

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Automatisierte Bestimmung von Volumen, Granularität, Kernstruktur und  
Oberflächenbeschaffenheit von neutrophilen Granulozyten, Monozyten  
und Lymphozyten:  
Präzision, Stabilität und Wertigkeit beim Einsatz als Infektions- und  
Sepsismarker**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von  
Daniel Mardi  
aus Essen

Magdeburg 2010

## Bibliographische Angaben:

### **Bibliographische Beschreibung:**

Mardi, Daniel: Automatisierte Bestimmung von Volumen, Granularität, Kernstruktur und Oberflächenbeschaffenheit von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten: Präzision, Stabilität und Wertigkeit beim Einsatz als Infektions- und Sepsismarker. 2010. – 90 Bl.: 21 Abb., 9 Tab.

### **Kurzreferat:**

Die Sepsis hat aufgrund ihrer Häufigkeit, ihrer Mortalitätsrate und ihrer Kostenintensität einen hohen sozioökonomischen Stellenwert erlangt. Neben dem Erregernachweis, der jedoch nur etwa in der Hälfte der Fälle aus Blutkulturen gelingt, stehen unterschiedliche infektionsimmunologische Biomarker (C-reaktives Protein (CRP), Leukozytose oder – penie, Zeichen der physiologischen Linksverschiebung) und Entzündungsmediatoren (Interleukin 6 (IL-6), Procalcitonin (PCT)) für eine schnelle Diagnostik zur Verfügung. Obwohl unterschiedliche Zellkompartimente der spezifischen und unspezifischen Immunität an der Immunantwort beteiligt sind, spielen zelluläre Marker bislang in der Sepsis-Diagnostik eine untergeordnete Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Lasertechnologie die automatisierte Bestimmung von Volumen, Granularität, Kernstruktur und Oberflächenbeschaffenheit von zirkulierenden Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten - sogenannte morphometrische Parameter - durchgeführt. Verglichen wurden diese zellulären Parameter mit CRP, Leukozytenzahl und IL-6 bei Patienten mit Sepsis, organspezifischer Infektion und gesunden Kontrollen. Die Untersuchungen an Patienten mit Sepsis zeigten, dass insbesondere die mittleren Volumina von Neutrophilen (MNV) und Monozyten (MMV) signifikant verändert waren im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Im Hinblick auf Sensitivität bzw. Spezifität zur Prädiktion von Sepsis waren die morphometrischen Parameter bei definierten cut-offs vergleichbar mit CRP-Konzentrationen von  $> 60$  mg/dl.

**Schlüsselwörter:** VCS-Parameter, Sepsis, Neutrophilen, Monozyten, Lymphozyten, MNV, MMV, prädiktive Marker

# INHALTSVERZEICHNIS

## Abkürzungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>1. <u>Einleitung</u></b>	8
1.1 Definition einer Sepsis	9
1.2 Ökonomische Bedeutung	10
1.3 Prävalenz, Inzidenz, Morbidität und Letalität	10
1.4 Pathophysiologie der Sepsis	11
1.5 Diagnostische Messgrößen der Sepsis und schweren Infektion	14
1.5.1 C-reaktives Protein (CRP)	14
1.5.2 Interleukin-6 (IL-6)	15
1.5.3 Procalcitonin (PCT)	16
1.5.4 Tumornekrosefaktor- (TNF- )	17
1.6 Quantitative / Qualitative Veränderungen der Immuneffektorzellen	19
1.6.1 Leukozytose / Leukopenie	19
1.6.2 Morphologische und funktionelle Veränderungen von Leukozyten bei bakteriellen Entzündungsprozessen	20
<b>2. <u>Zielsetzung</u></b>	22
<b>3. <u>Patienten, Material und Methoden</u></b>	24
3.1 Material	24
3.1.1 Chemikalien / Lösungen	24
3.1.2 Patientenauswahl und Studiendesign	24
3.1.2.1 Auswahl von Patienten mit physiologischer Linksverschiebung	24
3.1.2.2 Auswahl von Patientenproben für Untersuchungen zur Präzision in Serie von automatisiert gemessenen Volumenparameter und Einfluss der Probenalterung	24
3.1.2.3 Auswahl von Patienten mit Sepsis, organbezogenen Infektionen und Kontrollen	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Automatisierte Messung des Gesamtleukozyten	26

3.2.2	Bestimmung der Volumenparameter von Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten mittels VCS-Technologie	26
3.2.2.1	Prinzip der Bestimmung von Zellvolumen, Kern-Plasma-Relation und Granularität mittels VCS-Technologie	27
3.2.3	Untersuchungen zur Präzision der VCS-Parameter und Einfluss von Probenalterung	30
3.2.4	Anfertigen von peripheren Blutausstrichen und Färbung nach Pappenheim	30
3.2.5	Kriterien zur mikroskopischen Differenzierung von Patientenproben mit physiologischer Linksverschiebung	31
3.2.6	Bestimmung von CRP	32
3.2.7	Bestimmung von Interleukin 6	32
3.2.8	Mikrobiologische Untersuchungen der Blutkulturen	33
3.3	Statistische Analyse	33
<b>4.</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	34
4.1	Präzision der Lageparameter in Serie	34
4.2	Einfluss der Probenalterung auf die Lageparameter	38
4.2.1	Neutrophile Granulozyten	39
4.2.2	Monozyten	41
4.2.3	Lymphozyten	44
4.3	Intraindividuelle Vergleichbarkeit von Anteil an stabkernigen Granulozyten nach mikroskopischer Differenzierung und VCS-Lageparametern	46
4.4	Mikrobiologische und anthropometrische Daten der Patienten mit Sepsis, organbezogener Infektion und Kontrollen	48
4.5	VCS-Parameter von Neutrophilen und Monozyten bei Patienten mit Sepsis, organspezifischer Infektion und Kontrollgruppe	50
4.5.1	Neutrophilen	51
4.5.2	Monozyten	51
4.5.3	Lymphozyten	53
4.6	Beziehungen zwischen VCS Parameter, Leukozytenzahl und Serummarker der Inflammation (IL-6 und CRP)	53
4.7	Vorhersagewerte im Hinblick auf die Prädiktion einer Sepsis	53

<b>5.</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	56
5.1	Stabilität und Präzision der morphometrischen VCS-Parameter	56
5.2	Eignung morphometrischer VCS-Parameter zur Bestimmung der Linksverschiebung	58
5.3	Signifikanz morphometrischer VCS-Lageparameter, IL-6, CRP und Gesamtleukozytenzahl zur Differenzierung von Sepsis und organbezogener Infektion	60
<b>6.</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	64
<b>7.</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	66
	<b><u>Anhang</u></b>	74
	<b>A1: Abbildungsverzeichnis</b>	
	<b>A2: Tabellenverzeichnis</b>	
	<b>Danksagung</b>	80
	<b>Erklärung nach Promotionsordnung</b>	81
	<b>Darstellung des Bildungsweges</b>	82

## Abkürzungsverzeichnis

ACCP = American College of Chest Physicians  
AML = Acute Myeloid Leukemia (akute myeloische Leukämie)  
ANOVA = Analysis Of Variance (Varianzanalyse)  
APC = aktiviertes Protein C  
AUC = Area under the curve  
CRP = C-reaktives Protein  
DAMP = danger associated molecules  
DIC = disseminierte intravasale Koagulopathie  
FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)  
HMGB1 = High-Mobility-Group-Protein B1  
HSP = Hitzeschockproteine  
ICAM = intracellular adhesion molecule  
IL 1, 4, 6, 8, 10, 17A = verschiedene Interleukine  
KD = Kilodalton  
LEUKO = Leukozyten  
LBP = Lipopolysaccharide Binding Protein  
LPS = Lipopolysaccharide  
MIF = Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor  
MLC = mittlere Leukozyten-Konduktivität  
MLS = mittlere Leukozyten-Streuung  
MLV = mittleres Leukozyten-Volumen  
MMC = mittlere Monozyten-Konduktivität  
MMS = mittlere Monozyten-Streuung  
MMV = mittleres Monozyten-Volumen  
MNC = mittlere Neutrophilen-Konduktivität  
MNS = mittlere Neutrophilen-Streuung  
MNV = mittleres Neutrophilen-Volumen  
MPV = Mean Platelet Volume (mittleres Blutplättchen Volumen)  
mmHg = Millimeter Quecksilbersäule (Hg chem.: Quecksilber)  
NF-kB = nukleärer Faktor-kB  
NO = Stickstoffoxide  
NODs = Nukleotid bindende Oligomerisierende Domänen Proteine

PAI = Plasminogen Aktivator Inhibitor

PAMPS = pathogen-associated microbial patterns

pCO<sub>2</sub> = Kohlendioxidpartialdruck

PCT = Procalcitonin

PRRS = pattern recognition receptors (mustererkennende Rezeptoren)

SCCM = Society of Critical Care Medicine

SIRS = Systemic Inflammatory Response Syndrome

SPSS = Statistical Product and Service Solutions (Software zur statistischen Datenanalyse)

TFPI = tissue factor pathway inhibitor

TLR4 = Toll-like Rezeptor 4

TF = tissue factor

TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor alpha

VCS = Volumen, Konduktivität und Streuung (volume, conductivity, scatter)

WBC = white blood count (Leukozytenzahl)

## **1. Einleitung**

Der Begriff Sepsis, im Volksmund auch Blutvergiftung genannt, wurde bereits von Hippokrates geprägt und stammt aus dem Griechischen Wort für „faul machen“. Ibn Sina (979-1037) dokumentierte, dass „faules Blut“ (Septikämie) bei Betroffenen Fieber auslöste. Im 17. Jahrhundert beschrieb Hermann Boerhave, dass die Sepsis durch Erreger von außen (Luft) verursacht wird. Ignaz Semmelweis entdeckte im 19. Jahrhundert, dass der Grund für die hohe Sterblichkeitsrate bei Wöchnerinnen in der mangelnden Hygiene lag, worauf er eine Händedesinfektion einführte. Louis Pasteur postulierte, dass Prozesse wie Fäulnis und Verwesung durch kleinste einzellige Lebewesen, die er Bakterien und/oder Mikroben nannte, verursacht wurden. Außerdem stellte er fest, dass diese Krankheitserreger in Flüssigkeit durch Erhitzen abgetötet werden können. Robert Koch schließlich führte, nach Untersuchungen von Joseph Lister, die Dampfsterilisation medizinischer Gerätschaften ein. Trotz dieser Desinfektionsverfahren starben immer noch viele Menschen an der Sepsis. So dauerte es bis ins 20. Jahrhundert bis die Sterblichkeitsrate mit Hilfe der Entwicklung der Antibiotika gesenkt werden konnte.

Die moderne Definition der Sepsis, 1989 von Roger C. Bone veröffentlicht, spricht von einer „Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“. Sie gilt als eine der Hauptursachen für die Morbidität und Sterblichkeit auf Intensivstationen. Die Therapiekosten der Sepsis, schweren Sepsis und des septischen Schocks in Deutschland liegen bei ca. 1.77 Milliarden Euro pro Jahr. Dementsprechend ist das Ziel der „Surviving Sepsis Campaign“ die Verringerung der Letalität und Verbesserung der Therapie von Patienten mit einer Sepsis (Dellinger et al. 2004).

Verschiedene Behandlungsstrategien sind vorhanden, aber um eine möglichst effektive Behandlung zu gewährleisten, muss die Erkrankung so früh wie nur möglich erkannt werden. Eine frühzeitige Diagnosestellung ist diesbezüglich wichtiger als eine spezifische, aber spät begonnene Sepsis-Therapie.

Obwohl die Sepsis durch spezifische Kriterien charakterisiert wird, können die Symptome auf andere kritische Erkrankungen hindeuten. Des Weiteren müssen die Anzeichen nicht für den Grad der Sepsis sprechen.

## 1.1. Definition einer Sepsis

Wie bereits oben erwähnt wurde, ist die moderne Definition der Sepsis 1989 von Bone veröffentlicht worden.

In der Erweiterung dieser Definition wurden auf der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) folgende medizinische Begriffe neu eingeführt:

<b>Begriff</b>	<b>Definition</b>
Bakteriämie	Vorkommen lebensfähiger Bakterien im Blut
Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)	Generalisierte hyperinflammatorische Reaktion verschiedener Ursachen (z.B. Infektion, Verbrennung, Trauma)
Sepsis	Systemische Reaktion auf eine Infektion, im Rahmen derer mindestens zwei der SIRS-Kriterien vorliegen (SIRS mit dokumentierter Infektion)
Schwere Sepsis	SIRS mit dokumentierter Infektion und Beeinträchtigung der Hämodynamik, Laktatazidose, Oligurie oder akuter Verschlechterung des mentalen Status (Sepsis mit Organdysfunktionen)
Septischer Schock	Sepsis induzierte Hypotension

Zur Definition einer Sepsis müssen mindestens zwei der folgenden vier Kriterien des sogenannten systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) erfüllt sein: Die rektal gemessene Körpertemperatur muss über 38° C oder weniger als 36° C betragen, die Herzfrequenz 90 Schläge / min übertreffen, die Atemfrequenz mehr als 20 / min erreichen beziehungsweise der pCO<sub>2</sub> einen Druck von unter 32 mmHg bei Spontanatmung anzeigen und die Leukozytenanzahl einen Wert von mehr als 12.000/ l oder weniger als 4.000/ l betragen. Gegebenenfalls spricht, gemeinsam mit der klinischen Symptomatik, eine Erhöhung auf mehr als 10 % unreifer neutrophiler Granulozyten für eine Sepsis. Bei Vorliegen mindestens einer infektionsbezogenen Organdysfunktion wird eine schwere Sepsis angenommen. Der Begriff des septischen Schocks ist auf Patienten beschränkt, die trotz entsprechender therapeutischer Maßnahmen, wie zum Beispiel die Gabe von Antibiotika,

Katecholaminen, Protein C, Kortikosteroiden, intensivierter Insulintherapie, Sauerstoffbeatmung und Volumentherapie weiterhin ein Kreislaufversagen aufweisen (Konsensus-Konferenz ACCP/SCCM).

In den USA, Kanada und Australien werden für die weiterführende laboratoriumsmedizinische Diagnostik der Sepsis lediglich die Blutsenkungsreaktion und das Differentialblutbild verwendet, beziehungsweise den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen ein hoher Stellenwert eingeräumt.

In Europa ist seit vielen Jahren die Bestimmung des C-reaktiven Proteins (CRP) klinische Routine. Auch die Bestimmung des Procalcitonins (PCT) zur Diagnose und Verlaufskontrolle der Sepsis gewinnt bei deutschen Intensivmedizinern immer mehr an Bedeutung (Tschaikowsky et al. 2010, Reinhart et al. 2010). Über 80 % der Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock wiesen in der SepNet-Studie des Kompetenznetzwerkes Sepsis keine positive Blutkultur auf (Brunkhorst et al. 2005). Positive Blutkulturen weisen nur eine geringe Sensitivität bei Fällen der Sepsis auf, da sie auch bei Patienten mit nicht-systemischen Infektionen positiv ausfallen können (Procop et al. 1997).

## **1.2. Ökonomische Bedeutung**

Die direkten Kosten, die für die intensivmedizinische Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis anfallen, liegen in Deutschland bei ca. 1.77 Milliarden Euro. Somit werden ca. 30 % des Budgets für Intensivmedizin in die Behandlung der schweren Sepsis investiert.

Die indirekten Kosten, welche durch Produktivitätsverlust entstehen, werden auf zusätzliche ca. 4.5 Milliarden Euro geschätzt, sodass von Gesamtkosten in Höhe von ca. 6.3 Milliarden Euro auszugehen ist, welche durch die schwere Sepsis in Deutschland verursacht wird (Brunkhorst et al. 2005).

## **1.3. Prävalenz, Inzidenz, Morbidität und Letalität**

Im Rahmen einer Beobachtungsstudie über 3877 Sepsis-Patienten auf deutschen Intensivstationen konnten für Deutschland valide und repräsentative Daten zur Prävalenz, Inzidenz, Morbidität und Letalität erhoben werden. Die Definitionen der ACCP / SCCM Konsensus-Konferenz wurden dabei angewendet. Demzufolge betrug die Prävalenz von Infektionen 34.7 % (1348 Patienten). Eine schwere Sepsis, bzw. einen septischen Schock wiesen 11 % und eine Sepsis 12 % aller Patienten auf. Auf Deutschland hochgerechnet bedeutet dieses, dass pro Jahr 75.000 Einwohner (110 von 100.000) an einer schweren Sepsis

bzw. septischem Schock und 79.000 (116 von 100.000) an einer Sepsis erkranken. Mit insgesamt 154.000 Erkrankten stellt die Sepsis damit die siebthäufigste Krankenhausentlassungsdiagnose unter den lebensbedrohlichen Erkrankungen dar. Die 90-Tage-Sterblichkeit von Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock betrug 54 %. Des Weiteren verstarben 20 % der Patienten mit Sepsis.

Mit ca. 60.000 Todesfällen stellen septische Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache nach dem akuten Myokardinfarkt aber vor der Herzinsuffizienz dar. Es versterben täglich 162 Patienten in Deutschland an einer Sepsis, vergleichbar mit dem Tod am akuten Herzinfarkt (175 / Tag) und mehr als an Brustkrebs (49 / Tag) oder Darmkrebs (55 / Tag).

Nach den offiziellen Zahlen des Statistischen Bundesamtes hingegen (ICD-10 basierend) erkranken pro Jahr ca. 39.000 Einwohner an einer Sepsis, von denen ca. 6000 versterben. Demzufolge werden Häufigkeit und Sterblichkeit der Sepsis um den Faktor 4 bzw. 10 unterschätzt. Wichtig ist auch die Erkenntnis, dass die Sepsis nicht nur bei alten und schwerstkranken Patienten, sondern auch bei jungen und bisher gesundheitlich wenig kompromittierten Patienten auftritt.

Nach Betrachtung der Daten erscheint eine frühzeitige Diagnose und adäquate Verlaufsbeobachtung umso wichtiger, weil dadurch eine effizientere Therapie schwerstkranker Patienten auf den Intensivstationen erreicht werden könnte. Untersuchungen zeigten nämlich, dass die initiale antimikrobielle Therapie, abhängig von der Diagnose und dem Verlauf, den wichtigsten Einfluss auf die Prognose bei kritischen Patienten hat (Valles et al. 2003).

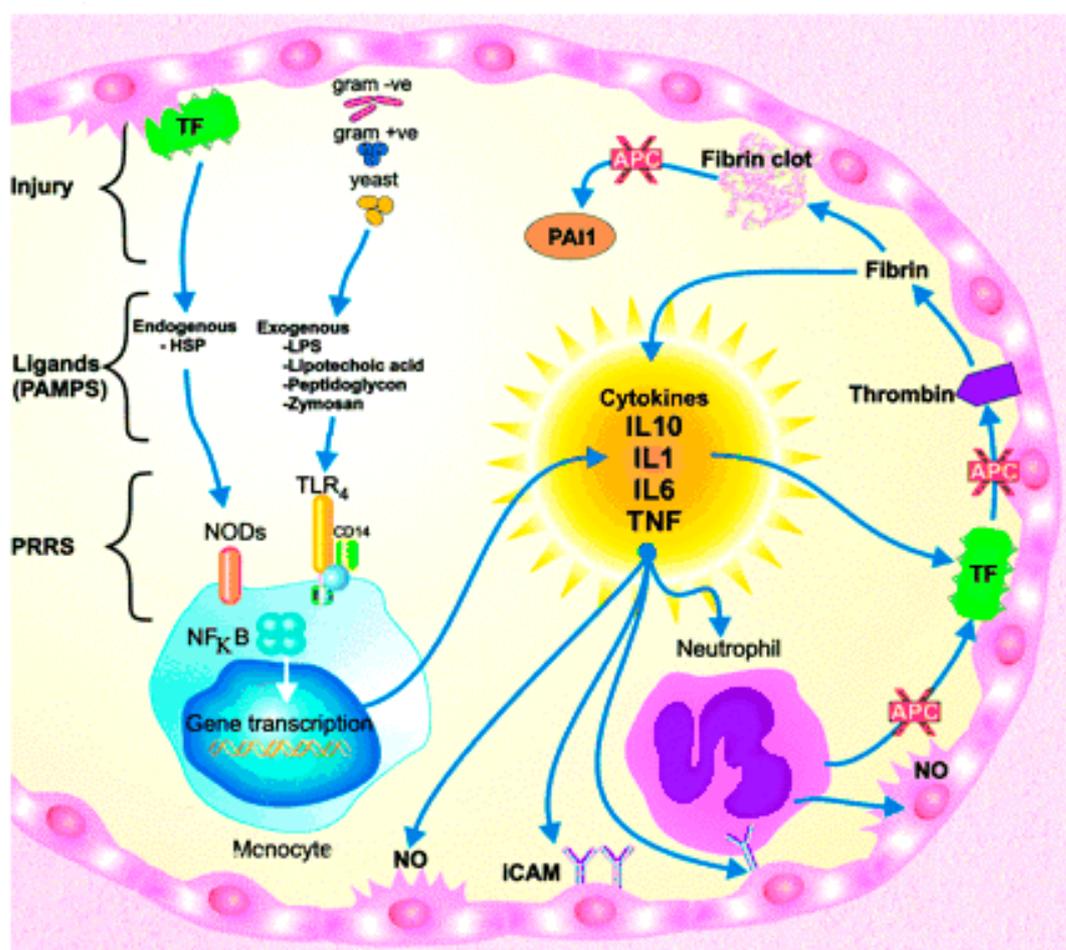
Des Weiteren spielt natürlich der Kostenfaktor in unserem Gesundheitssystem eine immer wichtigere Rolle. Einsparungen werden in allen Bereichen durchgeführt. Demzufolge gewinnt eine kosteneffizientere Therapie umso mehr an Bedeutung.

#### **1.4. Pathophysiologie der Sepsis**

In der Genese dieser Erkrankung spielt die Interaktion von Infektion und Immunantwort eine entscheidende Rolle. Unabhängig davon, ob die Infektion bakteriell, viral, fungal oder parasitär verursacht wurde. Alle Erreger sind dazu fähig eine Sepsis auszulösen.

In der Erkennung der Mikroorganismen scheinen sogenannte Toll-Like Rezeptoren (TLRs) eine wichtige Rolle zu spielen, die gegenwärtig im Detail noch ungeklärt ist (Uematsu et al. 2008).

**Abbildung 1:** Vereinfachte Darstellung der natürlichen Immunantwort auf Infektion und Gewebeschädigung unter Einbeziehung von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren und der Gerinnungskaskade. Das Vorhandensein von mikrobiellen Antigenen (exogenes LPS, Lipoteichonsäure, Peptidoglykanen, Zymosan von Gram negativen, Gram positiven Bakterien bzw. Pilzen) in der Blutzirkulation führt via zellgebundener TLR4 / CD14-Komplexierung zu einer Aktivierung von Makrophagen. Alternativ kann eine Gewebeschädigung mit Expression und / oder Freisetzung von tissue factor (TF) Liganden-vermittelt (PAMPS) ähnliche Effekte erzeugen. Aktivierte Makrophagen wiederum sezernieren ad hoc oder nach de novo Synthese unterschiedliche pro- (IL-1, IL-6, TNF) und antiinflammatorische (IL-10) Mediatoren, die Gefäßendothel (ICAM-Expression) und zirkulierende neutrophile Granulozyten (Adhäsion, NO-Freisetzung) aktivieren. Über Oberflächenaktivierung (Expression von TF auf unterschiedlichen immunkompetenten Zellen) wird konsekutiv die Fibrinbildung und Vernetzung mit clot-Bildung initiiert (Holmes et al. 2003).



Letztlich kommt es zu einer Aktivierung immunkompetenter Zellen und zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren Tumor-Necrosis-Faktor (TNF-) und Interleukin-1 (IL-1).

Diese primäre Immunantwort wird durch das Freisetzen einer Vielzahl von sekundären Mediatoren (z.B. Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 8 (IL-8) weiter verstärkt. Insbesondere bewirkt das IL-6 einen Anstieg der Körpertemperatur, stimuliert die Hypophyse zur Stresshormonausschüttung und induziert die hepatische Synthese von Akutphase-Mediatoren (v.a. CRP) (Steel et al. 1994, Leifsson et al. 2010). Des Weiteren kommt es neben der Hyperinflammation auch zu einer anti-inflammatorischen Reaktion. Dies geschieht durch die Bildung anti-inflammatorischer Substanzen (z.B. lösliche TNF- $\alpha$ -Rezeptoren, IL-1-Rezeptorantagonisten, IL-4, IL-10), was zum programmierten Zelltod (Apoptose) immunkompetenter Zellen führt. Welche Auswirkungen das Zusammenwirken pro- und anti-inflammatorischer Mechanismen auf den klinischen Verlauf hat, ist zurzeit noch ungeklärt. Letztlich führt die Immunantwort bei Sepsis zu einer Beeinträchtigung einer Reihe von Körperfunktionen.

So kommt es zu einer Expression von tissue factor (TF) auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen. Dies hat eine Aktivierung des Gerinnungssystems zur Folge. Gleichzeitig werden physiologische Antikoagulantien (Antithrombin III (AT III), Protein C / Protein S-System, Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)) in ihrer Wirkung gehemmt. Daraus resultiert eine disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) (Schuster et al. 1993). Des Weiteren exprimieren Endothelzellen Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1) für Leukozyten. Durch den Kontakt mit der Endothelzelloberfläche werden die Leukozyten aktiviert, was zur Freisetzung zytotoxischer Substanzen („respiratory burst“) führt. Diese wirken nicht nur antimikrobiell sondern auch toxisch auf Endothelzellen. Endothelzellschäden bewirken Störungen der Mikrozirkulation und vermehrte Durchlässigkeit der Kapillaren (Capillary Leakage), das den Austritt intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium erlaubt. Massive Flüssigkeitsverschiebungen können zu einem ausgeprägten intravasalem Volumenmangel führen (Marx et al. 2003).

Die Inflammationsmediatoren stimulieren außerdem die endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Synthetase (Cinel et al. 2009). NO ist eine Substanz mit ausgeprägten vasodilatatorischen Eigenschaften. Die hierdurch vermittelte Hypotension ist eine charakteristische Eigenschaft des septischen Schocks. Die Vasodilatation verringert die kardiale Vorlast durch einen fehlenden venösen Rückstrom.

Als weitere Komplikation geht die Sepsis mit einer Kardiomyopathie einher, welche sich in einer reduzierten Ejektionsfraktion und diastolischen Dilatation des linken Ventrikels

manifestiert. Die Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Volumens erlaubt jedoch in der Regel die Aufrechterhaltung eines suffizienten Schlagvolumens (Zanotti et al. 2010).

Gegenwärtige Forschungsdaten machen eine ausgeprägte endokrine Dysfunktion in der Sepsis wahrscheinlich, was z.B. eine relative Nebennierenrindeninsuffizienz sowie eine inadäquate Vasopressin- und Insulinsekretion beinhaltet.

Die ausgeprägten kardiozirkulatorischen Störungen, die auch die Organperfusion und Mikrozirkulation betreffen, begünstigen die Entstehung eines Multiorgandysfunktionssyndroms, welches die häufigste Todesursache in diesem Patientengut darstellt.

## **1.5. Diagnostische Messgrößen der Sepsis und schweren Infektion**

### **1.5.1 C-reaktives Protein (CRP)**

Das C-reaktive Protein ist ein klassisches Akute-Phase-Protein. Ein Anstieg im Serum erfolgt aufgrund der Freisetzung inflammatorischer Zytokine wie z.B. Interleukin-6. Die Erhöhung der CRP-Konzentration im Serum ist immer Indikator einer Entzündung, obgleich maligne Tumoren wie z.B. der Morbus Hodgkin, das Nierenzellkarzinom ebenfalls Zytokine bilden und eine Akute-Phase-Antwort auslösen können, die Fieber und eine erhöhte Konzentration von CRP im Plasma induziert.

CRP besteht aus fünf identischen, nicht glykosylierten Untereinheiten mit jeweils einer Polypeptidkette aus 206 Aminosäureresten und einem Molekulargewicht von 23 kD.

Das Akute-Phase-Protein wird schnell in der Leber synthetisiert nach Stimulation durch IL-6, und im Maximum der Akute-Phase-Antwort wird nahezu 20 % der Proteinsynthesekapazität der Leber für CRP aufgewendet. Die extrahepatische Synthese hat keine Bedeutung für die Plasmakonzentration (Black et al. 2004).

Es wurde bisher kein genetischer CRP-Defekt beschrieben, was darauf hinweist, dass CRP lebensnotwendig ist. Die wichtigsten Funktionen des C-reaktiven Proteins beinhalten einerseits die Erkennung und Auslösung der Entsorgung von verbrauchten Gewebezellen und ihren Produkten, die toxisch oder allergisch wirken können, andererseits seine Wirkung als

ein nicht-adaptiver Abwehrmechanismus durch Opsonisierung eindringender Mikroorganismen für die Phagozytose.

Bakterielle Endotoxine sind die potentesten Stimuli der Akute-Phase-Antwort. Die höchsten CRP-Konzentrationen werden bei Gram-negativen Infektionen erreicht (Abe et al. 2010). Gram-positive Infektionen und Parasitosen bewirken gewöhnlich eine moderate CRP-Antwort. Das Ausmaß der CRP-Erhöhung reflektiert die Masse des entzündeten Gewebes, und bei akuter Entzündung und Infektionen korreliert die Höhe des CRP-Wertes mit der Entzündungsaktivität. Bei chronischen Erkrankungen, wie der rheumatoide Arthritis, dem Morbus Crohn und der Polymyalgia rheumatica, ist das CRP für ein therapeutisches Monitoring wenig geeignet (Kohut et al. 2010).

Die Kinetik der CRP-Antwort bedeutet, dass die Plasmakonzentration den inflammatorischen Aktivitätsänderungen 12 - 24 h später folgt. Es muss aber bedacht werden, dass eine Änderung der klinischen Symptomatik sehr viel langsamer erfolgt, z.B. bei rheumatoider Arthritis 4 - 6 Wochen später, sodass ein CRP-Anstieg gegebenenfalls sehr viel früher erlaubt, klinische Entscheidungen zu treffen.

Eine persistierend erhöhte CRP-Konzentration zeigt generell an, dass die Therapie ineffektiv ist und geändert werden sollte, und dient als prognostischer Wert bei malignen Tumoren, Infektionen oder Herzinfarkt. Von den Akute-Phase-Proteinen, die im Labor routinemäßig gemessen werden können, ist CRP eines der sensitivsten (Russel et al. 1992).

### **1.5.2 Interleukin-6 (IL-6)**

Interleukin-6 ist eine Mediators substanz des Immunsystems mit mannigfaltigen biologischen Aktivitäten und bekannt als B-Zell-Stimulationsfaktor 2 (BSF-2), Hybridom-Wachstumsfaktor (HGF), Hepatozyten-Stimulationsfaktor (HSF) und zytolytischer Differenzierungsfaktor für T-Lymphozyten (CDF) (Kishimoto et al. 2010).

Die cDNA von IL-6 kodiert für ein Polypeptid, das aus 212 Aminosäuren besteht. Dieses Protein wird in ein reifes, aus 184 Aminosäuren bestehendes Protein aufgespalten. Aufgrund verschiedener Grade der Glykosylierung (an Positionen 73 bzw. 172) und Phosphorylierung variiert das Molekulargewicht von IL-6 zwischen 21 und 28 kD (Keller et al. 1996).

IL-6 kann von vielen verschiedenen Zellarten synthetisiert werden, darunter Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Mastzellen, T-Zellen und viele Tumorzelllinien (Mroczo et al. 2010). IL-6 fungiert in vivo und in vitro als Differenzierungsfaktor für B-Zellen und Aktivierungsfaktor für T-Zellen. Im Beisein von IL-2 bewirkt es, dass T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren und das Thymozyten proliferieren.

B-Zellen benötigen nach Stimulation mit IL-4 einen IL-6-Stimulus, um zu Ig-sezernierenden Plasmazellen zu differenzieren. IL-6 ist ein potenter Wachstumsfaktor für verschiedene menschliche Myelome und entfaltet seine Aktivitäten bereits in Konzentrationen von unter 10 pg/ml. IL-3 und IL-6 zeigen in vitro bei der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen synergistische Effekte (Williams et al. 1992).

Erhöhte IL-6-Werte in Serum oder Plasma können bei verschiedenen Krankheiten wie etwa Sepsis, Autoimmunerkrankungen, Lymphome, AIDS, alkoholbedingte Leberschäden sowie bei Infektionen oder Organabstossung auftreten, und erlaubt keinerlei differentialdiagnostische Schlussfolgerungen, sondern ist lediglich ein Marker für einen ablaufenden Entzündungsprozess unterschiedlichster Genese (Harbarth et al. 2001).

Es muss berücksichtigt werden, dass Antikörpertherapien, wie sie bei Transplantierten häufig eingesetzt werden, zum temporären „falsch positiven“ Anstieg führen.

Zusammen mit dem PCT erweist sich das IL-6 als valider prädiktiver Marker einer postoperativen Infektion innerhalb der ersten 3 Tage (Maruna et al. 2010).

### **1.5.3 Procalcitonin (PCT)**

PCT ist ein Protein, welches bei bakteriellen Infektionen mit systemischer Inflammationsreaktion (Sepsis) und anderen schweren Entzündungsreaktionen in erhöhten Konzentrationen im Plasma auftritt. Ebenso kann es bei Operationen, Trauma, Verbrennungen, Multiorganversagen und prolongiertem Kreislaufchock zu einem Anstieg kommen (Tschaikowsky et al. 2010). Bei viralen Infektionen, Autoimmun- oder allergischen Erkrankungen sowie lokalen bakteriellen Infektionen tritt in der Regel keine oder nur eine geringe Induktion von PCT auf.

PCT ist ein Prohormon von Calcitonin. Es ist im Plasma stabil und wird quantitativ nicht zu Calcitonin abgebaut. Die inflammatorisch-bakterielle Induktion ist unabhängig von der hormonellen Regulation der Calcitonin-Synthese. Bakterielle Endotoxine sind ein wichtiger Stimulus der PCT-Synthese, jedoch können unterschiedliche proinflammatorische Mediatoren, wie z.B. TNF- und IL-6, ebenfalls eine geringere Induktion von PCT bewirken. Das Protein reflektiert die Aktivität und damit den Schweregrad der systemischen Entzündungsreaktion und kann zur Differentialdiagnose und Verlaufskontrolle bakterieller Erkrankungen im Rahmen einer Sepsis herangezogen werden (Fendler et al. 2008, Harbarth et al. 2001).

Indiziert ist die Bestimmung von PCT als Akutparameter zur Differentialdiagnose bakteriell und nicht-bakteriell verursachter Erkrankungen, zur Diagnose und Verlaufsbeurteilung einer Sepsis, zur Risikoeinschätzung eines Multiorganversagens und zur Überwachung von Risikofälle, wie operierte, organtransplantierte, immunsupprimierte und kritische Patienten (Tschaikowsky et al. 2010).

Da lokale Entzündungen und Bagatellinfektionen kein PCT induzieren, sondern nur systemisch wirksame bakterielle Infektionen sowie Sepsis und SIRS und die post-traumatische Induktion vergleichsweise gering oder kurzzeitig ist, kann PCT bessere interpretative Möglichkeiten als z.B. CRP, IL-6, die Temperaturmessung, die Leukozytenzahl und die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) bieten (Svoboda et al. 2007).

#### **1.5.4 Tumornekrosefaktor- (TNF- )**

TNF- , erstmalig 1975 beschrieben, wird mit Hilfe des ELISA-Verfahrens als Marker einer überschiessenden Entzündungsreaktion bei Sepsis, Trauma und Herzinsuffizienz bestimmt. Des Weiteren kann der Laborwert bei chronischen Entzündungsprozessen, wie z.B. rheumatoide Arthritis, und im Liquor bei Multipler Sklerose oder einer bakteriellen Meningitis erhöht sein (Clark et al. 2007).

TNF- hat eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen und führt zu deren Nekrose.

Die genetische Information des TNF- ist auf dem Chromosom 6 des menschlichen Genoms lokalisiert. In Form eines 26 kD Membran-gebundenen Moleküls scheint TNF- eine Rolle bei interzellulären Prozessen zu spielen (Kriegler et al. 1988). Nach proteolytischer Spaltung

entsteht ein 17 kD großes Protein. Die bioaktive freie Form des TNF- ist ein Trimer, welches aus drei dieser Moleküle besteht.

Die Hauptquellen des TNF- stellen Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten dar. B-Lymphozyten, Mastzellen und Gliazellen können jedoch auch TNF- sezernieren. Die Freisetzung von TNF- kann von exogenen sowie von endogenen Faktoren induziert werden. Zu diesen Faktoren gehören: Enterotoxine, Endotoxine, Lipopolysaccharide (LPS), IL-1, Interferon- , Platelet Aggregating Faktor (PAF) und Faktoren des Komplementsystems (Okusawa et al. 1988). Wenn bakterielle Endotoxine in den Kreislauf gelangen, so werden diese u.a. vom sogenannten Lipopolysaccharide-Binding-Protein (LBP) gebunden. Eine Interaktion dieses Komplexes (LBP + Endotoxin) mit dem auf Makrophagen und Monozyten vorhandenen CD14 führt zur Induktion der TNF- Synthese (Carson et al. 1993). Die Bildung von TNF- konnte ebenfalls durch die Induktion eines Schocks beobachtet werden (Ayala et al. 1992).

Es gibt zwei verschiedene Membran-gebundene Rezeptoren, an denen TNF- binden kann: Es handelt sich um die TNF-RI (55kD) und -RII (75kD) Rezeptoren. Diese Rezeptoren befinden sich auf allen Zelltypen außer auf Erythrozyten. Für eine intrazelluläre Verknüpfung der Signaltransduktion von TNF-RI und -RII könnte sprechen, dass einige Zellen beide Rezeptoren zur Induktion der Apoptose durch TNF- benötigen (Vandenabeele et al. 1995).

Eine erhöhte TNF- -Konzentration erlaubt keine differentialdiagnostischen Schlussfolgerungen, sondern fungiert lediglich als Marker für einen unspezifischen Entzündungsprozess. Erhöhte TNF- -Plasmawerte zeigen lediglich eine exzessive oder prolongierte Entzündungsreaktion mit systemischer Manifestation an.

Bei herzinsuffizienten Patienten charakterisieren erhöhte TNF- -Konzentrationen eine Subgruppe deutlich schlechterer Prognose (Nakagomi et al. 2010). Zu beachten ist, dass TNF- durch Monozyten/Makrophagen und Mastzellen, weniger auch durch T-Lymphozyten, nach Stimulierung nur kurzfristig (< 6 h) sezerniert wird und im Plasma eine kurze Halbwertszeit von < 5 min hat. Monomere und Spaltprodukte lassen sich jedoch oft noch 24 h und länger nachweisen.

## **1.6. Quantitative / qualitative Veränderungen der Immuneffektorzellen**

### **1.6.1 Leukozytose / Leukopenie**

Die Leukozyten werden den Zellarten Granulozyten (Stabkernige, Segmentkernige; Neutrophile, Eosinophile und Basophile), Monozyten und Lymphozyten zugeordnet.

Sie stellen die im Blut zirkulierenden Zellen des Immunsystems dar und entstehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Bei einem gesteigerten Anteil von Stabkernigen und juvenilen Granulozyten mit vereinzeltm Auftreten von Metamyelozyten / Myelozyten spricht man von „Linksverschiebung“. Sie findet sich regelmäßig bei infektbedingter Leukozytenerhöhung und ist häufig mit einer Vermehrung der Neutrophilen (Neutrophilie) verbunden. Per definitionem spricht man von einer reaktiven Linksverschiebung, wenn die Stabkernigen mehr als 16 % der Leukozytengesamtzahl ausmachen.

Geht das Ausmaß der Linksverschiebung über die Myelozyten hinaus, so dass vermehrt Promyelozyten oder sogar Blasten im peripheren Blut auftreten, so muss man von einer pathologischen Linksverschiebung sprechen.

Die Leukozytose ( $> 12.000/l$ ) kann bakterielle Infektionen anzeigen, hat dabei aber insbesondere bei lokalen Infektionen eine geringen Sensitivität und Spezifität. Dies ist u.a. dadurch bedingt, dass einerseits eine Leukozytose generell auch durch körperliche Arbeit und nichtbakterielle Entzündungen induziert werden kann, andererseits ein nicht geringer Anteil von Patienten mit bakteriellen Infektionen weder eine Leukozytose noch eine Neutrophilie anzeigen (Berger et al. 1995, Bentley et al. 1987).

Die Leukozytopenie ( $< 4.000/l$ ) ist meistens durch eine neutrophile Granulozytopenie charakterisiert. Diese kann durch die Ausschwemmung von Zytokinen (z.B. durch TNF- ) entstehen, welche die Zellteilung der Stammzellen des Knochenmarks unterdrücken (Abbas et al. 1996). Für Patienten mit Leukopenie ist für Infektionen nur eine geringe Sensitivität aber hohe Spezifität festgestellt worden. Diesbezüglich kann eine Kombination von CRP und Leukopenie zur Feststellung einer Sepsis sinnvoll sein (Berger et al. 1995).

## **1.6.2 Morphologische und funktionelle Veränderungen von Leukozyten bei bakteriellen Entzündungsprozessen**

Bei einer beschleunigten Granulopoese durch Ausschwemmung vermehrter zellulärer CD34+-Prekursoren zeigt sich das Bild der physiologischen Linksverschiebung mit einer Dominanz von stabkernigen Granulozyten, aktivierten Monozyten und Vorstufen wie Metamyelozyten und Myelozyten. Als weitere Alterationen sind ein „Pseudoplasmozytom“ als Zeichen der chronischen Infektion und eine Eosinophilie in der späten Phase der Sepsis („eosinophile Morgenröte“) zu beobachten. Eine nukleäre-zytoplasmatische Dissoziation, eine persistierende zytoplasmatische Basophilie, zytoplasmatische Vakuolisierung, das Auftreten von „Döhle-Körper“, eine toxische Granulation und nukleäre Abnormalitäten werden als morphologische Veränderungen bei schweren bakteriellen Infektionen in der Literatur beschrieben (Al-Gwaiz et al. 2007). Als toxische Granulation der neutrophilen Segmentkernigen bezeichnet man mikroskopisch ein rotviolettes Hervortreten der sonst stippchenhaften, blassen Granulation. Die sichtbare Vakuolisierung findet sich als Endphänomen eines Phagozytosevorganges. Die Döhle-Körper zeigen sich mikroskopisch als kleine runde Inseln basophilen Zytoplasmas.

Bei der Sepsis wird den T-Lymphozyten und insbesondere den CD4+-T-Zellen eine zentrale regulatorische Rolle zugeschrieben. In der Frühphase der Sepsis dominieren CD4+Th1-Zellen als Zeichen der Hyperinflammation, wohingegen in der Spätphase CD4+Th2-Zellen als im Rahmen einer Immunparalyse überwiegen können. Des Weiteren scheinen Th17-Zellen für die Abwehr von Mikroorganismen wichtig zu sein, die nicht durch eine Th1- oder Th2-medierte Immunantwort eliminiert werden können (Weaver 2007). Während der Sepsis ist die Apoptose von Lymphozyten und dendritischen Zellen gesteigert, während die Apoptose von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten unbeeinflusst oder sogar vermindert ist (Hotchkiss et al. 2002).

Immunzellen und Epithelzellen exprimieren Rezeptoren zur Mustererkennung, welche als pathogen-associated molecular patterns (PAMP) mit Hilfe von intrazellulären Proteinen (Alarmine) und Mediatoren aus apoptotischen Zellen sogenannte damage-associated molecular patterns (DAMP) bilden. Die hohe Konzentration der DAMP bei der Sepsis bewirkt eine Überstimulation des Immunsystems und in Folge eine unbalancierte Zytokinantwort.

Eine der wichtigsten Rezeptoren im Rahmen der zellulären Wahrnehmung von

(zirkulierenden) bakteriellen Antigenen ist der ubiquitär vorkommende Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4), der insbesondere Lipopolysaccharide aus der Membran gramnegativer Bakterien erkennt (Poltorak 1998). Beispielsweise führt die Aktivierung von TLR4 in Thrombozyten zur Aggregation von Granulozyten-Exoprodukten, den sogenannten neutrophil extracellular traps (NET), die Bakterien im Gefäßsystem einfangen können.

Die wichtigsten Mediatoren der Inflammation sind gegenwärtig aktivierter Komplementfaktor C5 (C5a), Makrophagenmigration inhibierender Faktor (MIF), high-mobility group box 1 (HMGB1) und Interleukin 17A (IL-17A).

C5a als Teil des angeborenen, humoralen Immunsystems beeinflusst die Gerinnungskaskade, die TLR4-mediierte Immunantwort und die Freisetzung von Zytokinen wie MIF oder HMGB1 (Riedemann 2004). MIF wird aus Leukozyten sezerniert, nachdem Zytokine, Endo- und Exotoxine diese stimuliert haben. MIF wirkt proinflammatorisch und fördert die TLR4-Expression auf Phagozyten. Des Weiteren wird die Apoptose aktivierter Makrophagen gehemmt (Calandra 2003). HMGB1 ist ein proinflammatorisches Zytokin mit pleiotropen Wirkungen (Wang 1999), welches hauptsächlich von Makrophagen / Monozyten und neutrophilen Granulozyten gebildet wird (Lotze 2005). Im Gegensatz anderen proinflammatorischen Zytokinen tritt der Höhepunkt erst in den späten Sepsis-Stadien auf (Wang 1999). Auf Grund der pleiotropen Effekte und der späten Sekretion wird eine Blockade des HMGB1 zur Therapie der Sepsis angestrebt.

IL-17A ist ein Zytokin der Th17-Zellen, welches die Bildung von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  fördert und als Botenstoff zwischen Lymphozyten und Phagozyten fungiert (Weaver 2007). Weiterhin wirkt IL-17A über die Induktion von IL-8 chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten (Laan 1999), welche eine entscheidende Rolle bei Bekämpfung von bakteriellen Infektionserregern spielen.

## 2. Zielsetzung

Die exakte und schnelle Diagnose systemischer bakterieller Infektionen ist von außerordentlicher Bedeutung für das klinische Management von betroffenen Patienten und deren Prognose.

In der infektionsimmunologischen Diagnostik stehen bislang routinemäßig unterschiedliche mehr oder minder spezifische lösliche Biomarker wie Zytokine (IL-6), C-reaktives Protein und Procalcitonin zur Diagnostik von SIRS und Sepsis zur Verfügung. Durchflusszytometrisch bestimmte zelluläre Marker (beispielsweise HLA-DR-Expression auf Monozyten) haben unter anderem aus Kostengründen noch nicht den Einzug in das Routinelabor gehalten. Die mikroskopische Betrachtung von Blutaussstrichen bei Infektionen zum Nachweis von reaktiven Linksverschiebungen und morphologischen Veränderungen von Leukozyten gilt als subjektiv, arbeits- und kostenintensiv.

Seit vielen Jahren stehen in der Hämatologiediagnostik Techniken zur Verfügung, mit denen Leukozyten nach morphologischen Kriterien wie Kern-, Plasmarelation, Granulation, Volumen und Oberflächenbeschaffenheit - sogenannte **morphometrischen Parametern** - differenziert werden können. Diese Verfahren sind automatisiert, präzise, objektiv, standardisierbar, schnell und kostengünstig. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, mithilfe einer solchen Technologie Veränderungen von Volumen, Kern-, Plasmarelation und Lichtstreuung von Leukozyten bei Sepsis und nicht-systemischer Infektion zu charakterisieren und mit klassischen infektionsimmunologischen Biomarkern zu vergleichen.

Vor der klinisch-diagnostischen Anwendung der morphometrischen Parameter wurden zunächst Voruntersuchungen zur Testperformance durchgeführt:

1) Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde systematisch getestet, wie hoch die Präzision in Serie von Volumenmessungen, Messung zur Kern-Plasma-Relation, und Streulichtmessungen bei peripheren **Monozyten**, neutrophilen **Granulozyten** und **Lymphozyten** waren. Diese Untersuchungen waren notwendig zur Einschätzung von quantitativen Veränderungen vor dem Hintergrund der Impräzision der Methode.

2) Bei den vorliegenden Parametern handelt es sich um zelluläre Parameter, die **ex-vivo** einer raschen Alteration durch Alterung / Apoptose unterliegen können. Um diese ex-vivo Veränderungen einschätzen zu können, wurden Lagerungsuntersuchungen bei

Raumtemperatur durchgeführt und deren Einfluss auf die morphometrischen Parameter untersucht.

3) Morphologischen Veränderungen von Leukozyten bei Infektion und Sepsis können als reaktive Veränderungen eingestuft werden. Es wurde deshalb untersucht, inwieweit das Auftreten einer physiologischen Linksverschiebung - definiert anhand des mikroskopischen Bildes - ein Korrelat bei der Bestimmung der morphometrischen Parameter findet.

Die klinisch-diagnostische Anwendung der morphometrischen Parameter von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wurde abschließend in einer **retrospektiven, kontrollierten Studie** an Patienten mit **Sepsis** und positivem Blutkulturergebnis, und **nicht-systemischen Infektionen** untersucht. Hierbei war von besonderer Bedeutung, inwieweit sich Sepsis von organbezogenen Infektionen anhand von Veränderungen der morphometrischen Parameter im Vergleich zu klassischen Biomarkern (IL-6, CRP) diskriminieren lässt.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Chemikalien / Lösungen**

Folgende Lösungen wurden von der Fa. Merck bezogen

May-Grünwald-Lösung
Giensa-Lösung

Die automatisierte Bestimmung von morphometrischen Parametern erfolgte im Rahmen der routinemäßigen Blutbilddifferenzierung am LH750 Hämatologieanalyser von Beckman Coulter. Die hierfür verwendeten Reagenzien inkl. Kontrollmaterialien wurden vorkonfektioniert gemäß Medizinproduktegesetz vom Gerätehersteller bezogen.

#### **3.1.2 Patientenauswahl und Studiendesign**

##### **3.1.2.1 Auswahl von Patienten mit physiologischer Linksverschiebung**

Zum Vergleich von automatisiert gemessenen Volumenparametern von Neutrophilen mit dem Anteil von stabkernigen Neutrophilen in der mikroskopischen Differenzierung wurden zunächst geeignete Patientenproben mit laborchemischen Zeichen der Entzündung (n=23) aus der Routinediagnostik asserviert. Auswahlkriterien für entsprechende Proben waren Gesamtleukozyten von  $> 12 \times 10^3 / \mu\text{l}$ , ein „Automatenflag“ mit dem Hinweis auf unreife Vorstufen und CRP-Konzentration  $> 100 \text{ mg/L}$ .

##### **3.1.2.2 Auswahl von Patientenproben für Untersuchungen zur Präzision in Serie von automatisiert gemessenen Volumenparameter und Einfluss der Probenalterung**

Für die Untersuchungen zur Präzision in Serie der Volumenparameter von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten sowie zum Einfluss der Probenalterung wurden Patientenproben aus der Routinediagnostik gezogen. Ausschlusskriterium für die Eignung war das Vorliegen von hämatologischen Erkrankungen mit Einfluss auf das blutbildende System. Patientenproben wurden als geeignet angesehen, wenn sie folgenden Einteilungen gemäß Gesamtleukozytenzahl zugeordnet werden konnten: Leukopenie = Gesamtleukozyten  $< 3.0 *$

$10^3/\mu\text{l}$ , normale Leukozytenzahl = Gesamtleukozyten  $4.0 - 8.0 * 10^3/\mu\text{l}$  und Leukozytose = Gesamtleukozyten  $> 10.0 * 10^3/\mu\text{l}$ .

### 3.1.2.3 Auswahl von Patienten mit Sepsis, organbezogenen Infektionen und Kontrollen

Für diesen Teil der Untersuchung wurden zunächst Patienten mit positivem Blutkulturnachweis und unterschiedlicher Krankheitsschwere (systemische und nicht-systemische Infektion) rekrutiert und mit einem gesunden Kontrollkollektiv ( $n = 50$ ) verglichen. Die Krankheitsschwere des Patientenkollektivs wurde nach den Kriterien der schweren systemischen Infektionen (Sepsis) der ACCP (Tabelle 1) bewertet. Hiernach wurden insgesamt 40 Patienten als Sepsis-Patienten definiert. Die Patientengruppe mit nicht-systemischen Infektionen beinhaltete 40 Patienten. Auch diese Patienten zeigten gemäß Einschlußkriterien einen positiven Blutkulturnachweis, erfüllten jedoch nicht die ACCP-Kriterien der Sepsis. Diese Patienten zeigten klinisch Pneumonien (radiologisch und klinisch verifiziert), Exazerbationen von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (anamnestisch, klinisch, radiologisch und durch Lungenfunktionsprüfung verifiziert), schwere Infektionen der ableitenden Harnwege einschließlich Pyelonephritis (klinisch und mikrobiologisch-diagnostisch verifiziert) und postoperative Infektionen von Weichteilgewebe (klinisch und mikrobiologisch-diagnostisch verifiziert).

***Tabelle 1: ACCP-Kriterien der Sepsis***

- |   |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Körpertemperatur <math>&gt; 38^\circ\text{C}</math> oder <math>&lt; 36^\circ\text{C}</math></li> <li>- Herzfrequenz <math>&gt; 90/\text{min}</math></li> <li>- Atemfrequenz <math>&gt; 20/\text{min}</math> bzw. <math>\text{pCO}_2 &lt; 32 \text{ mmHg}</math> bei Spontanatmung</li> <li>- Leukozytenanzahl <math>&gt; 12.000/ \text{l}</math> oder <math>&lt; 4.000/ \text{l}</math></li> <li>- <math>&gt; 10\%</math> unreife leukozytäre Formen des Differentialblutbildes</li> <li>- Schwere Sepsis bei mind. 1 infektionsbezogene Organdysfunktion</li> <li>- Septischer Schock bei Kreislaufversagen trotz entsprechender Maßnahmen</li> </ul> |
|---|

Als Kontrollgruppe ( $n = 50$ ) definiert waren Personen mit unauffälliger Klinik im Hinblick auf Infektionserkrankungen und Konzentrationen von CRP und Gesamtleukozyten innerhalb des Normbereichs. Die Blutproben der Patienten für die Bestimmung von CRP, Gesamtleukozyten, IL-6 und morphometrischen Parametern wurden in zeitlichem

Zusammenhang ( $\pm 2$  Tage) mit dem mikrobiologischen Blutkulturnachweis einer Bakteriämie analysiert. Alle Untersuchungen und damit auch die Patientenrekrutierung wurden am St. Joseph-Hospital in Bremerhaven durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission des St. Joseph-Hospital genehmigt.

## 3.2 Methoden

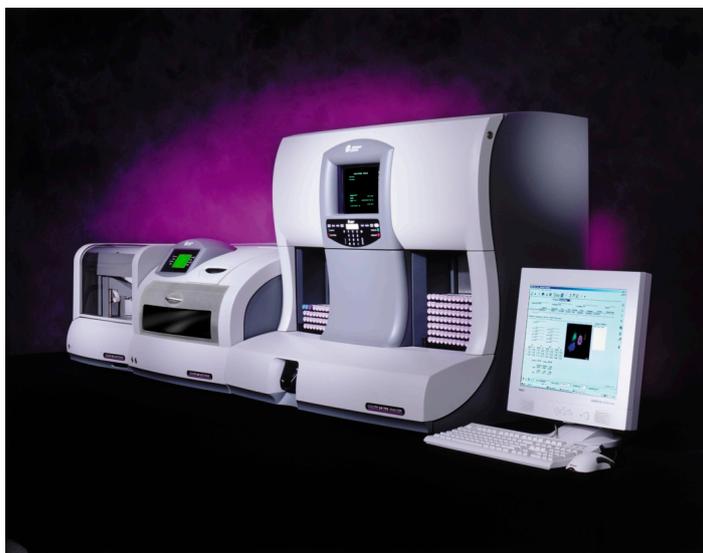
### 3.2.1 Automatisierte Messung des Gesamtleukozyten

Die Gesamtleukozytenzahl wurde automatisiert auf einem Beckman Coulter LH750 Hämatologieanalyser gemessen (Abbildung 2). Die Leukozytenzählung beruht auf der Impedanzmethode, bei der Blutzellen in einem Flüssigkeitsstrom durch ein Spannungsfeld fließen und über eine Widerstandsänderung in Abhängigkeit von Größe und korpuskulären Anteilen detektiert werden.

### 3.2.2 Bestimmung der morphometrischen Parameter von Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten mittels VCS-Technologie

Für die automatisierte Messung der morphometrischen Parameter bzw. des Differentialblutbildes wurde ebenfalls ein LH750 Hämatologieanalyser verwendet. Die Differenzierung der Leukozyten mit diesem System erfolgte mittels VCS-Lasertechnologie und charakterisiert die Zellen nach Volumen, Granularität, Kern- und Oberflächenbeschaffenheit.

**Abbildung 2:** Die Abbildung zeigt den Hämatologieanalyser LH750 der Firma Beckman Coulter mit angeschlossener automatisierter Ausstreich- und Färbereinheit.

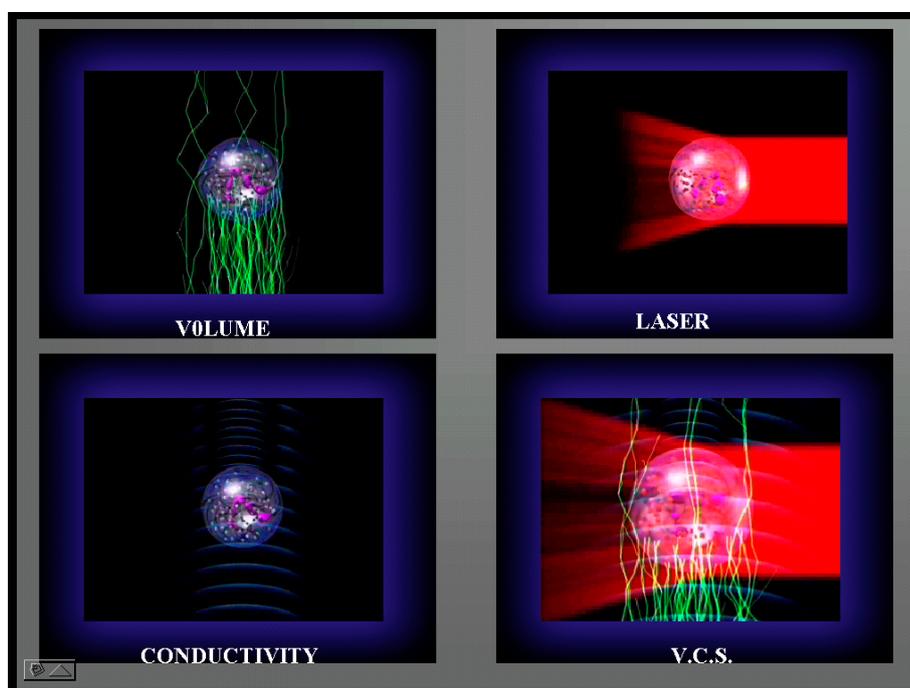


### 3.2.2.1 Prinzip der Bestimmung von Zellvolumen, Granularität, Kernstruktur- und Oberflächenbeschaffenheit mittels VCS-Technologie

Die VCS-Technologie von Beckman Coulter ermöglicht die maschinelle Zählung der fünf Subklassen reifer Leukozyten (Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen) und weist den Bediener gegebenenfalls auf abnormale Populationen hin.

Die VCS-Technologie verwendet eine drei-dimensionalen Rotationsdarstellung der Analyseergebnisse. Es handelt sich um eine Ein-Kanal-Technologie zur Identifikation und Zählung der fünf Leukozyten-Hauptpopulationen. Die Differenzierung erfolgt in einer Durchflusszelle mittels eines Lasers (Abbildung 3).

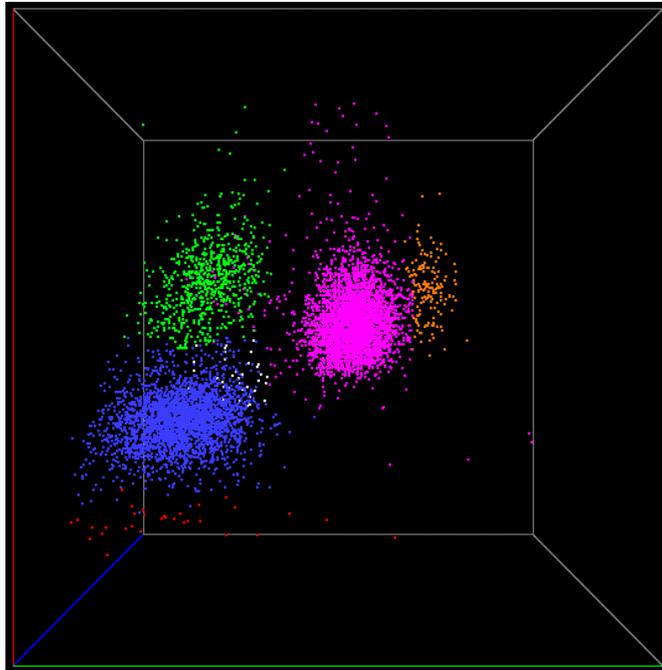
**Abbildung 3:** Prinzip der Bestimmung von Volumen, Konduktivität und Streulicht mittels VCS-Technologie: **Volumen:** diese Energie nutzt die Impedanzmethode für die Messung des Zellvolumens; **Konduktivität:** Informationen zu Zellgröße und internen Zellstrukturen einschließlich Kernvolumen; **Streulicht:** Messung von zellulärer Granularität, Kernstruktur und Oberfläche.



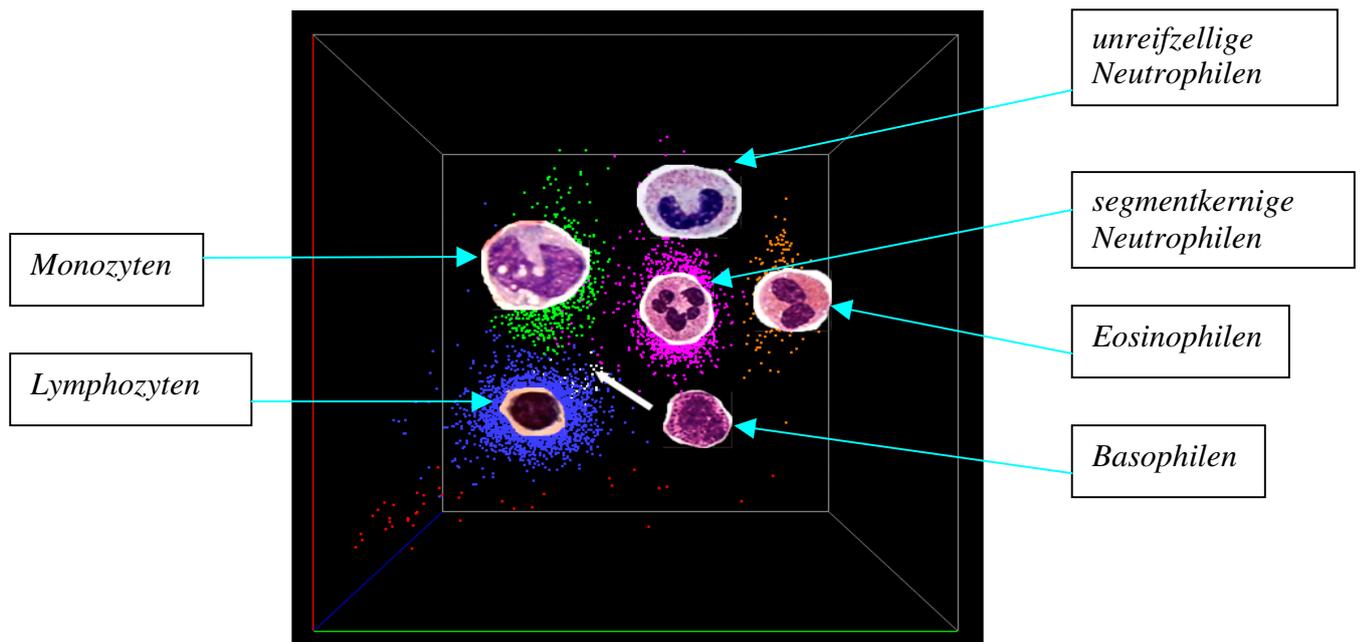
Im 3-dimensionalen Koordinatensystem liefern die 8192 Zellen klar abgegrenzte Cluster. Die Matrix enthält mehr als 16 Millionen Datenpunkte und ermöglicht dadurch die Darstellung der Leukozytenpopulationen im 3-dimensionalen Raum.

Die entsprechende Software analysiert somit die Clusterpositionen, deren Dichte, Kontur und Größe (siehe Beispiel-3D-Scatterplots).

**Abbildung 4a:** Der folgende 3D-Scatterplot zeigt eine unauffällige Verteilung von Monozyten (grün), Neutrophilen (lila) und Lymphozyten (blau).



**Abbildung 4b:** Position und farbliche Kodierung der Zellen im Scattergramm.

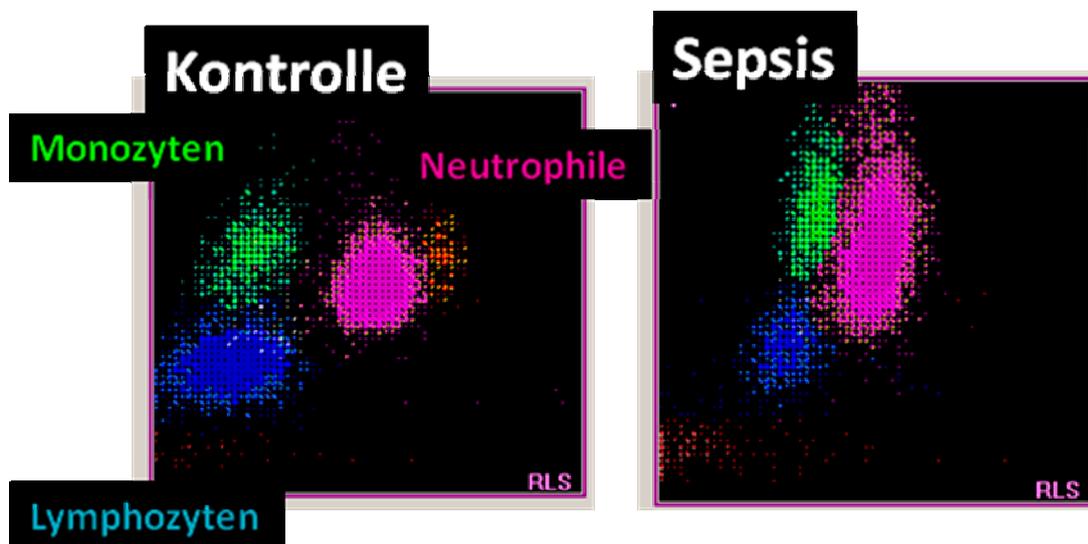


Um ein Differenzialblutbild mittels VCS-Technologie zu erstellen, werden die Zellen über drei separate Sensoren – Gleichstrom, Hochfrequenzwechselstrom und Laser-Streulicht – gleichzeitig erfasst und entsprechend ihres jeweiligen Volumens, der Kernstruktur und der Granularität charakterisiert. Alle drei Messwerte zusammengenommen definieren die Lage in einem dreidimensionalen Raum (sogenannte Lageparameter), der als 3D-Scatterplot (siehe Abbildung 4a + b) bezeichnet wird. Dabei steht die Abkürzung VCS im deutschen Sprachraum für Volumen, Konduktivität und Streuung des Laserlichtes.

Das Zellvolumen wird durch die direkte Impedanz, die Konduktivität mit der Radiofrequenz und die Streuung mit Hilfe des Laserlichtes gemessen. Die daraus ermittelten Ergebnisse werden in **arbiträren Einheiten** angegeben. Bei den meisten Anomalien kommt es zu Abweichungen (Abbildung 5) vom normalen Scatterplot: Die abnormalen Zellen erscheinen außerhalb der Bereiche der normalen Zellpopulationen.

Zusätzlich zu der Differenzierung der fünf Subklassen reifer Leukozyten und der Messung des Volumens, der Konduktivität und der Laserlichtstreuung, berechnet eine entsprechend installierte Software den Mittelwert und die Standardabweichung der gezählten Zellen.

**Abbildung 5:** Exemplarische Veränderung der Scattergramme für Monozyten, Neutrophile und Monozyten bei einem Patienten mit Sepsis im Vergleich zu einer Kontrolle.



### **3.2.3 Untersuchungen zur Präzision der VCS-Parameter und Einfluss von Probenalterung**

Im Rahmen der Methodvalidierung wurden Untersuchungen zur Präzision in Serie (5 Messungen) der morphometrischen Parameter von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten durchgeführt. Hierzu wurden je drei leukopene, normopene und leukozytische Patientenproben automatisiert differenziert und die Mittelwerte und Standardabweichung der Lageparameter (Volumen, Konduktivität und Lichtstreuung) berechnet.

Neben der Präzision in Serie wurde der Einfluss der Probenalterung auf die Messparameter untersucht. Hier ist bei der Bewertung von besonderer Bedeutung, dass insbesondere die Neutrophilenpopulation ex vivo einem apoptotischen Prozess unterliegt. Dieser führt zur Veränderung von Volumen, Granularität und Kern-Plasma-Relationen und damit zur Veränderung der Zielgrößen der VCS-Technologie.

Der Einfluss der Probenalterung auf die Messparameter wurde in einem Zeitfenster von 6 Stunden nach Probenentnahme untersucht. Hierzu wurden jeweils Messungen an leukopenen und leukozytischen Patientenproben bzw. Proben mit normalen Leukozytenzahlen in Zeitintervallen von 1.5 Stunden durchgeführt (Untersuchungszeitpunkte waren also 0 h (Messung direkt nach Probenentnahme) und jeweils 1.5 h, 3 h, 4.5 h und 6 h nach Probenentnahme). Die statistische Auswertung erfolgte in Relation zum Zeitpunkt 0 h.

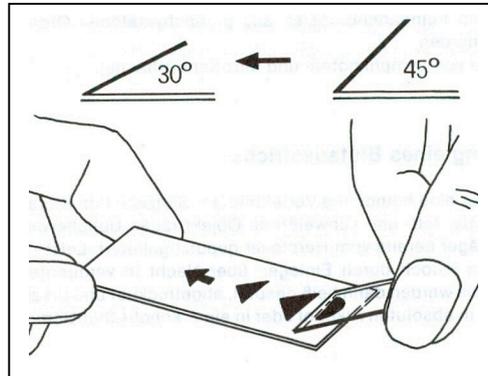
### **3.2.4. Anfertigen von peripheren Blutaussstrichen und Färbung nach Pappenheim**

Für das Anfertigen von Blutaussstrichen wurde zunächst von der Patientenprobe (EDTA-Blut) ein Tropfen mit der Pipetten-Spitze am Objektträger-Rand (nahe Mattschliff) auftragen. Der Rand eines zweiten Objektträgers (oder Deckgläschens) wurde in den aufgetropften Blutstropfen eingetaucht (Verteilung des Bluts auf Zweit-Objektträger-Breite) und zügig in Längsrichtung des Erst-Objektträgers unter Beibehalten eines flachen Anstellwinkels ausgestrichen (Abbildung 6). Vor der anschließenden Färbung wurde das Präparat luftgetrocknet. Das Färbeprotokoll sah wie folgt aus:

- Färbung mit May-Grünwald-Lösung (fixierende Färbung) für 3 bis 5 Minuten
- Abspülen der Farblösung mit Aqua dest.
- Färbung mit 1 : 20 verdünnter Giemsa-Lösung für 15 bis 20 Minuten
- Abspülen der Farblösung mit Aqua dest.

- Ausstriche lufttrocknen lassen und bei 1000x Vergrößerung mit einem Mikroskop Nikon Eclipse 80i beurteilen.

**Abbildung 6:** Schematische Darstellung zum Anfertigen von Blutausstrichen.

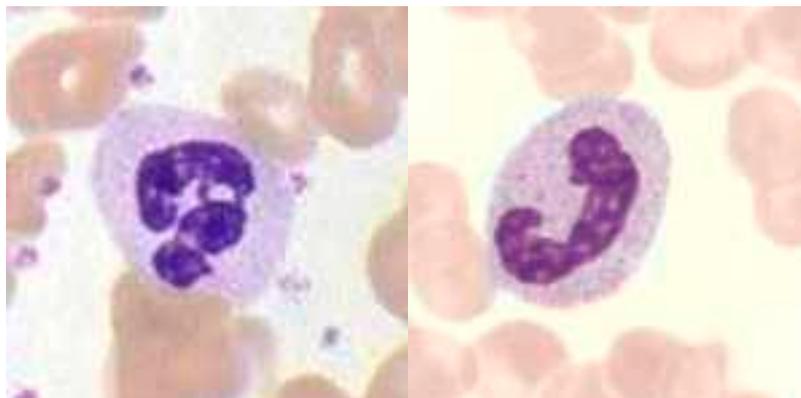


### 3.2.5 Kriterien zur mikroskopischen Differenzierung von Patientenproben mit physiologischer Linksverschiebung

Die mikroskopische Differenzierung von Ausstrichen des peripheren Blutbildes mit Nachweis von stabkernigen Neutrophilen und neutrophilen Vorläufen bis hin zum Myelozyten gilt klassischerweise als Kriterium für eine physiologische Linksverschiebung.

Im Hinblick auf ein diagnostisches und klinisches Validierungsverfahren der VCS-Parameter erschien ein Vergleich mit der mikroskopischen Differenzierung geeignet, um Veränderungen der Lageparameter von Neutrophilen bei Linksverschiebung mit dem Anteil von stabkernigen in der mikroskopischen Differenzierung abzugleichen (Abbildung 4B). Die mikroskopische Differenzierung der Patientenproben erfolgte durch denselben erfahrenen Untersucher. Die morphologischen Kriterien für den Nachweis von stabkernigen Neutrophilen bzw. Vorstufen waren wie folgt festgelegt: Mikroskopisch unterscheidet sich ein Segmentkerniger (Abbildung 7 (links)) von einem Stabkernigen (Abbildung 7 (rechts)) durch die Länge der schmalsten Brücken zwischen zwei Kernsegmenten. Diese beträgt weniger als  $\frac{1}{3}$  des größten Kerndurchmessers.

**Abbildung 7:** Mikroskopisches Bild eines neutrophilen Granulozyten (links) mit mehrfach segmentiertem Kern und eines Stabkernigen (rechts)



### 3.2.6. Bestimmung von CRP

Der in den vorliegenden Untersuchungen verwendete immuno-turbidimetrische Test zur quantitativen Bestimmung von CRP im Serum verwendete einen anti-humanen Ziegen-Antikörper (Fa. Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg). Die Analysen wurden auf einem Olympus AU 640 Autoanalyser durchgeführt. Die niedrigste zu bestimmende CRP-Konzentration (Sensitivität) wurde vom Hersteller mit 1.5 mg/L angegeben, die intra-assay Variabilität (CV%) lag bei 2.81 % (150 mg/L) und die totale Präzision 5.99 %. Die Linearität der Methode wurde vom Hersteller nach sechs-Punkt-Kalibration in einem Konzentrationsbereich zwischen 5 und 300 mg/L angegeben.

### 3.2.7. Bestimmung von IL-6

Konzentrationen von IL-6 wurden auf einem Immulite 1000 (DPC Bierman, USA) Autoanalyser mittels solid phase, enzyme-labeled Chemiluminescence Immunoassay bestimmt. Die Sensitivität für IL-6 wurde vom Hersteller mit 2 pg/mL angegeben. Nach Herstellerangaben betrug die intra-assay Variabilität (CV%) 5.2 % bei einer Gesamt-Variabilität von 7.4 % bei einer Konzentration von 112 pg/mL.

### **3.2.8 Mikrobiologische Untersuchungen der Blutkulturen**

Die Anzucht von Infektionserregern aus Blutkulturen der Patienten mit Sepsis bzw. organbezogenen Infektionen erfolgte mittels flüssiger und halbfester Standard-Kulturverfahren. Die biochemische Identifizierung angezüchteter Erreger erfolgte nach Isolierung auf einem VITEK 2 compact (bioMerieux) System unter Verwendung entsprechender Identifizierungskarten.

### **3.3 Statistische Analyse**

Alle Analysen erfolgten mit der SPSS Software Package 13.0. Deskriptive Statistiken wurden unter Angabe von Mittelwert, Standardabweichung, Median und Perzentilen durchgeführt. Vergleiche zwischen Mittelwerten nicht-normal verteilter Variablen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA bei  $> 2$  Variablen) und Mann-Whitney  $U$  Test (2 Variablen) durchgeführt. Ein Unterschied von  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikant angenommen. Häufigkeitsverteilungen wurden mittels Kreuztabellen und  $\chi^2$ -Testung verglichen, Korrelationen zwischen Variablen mittels bivariater Korrelationsalgorithmen (Pearsons Correlation) unter Angabe des Korrelationskoeffizienten bewertet. Sensitivitäten, Spezifitäten und Flächen unter der Kurve (AUC) wurden mittels Receiver Operating Characteristics Curves (ROC) Analysen berechnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Präzision der Lageparameter in Serie

Die Ermittlung der Präzision der Lageparameter in Serien zu 5 Messungen wurde in je drei Proben aus den Kategorien 1) Leukopenie = Gesamtleukozyten  $< 3.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ , 2) Normale Leukozytenzahl = Gesamtleukozyten  $4.0 - 8.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  und 3) Leukozytose = Gesamtleukozyten  $> 10.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ . In den **Tabellen 2 – 4** sind die Mittelwerte mit Variationskoeffizienten der Lageparameter der Neutrophilen- (2), Monozyten- (3) und Lymphozytenpopulation (4) in den jeweiligen Kategorien dargestellt. Nach Messung von jeweils über 8000 Zellen zeigt sich in allen gemessenen Proben eine hohe Präzision / Reproduzierbarkeit, respektive niedrige Variationskoeffizienten zwischen 0 und 3.8 % für die VCS-Parameter der jeweiligen Zellpopulation.

**Table 2A - C:** *Präzision in Serie der VCS-Parameter (Volumen (A), Konduktivität (B) und Scatter (C)) der Neutrophilenpopulation gemessen in je drei Proben der Kategorie 1.) Gesamtleukozyten  $< 3.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (Leukopenie), 2.) Gesamtleukozyten  $4.0 - 8.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (Normale Leukozytenzahl) und 3.) Gesamtleukozyten  $> 10.0 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (Leukozytose).*

<b>A. Volumen der Neutrophilen</b>				
<b>Leukopenie</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
Probe 1	138	168	156	1,8
Probe 2	144	170	161	2,4
Probe 3	142	171	166	2,6
<b>Normale Leukozytenzahl</b>				
Probe 1	137	171	151	2,3
Probe 2	175	176	175	0,4
Probe 3	135	143	141	3,4
<b>Leukozytose</b>				
Probe 1	149	153	151	1,6
Probe 2	144	153	148	3,3
Probe 3	140	146	143	2,7

<b>B. Konduktivität der Neutrophilen</b>				
<b>Leukopenie</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
Probe 1	142	145	143	1,1
Probe 2	144	146	145	0,8
Probe 3	149	153	150	1,5
<b>Normale Leukozytenzahl</b>				
Probe 1	150	153	151	1,3
Probe 2	146	149	148	1,3
Probe 3				
<b>Leukozytose</b>				
Probe 1	142	145	143	1,1
Probe 2	144	146	145	0,8
Probe 3	149	153	150	1,5

<b>C. Scatter der Neutrophilen</b>				
<b>Leukopenie</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
Probe 1	130	131	131	0,4
Probe 2	126	131	128	1,9
Probe 3	146	149	147	0,9
<b>Normale Leukozytenzahl</b>				
Probe 1	151	153	152	0,9
Probe 2	141	143	142	0,8
Probe 3				
<b>Leukozytose</b>				
Probe 1	115	118	117	1,3
Probe 2	142	144	143	0,8
Probe 3	145	145	145	0

***Table 3A - C: Präzision in Serie der VCS-Parameter (Volumen (A), Konduktivität (B) und Scatter (C)) der Monozytenpopulation gemessen in je drei Proben der Kategorie 1.) Gesamtleukozyten  $< 3.0 * 10^3/\mu\text{l}$  (Leukopenie), 2.) Gesamtleukozyten  $4.0 - 8.0 * 10^3/\mu\text{l}$  (Normale Leukozytenzahl) und 3.) Gesamtleukozyten  $> 10.0 * 10^3/\mu\text{l}$  (Leukozytose).***

<b>A. Volumen der Monozyten</b>				
<b>Leukopenie</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
Probe 1	138	168	156	1,8
Probe 2	144	170	161	2,4
Probe 3	142	171	166	2,6
<b>Normale Leukozytenzahl</b>				
Probe 1	137	171	151	1,3
Probe 2	175	176	175	0,4
Probe 3	135	143	141	3,4
<b>Leukozytose</b>				
Probe 1	149	153	151	1,6
Probe 2	144	153	148	3,3
Probe 3	140	146	143	2,7

<b>B. Konduktivität der Monozyten</b>				
<b>Leukopenie</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
Probe 1	142	145	142	1,1
Probe 2	144	146	145	0,8
Probe 3	149	153	150	1,5
<b>Normale Leukozytenzahl</b>				
Probe 1	150	153	151	1,5
Probe 2	146	149	147	1,3
Probe 3	135	143	141	3,4
<b>Leukozytose</b>				
Probe 1	142	145	143	1,1
Probe 2	144	146	145	0,8
Probe 3	149	153	150	1,5

<b>C. Scatter der Monozyten</b>				
<b>Leukopenie</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
Probe 1	130	131	131	0,4
Probe 2	126	131	128	1,9
Probe 3	146	149	147	0,9
<b>Normale Leukozytenzahl</b>				
Probe 1	151	153	152	0,9
Probe 2	141	143	142	0,8
Probe 3				
<b>Leukozytose</b>				
Probe 1	115	118	117	1,3
Probe 2	142	144	143	0,8
Probe 3	145	145	145	0

**Table 4A - C:** *Präzision in Serie der VCS-Parameter (Volumen (A), Konduktivität (B) und Scatter (C)) der Lymphozytenpopulation gemessen in je drei Proben der Kategorie 1.) Gesamtleukozyten  $< 3.0 * 10^3/\mu\text{l}$  (Leukopenie), 2.) Gesamtleukozyten  $4.0 - 8.0 * 10^3/\mu\text{l}$  (Normale Leukozytenzahl) und 3.) Gesamtleukozyten  $> 10.0 * 10^3/\mu\text{l}$  (Leukozytose).*

<b>A. Volumen der Lymphozyten</b>				
<b>Leukopenie</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
Probe 1	79	89	83	3,8
Probe 2	84	86	85	1,0
Probe 3	81	83	82	0,7
<b>Normale Leukozytenzahl</b>				
Probe 1	77	79	78	0,7
Probe 2	85	87	86	0,8
Probe 3				
<b>Leukozytose</b>				
Probe 1	85	87	86	0,8
Probe 2	90	95	92	2,3
Probe 3	80	85	81	2,1

<b>B. Konduktivität der Lymphozyten</b>				
<b>Leukopenie</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
Probe 1	109	115	112	2,2
Probe 2	111	113	112	0,8
Probe 3	113	116	114	1,1
<b>Normale Leukozytenzahl</b>				
Probe 1	116	120	118	1,5
Probe 2	116	118	117	0,9
Probe 3				
<b>Leukozytose</b>				
Probe 1	113	117	115	1
Probe 2	115	121	118	2,2
Probe 3	119	121	120	1,0

<b>C. Scatter der Lymphozyten</b>				
<b>Leukopenie</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Variationskoeffizient</b>
Probe 1	53	58	55	2,1
Probe 2	73	74	73	0,5
Probe 3	64	67	65	1,2
<b>Normale Leukozytenzahl</b>				
Probe 1	65	70	68	2,1
Probe 2	67	69	68	0,7
Probe 3				
<b>Leukozytose</b>				
Probe 1	79	82	80	1,1
Probe 2	76	82	79	2,3
Probe 3	76	80	78	1,6

#### 4.2 Einfluss der Probenalterung auf die Lageparameter

Im Rahmen Evaluierung der Lageparameter wurde der Einfluss der Probenalterung untersucht. Hierbei ist von Bedeutung, dass rote und weiße Blutkörperchen ex-vivo morphologischen Veränderungen unterliegen, die sich in Schrumpfungsprozessen unter Einfluss von Antikoagulanzen (Erythrozyten), über Degranulation (Thrombozyten) bis hin zu beschleunigter Apoptose (neutrophile Granulozyten) widerspiegeln. Da bei der diagnostischen Bewertung der Lageparameter morphologische Veränderungen der Zellen in-vivo ein entscheidendes Kriterium darstellen, wurde der Präanalytik zur Vermeidung von artifiziellen Veränderungen besonderes Augenmerk geschenkt. In den vorliegenden

Experimenten wurden wiederum Proben von leukopenen, leukozytischen Patienten bzw. von Patienten mit normalen Leukozytenzahlen untersucht (Definition s.o.).

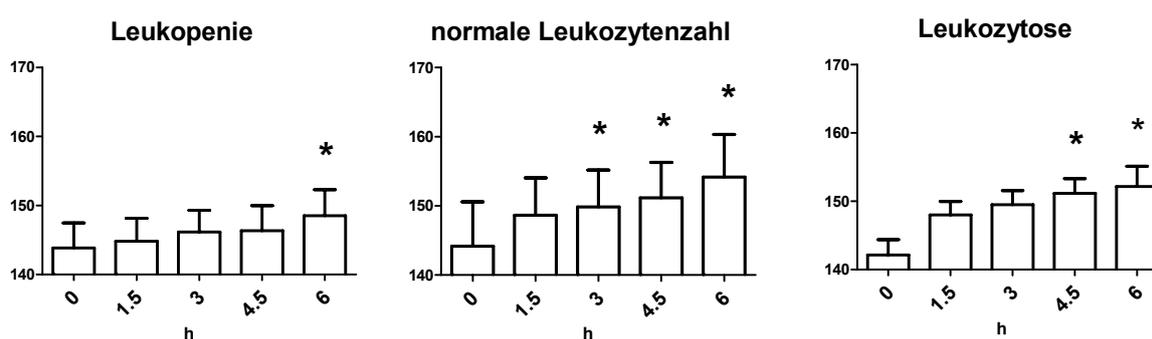
#### 4.2.1 Neutrophile Granulozyten

Vor allem beim Volumenparameter der Neutrophilen aus Proben mit normalen Leukozytenzahlen kam es zu einer signifikanten Zunahme (Abbildung 8; Tabelle 5) der Messwerte im Verlauf von 6 h nach Blutentnahme.

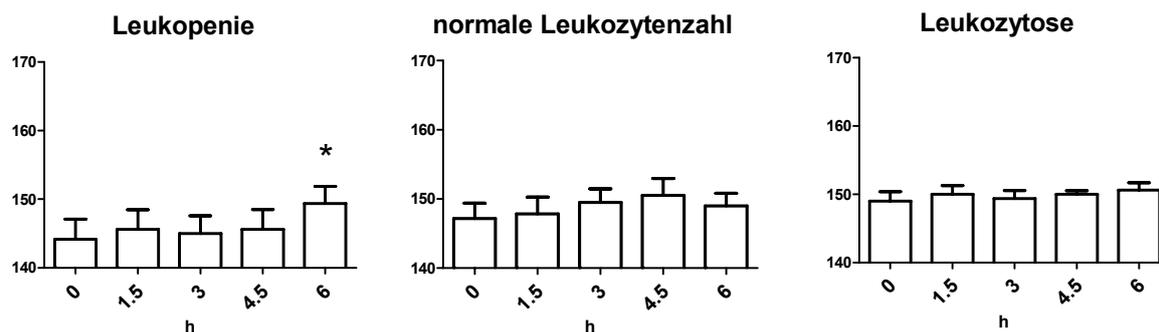
In Abbildung 8 – 10 sind jeweils die absoluten Messwerte der Lageparameter im Verlauf dargestellt, in Tabelle 5 die prozentualen Veränderungen mit Angabe der statistischen Signifikanzen (in Analogie erfolgten die Darstellungen für Monozyten und Lymphozyten s.u.).

**Abbildung 8 - 10:** *Veränderung der Volumina, Konduktivität und Scatter bei Neutrophilen in Abhängigkeit von der Probenalterung im 1.5 h-Abstand maximal 6 h nach Probenentnahme. Dargestellt sind die intraindividuellen Mittelwerte mit Standardabweichung aus jeweils 6 Proben aus der Kategorie Leukozytopenie / Normale Leukozytenzahl / Leukozytose. Die mit \* gekennzeichneten Balken zeigen Mittelwerte mit signifikanter Abweichung ( $p < 0.05$ ) vom 0 h-Wert an (ANOVA mit post-hoc Analyse).*

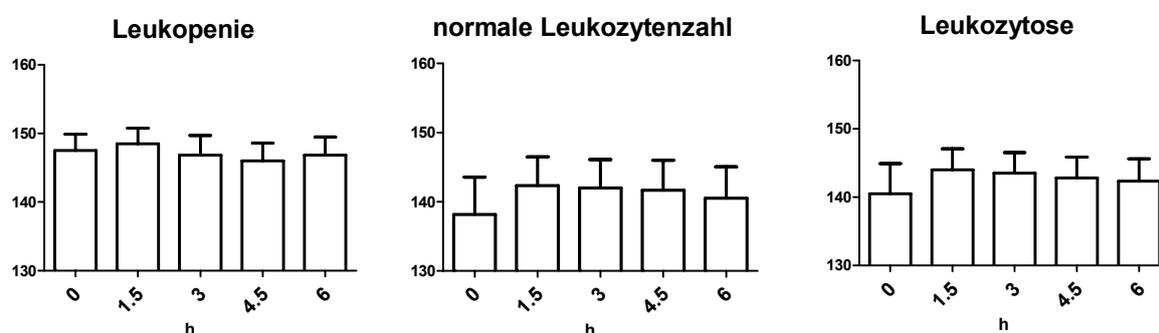
#### 8) Volumina



### 9) *Konduktivität (Informationen zu internen Zellstrukturen)*



### 10) *Scatter (zellulärer Granularität, Kernstruktur und Oberfläche)*



**Tabelle 5:** Effekt (%) der Probenalterung auf die Lageparameter Volumen, Konduktivität und Scatter bei **neutrophilen Granulozyten** aus leukopenen (Leukopenie), leukozytischen (Leukozytose) Proben und Proben mit normalen Leukozytenzahlen. Dargestellt sind jeweils die mittleren prozentualen Veränderungen gegenüber den Basalwerten. Ein negativer Wert bedeutet ein prozentualer Abfall der Messwerte, ein positiver ein prozentualer Anstieg.

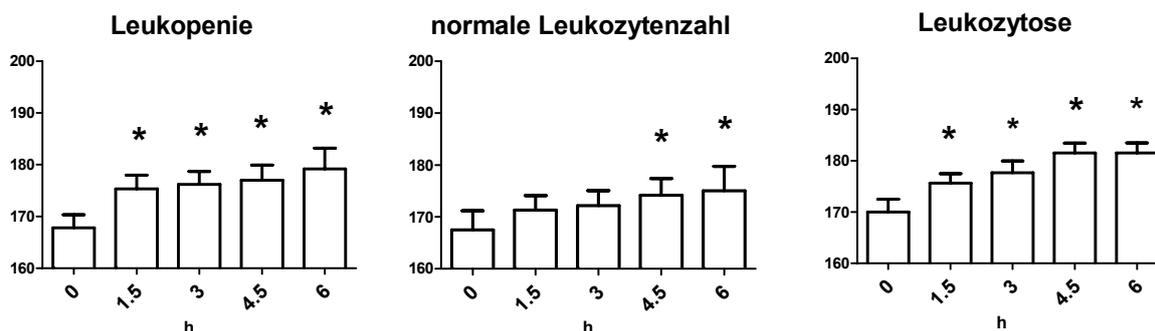
Zeit (h)	Leukopenie					normale Leukozytenzahl					Leukozytose				
	0	1,5	3	4,5	6	0	1,5	3	4,5	6	0	1,5	3	4,5	6
<b>Volumen</b>	X	0.7	1.6	1.8	3.3	x	3.3	4.1	5.1	7.3	x	4.2	5.3	6.5	7.2
<b>Konduktivität</b>	X	1.3	1.3	1.9	4.4	x	1.9	0	1.9	2.3	x	0.8	0.7	0.9	1.0
<b>Scatter</b>	X	0.7	-0.5	-1.1	-0.5	x	3.3	3.0	2.8	1.9	x	2.7	2.3	1.9	1.5

## 4.2.2 Monozyten

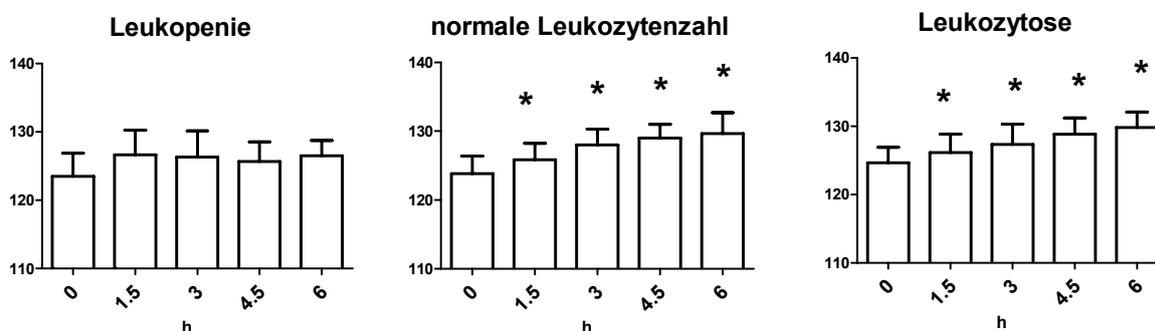
Bei Volumen- und Konduktivitätsmesswerten von Monozyten insbesondere aus leukopenen und leukozytischen Proben kam es zu einer signifikanten Zunahme der Messwerte bereits nach 1,5 und im weiteren Verlauf bis zu 6 h nach Blutentnahme (Abbildung 11, 12). Im Gegensatz hierzu hatte die Probenlagerung keinen wesentlichen Einfluss auf Granularität, Kernstruktur und Oberfläche (Scatter; Abbildung 13, Tabelle 6).

**Abbildung 11 - 13:** Veränderung der **Volumina, Konduktivität** und **Scatter** bei **Monozyten** in Abhängigkeit von der Probenalterung im 1.5 h-Abstand maximal 6 h nach Probenentnahme. Dargestellt sind die intraindividuellen Mittelwerte mit Standardabweichung aus jeweils 6 Proben aus der Kategorie Leukozytopenie / Normale Leukozytenzahl / Leukozytose. Die mit \* gekennzeichneten Balken zeigen Mittelwerte mit signifikanter Abweichung ( $p < 0.05$ ) vom 0 h-Wert an (ANOVA mit post-hoc Analyse).

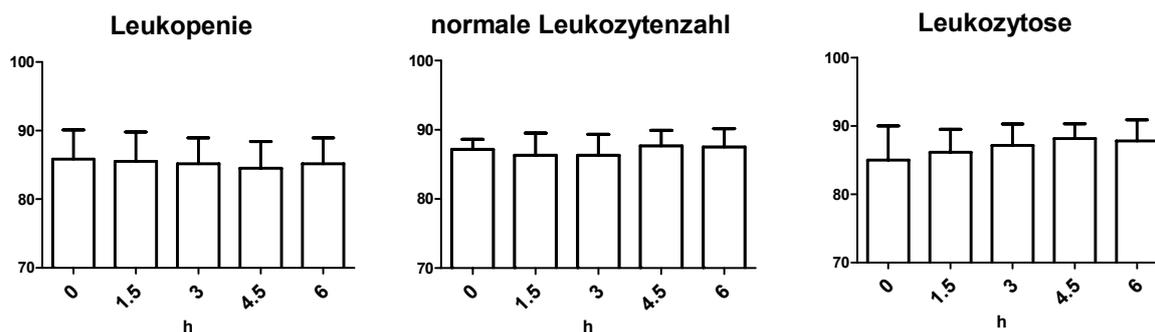
### 11) Volumina



### 12) Konduktivität (Informationen zu internen Zellstrukturen)



### 13) Scatter (zellulärer Granularität, Kernstruktur und Oberfläche)



**Tabelle 6:** Auswertung der Effekte (%) der Probenalterung auf die Lageparameter Volumen, Konduktivität und Scatter bei **Monozyten** aus denen unter Material / Methode 3.1.2.2 definierten Proben. In der tabellarischen Übersicht sind die mittleren prozentualen Veränderungen gegenüber dem Basalwert 0 h angegeben. Ein negativer Wert bedeutet ein prozentualer Abfall der Messwerte, ein positiver ein prozentualer Anstieg.

Zeit (h)	Leukozytopenie					normale Leukozytenzahl					Leukozytose				
	0	1,5	3	4,5	6	0	1,5	3	4,5	6	0	1,5	3	4,5	6
<b>Volumen</b>	X	4.5	5.0	5.5	6.7	x	2.4	2.9	4.1	4.7	x	3.4	4.6	6.8	6.8
<b>Konduktivität</b>	X	2.6	2.3	1.8	2.5	x	1.6	3.4	4.2	4.7	x	1.2	2.2	3.4	4.5
<b>Scatter</b>	x	-0.5	-0.7	-0.7	-0.7	x	-1	-1	0.5	0.4	x	1.5	2.7	3.9	3.5

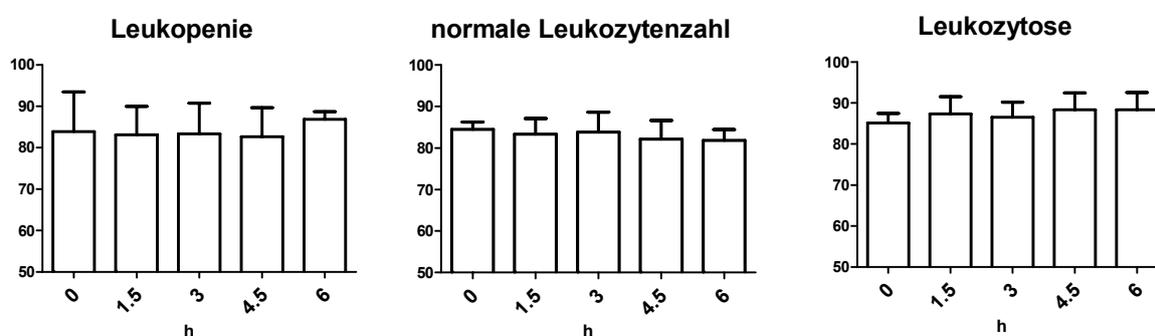
negatives (-) Vorzeichen: prozentuale Abnahme der Messwerte gegenüber dem 0h-Wert

### 4.2.3 Lymphozyten

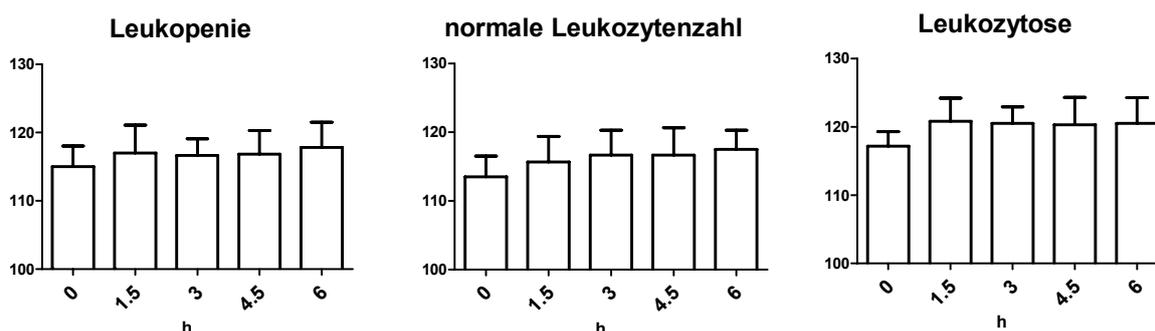
Im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten und Monozyten hatten die Lagerungsversuche von EDTA-Blut über 6 h nur einen geringen bis keinen Einfluss auf die Lageparameter Volumen, Konduktivität und Scatter von Lymphozyten (Abbildung 14 – 16, Tabelle 7).

**Abbildung 14 - 16:** Einfluss der Probenalterung über 6 h auf die Volumenmessungen, Konduktivität und Scatter bei Lymphozyten. Dargestellt sind die intraindividuellen Mittelwerte aus jeweils 6 Proben aus der Kategorie Leukozytopenie / Normale Leukozytenzahl / Leukozytose. Die mit \* gekennzeichneten Balken zeigen Mittelwerte mit signifikanter Abweichung ( $p < 0.05$ ) vom 0 h-Wert an (ANOVA mit post-hoc Analyse).

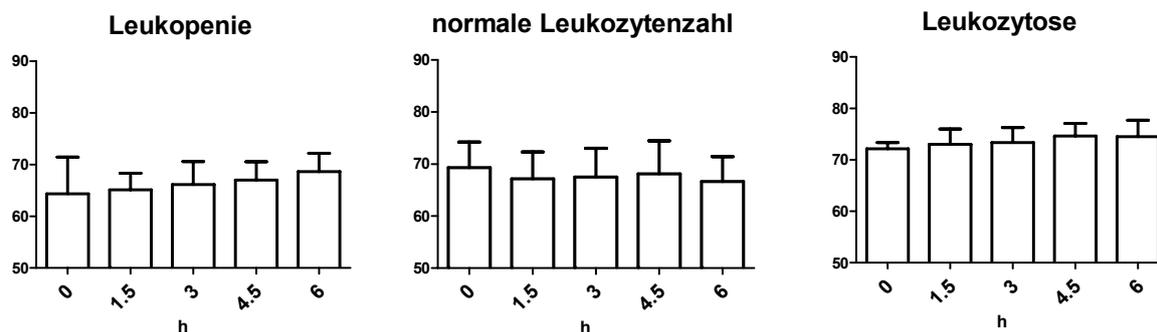
#### 14) Volumina



#### 15) Konduktivität (Informationen zu internen Zellstrukturen)



**16) Scatter** (zellulärer Granularität, Kernstruktur und Oberfläche)



**Table 7:** In Analogie zu Tabelle 5 und 6 sind hier die Effekte (%) der Probenalterung auf die Lageparameter Volumen, Konduktivität und Scatter bei **Lymphozyten** zusammengefasst. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Veränderungen im Verlauf im Vergleich zur 0 h-Messwerten. Ein negativer Wert bedeutet ein prozentualer Abfall der Messwerte, ein positiver ein prozentualer Anstieg.

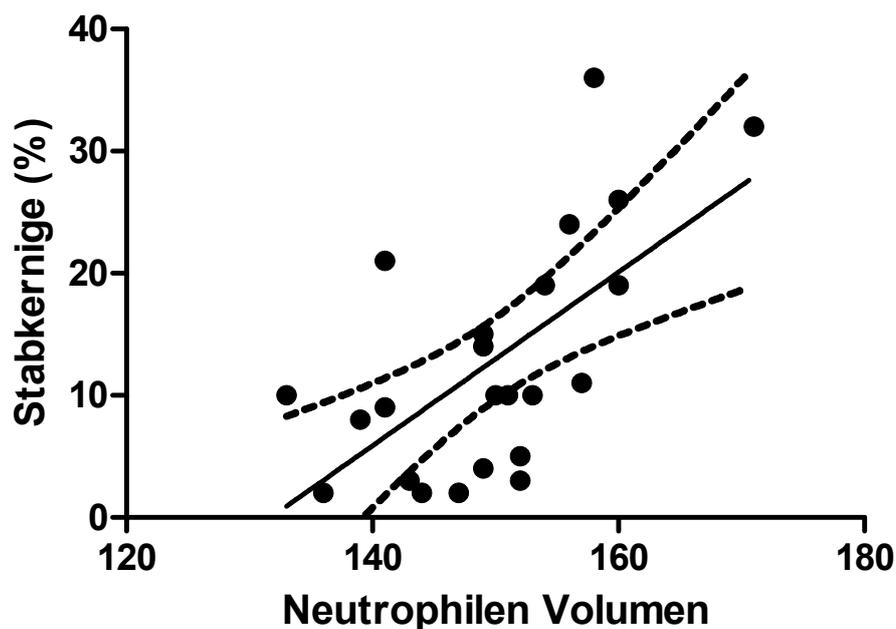
Zeit (h)	Leukozytopenie					normale Leukozytenzahl					Leukozytose				
	0	1,5	3	4,5	6	0	1,5	3	4,5	6	0	1,5	3	4,5	6
<b>Volumen</b>	x	-0.4	-0.2	-0.1	4.8	X	-1.4	-0.9	-2.8	-3.1	x	3.7	2.5	1.5	3.7
<b>Konduktivität</b>	x	1.8	1.5	1.6	2.5	X	1.9	2.8	2.8	3.5	x	3.2	2.9	2.7	2.9
<b>Scatter</b>	x	2.0	3.5	4.9	7.4	X	-3.1	-2.6	-1.8	-3.8	x	1.2	1.7	3.5	3.2

### 4.3 Intraindividuelle Vergleichbarkeit von Anteil an stabkernigen Granulozyten nach mikroskopischer Differenzierung und VCS-Lageparametern

Wie bereits im Methodenteil beschrieben, geht das gehäufte Auftreten von unreifen Vorstufen (z.B. Stabkernige) innerhalb der Population der neutrophilen Granulozyten mit einer Zunahme der mittleren Volumenbestimmung mittels VCS-Technologie einher. Im 3D-Scattergramm ist dies durch eine Verlagerung der „Neutrophilenwolke“ gekennzeichnet (exemplarisch s. Abbildung 3). Vor diesem Hintergrund war anzunehmen, dass der Grad der Volumenzunahmen mit dem Anteil an stabkernigen Vorstufen korrelieren sollte.

Die mikroskopische Differenzierung von 23 leukozytischen Patientenproben mit Bestimmung der jeweiligen Anteile stabkerniger Granulozyten ergab eine gute Korrelation mit den jeweiligen Volumenmesswerten ( $r^2 = 0.40$ ,  $p = 0.001$ , Abbildung 17), jedoch keine Korrelation mit Scatter ( $r^2 = 0.07$ ; ns.) oder Konduktivität ( $r^2 = 0.14$ ; ns.). Darüberhinaus korrelierte der Anteil Stabkerniger mit dem Anteil (%) an Neutrophilen nach Automatendifferenzierung ( $r^2 = 0.24$ ;  $p = 0.007$ ).

**Abbildung 17:** Korrelation (95%-Konfidenzintervalle) zwischen Volumenmesswerten der Neutrophilen (VCS-Technologie) und mikroskopisch differenziertem Anteil stabkerniger Granulozyten aus leukozytischen Proben (Gesamtleukozyten zwischen  $10$  und  $20 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$ ) ( $n = 23$ ).



## Zusammenfassung:

Die VCS-Lageparameter Volumen, Konduktivität und Scatter von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten aus EDTA-Blut zeigten eine hohe Präzision in Serie, respektive geringe Standardabweichung für die jeweiligen Zellpopulationen.

In Lagerungsversuchen bei Raumtemperatur über 6 h veränderten sich insbesondere Volumen- und Konduktivitätsmesswerte von neutrophilen Granulozyten und Monozyten durch einen signifikanten Anstieg gegenüber den Ausgangswerten.

Da Volumenparameter aus leukozytotischen Proben linear mit dem Anteil an Stabkernigen nach mikroskopischer Differenzierung korrelierten, kann davon ausgegangen werden, dass sich Volumenparameter zur Diskriminierung von Linksverschiebungen eignen könnten.

## 4.4 Mikrobiologische und anthropometrische Daten der Patienten mit Sepsis, organbezogener Infektion und Kontrollen

Das Alter und das Geschlecht wurden in der Tabelle 8 berücksichtigt. Die Kontrollen waren signifikant jünger als die Sepsis-Patienten. Es wurden zwar insgesamt 80 erwachsene Patienten, wovon 40 die ACCP-Kriterien (Dellinger et al. 2004) einer schweren systemischen Infektion (Sepsis) erfüllten, und 40 als nichtsystemisch (Pneumonie, bronchopulmonale Infektion, bakterielle Nephritis und postoperative Infektionen der Haut und des Bindegewebes) eingestuft wurden, und 50 gesunde Kontrollen in der Studie aufgenommen.

Jedoch mussten Patienten von der statistischen Analyse ausgeschlossen werden, wenn die Daten inkomplett (z.B. bei fehlenden Blutkulturen) waren. Dementsprechend beträgt die aktuelle Anzahl an Patienten und Kontrollen, die zur statistischen Analyse herangezogen wurden,  $n = 37$  für die Gruppe der Sepsis,  $n = 39$  für Patienten mit limitierten Infektionen und  $n = 48$  für die Kontrollen. Hinsichtlich der Ergebnisse der mikrobiellen Blutkulturen in der Sepsis-Gruppe konnten als am häufigsten isolierte Pathogene *Staphylococcus (S.) aureus*, *Escherichia (E.) coli*, *Enterococci spp.*, *Streptococcus pneumoniae* und *Pseudomonas spp.* ermittelt werden. Weitere waren Enterobacteriaceae *Klebsiella pneumoniae* ( $n = 1$ ), *Morganella morganii* ( $n = 1$ ), *Enterobacter spp.* ( $n = 2$ ), *Candida albicans* und Anaerobier ( $n = 1$ ).

Elf Patienten ( $n = 11$ ) mit nichtsystemischen Infektionen wiesen eine positive Blutkultur mit signifikanten Pathogenen auf. In dieser Gruppe wurde der Nachweis von koagulase-negative Staphylokokken und Propionibacteriaceae als unspezifische Keime klassifiziert.

Die Zahl der Leukozyten reichte von 1.2 bis 34.6 in der Sepsis-Gruppe und 1.4 bis 17.8 bei nicht-systemischen organspezifischen Infektionen. Beide Gruppen unterschieden sich signifikant von den Kontrollen hinsichtlich der Leukozytenzahl, CRP und IL-6 Werte (Tabelle 8). Allerdings waren die CRP Konzentrationen am höchsten in der Sepsis-Gruppe und wiesen einen Unterschied zu den Kontrollen ( $p < 0.001$ ) und Patienten mit nicht-systemischen Infektionen auf ( $p = 0.035$ ). Die IL-6 Werte zeigten sich auch am höchsten in der Sepsis-Gruppe, jedoch konnte keine Signifikanz im Vergleich zu lokalen Infektionen eruiert werden (Abbildung 18b).

**Table 8:** Demographische Daten und Entzündungsparameter der Studienpopulationen

	Sepsis (n=37)	NSI (n=39)	Ktr (n=48)	Sepsis vs. Ktr	Sepsis vs. NSI	Ktr vs. NSI
<b>Alter (Jahr)</b>	71.6 (24.1)	68.6 (19.0)	56.9 (15.9)	<0.05	Ns.	Ns.
<b>Geschlecht (f/m)</b>	23/14	22/17	26/22	Ns.	Ns.	Ns.
<b>CRP (mg/dL)</b>	175 (116)	123 (86)	4.5 (5.1)	<0.001	0.035	<0.001
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	4702 (16687)	325 (366)	8.6 (3.7)	0.001	Ns.	<0.001
<b>Leukozytenzahl (*10<sup>5</sup>/mL)</b>	10.5 (7.2)	14.4 (7.9)	7.7 (1.6)	Ns.	0.018	<0.001
<b>VCS Parameter**</b>						
<b>Neutrophile:</b>						
Volumen (MNV)	159 (16.2)	149 (9.1)	139 (6.6)	<0.001	<0.001	<0.001
Konduktivität (MNC)	146 (4.3)	147 (4.9)	143 (3.3)	0.013	Ns.	<0.001
Streuung (MNS)	137 (12.0)	142 (9.6)	144 (12.1)	<0.001	Ns.	Ns.
<b>Monozyten:</b>						
Volumen (MMV)	181 (15.2)	174 (10.0)	164 (5.6)	<0.001	0.017	<0.001
Konduktivität (MMC)	124 (5.7)	124 (3.9)	119 (3.4)	<0.001	Ns.	<0.001
Streuung (MMS)	89 (6.7)	89 (3.9)	89 (4.1)	Ns.	Ns.	Ns.
<b>Lymphozyten:</b>						
Volumen (MLV)	86 (7.0)	85 (8.6)	84 (3.8)	Ns.	Ns.	Ns.
Konduktivität (MLK)	121 (12.9)	120 (5.3)	111 (3.2)	<0.001	<0.001	<0.001
Streuung (MLS)	54 (7.6)	75 (5.3)	77 (4.1)	Ns.	Ns.	Ns.

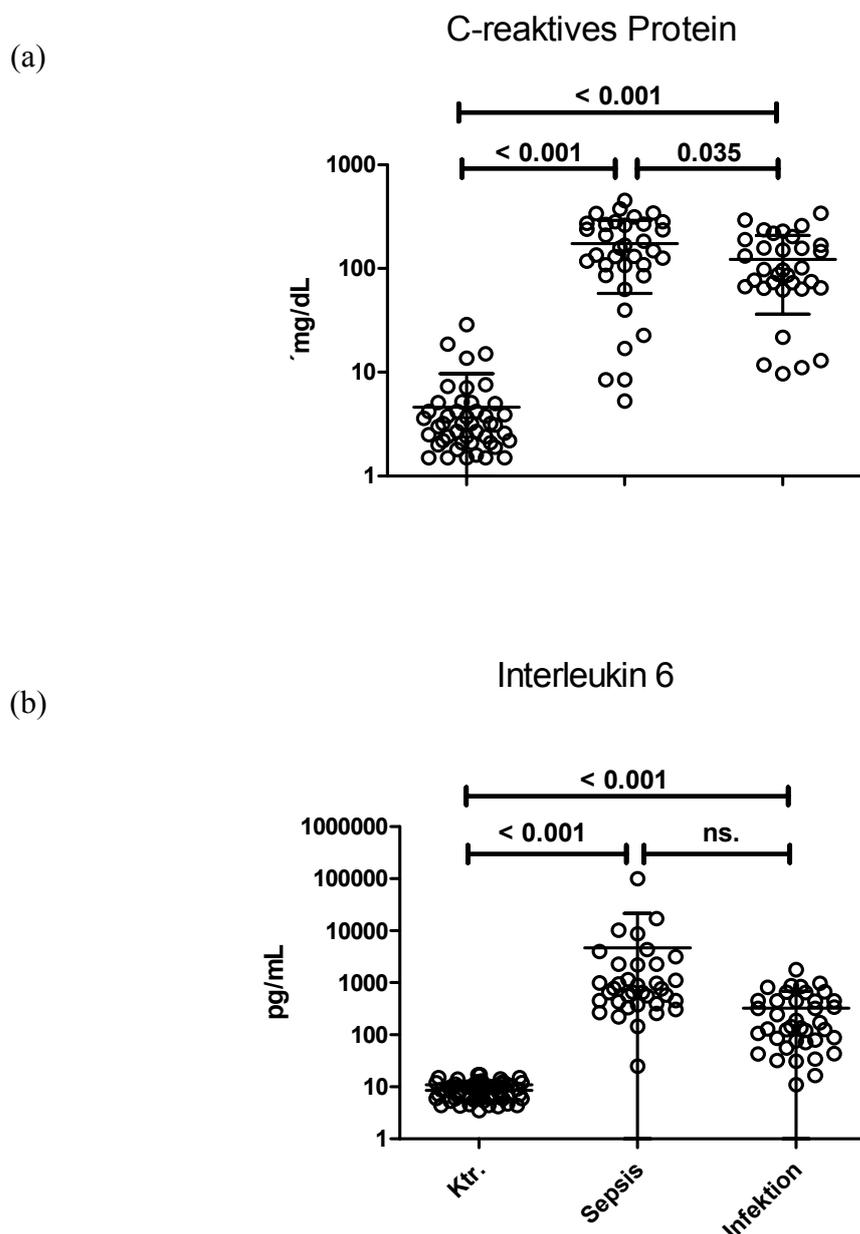
\*P value < 0.05 (ANOVA mit post hoc Analyse) wurde als statistisch signifikant eingestuft

\*\*willkürliche Einheiten

Ns. nicht signifikant;

**NSI nicht-systemische Infektionen; Ktr Kontrolle**

**Abbildung 18:** Intraindividuelle Plasmakonzentrationen (Mittelwert und Standardabweichung) des C-reaktiven Proteins und (a) Interleukin-6 (b) von Patienten mit Sepsis, nichtsystemischen Infektionen und gesunden Kontrollen (Signifikanzen zwischen den Gruppen wurden mittels ANOVA und post-hoc-Analyse ermittelt).



#### 4.5 VCS-Parameter von Neutrophilen und Monozyten bei Patienten mit Sepsis, organspezifischer Infektion und Kontrollgruppe

Obwohl die VCS Technologie von Beckman Coulter die maschinelle Zählung der fünf Subklassen reifer Leukozyten (Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und Basophilen) ermöglicht, konzentrierten wir uns auf die Untersuchung der Neutrophilen und

Monozyten. Wie bereits vorher schon beschrieben, zeigt sich unter einer beschleunigten Granulopoese, durch Ausschwemmung vermehrter Precursoren (CD34+), das Bild einer physiologischen Linksverschiebung mit einer Dominanz von stabkernigen Granulozyten, aktivierten Monozyten und Vorstufen wie Promyelozyten, diese reaktiv veränderten Leukozyten neigen, im Vergleich zum unstimulierten Zustand, dazu größer zu sein, und eine geringere Komplexität des Zellkerns aufzuweisen. Wie von Chaves et al. (2006) publiziert können die morphologischen Veränderungen der linksverschobenen Neutrophilen und reaktiven Monozyten bei bakteriellen Infektionen durch die VCS-Technologie quantitativ analysiert werden. Zur Validierung der Ergebnisse von Neutrophilen und Monozyten wurde zuletzt noch die statistische Analyse der Lymphozyten berücksichtigt.

#### **4.5.1 Neutrophilen**

Im Vergleich zu Patienten mit nichtsystemischen Infektionen und Kontrollen konnte ein signifikanter Anstieg des Volumen-Mittelwertes (MNV), im Zusammenhang mit den höchsten Werten unter einer Sepsis, beobachtet werden (Abbildung 19b). Die MNV Werte waren in der Patientengruppe der limitierten Infektionen höher, wenn positive Blutkulturen auf signifikante Pathogene ( $n = 11$ ) (Abbildung 19) nachgewiesen wurden.

Es wurde jedoch keine Statistik angefertigt, da die Patientengruppen zu klein waren.

Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen war der Streuungs-Mittelwert (MNS) bei der Patientengruppe erniedrigt. Dies wies auf einen Anstieg unreifer Granulozyten hin.

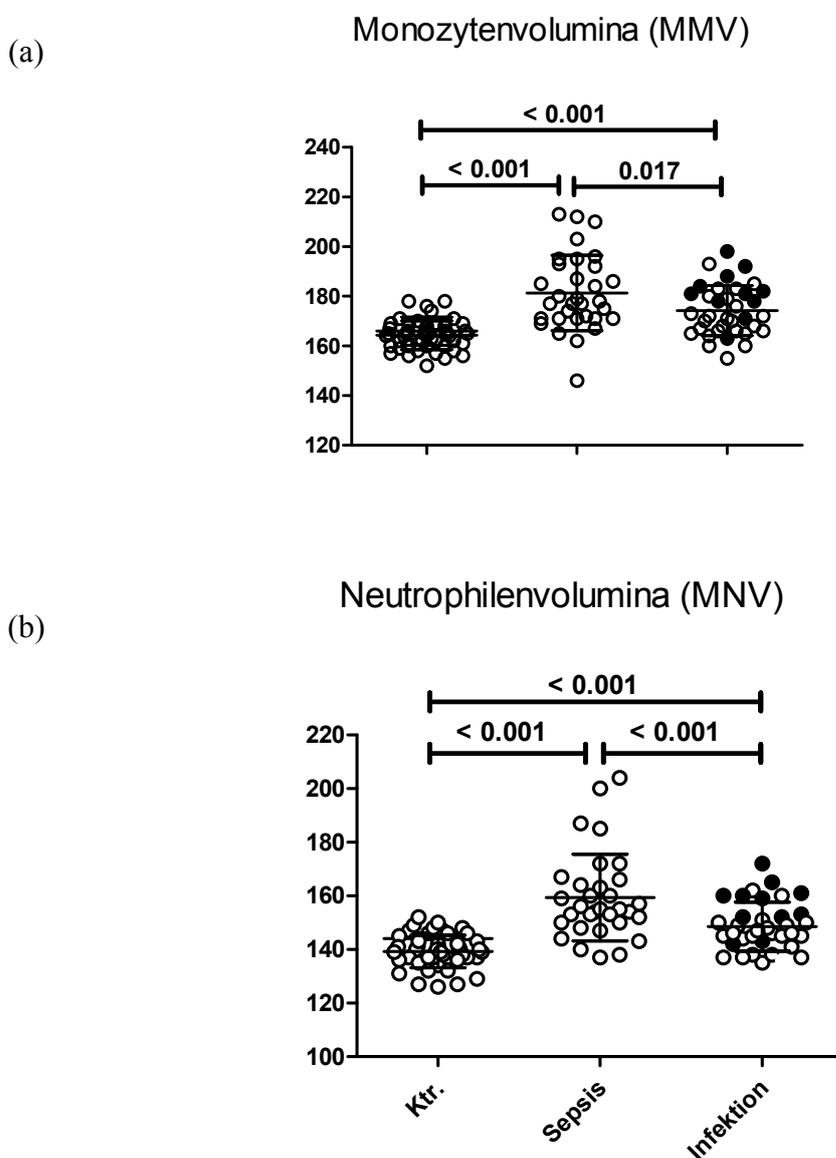
Tatsächlich zeigte sich unter der mikroskopischen Untersuchung der Untergruppe von Differentialblutbildern bei einer Linksverschiebung ( $n = 24$ ) eine gute Korrelation zwischen den intraindividuellen Prozentzahlen der Stabkernigen und des MNS  $r^2 = 0.48$ ,  $P = 0.001$  (Mardi et al. 2006)]. Gleichwohl wies der Streuungswert keinen Unterschied zwischen der Sepsis-Gruppe und Patienten mit limitierten Infektionen (Tabelle 8) auf. Hinsichtlich der Konduktivität waren die Werte bei Sepsis und nichtsystemischen Infektionen im Vergleich zu den Kontrollen (Tabelle 8) zwar signifikant erhöht, unter den Patientengruppen konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden.

#### **4.5.2 Monozyten**

Unter einer Sepsis war der Mittelwert des Monozytenvolumens (MMV) im Vergleich zu den nichtsystemischen Infektionen und Kontrollen (Abbildung 19a) am höchsten. Die Mittelwerte

der Monozytenstreuung (MMS) zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen (Tabelle 8). Obwohl die Konduktivität der Monozyten bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen erhöht war (Tabelle 8), konnte kein Unterschied zwischen einer Sepsis oder lokalen Infektion beobachtet werden.

**Abbildung 19:** Scattergramme von MMV (a) und MNV (b) von Patienten mit Sepsis, nichtsystemischen Infektionen und gesunden Kontrollen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung. Darüber hinaus sind diejenigen Patienten mit organspezifischen Infektionen gekennzeichnet (schwarze Punkte), die positive Blutkulturen hatten ( $n=11$ ). Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind angegeben und wurden mittels ANOVA und post-hoc-Analyse ermittelt.



### 4.5.3 Lymphozyten

Im Vergleich zu den Neutrophilen und Monozyten zeigten sich die Lymphozyten als eher schwache Diskriminierungsfaktoren. Zwar konnte hinsichtlich der Lymphozyten-Konduktivität (MLK) eine Signifikanz im Vergleich zu den Kontrollen ermittelt werden, da der Mittelwert unter einer Infektion erhöht ist. Zwischen einer Sepsis oder einer nichtsystemischen Infektion zeigten die Daten jedoch keinen Unterschied auf. Die Lymphozyten boten keine signifikanten Daten im Bezug auf das Volumen (MLV) und die Streuung (MLS).

### 4.6 Beziehungen zwischen VCS Parameter, Leukozytenzahl und Serummarker der Inflammation (IL-6 und CRP)

Sowohl eine signifikante nichtlineare Korrelation konnte zwischen MNV und MMV ( $r^2 = 0.15$ ,  $P = 0.036$ ) in der Sepsis-Gruppe beobachtet werden, als auch eine lineare Korrelation der Patienten mit nichtsystemischen Infektionen ( $r^2 = 0.38$ ,  $P < 0.001$ ). Dies könnte auf eine Zunahme der Aktivierung von Monozyten und Neutrophilen abhängig vom Schweregrad der Infektion hinweisen. Bei gesunden Kontrollen gab es keine Korrelation zwischen MNV und MMV. Die Leukozytenzahl korrelierte mit dem neutrophilen Volumen (MNV) von Patienten mit nichtsystemischen Infektionen ( $r^2 = 0.11$ ,  $P = 0.04$ ). Es zeigte sich jedoch keine Korrelation in der Sepsis-Gruppe.

### 4.7 Vorhersagewerte im Hinblick auf die Prädiktion einer Sepsis

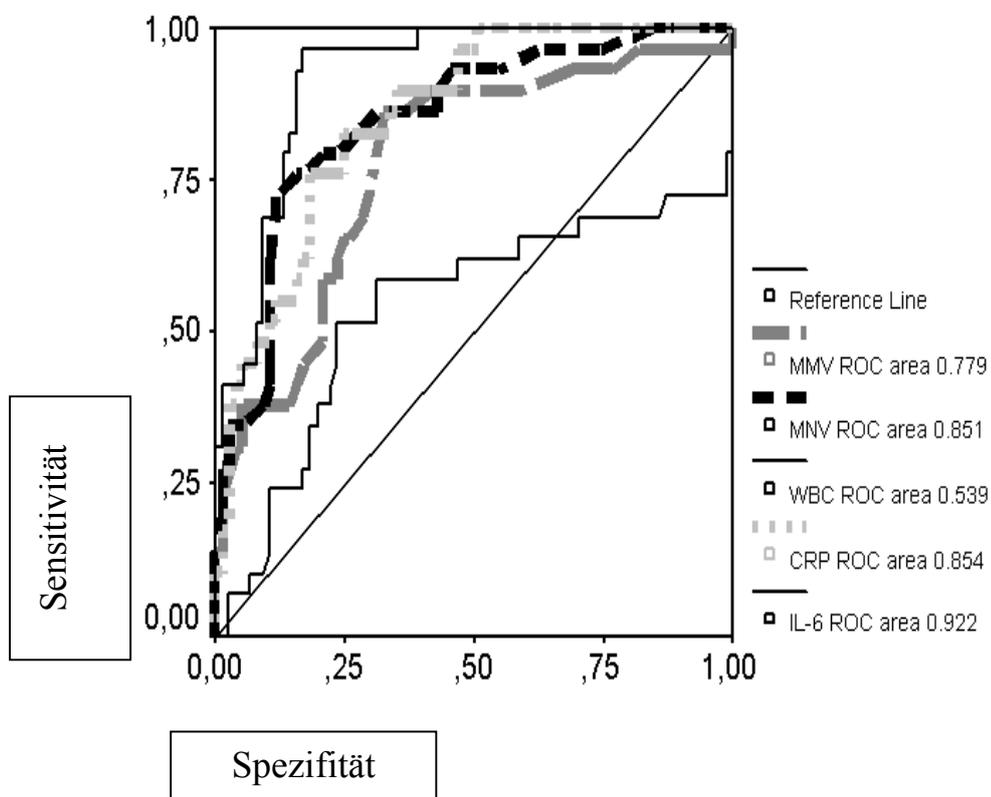
Die Sensitivität und Spezifität der untersuchten Parameter wurden auf Basis festgelegter cut off-Werte, anhand von ROC Analysen berechnet (Abbildung 20) und in der Tabelle 9 gezeigt, ermittelt. Ein cut off-Wert von 60 mg/dl für das CRP basiert auf schon vorher publizierte Ergebnisse von vergleichbaren Kohorten (Christ-Crain et al. 2004, Gaini et al. 2006). Gesunde Kontrollen wurden von der Kalkulation ausgeschlossen, weil ein normales Differentialblutbild und Leukozytenzahl zu den Einschlusskriterien gehörte.

Als wir ein cut off-Wert für MNV gleich oder größer als 150 wählten, konnte eine Sensitivität von 76 % und Spezifität von 63 % erreicht werden. Die Sensitivität war bei 100 mg/dl als cut off-Wert für CRP gleich, und signifikant besser als die 60 % bei 175 als cut off-Wert für

MMV. Obwohl sich die Sensitivität bei 145 als cut off-Wert des MNV auf 87 %, und auf 86 % bei 170 als cut off-Wert für MMV, steigern ließ, sank die Spezifität auf 41 % und 40 %. Also zeigte ein cut off-Wert von 150 für MNV (AUC 0.851) die gleiche Sensitivität wie das CRP (AUC 0.854) bei einer höheren Spezifität zur Unterscheidung einer Sepsis von nichtsystemischen Infektionen. Des Weiteren war das MNV im Vergleich zu MMV (AUC 0.779) ein besserer Indikator zur Verlaufsbeobachtung einer Sepsis. Nichtsdestotrotz wies das IL-6 (AUC 0.922) bei einem cut off-Wert von 250 pg/ml eine Sensitivität von 93 % bei einer Spezifität von 76 % auf, sodass es in der gegenwärtigen Studie als bester Verlaufsmarker zur Bestimmung einer Sepsis erscheint.

Als wir einen cut off von 500 pg/ml für IL-6 wählten, sank die Sensitivität auf 62 %, wobei die Spezifität sich auf 91 % erhöhte. Sensitivität und Spezifität von MNC und MMC waren viel niedriger als MMV und MNV (Daten sind nicht angegeben).

**Abbildung 20:** ROC-Analysen (mit AUCs) zum Vergleich von Infektionsmarkern (MonozytENVolumen-Mittelwert (MMV), NeutrophilENVolumen-Mittelwert (MNV), IL-6, C-reaktives Protein (CRP), Leukozytenzahl (WBC), um einen Unterschied zwischen Patienten mit Sepsis und nichtsystemischen Infektionen darzustellen.



**Tabelle 9:** Sensitivität und Spezifität von Infektionsmarkern für die Prädiktion von Sepsis in Abhängigkeit von definierten cut off-Wertelagen.

Parameter	cut off-Punkte	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
MNV	150	76	63
	145	87	41
MMV	170	86	40
	175	60	54
CRP (mg/dL)	60	76	65
IL-6 (pg/mL)	250	93	76
	500	62	91

Sensitivität / Spezifität der Leukozytenzahl wurden nicht angegeben, da das AUC der ROC-Kurve sich nicht signifikant von der "true area 0.5" unterschied (Abbildung 20).

MNV, Volumenmittelwert der Neutrophilen; MMV, Volumenmittelwert der Monozyten; CRP, C-reaktives Protein; IL, Interleukin.

### Zusammenfassung:

Volumenparameter von neutrophilen Granulozyten (mittleres Neutrophilen-Volumen (MNV)) und Monozyten (mittleres Monozyten-Volumen (MMV)) mit einem definierten cut off eignen sich zur Diskriminierung von Sepsis von organbezogenen Infektionen und Gesunden.

Im Hinblick auf prädiktive Sensitivität und Spezifität gegenüber Sepsis waren MNV und MMV vergleichbar mit einer CRP Konzentration von > 60 mg/dL. Interleukin 6 (IL-6) Konzentrationen von > 250 pg/mL hatten hingegen die höchste Sensitivität und Spezifität zur Prädiktion einer Sepsis im Vergleich der gemessenen Entzündungsmarker und VCS-Parameter innerhalb der vorliegenden Studienpopulation.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Stabilität und Präzision der morphometrischen VCS-Parameter**

Die exakte Bestimmung von hämatologischen Analysen und die Differenzierung von kernhaltigen Blutzellen sind entscheidend für die korrekte Diagnose, die Behandlung und den Krankheitsverlauf von entzündlichen oder hämatologisch-onkologischen Erkrankungen (Narayanan 2000). Neben unterschiedlichen Einflüssen in vivo können eine Reihe von in-vitro-Faktoren - wie beispielsweise Lagerungszeit und Temperatur - das Meßsignal von Laborparametern beeinflussen (Fielding et al. 1981, Guder et al. 1996). Die Kenntnis von den wichtigsten Einflussfaktoren einzelner Analyte ist deshalb essentiell für die richtige Interpretation von Laborbefunden.

Die klinische Definition für Probenstabilität bezieht sich auf den Referenzbereich als Kriterium und betrachtet einen Analyten als stabil, wenn die Differenz einer Messung zum Ausgangswert höchstens 1/12 des Referenzbereichs der Methode ausmacht (Deutsche Bundesärztekammer).

Unterschiedliche Arbeitsgruppen haben sich in der Vergangenheit mit der Bestimmung von Probenstabilität für klinisch-chemische Parameter befasst (Guder 1999, Guder et al. 1996, Rossing et al. 1980). Die publizierten Studien untersuchten die Analysenstabilität bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen (-20° C, 4 – 8° C und Raumtemperatur) in erster Linie von Urin-, Serum-, Plasma- und Liquor-Proben. Im Gegensatz zu klinisch-chemischen Analysen müssen Untersuchungen zur Stabilität von hämatologischen Proben immer auch zelluläre Bestandteile berücksichtigen. Hier existieren bislang nur wenige Untersuchungen (Bourner et al. 2005, Imeri et al. 2008), die sich vor allem mit den Erythrozytenindices (mittleres Erythrozytenvolumen (MCV), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH) befasst haben.

In einer side-by-side-Studie zur Vergleichbarkeit von vier unterschiedlichen Hämatologie-Systemen (Beckman Coulter LH750, Abbott Cell-Dyn 3500, Siemens Advia 120, Sysmex XE 2100) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das MCV innerhalb von 72 h in Abhängigkeit vom verwendeten Hämatologie-System signifikant ansteigt. Die Gesamtleukozytenzahl konnte in dieser Studie zuverlässig von allen getesteten Automaten innerhalb des untersuchten Zeitfensters gemessen werden. Bei der automatisierten Differenzierung zeigten sich beim Beckman Coulter LH750 eine Zunahme des prozentualen

Monozyten- und eine Abnahme des korrespondierenden Neutrophilen-Anteils. Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der Stabilität der Leukozyten-Differenzierung kam auch die Arbeitsgruppe von Imeri et al. (2008). Im Vergleich zu Systemen von Sysmex (XE 2100) und Siemens (Advia 120) wurde hier am LH750 eine Veränderung der Monozyten- und Neutrophilen-Anteile nach 4 h bzw. 10 h bei Lagerung bei 4° C bzw. Raumtemperatur beobachtet. Als Ursache für diese in-vitro Veränderungen können sogenannte EDTA-Effekte diskutiert werden. Hierbei bedingt das verwendete Antikoagulans zeit- und temperaturabhängig Veränderungen von Zellvolumen und Granularität, die sich bei ausschließlicher Verwendung von Streulichtmessungen zur Leukozyten-Differenzierung in einer messtechnischen Verschiebung innerhalb der Leukozyten-Subpopulationen niederschlagen.

In der vorliegenden Arbeit haben die Untersuchungen zur Probenstabilität nicht direkt auf die Leukozyten-Differenzierung Bezug genommen. Nichtsdestotrotz dienen die analysierten VCS-Parameter unmittelbar der Leukozyten-Differenzierung, und Veränderungen ihrerseits würden zu Ergebnisänderungen im Differentialblutbild führen. Wie aus Tabelle 5 und 6 - bezogen auf Neutrophilen bzw. Monozyten - zu entnehmen ist, nimmt die Wertelage der Volumenbestimmung und der Konduktivität innerhalb des untersuchten Zeitfensters von 6 h unabhängig von der Gesamtleukozytenzahl (Leukopenie, normale Leukozytenzahl oder Leukozytose) signifikant zu. Die differenzierte Betrachtung von Proben mit niedrigen, normalen bzw. erhöhten Gesamtleukozytenzahlen waren vor dem Hintergrund gemacht worden, dass sich hinter unterschiedlichen Gesamtleukozytenzahlen auch eine distinkte Zusammensetzung der leukozytären Subpopulationen verbergen könnte (beispielsweise können sich in leukozytösen Proben größere Anteile unreifzelliger Neutrophiler - in leukopenen ein höherer Anteil überalterter Granulozyten befinden). Fasst man diese beiden Ergebnisse zusammen, so kann konstatiert werden, dass die Probenlagerung unabhängig von der Gesamtleukozytenzahl bereits innerhalb weniger Stunden zu Veränderung der Lageparameter bei Monozyten und Neutrophilen führt. Dieses Erkenntnis ist bedeutsam vor dem Hintergrund eines potenziellen Einsatzes dieser Parameter als prädiktive Sepsismarker. Im Vorgriff auf die Spezifitäts- und Sensitivitätsberechnungen für Lageparametern würden in-vitro Veränderungen die Präzision und damit verbundene Vorhersagekraft für Sepsis und organbezogenen Infektion deutlich verändern. Ganz konkret würde die lagerungsbedingte Zunahme der Wertelage der Volumenparameter von Monozyten (Abbildung 8) vom Zeitpunkt 0 h zum Zeitpunkt 6 h einen Verlust an prädiktiver Sensitivität für Sepsis gegenüber organbezogener Infektion von bis zu 10 %-Punkten bedeuten (Tabelle 9).

Im Hinblick auf die intraassay-Variabilität, welche in den vorliegenden Untersuchungen in Serien von  $n = 5$  aus Patientenmaterial bestimmt worden ist, scheint die VCS-Technologie hochpräzise und reproduzierbar. Wie im Ergebnisteil ausgeführt worden ist, wurden Variationskoeffizienten zwischen 0 und 3.8 % erreicht - unabhängig davon, welcher Lageparameter (Volumen, Scatter, Konduktivität) betrachtet wurde. Die von uns in der vorliegenden Arbeit verwendeten Assays zur Bestimmung von CRP und IL-6 zeigen laut Herstellerangaben eine intraassay-Variabilität von jeweils 2.81 % und 5.2 % und damit vergleichbar präzise Werte. Zu denen in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Ergebnissen zur Präzision der VCS-Parameter existieren bislang keine Daten in der Literatur. Im Rahmen von Gerätevalidierungen wurden intraassay-Variabilitäten für die Leukozyten-Differenzierung ermittelt, die letztlich für den LH750 auf der Grundlage der VCS-Lageparameter entstanden sind. Hier wurden von Aulesia et al. (2003) für drei unterschiedliche standardisierte Kontrollmaterialien Variationskoeffizienten von 2.23 (Neutrophilen) – 3.95 % (Monozyten) bzw. 1.72 – 3.84 % für leuko-, normorpene und leukozytische Patientenproben beobachtet.

## **5.2 Eignung morphometrischer VCS-Parameter zur Bestimmung der Linksverschiebung**

Die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl, des absoluten und relativen Anteils Neutrophiler und der Anzahl unreifzelliger bzw. stabkerniger Neutrophiler sind klassische Parameter für die Diagnostik bakterieller Infektionen (Procop et al. 1997, Wenz et al. 1986, Mathy et al. 1974, Wile et al. 2001). Darüber hinaus geben morphologische Veränderungen von Neutrophilen wie toxische Granulation, toxische Vakuolisierung oder das Auftreten von Döhle Körperchen zusätzliche diagnostische Informationen. Solche Kriterien lassen sich jedoch lediglich mittels mikroskopischer Verfahren personal- und zeitintensiv ermitteln und sind in klinischen Studien nicht ausreichend evaluiert. Ein weiteres Problem besteht in der Impräzision mikroskopischer Methoden, die einerseits auf der Differenzierung von 100 – 200 Zellen beruht, einer möglichen Ungleichverteilung von kernhaltigen Zellen im peripheren Blutausschlag und der Untersucher-abhängigen Variation bei der Zellidentifizierung (Krause 1990, Gulati et al. 1992, Ardron et al. 1994). Aufgrund dieser Tatsachen sind die Aussagekraft und der diagnostische Wert der manuellen Differenzierung als Indikator einer Infektion unter fortwährender Diskussion.

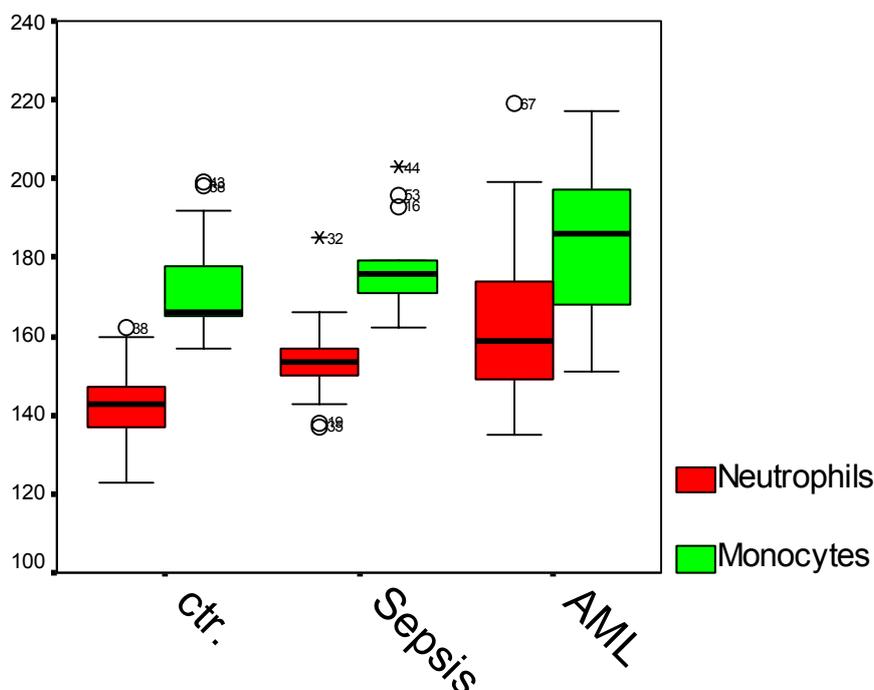
Vor Beginn der klinischen Studie zur Validität von morphometrischen Parametern bei der Diskriminierung von Sepsis wurde geprüft, inwieweit sich morphologische Veränderungen oder Veränderungen der Zusammensetzung der Leukozyten-Population in Veränderungen der VCS-Parameter widerspiegeln. Bekanntermaßen finden sich bei physiologischer Linksverschiebung erhöhte prozentuale Anteile an stabkernigen Neutrophilen bis hin zu Myelozyten, die sich sowohl in Zellgröße, Granularität als auch Kern-Plasma-Relation von neutrophilen Granulozyten unterscheiden und im VCS-3D-Scatterplot zu einer Verlagerung der Neutrophilen- als auch Monozyten-Scattergramme führen (Abbildung 4a, b und 5).

In der Tat zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass bei mikroskopischer Differenzierung von leukozytotischen Blutbildern der prozentuale Anteil an Stabkernigen als Gradmesser der Linksverschiebung linear mit einem Anstieg der VCS-Volumenparameter korreliert (Abbildung 17). Laut Chaves et al. (2005) findet sich diese Korrelation unabhängig von der Höhe der Leukozytenzahl in allen Untersuchungen von reaktiven Blutbildern.

Diese Ergebnisse sind ein Beleg dafür, dass Veränderungen der VCS-Parameter der Neutrophilen ein morphologisches Korrelat haben, welches letztlich den Begriff der reaktiven Linksverschiebung charakterisiert.

Beim Einsatz der VCS-Lageparameter zur Diagnostik von Infektion und Sepsis darf allerdings nicht vergessen werden, dass leukämische Blutbilder insbesondere der myeloischen Reihe (akute myeloische Leukämie (AML), chronisch myeloische Leukämie (CML)) ähnliche Veränderungen der Scattergramme zeigen. In entsprechenden Voruntersuchungen zur vorliegenden Arbeit hat sich dies bestätigt, sodass Patienten mit Sepsis und Leukämie von den vorliegenden klinischen Untersuchungen ausgeschlossen waren (Abbildung 21).

**Abbildung 21:** Vergleichende Darstellung (Boxplot mit Extremwerten) von Volumenparametern von Monozyten (Monocytes) und Neutrophilen (Neutrophils) bei gesunden Kontrollen (ctr.), Patienten mit physiologischer (Sepsis) und pathologischer (Akuter myeloischer Leukämie (AML)) Linksverschiebung.



### 5.3 Signifikanz morphometrischer VCS-Lageparameter, IL-6, CRP und Gesamtleukozytenzahl zur Differenzierung von Sepsis und organbezogener Infektion

Die Verwendung automatisierter Hämatologie-Analysenmessgeräte hat die klinische Routine der Labormedizin revolutioniert. Mit Hilfe dieser Technologie ist es möglich in einem vollautomatisierten Meßschritt eine große Anzahl von Zellen zu untersuchen und ein umfangreiches hämatologisches Profil zu ermitteln: gängige Parameter beinhalteten die Leukozytenzahl mit Differentialblutbild, Erythrozytenzahl mit Erythrozytenindices (s.o.) und Retikulozytenzahl. Des Weiteren kann die Zellvariabilität (Erythrozytenverteilungsbreite (EVB)) bestimmt werden, welche die Erythrozytenvolumina gegen die relative Häufigkeit aufträgt und so eine Aussage zum Vorliegen von mikro- oder makrozytären Anämien zulässt. Doch lassen sich nicht nur Aussagen zur zellulären Eigenschaften von Erythrozyten automatisiert ermitteln, auch Informationen zur Morphologie und Zusammensetzung der Leukozyten- oder Thrombozytenpopulation können in Abhängigkeit von der angewendeten

Technologie gewonnen werden. Im Fokus diverser Studien zur Charakterisierung von Leukozyten- und Thrombozytenpopulationen steht häufig eine ökonomische, schnellstmögliche, vollautomatisierte und mit hoher Präzision durchgeführte Differenzialdiagnostik von schweren Infektionen und Sepsis. Beispielsweise haben schon frühe Untersuchungen zur Diagnostik von neonataler late-onset Sepsis durch koagulase-negative Staphylokokken gezeigt, dass der Anstieg der Thrombozytenvolumina ein guter Prädiktor für Sepsis sein kann (O'Connor et al. 1993). In neueren Publikationen konnte positiv evaluiert werden, dass die automatisierte Quantifizierung von unreifen Granulozyten mittels Fluoreszenztechnologie eine unter anderem mit dem CRP vergleichbare Sensitivität (74 %) und Spezifität (50 %) bei der Prädiktion der Sepsis besitzt (Iddles et al. 2007, Ansari-Lari et al. 2003). Doch auch schwere Parasitämien insbesondere durch Plasmodien lassen sich automatisiert durch Analytik der Volumen-Variabilitäten von Lymphozyten und Monozyten mittels VCS-Technologie diagnostizieren (Fourcade et al.). Neben dem klassischen Procedere der Malariadiagnostik („Dicker Tropfen“, Blutausstrich) eignen sich diese Parameter als „screening tool“ und sind aufgrund klar definierter Referenzbereich und einer hohen Sensitivität (96.9 %) auch für den mikrobiologisch Unversierten einsetzbar.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Evaluierung von VCS-Volumenparametern insbesondere von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten im Hinblick auf ihren

1.) prädiktiven Wert bei der Differenzierung von Sepsis und organbezogener Infektion und dies 2.) im Vergleich zu klassischen Infektionsmarkern wie IL-6, CRP und Gesamtleukozytenzahl.

Wie bereits im Methodenteil zu den Grundlagen der VCS-Technologie ausgeführt worden ist, ermöglicht diese lasergestützte Technologie die hochsensitive Detektion von morphologischen Veränderungen der Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten. Die Charakterisierung von zirkulierenden Leukozyten über eine Volumenbestimmung, interne Zellstrukturen (Granularität) und ihre Kern-Plasma-Relation bietet die Grundlage für den Einsatz als statischer oder dynamischer Meßparameter. Bei Infektionen beispielsweise kommt es im Rahmen von Zellaktivierungen zu morphologischen Veränderungen der Immunzellen bzw. zu Veränderungen der Zusammensetzung der Zellpopulation, was sich wiederum in Veränderungen der VCS-Meßparameter niederschlägt. Wie bereits oben ausgeführt wurde, haben die Voruntersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sich ein erhöhter Anteil an unreifzelliger Neutrophilen bei Linksverschiebung in einer Zunahme der mittleren Neutrophilen-Volumina niederschlägt. Auch ist leicht nachzuvollziehen, dass sich

die Monozytenpopulation bei septischen Patienten aufgrund ihres mikroskopisch sichtbaren Volumenzuwachses und ihrer Vakuolisierung in einem verschobenen Meßquadranten nach VCS-Charakterisierung wieder findet (Abbildung 5).

Nach automatisierter Analyse von jeweils maximal 8000 Leukozyten pro Untersuchungsgang zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass insbesondere monozytäre und neutrophile Volumenparameter (MNV und MMV) bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöht waren (Abbildung 18). Insofern bestätigten die Studienergebnisse in diesem Punkt frühere Publikationen von Chaves et al. (2005), in deren Untersuchungen VCS-Lageparameter zwischen Patienten mit positiver Blutkultur und gesunde Kontrollen verglichen wurden. In der vorliegenden Studie jedoch waren nicht nur signifikante Unterschiede der Volumenparameter von Kontrollen und Patienten zu beobachten, sondern auch zwischen systemischen Infektionen und organbezogenen. Der parallel verlaufende Anstieg von MNV und MMV erschien offenkundig als Indikator für den **reaktiven Immunstatus** der septischen Patienten, da die Volumenparameter am Tag der positiven Blutkulturdiagnostik ermittelt worden waren. Dies wird auch durch die rein deskriptive Beobachtung untermauert, dass diese Marker auch bei Patienten mit organbezogener Infektion mit und ohne Bakteriämie offenkundig eine andere Verteilung zeigten (Abbildung 20). Morphologische Veränderungen der Lymphozyten während Sepsis und Infektion waren mit der VCS-Technologie ebenfalls bestimmbar, sind jedoch mit Ausnahme der Veränderung der Konduktivität in den statistischen Auswertungen nicht von Signifikanz gewesen. Diese Tatsache spiegelt möglicherweise wider, dass Lymphozyten in der unspezifischen Immunabwehr von Bakterien in der Akutphase nicht im Fokus stehen.

In der vorliegenden Studie waren neben den Lageparametern auch die klassischen Biomarker der Infektion wie IL-6, CRP und Leukozytenzahl geeignet, zwischen Gesunden und Patienten zu diskriminieren (Tabelle 8). Die Gesamtleukozytenzahl war hingegen nicht signifikant unterschiedlich zwischen systemischen und nicht-systemischen Infektionen. Dies unterstreicht die geringe Spezifität und Sensitivität dieses Entzündungsmarkers zur graduellen oder gar prognostischen Differenzierung bei Infektionen und bestätigt vorangegangene, ähnlich gelagerte Studien. In den Untersuchungen von Chan et al. (2003) beispielsweise war zwar der Anteil an Leukozytose ( $> 12000 / \text{mm}^3$ ) bzw. Leukopenie ( $< 4000$ ) bei infizierten, kritisch kranken, atraumatischen Patienten doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe, lag dort aber lediglich bei 36 %. Zu einer ähnlichen Aussage zur Wertigkeit der Gesamtleukozytenzahl gelangten Pettila et al. (2002) in Ihrer Studie zur Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu Procalcitonin und IL-6 bei der Diagnose und Prognose von systemischen Infektionen. Die

geringe Signifikanz der Leukozytengesamtzahl zur graduellen Differenzierung von Infektionen ist pathophysiologisch betrachtet über eine verkürzte Halbwertszeit von Granulozyten unter septischen Bedingungen und einer toxischen Knochenmarkssuppression erklärbar. Beide Prozesse können bei septischem Krankheitsbild parallel ablaufen und führen zu einer Gesamtleukozyten, die inner- oder unterhalb des Normbereichs liegen kann.

Wie bereits oben erwähnt, zeigten die untersuchten Entzündungsmarker IL-6 und CRP eine hohe Signifikanz bei der Differenzierung von Sepsis, nicht-systemischen Entzündungen und Gesunden (Tabelle 8). Im Vergleich zum Volumenparameter MNV der Neutrophilen (cut off > 150) war eine CRP-Konzentration > 60 mg/dL im Hinblick auf die Prädiktion einer Sepsis mit einer Sensitivität von 76 % und einer Spezifität von 63 % ebenbürtig. IL-6 hingegen wies bei einem cut off-Level von 250 pg/mL die höchste Sensitivität und Spezifität von allen getesteten Infektionsmarkern für die Vorhersage einer Sepsis auf. Diese ist offenbar noch steigerbar, wenn Spitzenwerte bei sequenzieller Bestimmung nach erstmaligem Fieberschub bewertet werden (Biffi et al. 1996, Hack et al. 1996, Munoz et al. 1991). Mit dieser Kernaussage zur Wertigkeit von CRP im Vergleich zu IL-6 bestätigten die Ergebnisse unterschiedliche vorangegangene Studien: in Untersuchungen von Pettilä et al. (2002) zur diagnostischen Sensitivität / Spezifität von Procalcitonin, IL-6, CRP, Leukozytenzahl, D-Dimer und Antithrombin III bei Sepsis und zur Mortalitätsprognose waren IL-6 und PCT allen anderen biochemischen und zellulären Markern überlegen, und vergleichbar mit dem APACHE II-Score. Zu ähnlichen Resultaten gelangten Selberg und Mitarbeiter (2000). Auch in deren Studie, die PCT, IL-6, Komplement C3a, Leukozytenelastase und CRP zur graduellen Differenzierung von schweren Infektionen untersuchten, war CRP am wenigsten geeignet. Dies wurde damit begründet, dass CRP als Syntheseparameter bei Leberfunktionsstörungen im Rahmen von systemischen Entzündungsprozessen an Sensitivität verlieren könnte (Castelli et al. 2004). In der prospektiven Studie von Gaini et al. (2006) hingegen wurden CRP und IL-6 als gleichwertige Parameter bei der Differenzierung von Sepsis und nicht-systemischer Infektion gefunden. In dieser Untersuchung war jedoch ein vergleichsweise niedriger cut off für IL-6 (> 50 pg/mL) mit entsprechend hoher Sensitivität und niedriger Spezifität gewählt worden.

Bei neonataler Sepsis hingegen scheint das CRP seine Berechtigung als überlegener und früher Infektionsmarker zu besitzen. In einer kleineren Untersuchung zur Differenzierung von SIRS und Sepsis (Pavczik-Arnol et al. 2004) waren CRP-Konzentrationen (cut off 23 mg/dL) und IL-6 (cut off 43 pg/mL) von vergleichbarer Aussagekraft.

## **6. Zusammenfassung**

Die Sepsis hat aufgrund ihrer Häufigkeit, ihrer Mortalitätsrate und ihrer Kostenintensität einen hohen sozioökonomischen Stellenwert erlangt. Ihre zeitnahe Diagnose, verbunden mit einer adäquaten antimikrobiellen Therapie, hat nicht nur eine erhebliche prognostische Bedeutung für den Patienten, sondern kann auch zu einer Verkürzung der intensivmedizinischen Betreuung und somit zu einer deutlichen Kostenreduktion führen.

Neben dem Erregernachweis, der jedoch nur etwa in der Hälfte der Fälle gelingt, stehen unterschiedliche infektionsimmunologische Biomarker zur Verfügung. Neben dem C-reaktiven Protein (CRP), der Leukozytose oder – penie, Zeichen der physiologischen Linksverschiebung haben Entzündungsmediatoren wie Interleukin-6 (IL-6) und Procalcitonin (PCT) Einzug die moderne Diagnostik gehalten. Bei diesen Biomarkern mit unterschiedlicher Spezifität für Sepsis-Erkennung ist insbesondere die Kinetik und Konzentration ein entscheidendes Kriterium für die Interpretation. Zelluläre Marker spielen bislang in der Sepsis-Diagnostik eine untergeordnete Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Lasertechnologie (VCS-Technologie, Beckman Coulter) die Bestimmung von Volumen, Granularität, Kernstruktur und Oberflächenbeschaffenheit von Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten aus peripheren Blutproben durchgeführt. Die Rationale hinter diesem Untersuchungsverfahren ist die Vorstellung, dass reaktive Veränderungen von Leukozyten, wie sie im Rahmen von bakteriellen Infektionen stattfinden, zu messbaren Veränderungen dieser sogenannten morphometrischen Parametern führen. Nachdem in Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, dass es sich um Verfahren mit hoher Präzision und guter Stabilität handelt, wurden Proben septischer Patienten mit nachgewiesener Bakteriämie charakterisiert, um Unterschiede zu Patienten mit organspezifischer Infektion und gesunden Kontrollen herauszuarbeiten.

Die Untersuchungen an 37 Patienten mit Sepsis unterschiedlicher Genese zeigten, dass insbesondere die mittleren Volumen von Neutrophilen (MNV: 139 6.6 vs. 159 16.2,  $p < 0.001$ ; ANOVA) und Monozyten (MMV: 164 5.6 vs. 181 15.2,  $p < 0.001$ ; ANOVA) signifikant verändert waren im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Nach Durchführung von ROC-Analysen unter Einbeziehung von klassischen Infektionsmarkern wie IL-6, CRP und Leukozytenzahl wurde für designierte cut-off Punkte eine Sensitivität bzw. Spezifität von 76 % und 63 % für MNV (cut off > 150) und 86 % und 40 % für MMV (cut off > 170) für die Vorhersage von Sepsis errechnet. Diese statistischen Maßzahlen waren vergleichbar mit denen für das CRP bei Konzentrationen > 60 mg/dl. Die höchste Sensitivität und Spezifität

für die Vorhersage von Sepsis wurde in der vorliegenden Untersuchung durch IL-6 Konzentrationen von  $> 250$  pg/ml erreicht.

Im Ergebnis lassen sich das MNV und MMV bei einer dem CRP ähnlich guten Sensitivität bzw. Spezifität zur Differenzierung zwischen Sepsis und gesunden Kontrollen heranziehen.

So wäre die Verwendung der mittleren Volumina von Neutrophilen und Monozyten zum Monitoring und als prädiktive Marker unter einem septischen Geschehen möglich.

## **7. Literaturverzeichnis**

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S.: Immunologie. pp. 296-301. Hans Huber Verlag 1996.
2. Abe R, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Tateishi Y, Shinozaki K, Hirasawa H: Gram-negative bacteremia induces greater magnitude of inflammatory response than Gram-positive bacteremia. *Crit. Care Med.* 14 (2). 27 (2010).
3. Al-Gwaiz LA, Babay HH: The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphologic changes of neutrophils in predicting bacterial infections. *Med. Princ. Pract.* 16 (5). 344-347 (2007).
4. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: Septic shock. *Lancet* 365. 63-78 (2005)
5. Ansari-Lari MA, Kickler TS, Borowitz MJ: Immature granulocyte measurement using the Sysmex XE2100. *Am. J. Clin. Pathol.* 120. 795-799 (2003)
6. Anonym. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* 20. 864-874 (1992)
7. Anonym. Leitlinie: Diagnose und Therapie der Sepsis im Auftrag der Deutschen-Sepsis-Gesellschaft und DIVI. AWMF-Leitlinien-Register. 079/001 (2005)
8. *Archives of Disease in Childhood* 67. 808-812 (1992)
9. Ardron M, Westengard JC, Dutcher TF: Band neutrophil counts are unnecessary for the diagnosis of infection in patients with normal total leukocyte counts. *Am. J. Clin. Pathol.* 102. 646-649 (1994)
10. Aulesia C, Pastor I, Naranjo D, Piqueras J, Galimany R: Validation of the Coulter LH 750 in a Hospital reference laboratory. *Laboratory Hematology* 9. 15-28 (2003)
11. Bentley SA, Pedgram MD, Ross DW: Diagnosis of Infective and Inflammatory Disorders by Flow Cytometric Analysis of Blood Neutrophils. *AJCP* 88. 177-182 (1987)
12. Berger C, Uehlinger J, Ghelfi D, Blau N, Fanconi S: Comparison of C-reactive protein and white blood cell count with differential in neonates at risk for septicemia. *Eur. J. Pediatr.* 154. 138-144 (1995)
13. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM: Interleukin 6 in the injured patient: marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg.* 224. 647-664 (1996)
14. Black S, Kushner I, Samols D: C - reactive protein. *J. Biol. Chem.* 279 (47). 48487-48490 (2005)
15. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101. 1644-1655 (1992)

16. Bone RC: Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann. Intern. Med.* 125. 680-687 (1996a)
17. Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med.* 24. 1125-1128 (1996b)
18. Bone RC: Toward a theory regarding the pathogenesis of the inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit. Care Med.* 24. 163-172 (1996c)
19. Bone RC: Why the sepsis trials failed. *JAMA* 276. 565-566 (1996d)
20. Bourner G, Dhaliwal J, Sumner J: Performance evaluation of the latest fully automated hematology analysers in a large, commercial laboratory setting: a 4-way, side-by-side study. *Lab. Hematol.* 11. 285-297 (2005)
21. Brunkhorst FM, Engel C, Reinhart K et al. for the German Competence Network Sepsis (SepNet): Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany – results from the German “Prevalence” Study. *Critical Care* 9 (Suppl 1). 83 (2005)
22. Canivet E, Lavaud S, Wong T: Cuprophane but not synthetic membranes induces increases in serum tumor necrosis factor alpha levels during hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 23. 41-46 (1994)
23. Castelli GP, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D, Sgarbi L: Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Critical Care* 8. 234-242 (2004)
24. Chan YL, Tseng CP, Tsay PK, Chang SS, Chiu TF, Chen JC: Procalcitonin as a marker of bacterial infection in the emergency department: an observational study. *Critical Care* 8. 12-20 (2003)
25. Chaves F, Tierno B, Xu D: Quantitative Determination of Neutrophil VCS Parameters by the Coulter Automated Hematology Analyzer. *Am. J. Clin. Pathol.* 124. 440-444 (2005)
26. Chaves F, Tierno B, Xu D: Neutrophil Volume Distribution Width – A New Automated Hematologic Parameter for Acute Infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 130. 378-380 (2006)
27. Chiesa C, Pellegrini G, Pandero A: C-reactive protein, Interleukin 6 and procalcitonin the immediate postnatal period: influence of illness severity, risk status, antenatal and perinatal complications and infections. *Clin. Chem.* 49. 60-68 (2003)
28. Cheval C, Timsit JF, Garrouste-Orgeas M, Assicot M, Jonghe BD, Misset B, Bohuon C, Carlet J: Procalcitonin is useful in predicting the bacterial origin of an acute circulatory failure in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 26. 153-158 (2000)
29. Chollet-Martin S, Stamatakis G, Bailly S, Mery P, Gougerot-Pocidal MA: Induction of tumor necrosis factor-alpha during hemodialysis. Influence of the membrane type. *Clin. Exp. Immunol.* 83. 329-332 (1991)

30. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, Gencay MM, Huber PR, Tamm M, Muller B: Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single blinded intervention trial. *Lancet* 363. 600-607 (2004)
31. Cinel I, Opal SM: Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit. Care Med.* 37 (1). 291-304 (2009)
32. Clark IA: How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18 (3-4). 335-343 (2007)
33. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420. 885-891 (2002)
34. Dellinger RP, Carlet JM, Masur M. et al.: Surviving Sepsis Campaign guidelines for the management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 32. 858-872 (2004)
35. Deutsche Bundesärztekammer: Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung von quantitativen laboratoriumsmedizinischen Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt* Vol. 98. A2747-2759, B2356-2367 (2001)
36. Fendler WM, Piotrowski AJ: Procalcitonin in the early diagnosis of nosocomial sepsis in preterm neonates. *J. Paediatr Child Health.* 44 (3). 114-118 (2008)
37. Fielding P, Hyltoft Peterson P, Horder M: The stability of blood, plasma and serum constituents during simulated transport. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 41. 35-40 (1981)
38. Fourcade C, Casbas MJC, Belaoui H, Gonzalez JJD, Garcia PJ, Pepio MAE: Automated detection of malaria by means of the haematology analyser Coulter GEN.S. *Clin Lab. Haem.* 26. 367-372 (2004)
39. Fraunberger P, Wang Y, Holler E, Parhofer K, Nagel D, Walli A, Seidel D: Prognostic value of interleukin 6, procalcitonin and C-reactive protein levels in intensive care unit patients during the first increase in fever. *Shock* 26. 10-12 (2006)
40. Gaini S, Koldkjaer OG, Pederson C, Pedersen SS: Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community acquired infections and sepsis: a prospective study. *Crit. Care* 10. 53 (2006)
41. Geppert A, Steiner A, Zorn G, Delle-Kurth G, Koreny M, Haumer M: Multiple organ failure in patients with cardiogenic shock is associated with high plasma levels of interleukin 6. *Crit. Care Med.* 30. 1987-1994 (2002)
42. Girndt T, Kohler H, Schiedheim-Weick E, Schlaak JF, zum Buschenfelde K-HM., Fleischer B: Production of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 in-vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 47. 559-565 (1995)
43. Guder WG: Preanalytical factors and their influence on analytical quality specifications. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 59. 545-550 (1999)
44. Guder W.G., Narayanan S., Wisser H., Zawta B.: Samples: from the patient to the laboratory. The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results. pp. 101. GIT Verlag, 1996.

45. Gulati GL, Hyun BH, Ashton JK: Advances of the past decade in automated hematology. *Am. J. Clin. Pathol.* 98 (Suppl. 1). 11-16 (1992)
46. Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA: Increased plasma levels of Interleukin 6 in sepsis. *Blood* 74. 1704-1710 (1996)
47. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J: Diagnostic value of Procalcitonin, interleukin-6 and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164 (3). 396-402 (2001)
48. Holmes CL, Russel JA, Walley KR: Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 124 (3). 1103-1115 (2003)
49. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of Sepsis. *N. Engl. J. Med.* 348. 138-150 (2003)
50. Hübl W, Andert S, Thum G, Ortner S, Bayer PM: Value of Neutrophil CD 16 Expression for Detection of Left Shift and Acute-Phase Response. *AJCP* 107. 187-196 (1997)
51. Iddles C, Cole R, Hill FGH: Evaluation of the immature granulocyte count in the diagnosis of Sepsis using the 2100 Sysmex analyzer. *Sysmex Journal International* 17. 20-29 (2007)
52. Imeri F, Herklotz R, Risch L, Arbetsleitner C, Zerlauth M., Risch G, Huber AR: Stability of hematology analytes depends on the hematology analyser used: a stability study with Advia 120, Beckman Coulter LH 750, and Sysmex XE 2100. *Clin. Chim. Acta* 397. 68-71 (2008)
53. Ishibashi M, Zaid D, Tsubakihara Y: Interleukin-8 in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 9 (10). 1435-1442 (1994)
54. Keller ET, Wanagat J, Ershler WB: Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci.* 1. 340-357 (1996)
55. Kimmel PL, Phillips TM, Simmens SJ, Peterson RA, Weihs KL, Alleyne S, Cruz I, Yankovski JA, Veis JH: Immunologic function and survival in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 54. 236-244 (1998)
56. Kishimoto T: IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.* 22 (5). 347-352 (2010)
57. Kohut M, Kacpersek-Hartleb T, Sojka D, Hartleb M: Serum level of TNF-alpha receptor type II better correlates with severity of Crohn's disease than other cytokines and conventional clinical activity indicators. *Pol. Merkur Lekarski.* 28 (168). 454-458 (2010)
58. Krause JR: Automated differentials in the hematology laboratory. *Am. J. Clin. Pathol.* 93 (4 suppl. 1). 11-16 (1990)

59. Larsen MV, Janner JH, Nielsen SD, Friis.Moller A, Ringbaek T, Lange P: Bacteriology in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease in patients admitted to hospital. *Scand. J. Infect. Dis.* 41 (1). 26-32 (2009)
60. Leifsson PS, Iburg T, Jensen HE, Agerholm JS, Kjelgaard-Hansen M, Wiinberg B, Heegaard PM, Astrup LB, Olsson AE, Skov MG, Aalbaek B, Nielsen OL: Intravenous inoculation of *Staphylococcus aureus* in pigs induces severe sepsis as indicated by increased hypercoagulability and hepatic dysfunction. *FEMS Microbiol Lett.* 309 (2). 208-216 (2010)
61. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK: Bacteremia associated with tooth brushing and dental extraction. *Circulation* 117. 3118-3125 (2008)
62. Lonnemann G, van der Meer JW, Cannon JG, Dinarello CA, Koch KM., Granocleras C, Deschodt G, Shaldon S: Induction of tumor necrosis factor during extracorporeal blood purification. *N. Engl. J. Med.* 317. 963 (1987)
63. Lowenberg B, Downing J., Burnett A: Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 341 (19). 1484 (1999)
64. Mardi D, Heidtmann H, Ambrosch A: New indicators for bacterial infections: neutrophil and thrombocyte volume in patients with bacteremia and sepsis in comparison to non-systemic infections. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44. A129-A130 (2006)
65. Maruna P, Kunstyr J, Plocova KM, Mlejnsky F, Hubacek J, Klein AA, Lindner J: Predictors of infection after pulmonary endarterectomy for chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* Epub ahead of print, Jul. 6 (2010)
66. Marx G: Fluid therapy in sepsis with capillary leakage. *Eur. J. Anaesthesiol.* 20 (6). 429-442 (2003)
67. Mathy KA, Koepke JA: The clinical usefulness of segmented vs. stab neutrophil criteria for differential leukocyte counts. *Am. J. Clin. Pathol.* 61. 947-958 (1974)
68. Mimos O, Benoist JF, Edouard AR, Assicot M, Bohoun C, Samii K: Procalcitonin and C-reactive protein during early posttraumatic systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.* 24. 185-188 (1998)
69. Mroczko B, Groblewska M, Gryko M, Kedra B, Szmitkowski M: Diagnostic usefulness of serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in the differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *J. Clin. Lab. Anal.* 24 (4). 256-261 (2010)
70. Munoz C, Misset B, Fitting C, Bleriot JP, Carlet J, Cavaillon JM: Dissociation between plasma and monocyte-associated cytokines during sepsis. *Eur. J. Immunol.* 21. 2177-2184 (1991)
71. Nakagomi A, Seino Y, Endoh Y, Kusama Y, Atarashi H, Mizuno K: Pregulation of monocyte proinflammatory cytokine production by C-reactive protein is significantly related to ongoing myocardial damage and future cardiac events in patients with chronic heart failure. *J Card Fail.* 16 (7). 562-571 (2010)

72. Nakanishi I, Moutabarrik A, Okada N, Kitamura E, Hayashi A, Syouji T, Namiki M, Ishibashi M, Zaid D, Tsubakihara Y: Interleukin-8 in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 9 (10). 1435-1442 (1994)
73. Narayanan S: The preanalytical phase: An important component of laboratory medicine. *Am. J. Clin. Pathol.* 113. 429-452 (2000)
74. O'Connor TA, Ringer KM, Gaddis ML: Mean platelet volume during coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates. *Am. J. Clin. Pathol.* 99. 69-71 (1993)
75. Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S, Stonanae E, Vogelsang H, Junker U, Jaeger L, Reinhart K: Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis related cytokines in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* 134. 49-55 (1999)
76. Oberhoffer M, Vogelsang H, Russwurm S, Hartung T, Reinhart K: Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37. 363-368 (1999)
77. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K, Nakamura M: Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS/sepsis). *Cytokine* 29. 169-175 (2005)
78. Olsen I: Update to bacteremia related to dental procedures. *Transf. Apher. Sci.* 39 (2). 173-178 (2008)
79. Patrick CH, Lazarchick J: The effect of bacteremia on automated platelet measurements in neonates. *Am. J. Clin. Pathol.* 93. 391-394 (1990)
80. Pettilä V, Hynninen M, Takkunen O, Kuusela P, Valtonen M: Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Intensive Care Med.* 28. 1220-1225 (2002)
81. Pavcik-Arnol M, Hojker S, Derganc M: Lipopolysaccharide-binding protein in critically ill neonates and children with suspected infections: comparison with procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein. *Intensive Care Med.* 30. 1454-1460 (2004)
82. Resch B, Gusenleitner W, Müller WD: Procalcitonin and IL-6 in the diagnosis of early onset of the neonates. *Acta Paediatr.* 92. 243-245 (2003)
83. Procop GW, Hartman JS, Sedor F: Laboratory tests in evaluation of acute febrile illness in pediatric emergency room patients. *Am. J. Pathol.* 107. 114-121 (1997)
84. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S, Kern W, Kreyman G, Krüger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stüber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T; German Sepsis Society; German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine: Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *Ger. Med. Sci.* 8. Doc. 14 (2010)

85. Rea-Neto A, Youssef NC, Tuche F, Brunkhorst F, Ranieri VM, Reinhart K, Sakr Y: Diagnosis of ventilator associated pneumonia: a systemic review of the literature. *Crit. Care*, 12 (2). 56 (2008)
86. Richardson-Jones A: An automated hematology instrument for comprehensive WBV, RBC and platelet analysis. *Am. Clin. Lab.* 9. 18-22 (1990)
87. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Eng. J. Med.* 340. 115-126 (1999)
88. Rossing RG, Foster DM: The stability of clinical chemistry specimens during refrigerated storage of 2 hours. *Am. J. Clin. Pathol.* 73. 91-95 (1980)
89. Rubinstein E: Staphylococcus aureus bacteremia with known sources. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32 (1). 18-20 (2008)
90. Russel GA, Smyth A, Cooke RW: Receiver operating characteristic curves for comparison of serial neutrophil band forms and C reactive protein in neonates at risk of infection. *Arch. Dis. Child* 67 (7). 808-12 (1992)
91. Schluter B, Erren M, Schotte H, Junker R, Rust S, Assmann G: The mutagenically separated polymerase chain reaction is a rapid and reliable method for genotyping of the tumour necrosis factor-alpha promoter polymorphism (-308 G/A). *Clin. Chim. Acta.* 320 (1-2). 135-8 (2002)
92. Schuster HP: AT III in septicemia with DIC. *Intensive Care Med.* 19. 16-18 (1993)
93. Seebach J, Morant R, Rüegg R, Seifert B, Fehr J: The Diagnostic Value of the Neutrophil Left Shift in Predicting Inflammatory and Infectious Disease. *AJCP* 107 (5). 582-591 (1997)
94. Sierra R, Rello J, Bailen MA, Benitez E, Gordillo A, Leon C, Pedraza S: C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.* 30. 2038-2045 (2004)
95. Slavin S, Goldwyn RM: Is there postdefecation bacteremia? *Arch. Surg.* 114. 937-938 (1997)
96. Steel DM, Whitehead AS: The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today.* 15 (2). 81-88 (1994)
97. Suprin E, Camus C, Gacouin A, Le TY, Lavoue S, Feuillu A, Thomas R: Procalcitonin: a valuable indicator for infection in a medical ICU. *Intensive Care Med.* 26. 1232-1238 (2000)
98. Svoboda P, Kantorová I, Scheer P, Radvanova J, Radvan M.: Can procalcitonin help us in timing of re-intervention in septic patients after multiple trauma or major surgery? *Hepatology*. 54 (74). 359-363 (2007)
99. Tschakowsky K, Hedwig-Geissing M, Braun GG, Radespiel-Troeger M: Predictive value of procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein for survival in postoperative patients with severe sepsis. *J. Crit. Care.* Epub ahead of print. Jun. 18 (2010)
100. Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J: Septic shock; current

- pathogenic concepts from a clinical perspective. *Med. Sci. Mon.* 11 (3). 76-85 (2005)
101. Uematsu S, Akira S: Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb. Exp. Pharmacol.* 183. 1-20 (2008)
  102. Valles J, Rello J, Ochagavia A, Garnacho J, Alcala M: Community-Acquired Bloodstream Infection in Critically Ill Adult Patients. *Chest* 123. 1615-1624 (2003)
  103. Wenz B, Gennis P, Gaehler S: The clinical utility of the leukocyte differential in emergency medicine. *Am. J. Pathol.* 86. 298-303 (1986)
  104. Wile MJ, Homer LD, Gaehler S, Phillips S, Millan J: Manual differential cell counts help predict bacterial infection: a multivariate analysis. *Am. J. Clin. Pathol.* 115. 644-649 (2001)
  105. Williams N, Bertoncello I, Jackson H, Arnold J, Kavnoudias H: The role of interleukin 6 in megakaryocyte formation, megakaryocyte development and platelet production. *Ciba Found Symp.* 167. 160-170 (1992)
  106. Zanutti-Cavazzoni SL, Guglielmi M, Parrillo JE, Walker T, Dellinger RP, Hollenberg SM: Ventricular Dilation is Associated with Improved Cardiovascular Performance and Survival in Sepsis. *Chest*, Epub ahead of print. Jul. 22 (2010)

## Anhang

### A.1 Abbildungsverzeichnis

#### Seite

**Abbildung 1:** Vereinfachte Darstellung der natürlichen Immunantwort auf 12 Infektion und Gewebeschädigung unter Einbeziehung von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren und der Gerinnungskaskade. Das Vorhandensein von mikrobiellen Antigenen (exogenes LPS, Lipoteichonsäure, Peptidoglykanen, Zymosan von Gram negativen, Gram positiven Bakterien bzw. Pilzen) in der Blutzirkulation führt via zellgebundener TLR4 / CD14-Komplexierung zu einer Aktivierung von Makrophagen. Alternativ kann eine Gewebeschädigung mit Expression und / oder Freisetzung von tissue factor (TF) Liganden-vermittelt (PAMPS) ähnliche Effekte erzeugen. Aktivierte Makrophagen wiederum sezernieren ad hoc oder nach de novo Synthese unterschiedliche pro- (IL-1, IL-6, TNF) und antiinflammatorische (IL-10) Mediatoren, die Gefäßendothel (ICAM-Expression) und zirkulierende neutrophile Granulozyten (Adhäsion, NO-Freisetzung) aktivieren. Über Oberflächenaktivierung (Expression von TF auf unterschiedlichen immunkompetenten Zellen) wird konsekutiv die Fibrinbildung und Vernetzung mit clot-Bildung initiiert (Holmes et al. 2003).

**Abbildung 2:** Die Abbildung zeigt den Hämatologieanalyser LH750 der 26 Firma Beckman Coulter mit angeschlossener automatisierter Ausstreich- und Färbeeinheit.

- Abbildung 3:** *Prinzip der Bestimmung von Volumen, Konduktivität und 27 Streulicht mittels VCS-Technologie: **Volumen:** diese Energie nutzt die Impedanzmethode für die Messung des Zellvolumens; **Konduktivität:** Informationen zu Zellgröße und internen Zellstrukturen einschließlich Kernvolumen; **Streulicht:** Messung von zellulärer Granularität, Kernstruktur und Oberfläche.*
- Abbildung 4a:** *Der folgende 3D-Scatterplot zeigt eine unauffällige Verteilung 28 von Monozyten (grün), Neutrophilen (lila) und Lymphozyten (blau).*
- Abbildung 4b:** *Position und farbliche Kodierung der Zellen im Scattergramm. 28*
- Abbildung 5:** *Exemplarische Veränderung der Scattergramme für 29 Monozyten, Neutrophilen und Monozyten bei einem Patienten mit Sepsis im Vergleich zu einer Kontrolle.*
- Abbildung 6:** *Schematische Darstellung zum Anfertigen von Blutausstrichen. 31*
- Abbildung 7:** *Mikroskopisches Bild eines neutrophilen Granulozyten (links) 32 mit mehrfach segmentiertem Kern und eines Stabkernigen (rechts)*
- Abbildung 8 -** *Veränderung der **Volumina, Konduktivität und Scatter** bei 39 - 40*  
**10:** ***Neutrophilen** in Abhängigkeit von der Probenalterung im 1.5 h-Abstand maximal 6 h nach Probenentnahme. Dargestellt sind die intraindividuellen Mittelwerte mit Standardabweichung aus jeweils 6 Proben aus der Kategorie Leukozytopenie / Normopenie / Leukozytose. Die mit \* gekennzeichneten Balken zeigen Mittelwerte mit signifikanter Abweichung ( $p < 0.05$ ) vom 0 h-Wert an (ANOVA mit post-hoc Analyse).*

**Abbildung 11-** *Veränderung der Volumina, Konduktivität und Scatter bei 41 - 42*

**13:** ***Monozyten** in Abhängigkeit von der Probenalterung im 1.5 h-Abstand maximal 6 h nach Probenentnahme. Dargestellt sind die intraindividuellen Mittelwerte mit Standardabweichung aus jeweils 6 Proben aus der Kategorie Leukozytopenie / Normopenie / Leukozytose. Die mit \* gekennzeichneten Balken zeigen Mittelwerte mit signifikanter Abweichung ( $p < 0.05$ ) vom 0 h-Wert an (ANOVA mit post-hoc Analyse).*

**Abbildung 14-** *Einfluss der Probenalterung über 6 h auf die 43 - 44*

**16:** *Volumenmessungen, Konduktivität und Scatter bei Lymphozyten. Dargestellt sind die intraindividuellen Mittelwerte aus jeweils 6 Proben aus der Kategorie Leukozytopenie / Normopenie / Leukozytose. Die mit \* gekennzeichneten Balken zeigen Mittelwerte mit signifikanter Abweichung ( $p < 0.05$ ) vom 0 h-Wert an (ANOVA mit post-hoc Analyse).*

**Abbildung 17:** *Korrelation (95%-Konfidenzintervalle) zwischen 46 Volumenmesswerten der Neutrophilen (VCS-Technologie) und mikroskopisch differenziertem Anteil stabkerniger Granulozyten aus leukozytischen Proben (Gesamtleukozyten zwischen  $10$  und  $20 \cdot 10^3 / \mu\text{l}$ ) ( $n = 23$ ).*

**Abbildung 18:** *Intraindividuelle Plasmakonzentrationen (Mittelwert und 49 Standardabweichung) des C-reaktiven Proteins und (a) Interleukin-6 (b) von Patienten mit Sepsis, nichtsystemischen Infektionen und gesunden Kontrollen (Signifikanzen zwischen den Gruppen wurden mittels ANOVA und post-hoc-Analyse ermittelt).*

**Abbildung 19:** Scattergramme von MMV (a) und MNV (b) von Patienten mit Sepsis, nichtsystemischen Infektionen und gesunden Kontrollen mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung. Darüber hinaus sind diejenigen Patienten mit organspezifischen Infektionen gekennzeichnet (schwarze Punkte), die positive Blutkulturen hatten (n=11). Die Signifikanzen zwischen den Gruppen sind angegeben und wurden mittels ANOVA und post-hoc-Analyse ermittelt.

**Abbildung 20:** ROC-Analysen (mit AUCs) zum Vergleich von Infektionsmarkern (Monozytenvolumen-Mittelwert (MMV), Neutrophilenvolumen-Mittelwert (MNV), IL-6, C-reaktives Protein (CRP), Leukozytenzahl (WBC), um einen Unterschied zwischen Patienten mit Sepsis und nichtsystemischen Infektionen darzustellen.

**Abbildung 21:** Vergleichende Darstellung (Boxplot mit Extremwerten) von Volumenparametern von Monozyten (Monocytes) und Neutrophilen (Neutrophils) bei gesunden Kontrollen (ctr.), Patienten mit physiologischer (Sepsis) und pathologischer (Akuter myeloischer Leukämie (AML)) Linksverschiebung.

## A.2 Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b><u>Tabelle 1:</u></b> <i>ACCP-Kriterien der Sepsis</i>	25
<b><u>Tabelle 2:</u></b> <i>Präzision in Serie der VCS-Parameter (Volumen (A), 34 Konduktivität (B) und Scatter (C)) der <b>Neutrophilenpopulation</b> gemessen in je drei Proben der Kategorie 1.) Gesamtleukozyten <math>&lt; 3.0 * 10^3/\mu\text{l}</math> (Leukopenie), 2.) Gesamtleukozyten <math>4.0 - 8.0 * 10^3/\mu\text{l}</math> (Normopenie) und 3.) Gesamtleukozyten <math>&gt; 10.0 * 10^3/\mu\text{l}</math> (Leukozytose).</i>	34
<b><u>Tabelle 3:</u></b> <i>Präzision in Serie der VCS-Parameter (Volumen (A), 36 Konduktivität (B) und Scatter (C)) der <b>Monozytenpopulation</b> gemessen in je drei Proben der Kategorie 1.) Gesamtleukozyten <math>&lt; 3.0 * 10^3/\mu\text{l}</math> (Leukopenie), 2.) Gesamtleukozyten <math>4.0 - 8.0 * 10^3/\mu\text{l}</math> (Normopenie) und 3.) Gesamtleukozyten <math>&gt; 10.0 * 10^3/\mu\text{l}</math> (Leukozytose).</i>	36
<b><u>Tabelle 4:</u></b> <i>Präzision in Serie der VCS-Parameter (Volumen (A), 37 Konduktivität (B) und Scatter (C)) der <b>Lymphozytenpopulation</b> gemessen in je drei Proben der Kategorie 1.) Gesamtleukozyten <math>&lt; 3.0 * 10^3/\mu\text{l}</math> (Leukopenie), 2.) Gesamtleukozyten <math>4.0 - 8.0 * 10^3/\mu\text{l}</math> (Normopenie) und 3.) Gesamtleukozyten <math>&gt; 10.0 * 10^3/\mu\text{l}</math> (Leukozytose).</i>	37
<b><u>Tabelle 5:</u></b> <i>Effekt (%) der Probenalterung auf die Lageparameter 40 Volumen, Konduktivität und Scatter bei <b>neutrophilen Granulozyten</b> aus leukopenen (Leukopenie), leukozytotischen (Leukozytose) und normopenen (normale Leukozytenzahl) Proben. Dargestellt sind jeweils die mittleren prozentualen Veränderungen gegenüber den Basalwerten. Ein negativer</i>	40

*Wert bedeutet ein prozentualer Abfall der Messwerte, ein positiver ein prozentualer Anstieg.*

**Tabelle 6:** *Auswertung der Effekte (%) der Probenalterung auf die 42  
Lageparameter Volumen, Konduktivität und Scatter bei  
**Monozyten** aus den unter Material / Methode 3.1.2.2  
definierten Proben. In der tabellarischen Übersicht sind die  
mittleren prozentualen Veränderungen gegenüber dem  
Basalwert 0 h angegeben. Ein negativer Wert bedeutet ein  
prozentualer Abfall der Messwerte, ein positiver ein  
prozentualer Anstieg.*

**Tabelle 7:** *In Analogie zu Tabelle 5 und 6 sind hier die Effekte (%) der 44  
Probenalterung auf die Lageparameter Volumen,  
Konduktivität und Scatter bei **Lymphozyten** zusammengefasst.  
Dargestellt sind jeweils die prozentualen Veränderungen im  
Verlauf im Vergleich zur 0 h-Messwerten. Ein negativer Wert  
bedeutet ein prozentualer Abfall der Messwerte, ein positiver  
ein prozentualer Anstieg.*

**Tabelle 8:** *Demographische Daten und Entzündungsparameter der 48  
Studienpopulationen*

**Tabelle 9:** *Sensitivität und Spezifität von Infektionsmarkern für die 55  
Prädiktion von Sepsis in Abhängigkeit von definierten cut off-  
Wertelagen.*

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Allen danken, die mir die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. med. H.-H. Heidtmann danke ich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Herrn PD Dr. med. A. Ambrosch danke ich für die anspruchsvolle und interessante Promotions-Thematik, seine stete Hilfsbereitschaft, Anregungen und insbesondere für seine Wartebereitschaft. Des Weiteren für die stets freundliche Atmosphäre in seinem Team.

Für fruchtbare Gespräche und Anregungen danke ich PD Dr. med. M. Koksich und Dr. med. R. Simon.

Dr. med. T. Brin für die Motivation und gut verständliche Fachartikel.

Allen Mitarbeitern des St. Joseph-Hospitals möchte ich hier nicht versäumen, für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre zu danken.

Außerdem bedanke ich mich bei Sven Breidenbach für geduldiges Korrekturlesen dieser Arbeit.

Abschließend gilt mein größtes und herzlichstes Dankeschön meinen Eltern, Ellen, Alexandra, Daria, Kay-Oliver und meinen engsten Freunden. Ohne ihre Unterstützung, ihr Verständnis, ihre Geduld und ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten wäre mir dieser Lebensweg nicht möglich gewesen.

## **Erklärung nach Promotionsordnung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Automatisierte Bestimmung von Volumen, Granularität, Kernstruktur und Oberflächenbeschaffenheit von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten: Präzision, Stabilität und Wertigkeit beim Einsatz als Infektions- und Sepsismarker.

im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch PD Dr. med. A. Ambrosch ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 23.08.2010.

gez. Mardi

## Darstellung des Bildungsweges

### SCHULISCHER WERDEGANG

---

<i>1983-1984</i>	Marien-Grundschule, Duisburg, Deutschland
<i>1984-1988</i>	Gummarus-Grundschule, Steenbergen, Niederlande
<i>1988-1995</i>	Privatgymnasium Don Bosco, Essen, Deutschland
<i>1996</i>	Abitur (Leistungsfächer: Englisch, Mathematik, Deutsch and Religion)

### MEDIZINISCHER WERDEGANG

---

<i>1996</i>	Ruhr-Universität Bochum Beginn des Studiums der Humanmedizin
<i>1999</i>	Physikum
<i>2000</i>	Erstes Staatsexamen
<i>2002</i>	Zweites Staatsexamen
<i>10/2002</i>	Praktisches Jahr
<i>10/02-02/03</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evangelisches Krankenhaus Herne, Deutschland Abteilung der Allgemein-, Visceral- und Unfallchirurgie Chefarzt Prof. Dr. med. M. Kemen 1. Tertial</li> </ul>
<i>02/03-05/03</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evangelisches Krankenhaus Herne, Deutschland Anästhesie and Intensivmedizin Chefarzt Dr. med. E. von Scheven 2. Tertial</li> </ul>
<i>06/03-09/03</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evangelisches Krankenhaus Herne, Deutschland Innere Medizin (Kardiologie, Gastroenterologie, Onkologie, Pulmonologie und Endokrinologie/Diabetologie) Chefarzt Prof. Dr. med. F. Jockenhövel 3. Tertial</li> </ul>
<i>11/2003</i>	Drittes Staatsexamen
<i>03/04-07/10</i>	Assistenzarzt in der Weiterbildung für Innere Medizin, Hämato-Onkologie, St. Joseph Hospital, Prof. Dr. med. H.H. Heidtmann (zusätzliche Erfahrung in Palliativmedizin, Intensivmedizin, Gastroenterologie)
<i>seit 07/10</i>	Facharzt für Innere Medizin
<i>seit 05/09</i>	Assistentensprecher der Inneren Abteilung

Nebentätigkeiten

---

2005-2006 Zeitweise Vertretung des Hafenarztes der Stadt Bremerhaven

Famulaturen

---

- 03/2002 Marienhospital Herne, Abteilung der Kardiologie,  
Prof. Dr. med. H.J. Trappe, Hoelkeskampring 40, 44625 Herne
- 08/2001 Elisabeth Krankenhaus Essen, Abteilung der Kardiologie,  
Prof. Dr. med. G.V. Sabin, Moltkestr. 61., 45138 Essen
- 07/2001 St. Josef Hospital, Abteilung der Gefäßchirurgie,  
Prof. Dr. med. A. Mumme, Gudrunstr. 56, 44791 Bochum
- 04/2001 Praxis Dr. med. C. Naumann d'Alnoncourt, Kardiologie, Steeler Str. 238,  
45138 Essen
- 03/2001 Praxis Dr. med. S. Klein, Neurochirurgie, Martin-Luther-Str. 122, 45147 Essen
- 07/2000 St. Josef Hospital, Abteilung der Dermatologie und Allergologie,  
Prof. Dr. med. P. Altmeyer, Gudrunstr. 56, 44791 Bochum
- 08/1999 Harbor-UCLA Medical Center, Abteilung der Gastroenterologie,  
Prof. Dr. med. V.E. Eysselein, 1000 West Carson Street, N-21 Torrance,  
CA 90509, U.S.A.

WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN

---

05/2001- 10/2002

Marienhospital Herne, Prof. Dr. med. H.J. Trappe,  
Prof. Dr. med. B. Brandts,  
Institut für Experimentelle Kardiologie  
Elektrophysiologische Untersuchungen

seit 09/2004

St. Joseph Hospital Bremerhaven, PD Dr. med. A. Ambrosch,  
Arbeit zur Dissertation an der  
Otto von Guericke Universität Magdeburg,  
Institut für medizinische Mikrobiologie

Publikationen:

New indicators for bacterial infections: neutrophil and thrombocyte volume in patients with bacteremia and sepsis in comparison to non-systemic infections.

Mardi D, Heidtmann H, Ambrosch A.

Clin. Chem. Lab. Med. 2006; 44: A129-A130.

Mean cell volume of neutrophils and monocytes compared with C-reactive protein, interleukin-6 and white blood cell count for prediction of sepsis and nonsystemic bacterial infections.

Mardi D, Fwity B, Lobmann R, Ambrosch A.

Int. J. Lab. Hematol. 32 (4). 410-418 (2010).