

XN Fallbeispiel: Akutes Atemnotsyndrom – eine schwere COVID-19 Komplikation

1 Klinische Informationen und Laborergebnisse [CBC/DIFF]

Ein 56-jähriger männlicher Patient wurde aufgrund schwerer klinischer Symptome (u. a. Fieber, Dyspnoe, Husten) im Zusammenhang mit einer SARS-CoV-2-Infektion ins Krankenhaus eingeliefert. In diesem Fall beschreiben wir den Krankheitsverlauf und wie sich die hämatologischen Parameter (CBC/DIFF) des Patienten im Laufe der Zeit änderten. Der Patient entwickelte rasch ein akutes Atemnotsyndrom (ARDS) – eine schwere klinische Komplikation und ein lebensbedrohlicher Zustand bei kritisch Erkrankten mit Atemwegsinfektionen.

Aufnahme ins Krankenhaus:

- CBC-Ergebnisse waren eher unauffällig
- Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit waren sogar leicht über dem Referenzbereich
- Unauffälliges Differenzialblutbild, abgesehen von wenigen Lymphozyten mit erhöhtem Fluoreszenzsignal (erhöhter Gehalt an RNA/DNA)

Krankenhaus Tag 1:

- Leukozytose mit Neutrophilie:
WBC $14,65 \times 10^3/\mu\text{L}$
- Neutrophile: keine Aktivierung:
NEUT-RI 42,6 FL
NEUT-GI 153,6 SI, innerhalb des Referenzintervalls [1]

Krankenhaus Tag 4:

- WBC-Zahl steigt auf $17,89 \times 10^3/\mu\text{L}$
- 5,1% IG lösen den "IG Present" Flag aus

Krankenhaus Tag 11:

- Leukozyten steigen auf über $20 \times 10^3/\mu\text{L}$

Krankenhaus Tag 17:

- Leukozytose: $> 30 \times 10^3/\mu\text{L}$
- Während der drei Wochen fielen Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit kontinuierlich ab; die Thrombozyten fielen ebenfalls ab, blieben aber innerhalb des Referenzbereichs

Krankenhaus Tag 24:

- NRBC steigen: 280 Zellen/ μL (0,7%)
- Anstieg der Neutrophilen-Aktivität (NEUT-RI)

Krankenhaus Tag 26:

- Thrombozyten fallen erstmals $< 100 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Nadir an Tag 33 mit $31 \times 10^3/\mu\text{L}$)

Krankenhaus Tag 31-33

- NRBC steigen von 11% auf 116,5%
- PLT sinken auf $31 \times 10^3/\mu\text{L}$

Thrombozyten

Bei Aufnahme hatte der Patient einen Thrombozytenwert im oberen Normalbereich. ($> 400 \times 10^3/\mu\text{L}$). Der Wert sank jedoch im Laufe der Zeit und erreichte erstmals an Tag 26 einen Wert $< 100 \times 10^3/\mu\text{L}$. Der Nadir wurde an Tag 33 mit einem Wert von $31 \times 10^3/\mu\text{L}$ gemessen.

In einer Meta-Analyse von Lippi *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Thrombozyten-Zahl ein simpler, wirtschaftlicher und schnell verfügbarer Laborparameter ist und dass eine Thrombozytopenie bei einer COVID-19-Infektion statistisch signifikant mit der Schwere der Erkrankung korreliert ist. Darüber hinaus war die Thrombozytopenie mit einem 3-fach erhöhten Risiko für einen klinisch schweren COVID-19-Verlauf bei erhöhter Mortalität verbunden [2].

Leukozyten

Schon bei Krankenhausaufnahme waren Lymphozyten mit sehr hohem Fluoreszenzsignal (AS-LYMP $> 0\%$; AS-LYMP = Antikörper-sezernierende Lymphozyten) zu finden. Diese Antikörper-sezernierenden Lymphozyten gehören zu den B-Zellen aus dem marginalen Pool und stellen Plasmazellen dar, die Immunglobuline synthetisieren. AS-LYMP werden im Blut bei schweren systemischen Infektionen nachweisbar und erlauben folglich Rückschlüsse auf die Aktivierung des erworbenen (humoralen) Immunsystems (\Rightarrow Produktion von Antikörpern) als Reaktion auf Pathogene. Aus wissenschaftlichen Publikationen ist bekannt, dass trotz häufig auftretender Lymphopenie bei COVID-19-Erkrankten bestimmte Lymphozytenpopulationen im Rahmen der SARS-CoV-2-Infektion dennoch ansteigen können. Martens *et al.* gelang beispielsweise der Nachweis, dass reaktive Lymphozyten (reaktive Lymphozyten: RE-LYMP, AS-LYMP bzw. hochfluoreszierende Lymphozyten) im Blut von COVID-19-Erkrankten im Vergleich zu Blut-gesunden Kontrollpatienten und -patientinnen erhöht waren [3].

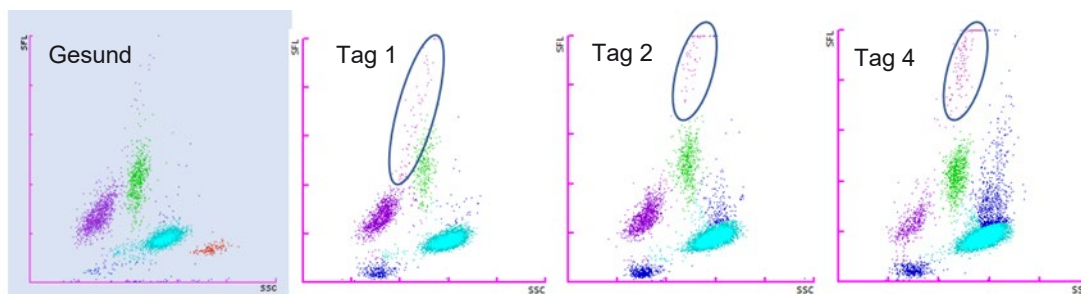


Abb. 1 WDF-Scattergramm: Vorhandensein von Lymphozyten mit erhöhter Fluoreszenzsignal-Intensität (RE-Lymp/AS-Lymp/bzw. HFLC). Die Kombination der Parameter RE-LYMP und AS-LYMP liefern zusätzliche Informationen über die zelluläre Aktivierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort.

Auch die Monozytenpopulation (grün) zeigte im o. a. Kollektiv erhöhte Seitwärtsfluoreszenzsignale, was durch einen „Aufwärtstrend“ der grünen Zellpopulation im WDF-Scattergramm sichtbar wird und explizit auf den ‚aktivierten Zustand‘ der Monozyten hinweist [3].

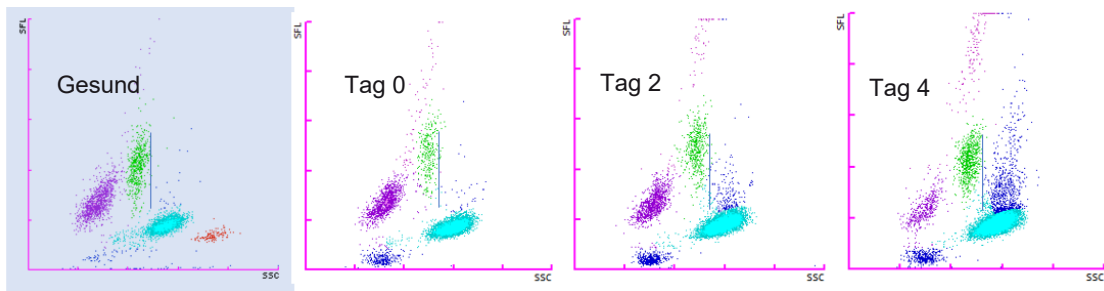


Abb. 2 WDF-Scattergramm: Aufwärtstrend der Monozytenpopulation im Vergleich zu einer gesunden Person.

Die Studien [4,5] beschreiben leukoerythroblastische Reaktionen im peripheren Blut von COVID-19-Erkrankten. Diese traten im beschriebenen Fall erst nach ca. zweiwöchigem Krankenhausaufenthalt ein und nahmen im Verlauf deutlich zu. Neben nukleierten roten Blutzellen (NRBC) stiegen unreife Granulozyten an. Der Blutausstrich zeigte eine Linksverschiebung bis zum Promyelozyten. Neutrophilie war ab Tag 2 des Krankenhausaufenthaltes ersichtlich. Eine Neutrophilenaktivierung (NEUT-RI) wurde erst am 24. Tag nach Krankenhausaufnahme gemessen. Typischerweise kommt es bei Infektionen (Phagozytosefähigkeit der Neutrophilen) zu aktivierten Neutrophilen. In der bisherigen Literatur zeigen sich vor allem bei bakteriellen Infektionen eine erhöhte Neutrophilenaktivierung. Diese ist jedoch auch bei viralen oder fungalen Infektionen beschrieben worden. Ebenso konnte im vorliegenden Fall einer COVID-19-Infektion eine Neutrophilenaktivierung gemessen werden. Der Anstieg des NEUT-RI-Wertes dieses Patienten von 42 FI auf maximal 53,8 FI ab Tag 24 deutet auf einen ‚Zytokinsturm‘ (CRS: cytokine release syndrome) und verdeutlicht das hyperinflammatorische Geschehen. Es wird angenommen, dass NEUT-RI-Werte > 60 FI während einer COVID-19 Infektion auf Neutrophilen-Mikrophagen hinweisen, so dass eine bakterielle Co-Infektion vermutet werden kann.

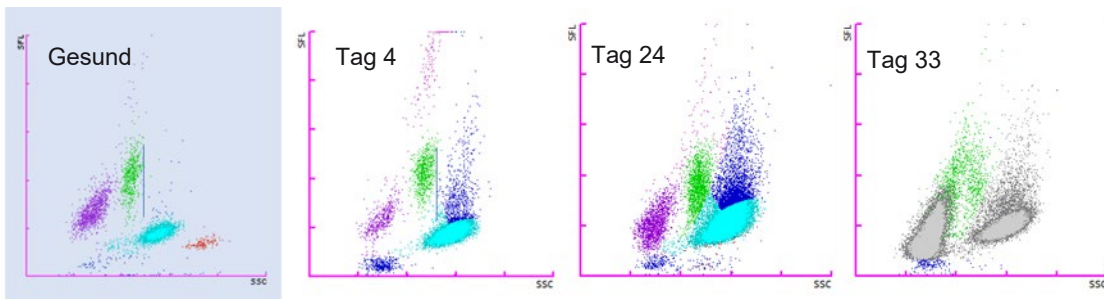


Abb. 3 WDF Scattergramm: die Neutrophilenreaktivität (NEUT-RI) war an Tag 24 stark erhöht und könnte den Zytokinsturm spiegeln. An Tag 33 war aufgrund der sehr hohen NRBC-Zahl keine automatisierte Differenzierung möglich.

NRBC

Nukleierte rote Blutzellen traten ab 24. Tag auf und blieben 6 weitere Tage zwischen 1-2 Prozent. Im weiteren Verlauf stiegen sie stark an und spiegelten den dramatischen Krankheitsverlauf wider:

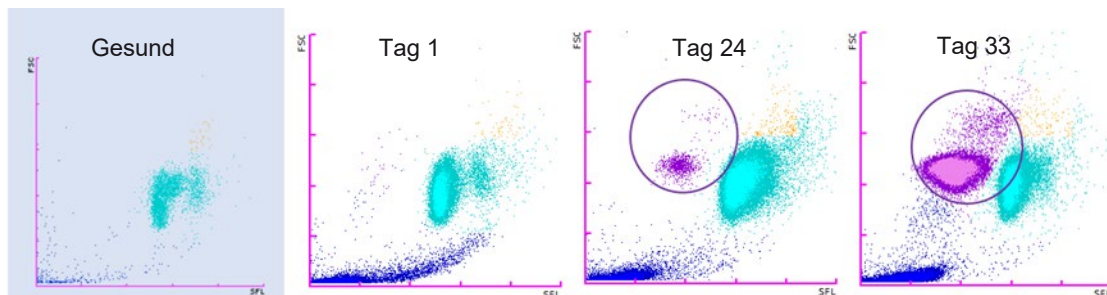


Abb 4 WNR-Scattergramm: NRBC waren ab Tag 24 auffällig und zeigten an Tag 33 ihren Höhepunkt mit 116,5%

NRBC kommen im peripheren Blut gesunder Erwachsener nicht vor. Sie können jedoch bei starken hämopoetischen Stresssituationen aus dem Knochenmark freigesetzt werden, z. B. im Sinne einer extra-medullären Blutbildung (z. B. bei Sepsis/systemischen bakteriellen Entzündungen, Polytraumen, sonstigen schweren entzündlichen oder malignen Erkrankungen etc.). Wenn NRBC im Blut kritisch Erkrankter vorhanden sind, ist dies mit einer erhöhten Mortalität verbunden. Ab einem Cut-off-Wert von 0,5/nL NRBCs im peripheren Blut steigt die Mortalität auf bis zu 85% an (Stachon et al.).

Interessanterweise zeigten NRBC-positive Personen während der Intensivbehandlung signifikant niedrigere Mengen an arteriellem Sauerstoffpartialdruck als NRBC-negative Personen. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein niedrigerer arterieller Sauerstoffpartialdruck ein Indikator für das zukünftige Vorhandensein von NRBC im peripheren Blut sein kann. Darüber hinaus zeigen Befunde von kritisch kranken ARDS-Patienten und -Patientinnen, dass NRBC auch ein prädiktiver Biomarker im Hinblick auf die ARDS-Mortalität sind.

Trotz intensiver Behandlungsbemühungen verschlechterte sich der Zustand des o. g. Patienten zunehmend und er verstarb an den Komplikationen eines akuten Atemnotsyndroms.

2 Fazit

Mediziner und Medizinerinnen – insbesondere in der Intensivmedizin – benötigen eine schnelle, effiziente und kostengünstige Überwachung des Immunstatus ihrer Patientinnen und Patienten. Aus klinischer Perspektive benötigt eine ‚Hyperinflammation‘ eine andere Therapie als eine ‚Immunparalyse‘. Neue zellbasierte Biomarker aus dem Blutbild können als ‚Aktivierungsmarker‘ der roten und weißen Zellreihe zusätzliche wertvolle Hinweise auf den Status des Immunsystems eines Patienten oder einer Patientin geben und eine Veränderung des Zytokinspiegels anzeigen bzw. vorhersagen und folglich die Therapie unterstützen.

In diesem Beispiel würde die zusätzliche Bestimmung der Retikulozyten und des Delta-Hämoglobin-Äquivalents (Delta-He) das Monitoring der Hyperinflammation zusätzlich unterstützen. Ein Abfall der Retikulozytenkonzentration und eine Negativierung des Delta-He sind sehr schnelle pathobiochemische Reaktionen der Hämatopoese auf eine proinflammatorische Zytokinproduktion – nach Abklingen (z. B. durch suffiziente Therapie) der Entzündung steigt die Retikulozytenproduktion wieder an und die vermehrt gebildeten Retikulozyten werden wieder mit mehr Hämoglobin gefüllt, so dass sich das Delta-He wieder in den positiven Bereich bewegt.

In diesem Zusammenhang ist auch ein kürzlich entwickelter Score, der „COVID-19 Prognostic Score“ (Research), von großem Interesse für die Intensivmedizin. Der COVID-19 Prognostic Score, der

ausschließlich Parameter aus dem Blutbild nutzt, kann bereits in den ersten Tagen nach Krankenhausaufnahme eines an COVID-19 Erkrankten eine Prognose hinsichtlich der Entwicklung des Schweregrades der Infektion geben. Ziel dieses Scores ist es, möglichst frühzeitig kritische Krankheitsverläufe einer COVID-19-Erkrankung und einen hierdurch bedingten Aufenthalt auf der Intensivstation vorherzusagen. Die dazugehörige klinische Studie wurde an elf verschiedenen europäischen Krankenhäusern an insgesamt 982 SARS-CoV-2-positiv getesteten Erkrankten durchgeführt. Die Publikation finden Sie hier: LINK: <https://elifescience.org/articles/63195>

Weitere Informationen finden Sie im Themenblatt Fallbeispiel XTRA | 1/2022 | Themenblatt Nr.2: COVID-19 Infektion – COVID-19 Prognostic Score sagt schweren Verlauf voraus

3 Hintergrund-Informationen – Zellaktivierungsparameter

Wird das Immunsystem mit eingedrungenen Pathogenen (z. B. Bakterien oder Viren) konfrontiert, werden bestimmte Zellen der angeborenen Immunabwehr aktiviert. Je nach Erreger (bakteriell vs. viral vs. fungal) kann diese Aktivierung unterschiedlich deutlich ausfallen. Sysmex Hämatologieanalysensysteme der XN-Serie detektieren eine Reihe von Zellaktivierungsparametern, die sich unter anderem aus der seitlichen Fluoreszenzlicht-Intensität (SFL) der Leukozyten im WDF-Kanal ableiten.

Neutrophilen-Aktivierung

Das Verständnis der Rolle neutrophiler Granulozyten bei Entzündungen oder Infektionen hat sich in den letzten Jahren grundlegend geändert. Die Ansicht, dass Neutrophile nur eine passive Rolle spielen und einfach auf äußere Signale reagieren, wurde inzwischen durch die Erkenntnis ersetzt, dass aktivierte Neutrophile die meisten Funktionen von Makrophagen erfüllen können und eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen und Oberflächenmolekülen (MHCII) sezernieren bzw. exprimieren. Auf diese Weise können auch Neutrophile auf ihrer Zelloberfläche Antigene präsentieren und ebenso spezifische T-Zellen aktivieren.

Der Parameter **NEUT-RI** (Neutrophilen-Reaktivitätsindex) spiegelt die Stoffwechselaktivität neutrophiler Granulozyten wider, indem die intrazytoplasmatischen und intranukleären Mengen an Nukleinsäuren (RNA und DNA) mit Hilfe der Intensität des Seitwärtsfluoreszenzlichtes quantifiziert werden. Aktivierte Zellen haben nicht nur eine andere Membranlipidzusammensetzung, sondern auch eine größere Menge an Nukleinsäuren im Zytoplasma, da sie u. a. aktiv Zytokine synthetisieren. Folglich weisen diese Zellen deutlich höhere Fluoreszenzsignale auf als ruhende/immunologisch inaktive Zellen. Der Parameter NEUT-RI spiegelt die Intensität der Stoffwechselaktivität neutrophiler Granulozyten präzise wider. Ein erhöhter NEUT-RI ist häufig bei bakteriellen Infektionen zu beobachten, konnte jedoch auch im Blut von COVID-19-Erkrankten festgestellt werden. Nimmt die Menge an intrazytoplasmatischen Nukleinsäuren zu, so steigt die Neutrophilenwolke auf der y-Achse (Drift nach oben auf der SFL-Y-Achse) nach „oben“. Im Falle einer abklingenden Infektion, bzw. bei adäquater Therapie, verändert die Neutrophilenwolke ihre Position auf der y-Achse und steigt wieder nach unten (Drift nach unten auf der SFL-Y-Achse), bedingt durch abfallende Mengen an intrazytoplasmatischen Nukleinsäuren bei insgesamt rückläufiger Infektionslast.

Der Parameter **NEUT-GI** steht für die Granulationsintensität von Neutrophilen. Bereits im frühen 19. Jahrhundert beschrieben Kugel & Rosenthal erstmalig die heute als „toxische Granulation“ bekannten dunkelvioletten und mikroskopisch kleinen Granulationen im Zytoplasma der Neutrophilen aus dem Blut von Schwerkranken (die von Kugel & Rosenthal ursprünglich beschriebenen toxischen Granulationen fanden sich fast ausschließlich im Blut von Patienten und Patientinnen, die an schweren bakteriellen Infektionen litten). Das 90-Grad-seitlich gestreute Licht des XN-DIFF-Kanals liefert Informationen über die zytoplasmatische Granularität der Neutrophilen. Nimmt die Komplexität und damit die Menge an zytoplasmatischen Granulationen in den Neutrophilen zu, so spricht man von einer toxischen Granulation. Dieser Zustand beeinflusst die Position der ‚Neutrophilenwolke‘ im DIFF-Scattergramm (Drift nach rechts auf der SSC-X-Achse). Der Parameter NEUT-GI, ausgedrückt in der Einheit SI

(Streuintensität), ändert sich bei entsprechender Therapie: Die Menge an intrazytoplasmatischen toxischen Granulationen verringert sich und die ‚Neutrophilenwolke‘ verändert wieder ihre Position im DIFF-Scattergramm (Drift nach links auf der SSC-X-Achse SSC).

Lymphozyten-Aktivierung

Dargestellt durch die Parameter **RE-LYMP** und **AS-LYMP**.

RE-LYMP steht für reaktive Lymphozyten und spiegelt alle ‚reaktiven Lymphozyten‘ wider, die ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im Seitwärtsfluoreszenzlicht aufweisen als die übrige Lymphozytenpopulation. AS-LYMP quantifizieren die Subgruppe der aktivierten Antikörper-synthetisierenden Lymphozyten (T-Zell-unabhängig aktivierte B-Zellen aus der Marginalzone: Plasmazellen). Diese sind eine Subpopulation der RE-LYMP-Population.

Monozyten-Aktivierung

Reaktive Monozyten (RE-MONO): Der Parameter **RE-MONO*** liefert zusätzliche Informationen über den Aktivierungsstatus des Immunsystems. Wenn Monozyten ‚reaktiv‘ sind, quantifiziert durch eine erhöhte Seitwärtsfluoreszenzlichtintensität im DIFF-Kanal, spricht dies dafür, dass Monozyten bestimmte Pathogene durch Phagozytose eliminieren. Hierbei werden u. a. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt, proinflammatorische Zytokine produziert sowie die T-Zellantwort des adaptiven Immunsystems moduliert.

Die Parameter NEUT-RI, NEUT-GI sowie RE-LYMP und AS-LYMP sind mit der EIP-Lizenz an Sysmex XN-Systemen verfügbar. Für ihre Bewertung ist es essentiell, hämatologische Systemerkrankungen auszuschließen! Der Parameter RE-MONO ist ab XN-Software 22.0 an *Extended* IPU übertragbar.

*Research use only (RUO)

1 Tabelle 3: Referenzbereiche erweiterte Blutbildparameter

Parameter	Einheit	Männer & Frauen			
		LL	Median	UL	N
NRBC	10 ⁹ /L	0,00	0,00	0,01	14612
NRBC	%	0,0	0,0	0,2	14612
RET-He	pg	29,3	32,8	35,4	14484
RET-He	amol	1817	1986	2195	14484
RBC-He	pg	27,2	30,2	32,5	14484
RBC-He	amol	1688	1875	2017	14484
Delta-He	pg	1,2	2,6	3,6	14484
Delta-He	amol	77	161	223	14484
MicroR	%	0,3	1,1	3,3	14407
MacroR	%	3,1	3,6	4,5	14438
HYPO-He	%	0,0	0,1	0,4	14484
HYPER-He	%	0,4	0,6	0,8	14484
IG	10 ⁹ /L	0,01	0,03	0,07	14536
IG	%	0,2	0,6	1,0	14540
NEUT-RI	FI	42,0	46,1	50,6	14590
NEUT-GI	SI	143	149	157	14597
RE-LYMP	10 ⁹ /L	0,03	0,06	0,17	14513
RE-LYMP	%WBC	0,4	1,1	2,5	14505
RE-LYMP	%LY	1,3	3,3	7,8	14509
AS-LYMP	10 ⁹ /L	0,00	0,00	0,00	14643
AS-LYMP	%WBC	0,0	0,0	0,0	14643
AS-LYMP	%LY	0,0	0,0	0,0	14630
RE-MONO	10 ⁹ /L	0,00	0,01	0,02	12450
RE-MONO	%WBC	0,0	0,2	0,4	12450
RE-MONO	%MO	0,0	2,0	4,4	12450
HFLC	10 ⁹ /L	0,00	0,00	0,02	14612
HFLC	%	0,0	0,0	0,3	14612
IPF	10 ⁹ /L	3,1	7,9	18,7	14395
IPF	%	1,2	3,1	8,9	14444

Tabelle 3: Referenzbereiche der XN-Serie van Pelt *et al.* [8] Ausschlussmethode: LAVE(+) Abn 1 [8]

Wir bedanken uns bei Herrn Dr. M. Zimmermann für die fachliche Unterstützung.

2 Literatur

- [1] Cornet E et al. (2015): Contribution of the new XN-1000 parameters NEUT-RI and NEUT-WY for managing patients with immature granulocytes. *Int J Lab Hematol.* 37(5): e123–126.
- [2] Lippi et al. (2020): Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: A meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 506: 145–148.
- [3] Martens R et al. (2021): Hemocytometric characteristics of COVID-19 patients with and without Cytokine Storm Syndrome on the Sysmex XN-10 hematology analyzer. *Clin Chem Lab Med.* 59(4): 783–793.
- [4] Mitra A et al. (2020): Leukoerythroblastic reaction in a patient with COVID-19 infection. *Am J Hematol.* 95(8): 999–1000.
- [5] Milanesio M et al. (2021): Leukoerythroblastic reaction associated with COVID-19 infection. Case report. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 78(1): 64–67. Article in Spanish.
- [6] van Pelt et al. Reference intervals for Sysmex XN hematological parameters as assessed in the Dutch Lifelines cohort *Clin Chem Lab Med* 2022 <https://doi.org/10.1515/cclm-2022-0094>

3 Kontakt

Sysmex Deutschland GmbH · Bornbarch 1, 22848 Norderstedt · Telefon +49 40 534102-0 · Fax +49 40 5232302 · xtra@sysmex.de · www.sysmex.de/xtra
Sysmex Suisse AG · Tödistrasse 50, 8810 Horgen · Telefon +41 44 718 38 38 · xtra@sysmex.ch · www.sysmex.ch/xtra
Sysmex Austria GmbH · Lienfeldergasse 31-33, 1160 Wien · Telefon + 43 1 486 16 31 · Fax + 43 1 486 16 31 25 · xtra@sysmex.at · www.sysmex.at/xtra