

Automatische Blutzelldifferenzierung – ein neues Hilfsmittel zur Malariadiagnostik?

M. P. Grobusch¹, T. Hänscheid²

Einleitung Trotz der Einführung neuer adjuvanter Techniken wie beispielsweise von immunochromatographischen Plasmodien-Antigennachweisverfahren („Schnelltests“) bleibt die Mikroskopie der Standard in der Malariadiagnostik. Allerdings müssen alle diese Tests auf dem Boden eines klinischen Verdachtes durchgeführt werden. Insbesondere in Nichtendemiegebieten wird der Verdacht auf eine Malariaerkrankung bisweilen nicht frühzeitig in die Differentialdiagnose des febrilen Patienten einbezogen, so dass es zu einer ernsthaften Verzögerung der Diagnosestellung bei Reiserückkehrern kommen kann. Eine neue Generation von automatischen Blutzell-Analysegeräten, die auf flowzytometrischen Prinzipien beruhen, werden zunehmend in zahlreichen der gut ausgestatteten Hämatologielaboratorien weltweit zur Erstellung von Routineblutbildern verwendet. Hierbei wurde die anekdotische Beobachtung gemacht, dass Fälle von Malaria, vermutlich durch die Detektion von Hämozoïn (Malariapigment), angezeigt wurden. Wir berichten hier in Kürze über erste systematische Untersuchungen des Phänomens und seine mögliche Rolle als adjuvantes Verfahren in der Diagnosestellung der Malaria.

Technisches Prinzip Die Instrumente der Cell-Dyn®-3000-Reihe (Abbott Diagnostics, Santa Clara, USA) arbeiten mit einem Helium-Neon-Laser und benutzen das Streulicht, das in 4 Winkeln von der Messkammer durchfließenden Leukozyten erzeugt wird, zum Erstellen eines Leukozyten-Differentialblutbildes. Hierbei werden die Leukozyten nach Größe (0°), Kern: Zytoplasma-Relation (KZR, 10°), Kernlappung ('Lobularität', 90°) und Präsenz von zytoplasmatischen Granula ('Granularität', 90° Depolarisation) differenziert. Mononukleäre Zellen (Monozyten und Lymphozyten) werden von polymorphonukleären Zellen (Neutrophilen und Eosinophilen) mittels Kernlappung und KZR differenziert. Eosinophile werden von Neutrophilen durch die depolarisierenden Granula unterschieden. Im Endeffekt werden Eosinophile in einem Granularitäts/Lobularitäts-Plot als grüne Punkte oberhalb einer Schwelle dargestellt, unterhalb derer sich Monozyten (violett), Lymphozyten (blau) und Neutrophile (gelb) befinden (Abb. 1 und 2).

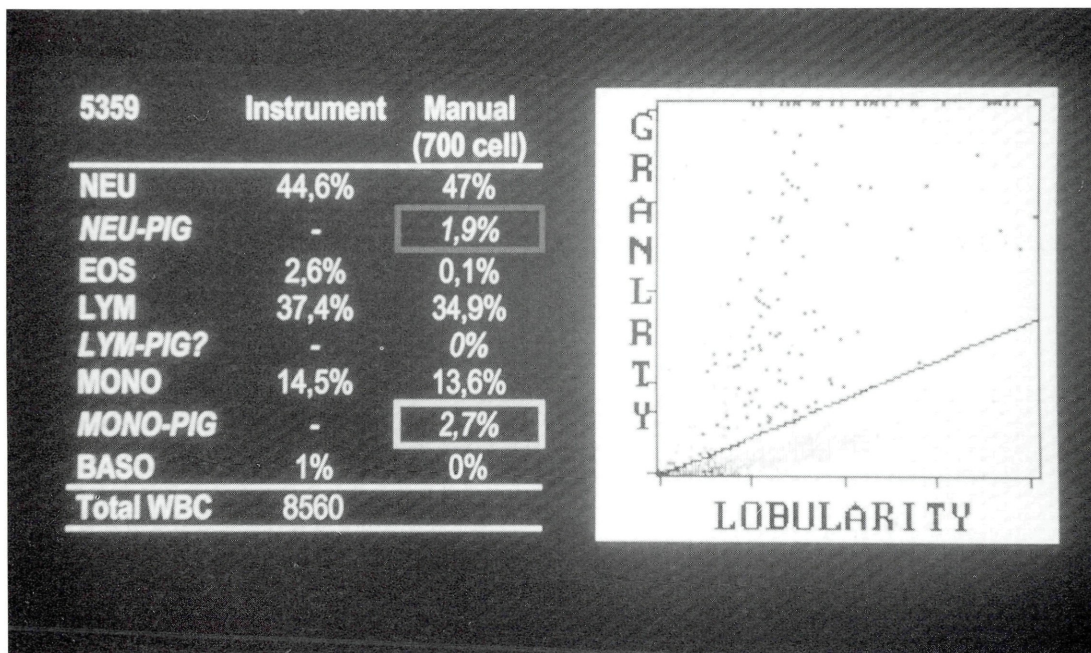


Abbildung 1:

Scattergram eines Malariapatienten, Granularitäts-/Lobularitäts-Plot. *P. falciparum*-Infektion (0.02%), 3. Behandlungstag.

Bei der Blutprobenanalyse von Malariapatienten wurden abnorme Granularitäts- und Lobularitätsplots gefunden: es fanden sich lila (Monozyten repräsentierende) Punkte im Eosinophilen-Areal ebenso wie eine abnorm verteilte und weit verstreute Eosinophilenpopulation. Beide Phänomene scheinen durch die Präsenz von doppelbrechendem, depolarisierenden Malariapigment in Monozyten und Neutrophilen hervorgerufen zu sein (6). Das Instrument scheint Monozyten korrekt als solche zu identifizieren, 'verteilt' diese aber durch die depolarisierenden Eigenschaften des Malariapigmentes in das Eosinophilenfeld. Hierbei können leichte Unterschiede in der Kernstruktur und die durch das Hämozin erzeugte Streuung für die abnorme Verteilung im Vergleich zur normalen Eosinophilenstruktur verantwortlich sein.

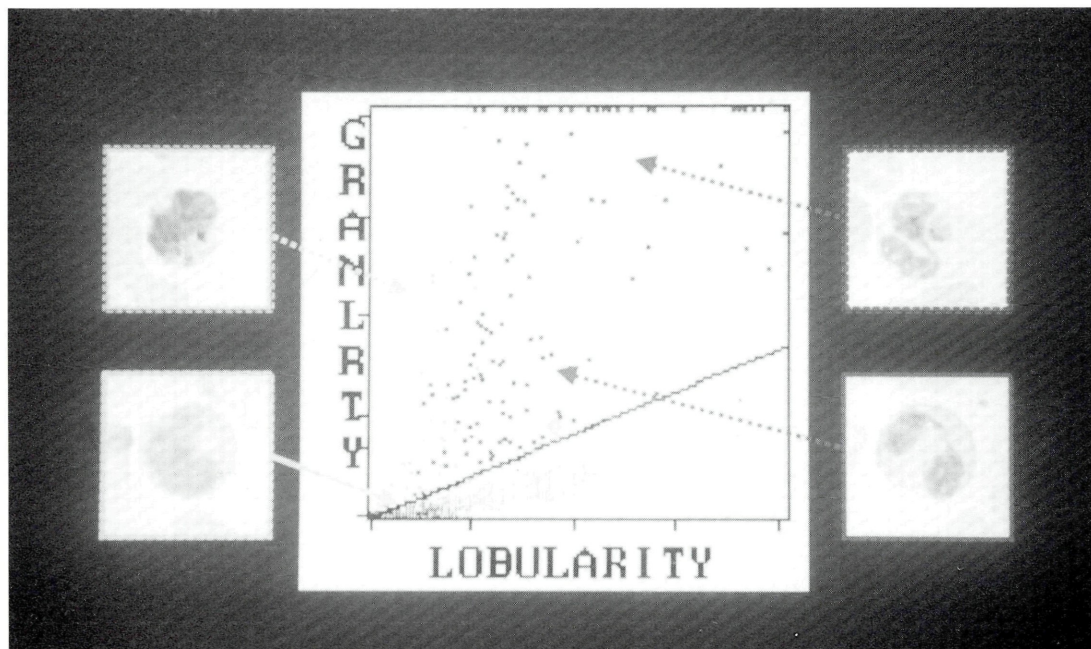


Abbildung 2:

Identisches Scattergramm mit dem Verteilungsmuster von Leukozyten-Subpopulationen. Links oben: Hämozin-enthaltender Monozyt (violette Punkte im Eosinophilenareal); links unten: normaler Monozyt (violette Punkte unterhalb der Schwelle); rechts oben: Hämozin-enthaltender Granulozyt; rechts unten: normaler Eosinophiler.

Studienergebnisse

In einer ersten Studie in Südafrika fanden MENDELOW et al. (5) bei der Untersuchung von 224 Blutproben von Malariaverdachtsfällen mit einem CellDyn® 3500-Gerät (95 positiv, 129 negativ; Diagnosesicherung durch Mikroskopie und Antigennachweis) eine Sensitivität von 72% bei einer Spezifität von 96% (PPV 93%, NPV 82%).

HÄNSCHIED et al. (1) fanden bei einem kleineren portugiesischen Patientenkollektiv von 90 Verdachtsfällen 36

M.A.P.P.S.-positive inklusive aller 29 mikroskopisch positiven Patienten (CellDyn® 3500). Von den 7 falsch positiven Proben stammten 6 von Patienten, die sich 5 bis 21 Tage nach klinisch und mikroskopisch erfolgreich behandelter Malaria zur Kontrolluntersuchung vorstellten.

In einer fortlaufenden Studie analysieren wir frische EDTA-Blutproben von febrilen Reiserückkehrern (einem gemischten Kollektiv aus Nichtimmunen und möglicherweise semiimmunen Afrikanern), die sich mit Verdacht auf eine Malariaerkrankung in unserer Einrichtung, einer infektiologischen Abteilung an einem großen Berliner Klinikum, vorstellen, mit einem CellDyn® 3000-M.A.P.P.S.-Analysegerät. Von den bisher untersuchten 73 Proben waren 41 mikroskopisch malaria-positiv (*P. falciparum*: 33; *P. vivax*: 5; *P. ovale*: 3). Von diesen waren lediglich 21/41 (51.2%) M.A.P.P.S.-positiv (*Pf.* 16/33 [48.5%], *P.v.* 3/5 [60.0%], *P.o.* 2/3 [66.7]). Alle 32 malaria-negativen Proben waren M.A.P.P.S.-negativ. In Abb.1 und 2 ist ein typisches Analyseergebnis dargestellt.

Diskussion

Die unterschiedlichen Ergebnisse in den obengenannten, teilweise noch nicht abgeschlossenen Pilotstudien erklären sich unter anderem aus den unterschiedlichen Patientenkollektiven. Je höher der Anteil an semiimmunen Patienten ist, desto höher erscheint die Sensitivität des Verfahrens. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Erreichen der „klinischen Schwelle“ bei den Patienten mit partieller Immunität später im Verlauf der Infektion erfolgt und mithin zum Zeitpunkt der Diagnostik bereits mehr Malariapigment gebildet wurde, als dies bei Nichtimmunen der Fall ist. Da kinetische Studien zeigten, dass Malariapigment enthaltende Leukozyten bis zu drei Wochen nach Eradikation der Parasiten in der Zirkulation verbleiben können (6), bedeutet dies, dass das Verfahren für ein Follow-up zur Therapieerfolgskontrolle wegen des zu erwartenden hohen Anteils falsch positiver Ergebnisse ungeeignet erscheint.

Während die Spezifität der Ergebnisse bisher durchgehend gut zu sein scheint, wird die Sensitivität der Methode durch die Standardeinstellungen der verwendeten Maschinen limitiert, die auf die Anwendung zur Erstellung von Routine-Differentialblutbildern zugeschnitten und auf die Messung von maximal 10.000 Leukozyten ('gated events') pro Analyse beschränkt sind. Die Software der hier angewandten Instrumente ist nicht spezifisch darauf zugeschnitten, Malariaverdachtsfälle 'auszuflaggen'. Speziell auf die Erfordernisse der Malariadiagnostik zugeschnittene Modifikationen mit Analyse des nicht hämolysierten roten Blutes sind hier denkbar, da es möglich ist, Pigment enthaltende Parasiten, die in Erythrozyten liegen, zu erkennen (2). Darüberhinaus verwenden neuere Modelle (CellDyn® 4000-Instrumentenserie) einen Argon-Ionen-Laser, der auch das Aufspüren von Fluoreszenzfarbstoffmarkierungen und mithin eine Nukleinsäure-Detektion ermöglicht, so dass Parasiten direkt identifiziert werden können (4).

Während dieses Verfahren in ärmeren Ländern unerschwinglich ist, könnte die Kenntnis dieses Phänomens dazu dienen, möglicherweise anderweitig unerkannt gebliebene – weil vom Kliniker zunächst nicht bedachte – Fälle von importierter Malaria zu entdecken (3). Verschiedene Weiterentwicklungen der automatischen Blutanalysetechniken, speziell als Hilfsmittel zur Malariadiagnostik, sind somit denkbar. Sie erscheinen aber derzeit nur als adjuvante Verfahren, insbesondere in Nichtendemiegebieten, praktikabel.

Zusammenfassung

Die Mikroskopie ist die unangefochtene Standardmethode der Malariadiagnostik, trotz neuerer adjuvanter Verfahren wie immunochromatographischen Schnelltests. Alle Tests müssen in der Regel von einem Kliniker auf dem Boden einer Verdachtsdiagnose angefordert werden. Automatische Blutzell-Analysegeräte kommen in zahlreichen Ländern in Nichtendemiegebieten zum Einsatz. Anekdotische Erfahrung mit Cell-Dyn®-Blutzelldifferenzierungsgeräten, die auf der Basis der flowzytometrischen Laser-Mehrwinkelstreu-Depolarisierung (M.A.P.P.S.) arbeiten, zeigte, dass – ungeachtet der Plasmodienspezies – im Granularitäts-/Lobularitäts-Scattergramm ein charakteristisches Parasitenprofil entsteht. Dieses Phänomen der Malariadetektion beruht möglicherweise auf den physikalischen Eigenschaften von Hämozoïn (Malariapigment).

In der ersten Untersuchung in Südafrika (5) an 224 Malariaverdachtsfällen betrug die Sensitivität 72% bei einer Spezifität von 96%. In dem portugiesischen Patientenkollektiv (1) fanden sich bei 90 Verdachtsfällen 36 M.A.P.P.S.-positive inklusive aller 29 mikroskopisch positiven Patienten. Hingegen sind in einer fortlaufenden Studie in einem Berliner Reiserückkehrerkollektiv (n=73) von bisher 41 bestätigten Malariafällen nur 51,2% M.A.P.P.S.-positiv.

Während dieses Verfahren in ärmeren Ländern unerschwinglich ist, könnte die Kenntnis dieses Phänomens dazu dienen, möglicherweise anderweitig unerkannt gebliebene – weil vom Kliniker zunächst nicht bedachte – Fälle von importierter Malaria zu entdecken. Denkbar sind gezielte Weiterentwicklungen dieser Technik speziell zur Malariadiagnostik.

Schlüsselwörter Malariadiagnose, Malariapigment, automatische Blutzellendifferenzierung, flowzytometrische Laser-Mehrwinkelstreu-Depolarisierung (M.A.P.P.S.)

Summary *Automated Blood Cell differentiation - a new adjuvant tool for diagnosing malaria?*

Despite the introduction of new adjuvant techniques such as rapid immunochromatographic antigen detection tests, expert microscopy remains the standard for the diagnosis of malaria. All kinds of tests have to be initiated on the grounds of a clinical suspicion. Automated blood cell analyzers are in routine use in many countries, particularly in those where malaria is not endemic. Anecdotal experience with CellDyn® instruments working with flowcytometric multi-angle polarized scatter separation (M.A.P.P.S.) revealed that samples from malaria patients display a characteristic granularity/lobularity scattergram independent of the infecting plasmodium species. The phenomenon seems to be due to the detection of malaria pigment (hemozoin) which has birefringent optical properties.

First investigations in South Africa showed a sensitivity of 72% and a specificity of 96% in 224 cases of suspected malaria. In a Portuguese study, out of 90 cases of suspected malaria, 36 samples were M.A.P.P.S. positive including all 29 from microscopically positive patients. In an ongoing study amongst returning travellers to Berlin, Germany, (n=73, 41 malaria cases) only 51.2% of the confirmed malaria cases tested M.A.P.P.S. positive.

Whereas this technique is too expensive for non-affluent countries, the knowledge of the phenomenon described here might be valuable by alerting physicians towards primarily unsuspected cases of malaria. Further developments aiming specifically at improved malaria diagnosis appear to be possible.

Keywords Malaria diagnosis; malaria pigment; automated blood cell differentiation, flowcytometric multi-angle-polarized scatter separation (M.A.P.P.S.).

Literatur

1. HÄNSCHEID, T., CHRISTINO, J. M., PINTO, B. G.:
Automated detection of malaria pigment in white blood cells to diagnose malaria in Portugal.
Am J. Trop. Med. Hyg. (in Druck).
2. HÄNSCHEID, T., VALADAS, E., GROBUSCH, M. P.:
Malaria pigment detection during routine automated full blood counts to diagnose malaria.
Parasitology Today (in Druck).
3. HÄNSCHEID, T. et al. (2000):
Avoiding misdiagnosis of malaria: A novel automated method allows specific diagnosis, even in the absence of clinical suspicion.
Emerg. Inf. Dis. 5, 836-837.
4. HOFFMANN, J. J. M. L., PENNING, J.M.A. (1999):
Pseudo-reticulocytosis as a result of malaria parasites.
Clin. Lab. Haem. 21, 257-260.
5. MENDELOW, B. V. et al. (1999):
Automated malaria detection by depolarization of laser light.
Brit. J. Haematol. 104, 499-503.
6. METZGER, W. G., MORDMÜLLER, B. G., KREMSNER P. G. (1995):
Malaria pigment in leukocytes.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89, 637-638.

Korrespondenzadresse Dr. Martin P. Grobusch
Medizinische Klinik (Infektiologie)
Charité/Humboldt-Universität
Augustenburger Platz 1 · D-13353 Berlin

Tel.: (+49 30 4505 3318)
Fax: (+49 30 4505 3958)
e-mail: martin.grobusch@charite.de

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 2000

Band/Volume: [22](#)

Autor(en)/Author(s): Grobusch Martin P., Hänscheid T.

Artikel/Article: [Automatische Blutzelldifferenzierung - ein neues Hilfsmittel zur Malariadiagnostik? 75-80](#)