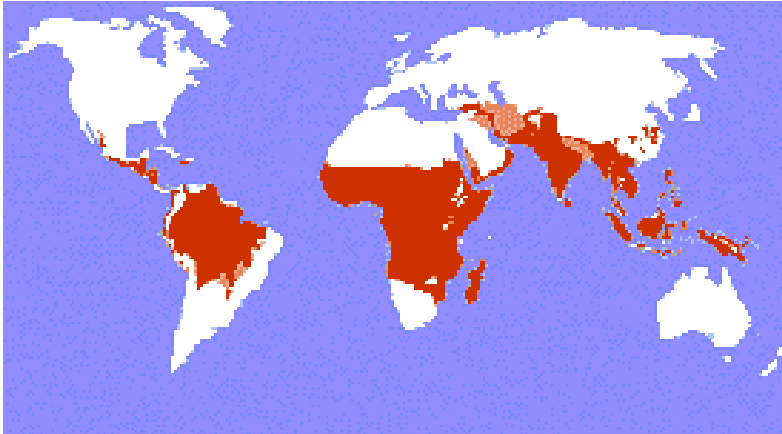


# Fluoreszenzdifferenzierung unterstützt die Malariadiagnostik

## Teil 1



**Abb. 1:** Verbreitungsgebiet der Malaria weltweit [4]

Obwohl Malariainfektionen hauptsächlich ein Problem der Tropen sind (Abb. 1), treten sie im Zuge von Tourismus und Globalisierung immer häufiger auch in unseren Breitengraden auf [1]. Laut WHO (World Health Organisation) ist die Anzahl der Malariainfektionen im Jahr 2000 in Europa seit 1970 um das Zehnfache auf 15.000 angestiegen. Weltweit erkranken jährlich 300 bis 500 Millionen Menschen [2,3]. Während jedoch in Ländern, in denen diese Erkrankung endemisch vorkommt, Diagnose und Behandlung Alltag sind, gilt dies leider nicht für Europa.

Häufig tun sich behandelnde Ärzte mit Beratungen zur Prophylaxe oder einer schnellen und eindeutigen Diagnose im Falle einer Infektion schwer. Nicht vertraut mit dem Krankheitsbild, können die primä-

ren klinischen Symptome wie Fieber und Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Vergrößerung der Leber oder der Milz, Übelkeit und Erbrechen, Unterleibschmerzen und/oder Diarrhoe als grippaler Infekt oder ähnliche leichte Erkrankungen missinterpretiert werden. Besonders kritisch wird es dann, wenn sich der zu behandelnde Patient gar nicht in Infektionsgebieten aufgehalten hat und somit nichts auf eine Malariainfektion hindeutet, ein zugegebenermaßen seltener, aber durchaus vorkommender Fall. Wertvolle Zeit kann so verstreichen, bis die richtige Diagnose gestellt wird und die Behandlung beginnen kann. Je nach Erregertyp kann eine solche Verzögerung fatal für den Patienten sein, insbesondere, da Europäer eine deutlich geringere Immunabwehr gegen diese Art der Infektion

aufweisen und der Krankheitsverlauf für den Patienten mit einem höheren Risiko behaftet ist [5].

Für den Patienten wie auch den behandelnden Arzt und das Labor ist es deshalb von größter Bedeutung, alle zur Verfügung stehenden Informationen so zu nutzen, dass eine schnelle Diagnose und Behandlung möglich wird. Dies gilt für Europa auch deshalb, weil hier kein Malaria-Schnelltest zum Standardprogramm bei der Erst-Diagnose von Patienten mit grippeartigen Symptomen gehört, sondern erst bei Verdacht auf eine solche Infektion speziell angefordert wird. Neben den klinischen Symptomen und Informationen über Reisen des Patienten können unter bestimmten Bedingungen auch Abweichungen im Blutbild herangezogen werden, um einen Malaria-Test oder Blutausschick („Dicker Tropfen“) überhaupt anzufordern. Letzteres setzt eine gute Kenntnis der Möglichkeiten, aber auch der Grenzen von Hämatologie-Analysegeräten sowie der zu erwartenden Muster im Blutbild voraus, speziell im Anfangsstadium der Infektion.

Zu berücksichtigen ist in diesem Zusammenhang die Sensitivität des Referenztests „Dicker Tropfen“, den die WHO mit 1:100.000 (für einen durchschnittlich ausge-

bildeten Untersucher) angibt. Eine solche Sensitivität wird auch von den Antigen-Tests gefordert, jedoch nicht immer erreicht und liegt außerhalb der Reichweite für jedes heute am Markt erhältliche Hämatologie-Analysegerät. Eine entsprechende Warnmeldung, die auf eine Malariainfektion mit der Sensitivität der heutigen Referenzmethode hinweist, ist daher für die heutigen Hämatologie-Analysegeräte leider noch nicht realisierbar.

Die Situation wird zusätzlich komplexer durch das Vorkommen verschiedener Malaria-Erreger, deren Lebenszyklus und Auftreten in den Erythrozyten des Wirtes durchaus sehr unterschiedlich sein können. Im Folgenden sollen die beiden Haupttypen der Malaria-Erreger genauer beschrieben werden: *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax*. Diese beiden Erregertypen sind die am verbreitetsten und weisen sehr charakteristische Unterschiede auf, sowohl im Krankheitsverlauf als auch im Blutausstrich und damit auch in den Ergebnissen im Hämatologie-Analysegerät.

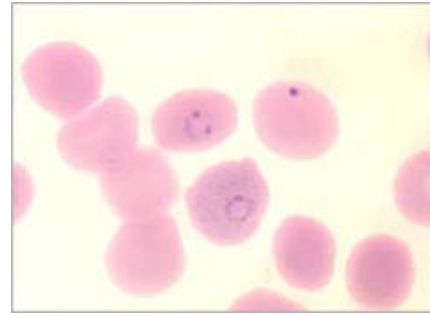
#### ***Plasmodium falciparum* – Erreger der Malaria tropica**

Dieser Erreger ist mit Abstand der gefährlichste aller Plasmodium-Arten, da er die meisten Todesopfer fordert - unbehandelt verlaufen ca. 30% aller Infektionen mit diesem Parasiten tödlich [6]. Zugleich ist er auch der am häufigsten vorkommende Erreger und mit Ausnahme von Europa und Australien endemisch in allen Kontinenten anzutreffen.

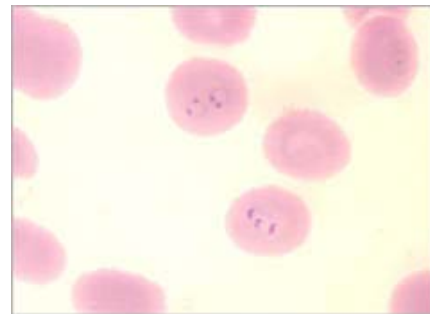
Nach dem Stich einer infizierten weiblichen Anophelesmücke, die für alle Malaria-Erreger als Zwischenwirt fungiert, befällt der Erreger zunächst die Leberzellen. Von dort werden nach mehreren Entwicklungsschritten die so genannten Merozoiten ins Blut entlassen, die als infektiöse Form in die Erythrozyten eindringen, sowohl in junge als auch reife Zellen. Dort entwickeln sie sich weiter zu Trophozoiten die im Ausstrich als typische Ringform erkennbar sind (Abb. 2 und 3).

Die weitere Vermehrung und Entwicklung der Erreger führt zum Platzen der Erythrozyten und aufgrund der dadurch freigesetzten Parasiten und ihrer Stoffwechselprodukte zu den klinisch erkennbaren Symptomen wie Fieber und Schüttelfrost. Die übliche Inkubationszeit beträgt 12 bis 14 Tage, wobei die Malaria tropica keine regelmäßigen Fieberschübe aufweist.

Als Besonderheit des Krankheitsbildes gilt die veränderte Oberflächeneigenschaft der befallenen Erythrozyten, sie „kleben“ quasi an den Endothelzellen der Gefäßinnenwände fest. Diese haftende Eigenschaft der Erythrozyten birgt das große Risiko der Malaria tropica, da Gefäßverschlüsse, speziell von Kapillargefäßen, z. B. im Gehirn (die sogenannte zerebrale Malaria), oder Nieren schwere Komplikationen nach sich ziehen können, die Hauptursache für die hohe Letalitätsrate dieses Erregertyps. Gleichzeitig bewirkt diese haftende Eigenschaft auch, dass nur bestimmte Formen befallener Erythrozyten im peripheren Blut



**Abb. 2:** Trophozoiten oder Ringformen bei einer *Plasmodium falciparum* Infektion



**Abb. 3:** Doppelte Ringformen des *Plasmodium falciparum* Erregers in Erythrozyten

nachweisbar sind, hauptsächlich die genannte Ringform.

Im Ausstrich lassen sich neben der Tatsache, dass vornehmlich die Ringform in Erythrozyten detektierbar ist, auch noch andere Besonderheiten feststellen:

1. Die befallenen und im Blutbild detektierbaren Erythrozyten sind nicht vergrößert.
2. Befallene Erythrozyten enthalten einen detektierbaren parasitären Nukleinsäureanteil im Gegensatz zu nicht befallenen roten Blutzellen. Hierbei können Ringformen mit zwei Chromatinknoten auftreten (siehe mittlere Zelle in Abb. 2).
3. Mehrere Ringformen in einem

Erythrozyten sind ebenfalls möglich (siehe Abb. 3).

4. Gametozyten treten im peripheren Blut erst nach ca. 4 Wochen auf, sind jedoch selten sichtbar. Diese geschlechtliche Form wird vom Zwischenwirt aufgenommen und entwickelt sich dort bis zur erneuten Übertragung in einen anderen Menschen fort.
5. Der Anteil infizierter Erythrozyten kann sehr hoch sein, wobei hier schon ein Anteil von unter 1‰ eine schwere Erkrankung bedeuten kann. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass der Erregeranteil stark ansteigt, während gleichzeitig die Erythrozytenzahl sinkt.
6. Ein weiteres hämatologisches Merkmal ist die sich verschlimmernde Anämie.
7. Daneben ist auch eine Thrombozytopenie und Leukozytopenie sowie das Auftreten einer Monozytose typisch für das Krankheitsbild. In einem sehr späten Stadium kann die Anzahl der Leukozyten dann wieder ansteigen.

Glücklicherweise birgt eine überstandene Malaria tropica Infektion nicht mehr das Risiko eines wieder auftretenden Fiebers Monate oder Jahre nach der Erstinfektion, da der Erreger nach dem ersten Entwicklungszyklus nicht in der Leber verbleibt, im Gegensatz zu den anderen Malaria hervorrufenden Erregerstämmen.

#### ***Plasmodium vivax* – Erreger der Malaria tertiana**

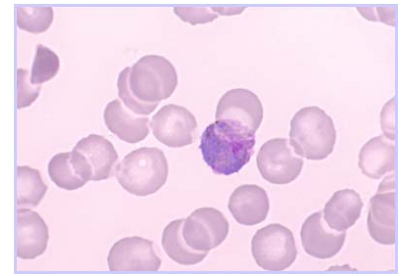
Grundsätzlich verläuft der Lebenszyklus von *Plasmodium vivax* ganz ähnlich wie jener von *Plasmodium falciparum*. Vom Krankheitsbild her

ist die Malaria tertiana jedoch nicht annähernd so gravierend wie die Malaria tropica.

So werden nur junge Erythrozyten befallen, was die Gesamtanzahl der infizierten Blutzellen erheblich verringert und damit die Pathogenität des Erregers im Vergleich zu *Plasmodium falciparum* deutlich vermindert. Die befallenen Erythrozyten haften nicht an Endothelzellen, da ihnen die „klebenden“ Eigenschaften fehlen. Somit sind die schwerwiegenden Komplikationen einer Malaria tropica in diesen Fällen nicht präsent. Fieberschübe treten oft, jedoch nicht immer in sehr regelmäßigen Abständen von etwa 48 Stunden auf, mit fast fieberfreien Phasen dazwischen [7].

Auch im Blutbild lassen sich einige Unterschiede im Vergleich zu *Plasmodium falciparum* erkennen:

1. Die Hämolyse junger Erythrozyten stimuliert die Produktion von Retikulozyten, deren Anteil im Verlauf der Infektion leicht ansteigt. Freien Erregern im Blut dienen diese jungen Zellen wiederum als Ziel.
2. Da Erythrozyten nicht an Endothelzellen der Blutgefäße haften bleiben, finden sich alle Reifungsformen in den roten Blutzellen des peripheren Blutes, d. h. neben den Trophozoiten (Ringformen) auch Merozoiten, Schizonten und Gametozyten.
3. *Plasmodium vivax* baut Hämoglobin zu Hämozin ab; auch bezeichnet als Schüffnersche Tüpfelung oder Malariapigment und im Ausstrich als kristalline Struktur deutlich erkennbar (siehe Abb. 4). Da alle befallenen



**Abb. 4:** Schizonten und Hämozin in einem Erythrozyten enthalten

Zellen im peripheren Blut weiterhin zirkulieren, sind auch diese Zellen detektierbar.

4. Die befallenen Erythrozyten vergrößern sich mit Wachstum und zunehmender Reifung der Erreger innerhalb der Zellen, bevor sie platzen.

Allerdings birgt *Plasmodium vivax* auch ein besonderes Charakteristikum, das für betroffene Patienten sehr unangenehm ist: Zirka alle 6 Monate ist mit einer erneuten Malariainfektion zu rechnen, da einige Erreger in der Leber in einem speziellen Entwicklungsstadium (Hypnozoit) verharren und sich erst nach Reaktivierung zu einem späteren Zeitpunkt weiterentwickeln. Im Extremfall können diese Rückfälle noch Jahre bis Jahrzehnte nach der ersten Infektion auftreten.

Die Malaria tertiana wird auch von dem Erreger *Plasmodium ovale* verursacht, während der vierte der Malaria-Erreger, *Plasmodium malariae*, die Malaria quartana verursacht.

#### **Fluoreszenzbasierte Technologie von XE-2100 und XT-2000i – Wo finden sich Malariaerreger im Scattergram?**

Fast alle der unter beiden Malaria-

erregern aufgelisteten hämatologischen Merkmale kann man sowohl im Ausstrich als auch in den Hämatologie-Analysegeräten XE-2100 und XT-2000i wieder finden. Vornehmlich sind es zwei Kanäle der beiden SYSMEX Geräte XE-2100 und XT-2000i, in denen die Blutparasiten bei entsprechend starkem Befall auffindbar sind:

- RET-Kanal
- DIFF-Kanal

Für beide Kanäle werden spezielle Fluoreszenz-Farbstoffe eingesetzt, die sehr spezifisch Nukleinsäuren anfärben. Je höher der Anteil der Nukleinsäuren (DNA und RNA) in der Zelle ist, desto größer ist auch das resultierende Fluoreszenzsignal. Im Folgenden werden beide Kanäle etwas detaillierter vorgestellt und Hinweise geliefert, wo und warum im Scattergram von Malariaerregern befallene Erythrozy-

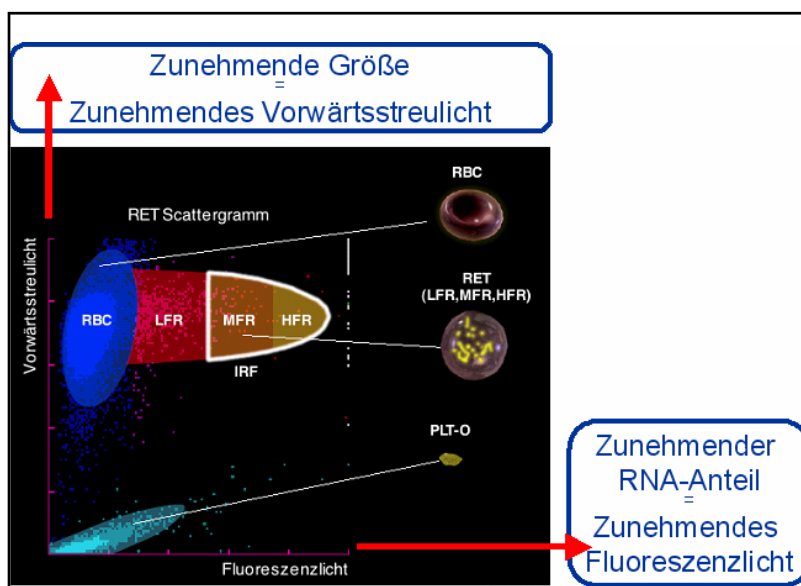
ten zu finden sind. Darüber hinaus gibt es noch weitere Parameter des Blutbildes, die in Kombination zusätzlich auf eine Malariainfektion hindeuten können und Basis für die von SIS (SYSMEX INFORMATION SYSTEM) angegebenen Warnmeldungen sind. Aufgrund vielfacher Erfahrungen mit Einzelfällen bietet SYSMEX im SIS auch eine entsprechende Warnmeldung „Malaria“, die die im Folgenden beschriebenen Phänomene in einem regelbasierten System zusammenfasst.

### RET-Kanal

Einziges morphologisches Unterscheidungskriterium zwischen Erythrozyten und Retikulozyten ist der RNA-Anteil der Retikulozyten, und dies gilt auch für die automatisierte Zählung (Abb. 5). Dieser Nukleinsäureanteil wird mittels eines patentierten Fluoreszenz-Farbstoffes im RET-Kanal speziell

angefärbt. Je höher der Nukleinsäureanteil der Retikulozyten, desto jünger sind die Zellen und desto größer ist gleichzeitig auch ihr Fluoreszenzsignal im RET-Kanal. Dieses verhält sich proportional zum RNA-Anteil der Retikulozyten, d. h. reife Erythrozyten weisen ein sehr geringes bzw. gar kein Fluoreszenzsignal auf und sind somit auf der X-Achse sehr weit links anzutreffen. Leukozyten, die in diesem Kanal nicht lysiert werden, besitzen einen Zellkern mit deutlich mehr Nukleinsäuren als Retikulozyten und liegen deshalb außerhalb des Scattergrams.

Malariaerreger enthalten ebenfalls Nukleinsäuren. Auch diese werden im RET-Kanal angefärbt und detektiert. Angesichts der unterschiedlichen hämatologischen Merkmale der beiden wichtigsten Malariaerreger *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium vivax* ist das Erscheinungsbild der beiden Typen im Scattergram jeweils sehr unterschiedlich. So lässt sich ein Befall mit *Plasmodium vivax* Erregern aufgrund der niedrigen Gesamtanzahl infizierter Erythrozyten und der erwähnten geringen Sensitivität für die Detektion von diesen Blutparasiten in den Hämatologiegeräten XE-2100 und XT-2000i zumindest im RET-Kanal nicht erkennen.

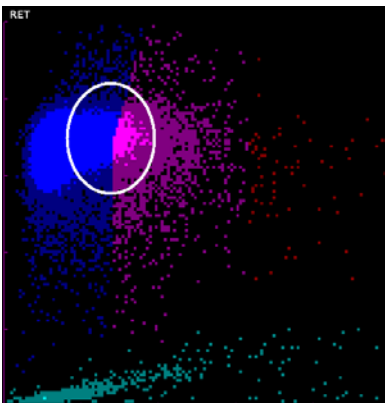


**Abb. 5:** Der RET-Kanal von XE-2100 und XT-2000i. Auf der X-Achse ist aufsteigend die Fluoreszenzintensität basierend auf dem Nukleinsäureanteil der Zelle aufgetragen. Die Y-Achse dagegen markiert aufsteigend die Größe der Zellen.

# Fluoreszenzdifferenzierung unterstützt die Malariadiagnostik

## Teil 2

Anders ist dagegen die Situation bei einer Malaria-Infektion mit *Plasmodium falciparum*. Der Anteil an infizierten Erythrozyten ist mitunter relativ hoch, während gleichzeitig mehrere Ringformen und solche mit mehreren Chromatinknoten auftreten können. Beides führt dazu, dass der Anteil an Erythrozyten, die einen nicht unerheblichen Anteil an Nukleinsäuren enthalten, deutlich steigt. Abb. 6 zeigt an, wo genau sich bei einer Malaria tropica die befallenen Erythrozyten finden: Die mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten weisen ein durch die parasitären Nukleinsäuren erhöhtes Fluoreszenzsignal im RET-Scattergram auf. Gleichzeitig sind die befallenen Zellen jedoch nicht vergrößert, weshalb das Vorwärtstrelucht nicht erhöht ist.



**Abb. 6:** Das RET-Scattergram eines mit *Plasmodium falciparum* infizierten Patienten

### Warnmeldungen aus dem RET-Kanal

Alle derzeit auf dem Markt befindlichen Hämatologie-Analysegeräte sind konzipiert Anomalien im Blutbild festzustellen, jedoch nicht um spezielle Inhaltsstoffe von Blutzellen zu erkennen. Die Sensitivität eine Malaria-Infektion zuverlässig diagnostizieren zu können, beispielsweise in Form einer Warnmeldung des Hämatologiegerätes, ist zu gering. Hierfür bleibt der „Dicke Tropfen“ nach wie vor unersetzlich. Dies gilt auch für die Geräte XE-2100 und XT-2000i, die sehr spezifisch den intrazellulären Nukleinsäuregehalt von Blutzellen detektieren, aber nicht zwischen parasitären Nukleinsäuren und zelleigener DNA/RNA oder bei Retikulozyten RNA unterscheiden können.

XE-2100 und XT-2000i zeigen bei Malariainfektionen durch *Plasmodium falciparum*, die auch im RET-Scattergram sichtbar sind, üblicherweise folgende Resultate an:

- „RET Abn Scattergram“ lautet die angezeigte Warnmeldung
- Scheinbar stark erhöhte „Retikulozytenanzahl“, speziell der reiferen „Retikulozyten“. Insbesondere der LFR-Wert (Low Fluorescence Ratio) der Retikulozytenparameter kann enorm erhöht sein und einen Anteil von

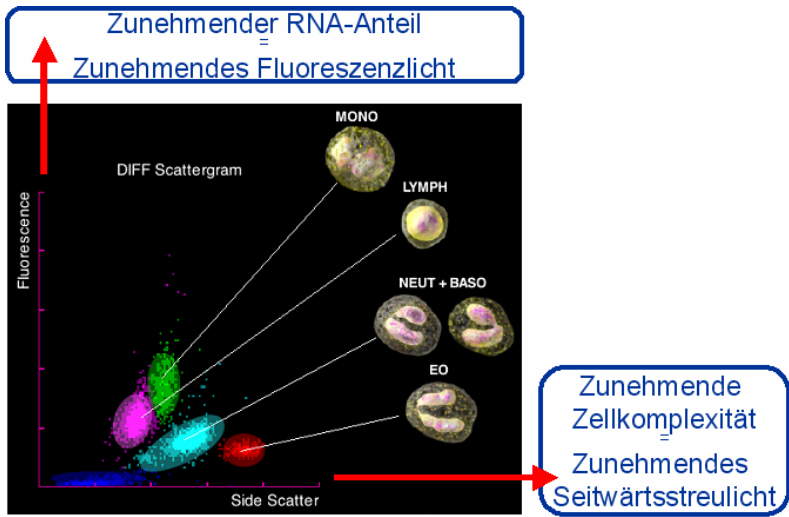
ca. 90% erreichen.

- Die Anzahl sehr junger Retikulozyten, IRF (Immature Retikuloocyte Fraction), ist gering bzw. normal, während gleichzeitig die „Retikulozytenzahl“ scheinbar stark erhöht ist. Physiologisch ist eine solch stark erhöhte Gesamtzahl von Retikulozyten bei normaler Produktion nicht möglich. Die Konstellation dieser Parameter kann jedoch durch eine Infektion mit dem *Plasmodium falciparum* ausgelöst sein.

Insbesondere die Retikulozytenzahl und der prozentuale Wert des LFR könnten herangezogen werden, um das Anschlagen der Therapie bei einer Malariainfektion zu überprüfen. Die Retikulozytenzahl sollte deutlich zurückgehen, wenn der Befall der Erreger in den Erythrozyten rückläufig ist.

### DIFF-Kanal

Im DIFF-Kanal werden Leukozyten nach ihrem Nukleinsäureanteil und ihrer inneren Struktur unterschieden, nicht nach ihrer Größe (Abb. 7). Dies gewährleistet eine exakte Zählung von Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und Neutrophilen. Gleichzeitig bietet es eine exzellente Registrierung unreifer Blutzellen und damit ein verlässliches Flagging auch von hochpathologischen Proben. Grund



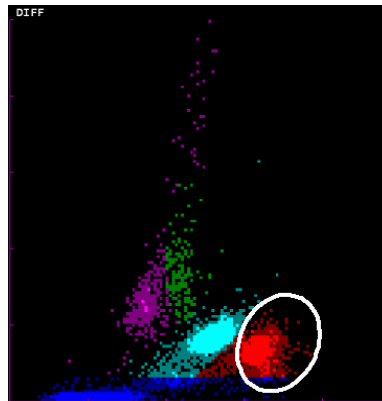
**Abb. 7:** Der DIFF-Kanal von xE-2100 und xT-2000i. Auf der Y-Achse ist aufsteigend die Fluoreszenzintensität basierend auf dem Nukleinsäureanteil der Zelle aufgetragen. Die X-Achse dagegen markiert aufsteigend die zunehmende Komplexität der Zellen, insbesondere basierend auf dem Anteil an Granula

hierfür ist der beträchtliche Nukleinsäureanteil von jungen teilungsaktiven Blutzellen im Vergleich zu ausgereiften Leukozyten im Blutkreislauf, denn je unreifer die Blutzelle, desto höher ihr Anteil an RNA.

Auch wenn die durch Malariaerreger befallenen Erythrozyten einen deutlich erhöhten Nukleinsäureanteil im Vergleich zu nicht befallenen Erythrozyten aufweisen, ist das resultierende Signal dennoch viel kleiner als von jeder kernhaltigen Zelle, die DNA enthält und daher immer ein stärkeres Fluoreszenzsignal hervorruft. Dementsprechend finden sich Erythrozyten oder Retikulozyten, befallen oder nicht, im DIFF-Scattergram im Bereich der „Ghost Area“ (dunkelblau gekennzeichnete Bereich in Abb. 7).

Vor allem bei *Plasmodium vivax* Infektionen lässt sich bei Vorliegen jener freien Erregerformen der

Schizonten und Gametozonten im DIFF-Scattergram ein erhöhtes Seitwärts- und Fluoreszenz-Streulicht im Detektionsbereich der Eosinophilen beobachten (Abb. 8). Auch das freigesetzte Hämozoin dürfte zu diesem erhöhten Seitwärts- und Fluoreszenz-Signal seinen Beitrag leisten. Weniger spezifisch lassen sich dagegen Infektio-



**Abb. 8:** Schizonten und Gametozonten verursachen das deutlich erhöhte Seitwärtsstreulichtsignal speziell im Detektionsbereich der Eosinophilen.

nen mit *Plasmodium falciparum* im DIFF-Scattergram erkennen.

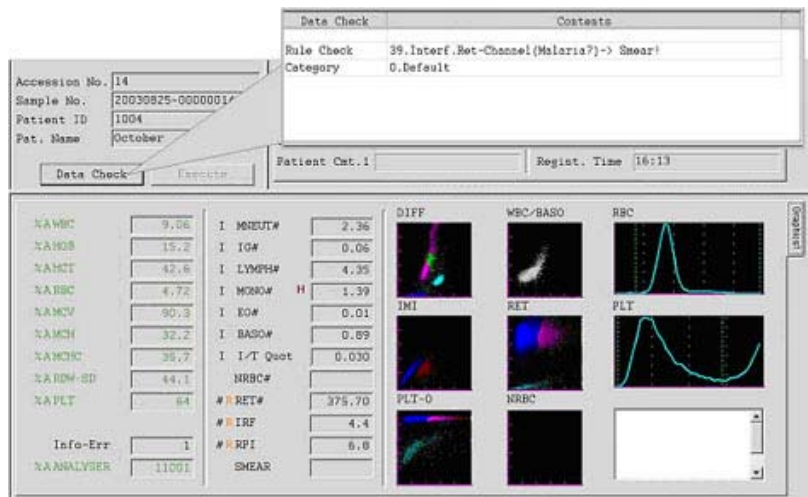
**Warmmeldungen aus dem DIFF-Kanal**

xE-2100 und xT-2000i zeigen bei Malariainfektionen durch *Plasmodium vivax*, die auch im DIFF-Scattergram sichtbar sind, üblicherweise folgende Resultate an:

- Bei Resultaten wie in Abb. 8 dargestellt, wird das Eosinophilen-Ergebnis komplett gesperrt aufgrund der störenden zusätzlich detektierten Partikel.
- Als angezeigte Warmmeldung findet sich häufig auch „Atypical Lymph?“, hervorgerufen durch reaktive Lymphozyten.

**sis-Regelwerk für Malaria Warmmeldungen**

Sofern ein starker Befall mit Malaria-Erregern vorliegt, der sich deutlich im RET- oder DIFF-Scattergram zeigt und in unterschiedlichen Gerätewarmmeldungen resultiert, kann mit Hilfe entsprechender Regeln im SYMEX INFORMATION SYSTEM (SIS) das Resultat zuverlässig nach technischen Gesichtspunkten interpretiert werden. Eine solche technische Validierung resultiert dann in einer genaueren Warmmeldung: „Malaria? Ausstrich prüfen!“. Voraussetzung für eine solche Warmmeldung vom sis ist, die zuvor beschriebenen malarieatypischen Charakteristika für RET- und DIFF-Scattergramme mit hämatologischen Basisregeln zu kombinieren. Gleichzeitig werden die ursprünglichen Gerätewarmmeldungen nicht mehr angezeigt.



**Abb. 9:** Befund für eine *Plasmodium falciparum* Infektion, die mit Hilfe von SIS die Warnmeldung „Malaria?“ generiert hat.

## Literatur

- [1] Muentener P et al: Imported malaria (1985–95): trends and perspectives. Bulletin of the World Health Organization, 77:560–565, 1999.
- [2] World Health Organization: World malaria situation in 1994. Wkly, Epidem Rec., No 36, p270-290, 1997.
- [3] National Institute of Health: Malaria, NIH Publication No 02-7139, 2002.
- [4] Institutum Tropologicum Helveticum: [www.infektionsbiologie.ch](http://www.infektionsbiologie.ch) (accessed on 29-04-05)
- [5] World Health Organization: International travel and health publication, chapter 7. Malaria, [http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241580364\\_chap7.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241580364_chap7.pdf) (accessed on 09-06-05)
- [6] Medicine-Worldwide, OnVista Media GmbH: [www.m-ww.de/krankheiten/erreger/parasiten\\_protozoen/plasmodium\\_falciparum.html](http://www.m-ww.de/krankheiten/erreger/parasiten_protozoen/plasmodium_falciparum.html) (accessed on 29-04-05)
- [7] Medicine-Worldwide, OnVista Media GmbH: [www.m-ww.de/krankheiten/erreger/parasiten\\_protozoen/plasmodium\\_vivax.html](http://www.m-ww.de/krankheiten/erreger/parasiten_protozoen/plasmodium_vivax.html) (accessed on 29-04-05)

