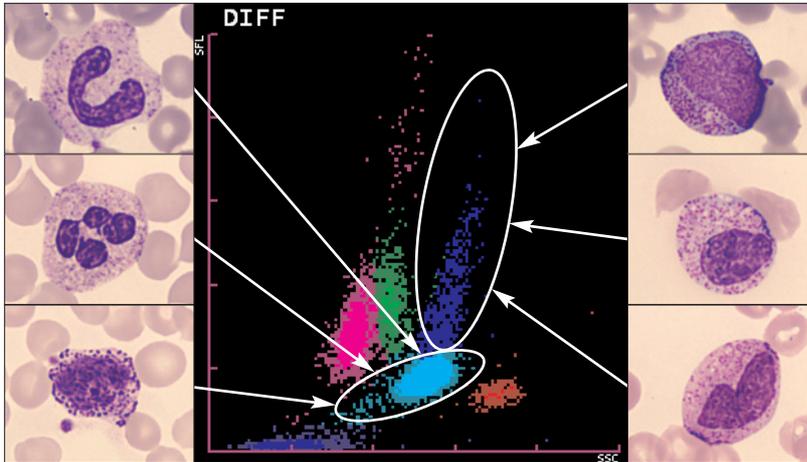


Abb. 2: Scattergramm DIFF-Kanal am XE-2100 mit IG-Master

### ■ IMI (automatisiert am XE-2100):

Gesamtheit aller unreifen myeloischen Zellen – (rote Population in Abb.3)

Das Prinzip der Zählung basiert auf der Widerstandsmessung (Volumensignal) mit hochfrequentem Wechselstrom (Leitfähigkeitssignal) nach Zellmembranlyse bei reifen Blutzellen – (blaue Population in Abb3).

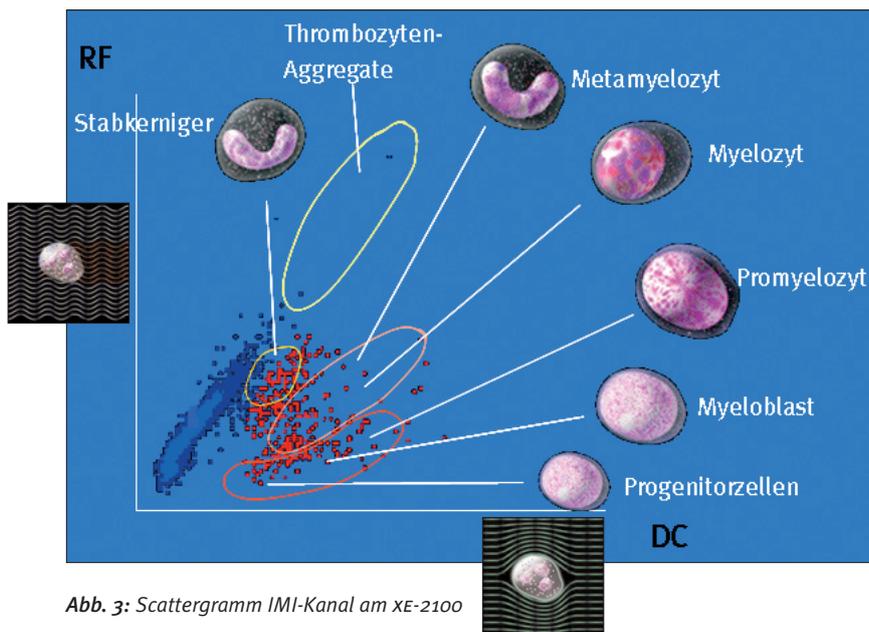


Abb. 3: Scattergramm IMI-Kanal am XE-2100

## Parameter des XE-2100

### ■ NRBC (automatisiert am XE-2100):

Anzahl der Erythroblasten – (lila Population in Abb.4) Das Prinzip der Zählung basiert auf durchflusszytometrischer Analyse nach RNA/DNA – Anfärbung der Zellen.

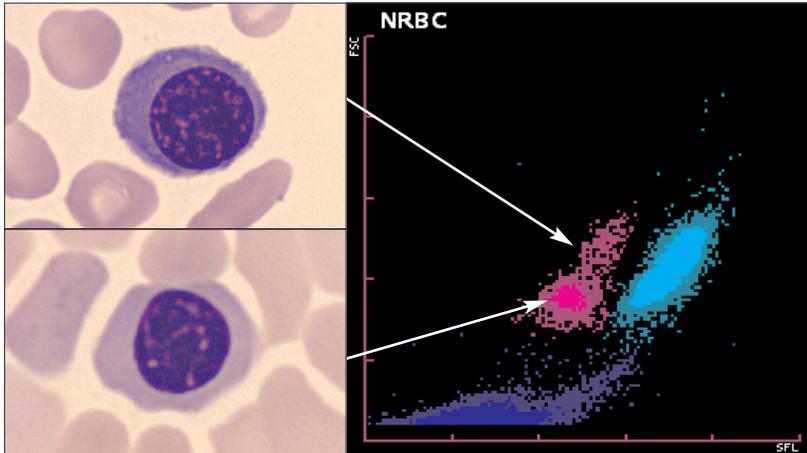


Abb. 4: Scattergramm NRBC-Kanal am XE-2100

### Bewertung:

- Schnelles, vollautomatisiertes und routinetaugliches Messverfahren
- Diese Parameter können 150 mal pro Stunde ohne manuelle Probenvorbereitung rund um die Uhr bestimmt werden
- Exzellente Trennung der pathologischen und physiologischen Populationen durch entsprechend eingesetzte Reagenzien und Messverfahren
- Statistische Genauigkeit der Zählung ist hoch (im DIFF-Kanal und NRBC-Kanal werden rund 0,8 µl der Probe ausgezählt – im IMI-Kanal wird 1 µl der Probe ausgezählt)
  - Rechenbeispiel:  
Bei einer Konzentration von  $10.00 \times 10^3 / \mu\text{l}$  kernhaltiger Zellen werden vom System tatsächlich gezählt und bewertet:
    - Im DIFF-und NRBC-Kanal:  $8.00 \times 10^3 / \mu\text{l}$
    - Im IMI-Kanal:  $10.00 \times 10^3 / \mu\text{l}$
- Objektivität der Methode – Trennung und Einteilung der Populationen nach immer gleichen Algorithmen
- Keine ungleichmäßige Verteilung der Zellen im System möglich
- Die klinische Wertigkeit wird im folgenden Beispiel näher erläutert.

## Befundbeispiel aus der Universität Tübingen:

Dieser Fall zeigt ein reifes neugeborenes Mädchen, das per Kaiserschnitt geboren wurde. Die Diagnose EOBI (early onset bacterial infection) stützt sich zum einen auf klinische Marker wie grünes Fruchtwasser, Blässe, beschleunigte Herzfrequenz und Temperaturinstabilität, zum anderen auf Laborparameter. Hier zeigt sich zum Zeitpunkt der Geburt (0h) eine erhöhte Interleukin-8 – Konzentration (101pg/ml), eine gesteigerte Anzahl von unreifen Granulozyten (IMI,IG) und Erythroblasten (NRBC – nucleated red blood cell). Direkt nach der Diagnose wurde eine antibiotische Therapie mit Ampicillin und Cefuroxin eingeleitet.

Abb.5 zeigt das am xE-2100 gemessene Blutbild zum Zeitpunkt der Geburt (0h). Dieses zeigt keine auffälligen Werte für das kleine Blutbild und die Parameter Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Basophile Granulozyten<sup>4</sup>. Allerdings werden erhöhte Werte für IG, IMI und NRBC angegeben.

Im Moment wird bezüglich dieser Parameter eine Studie in der Abteilung der Neonatologie der Universität Tübingen durchgeführt. Erste Ergebnisse dieser laufenden Studie wurden auf dem SYSMEX-Symposium 2005 von Dr. Orlikowsky vorgestellt und zeigen eine signifikante Übereinstimmung zwischen Sepsis bei Neugeborenen und einer erhöhten Anzahl unreifer Granulozyten und Erythroblasten<sup>5</sup>. Der IMI-Wert beträgt 2155 Zellen/ $\mu$ l (Normalwert zum Zeitpunkt der Geburt bei reifen Neugeborenen: 200–1700/ $\mu$ l<sup>6</sup>). Auch der IG-Wert zeigt ein gesteigertes Level mit 1050/ $\mu$ l (4.5%). Die Anzahl der Erythroblasten ist ebenfalls erhöht: 2890 Zellen/ $\mu$ l (Normalwert zum Zeitpunkt der Geburt bei reifen Neugeborenen: 100–1100/ $\mu$ l<sup>6</sup>)

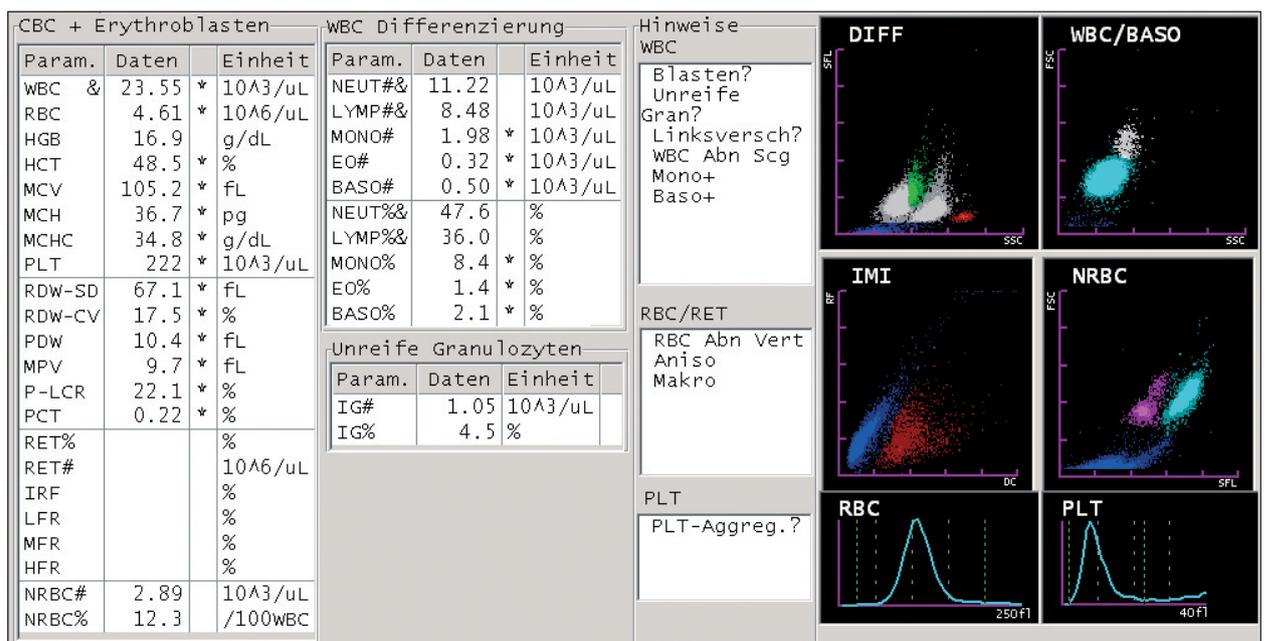
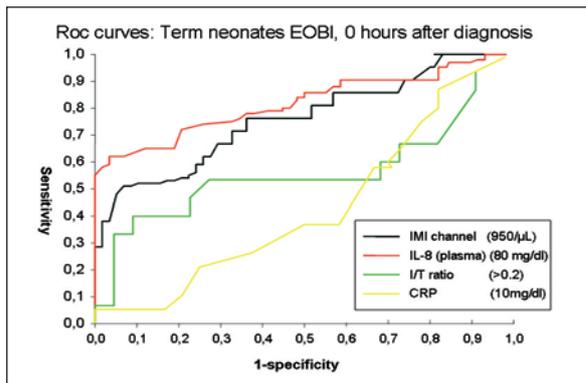


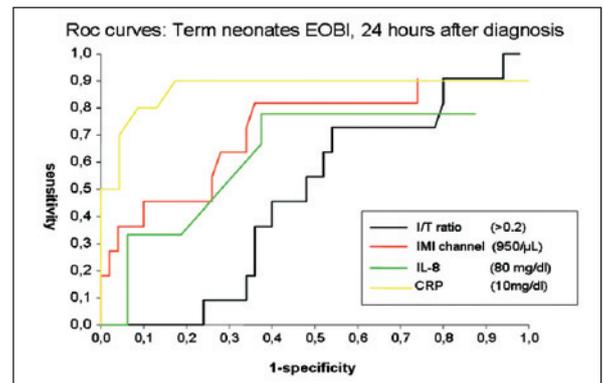
Abb. 5: Hämatogramm zum Zeitpunkt der Geburt gemessen am xE-2100

## Befundbeispiel aus der Universität Tübingen:

Herr Dr. Orlikowsky<sup>5</sup> zeigt in Abb. 6 und 7 den Zusammenhang zwischen verschiedenen Parametern und dem Zeitpunkt der Messung (0h und 24h nach Diagnose) bezüglich der diagnostischen Sensitivität und Spezifität einer EOBI bei reifen Neugeborenen. Zum Zeitpunkt der Diagnose werden hier die besten Ergebnisse mit Interleukin 8 und dem IMI-Wert erzielt. Das CRP zeigt zu diesem Zeitpunkt erwartungsgemäß eine schlechte diagnostische Genauigkeit. Diese steigt zum Zeitpunkt 24h nach Diagnose an und zeigt dort die besten Ergebnisse. Der I/T-Quotient zeigt hier eine schlechte Sensitivität sowohl bei 0 als auch bei 24 h nach Diagnose.



**Abb. 6:** ROC Kurve für die Parameter IMI, IL-8, I/T-Quotient und CRP bei EOBI von reifen Neugeborenen (zum Zeitpunkt der Diagnose)



**Abb. 7:** ROC Kurve für die Parameter IMI, IL-8, I/T-Quotient und CRP bei EOBI von reifen Neugeborenen (24h nach Diagnose)

In Abb. 8 ist der zeitliche Verlauf der neugeborenen Patientin kumulativ dargestellt (0, 4, 12, 24 und 108 Stunden nach Diagnose). Die Parameter in roter Farbe (IL-8, IG, IMI und NRBC) zeigen einen prädiktiven Wert für eine NBI. Das CRP und der I/T-Quotient überschreiten erst nach 12h die entsprechenden Cut-Off-Werte. Nach 24 h zeigt die antibiotische Therapie erste Erfolge und die klinische Situation der Patientin verbessert sich.

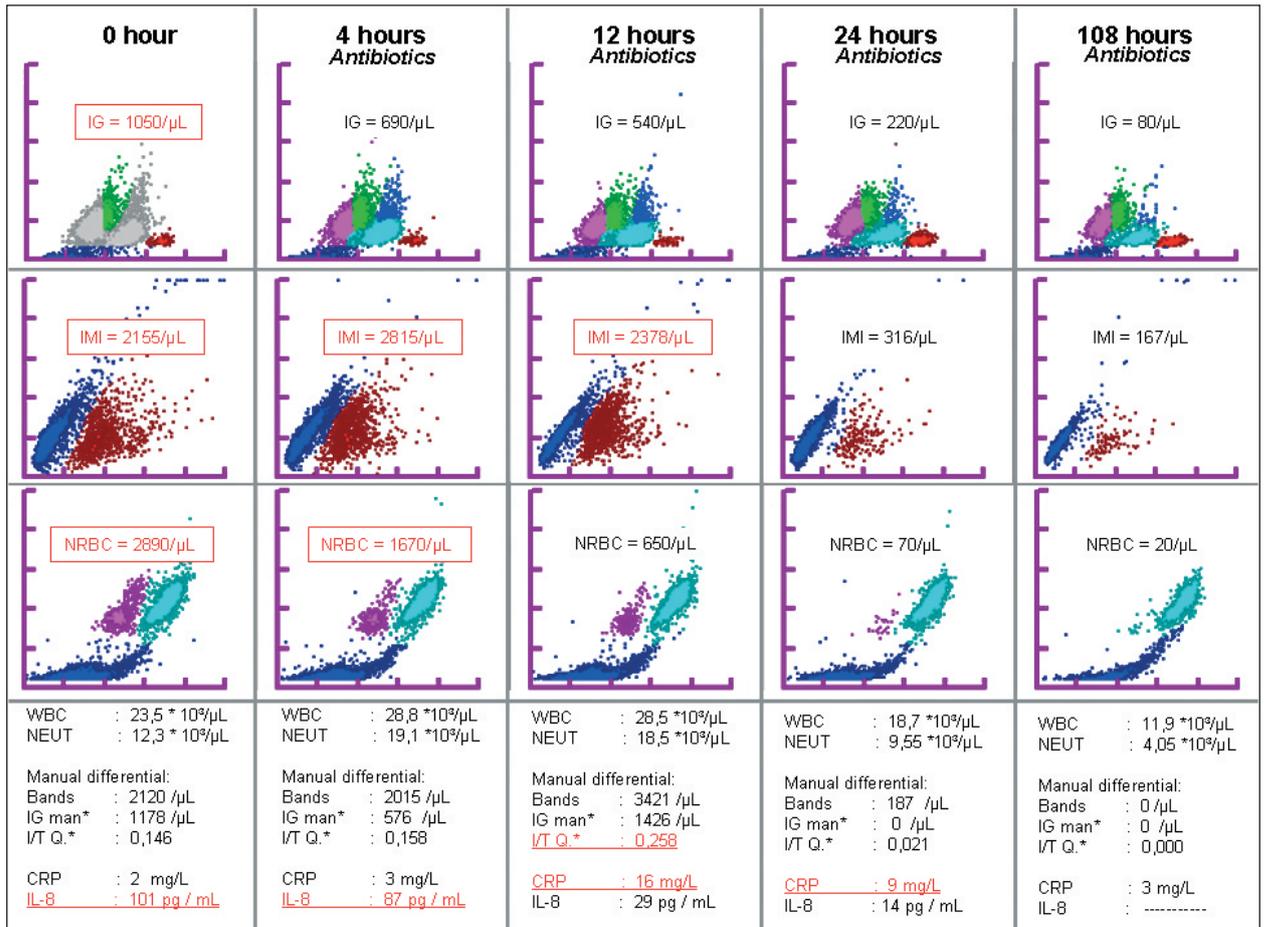


Abb. 8: Kumulativdaten (0, 4, 12, 24 und 108 Stunden) eines reifen neugeborenen Mädchens (Diagnose: EOBI) unter Antibiotikatherapie

In Abb. 9 stellt Herr Dr. Orlikowsky<sup>5</sup> den weiteren Nutzen solcher Parameter am Beispiel der IMI-Zählung dar. Neben der wertvollen klinischen Information als prädiktiver Wert der NBI sieht man hier, wie sich das Anforderungsverhalten der Klinik nach Einführung »neuer Parameter« entwickelt hat. Trotz steigender Geburtenzahl nehmen die Zahlen von Leukozytendifferenzierungen und Interleukin 8-Bestimmungen nach Einführung der IMI-Zählung im Jahr 2003 am xE-2100 signifikant ab.

»Neue Parameter«	–	IL-8	IMI	–	
Anzahl/Jahr	Jahr	1999	2001	2003	2004
Geburten		2.107	2.416	2.630	2.718
WBC-Differenzierung		7.257	7.219	3.443	2.100
IL-8		–	5.114	3.220	2.518
CRP		7.419	7.220	6.310	6.400

Abb. 9: Anforderungsentwicklung nach Einführung von Interleukin-8 und IMI-Zählung

## Zusammenfassung

Erkrankungen, speziell von neu- oder frühgeborenen Patienten mit hoher Inzidenz und einer erheblichen Morbiditäts- und Mortalitätsrate, bedürfen besonders hoher Aufmerksamkeit. Der Fall des Halbjahres und auch die ersten Ergebnisse der laufenden Studie aus der Universität Tübingen zeigen, dass innovative Parameter wie IG, IMI und NRBC, gemessen am xE-2100, dazu beitragen können, solche Erkrankungen wie NBI früher zu erkennen und somit den schnellen Einsatz einer zielgerichteten Therapie zu ermöglichen. Zusätzlich kann man im Labor den hohen Aufwand an mikroskopischen Untersuchungen mit limitiertem klinischem Nutzen deutlich reduzieren und durch objektive automatisierte Methoden ergänzen.

## Literatur

- (1) F. Neunhoeffer, Wertigkeit von IL-8 in Plasma und lysiertem Vollblut bei neonataler bakterieller Infektion. 2005: 9-11
- (2) Wim van de Meer, J.L. Willems. University St. Radboud Nijmegen, the Netherlands. Poster Microscopic band cell counting with a virtual slide. 2003
- (3) Dickerhoff, R.,A. von Rücker. University Johanniter child hospital Bonn, Germany. Sinn und Unsinn des Differentialblutbildes. Pädiat. Prax. 49, 621-629, 1995.
- (4) Bain BJ. Normal ranges. In: Blood cells, a practical guide. 2nd ed. Oxford: Blackwell, 1995:147-159.
- (5) Orlikowsky et al. University Hospital Dept. of Neonatology Tübingen, Germany. First results "New hematological parameters in neonatology" presented on the sysmex symposium 2005 in St. Wolfgangsee in Austria.
- (6) Orlikowsky et al. University Hospital Dept. of Neonatology Tübingen, Germany. Poster; Automatische Differenzierung des weißen Blutbildes bei Neugeborenen mit neonataler bakterieller Infektion (NBI), 2004.
- (7) Orlikowsky et al. University Hospital Dept. of Neonatology Tübingen, Germany/Lipopolysaccharide-binding protein in noninfected neonates and those with suspected early-onset bacterial infection. /J Perinatol. 2006 Feb;26(2):115-9/Items 21 - 23 of 23
- (8) Franz AR, Kron M, Pohlandt F, Steinbach G. Comparison of procalcitonin with interleukin 8, C-reactive protein and differential white blood cell count for the early diagnosis of bacterial infections in newborn infants. /Pediatr Infect Dis J. 1999 Aug;18(8):666-71.