

IMMUNOLOGIE

DIAGNOSTIK VON IMMUNDEFEKTEN

Bei Verdacht auf eine Störung des Immunsystems mit inadäquater Immunantwort und Bewältigung von Infektionen durch vor allem Bakterien und Viren, aber auch Pilzen und Parasiten ist eine Immundiagnostik angezeigt. Da die Immunantwort je nach Erreger unterschiedlich abläuft, kann ein Rückschluss auf die Lokalisation des Immundefektes gezogen werden (siehe Tabelle, *modifiziert nach Praktische Labordiagnostik, Harald Renz, Hrsg., 2009*):

Immunantwort je nach Erregergruppe					
Extrazelluläre Erreger	Intrazelluläre Erreger				
	fakultativ			obligat	
Hämophilus influenzae Pneumokokken Staphylokokken	Enterobakterien Mykobakterien Candida Aspergillus Pneumocystis			Viren	
↓	↓	↓	↓	↓	↓
Antikörper	Komplement	Neutrophile	Makro- phagen	T-Helfer- zellen	Zytotoxische T-Zellen
↓	↓	↓	↓	↓	↓
Humoraler Immundefekt B-Zelldefekt	Komplement- Defekt		Phagozyten- Defekt	Zellulärer Immundefekt T-Zelldefekt	

Grundsätzlich sind Defekte des Immunsystems viel häufiger erworbener Natur (=sekundäre Immundefekte) als angeboren (=primäre Immundefekte). Physiologischerweise treten zum einen in der Neonatalperiode und zum anderen im hohen Alter veränderte Abwehrmechanismen auf. So beobachtet man zum Beispiel bei alten Personen eine nur mehr inadäquate T-Zell-Antwort auf die MMR-Impfung, Reaktivierungen von Varizella-Zoster-Infektionen häufen sich und die Tuberkulinreaktion fällt negativ aus. Ein eingeschränkter Immunstatus liegt physiologisch auch während der Schwangerschaft vor.

Primäre, angeborene Immundefekte	Sekundäre, erworbene Immundefekte
B-ZELL-DEFEKTE	Infektionen, z.B. durch HIV (infiziert humane CD4 positive T-Lymphozyten)
Agammaglobulinämie, Morbus Bruton X-chromosomale Mutation der prä-B-Zellen; Patienten tragen keine Lymphknoten und Tonsillen, gehäuft Echoviren-Enzephalitiden Cave: MMR- und BCG-Impfungen	Leukämien ALL, CLL Lymphome NHL, Myelom, Morbus Hodgkin
Common-Variable Immundefekte	Polytrauma

Primäre, angeborene Immundefekte	Sekundäre, erworbene Immundefekte
Hyper-IgM-Syndrom Der sog. „Isotopenswitch“ von IgM zu IgG ist gestört; rezidivierende Neutropenien, Autoimmunerkrankungen, wie Primär sklerosierende Cholangitis / PSC, Parvovirus B19-assoziierte aplastische Anämie Infektionen mit <i>Pneumocystis jirovecii</i> , Histoplasmen, <i>Toxoplasma gondii</i> , Cryptosporidien	Verbrennungen Malnutrition Proteinverlust
Selektiver IgA-Mangel Patienten haben in 50% auch einen IgE-Mangel, hfg. assoziiert mit Autoimmunerkrankungen (SLE, RA, perniziöse Anämie) Patienten mit völligem Fehlen von IgA tragen Anti-IgA-Antikörper – Cave: Gabe von Blutprodukten mit IgA, da Anaphylaxie!	Malignome Diabetes mellitus
T-ZELL-DEFEKTE SCID, Severe Combined Immunodeficiency	<i>Sekundäre, iatrogene Immundefekte</i>
GRANULOZYTEN-DEFEKTE	Immunsuppressive Therapie Chemotherapie Bestrahlung
KOMPLEMENT-DEFEKTE	Operative Eingriffe Organ-/Kochenmarktransplantationen

ZELLULÄRER IMMUNSTATUS

Zur Bestimmung des zellulären Immunstatus gehört neben Blutbild- und Differentialblutbildmessung die durchflusszytometrische Untersuchung der Lymphozyten.

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper können die Lymphozyten und ihre Subpopulationen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle absolut und relativ quantifiziert werden.

Die Ergebnisse des zellulären Immunstatus sind Bestandteil der Diagnostik bei Infektionen oder Lymphomen. Die Konzentration der Immunzell-Fraktionen allein gibt jedoch keine Auskunft über ihre Funktionsfähigkeit, da auch normale Zellzahlen einen funktionellen Immundefekt nicht ausschließen. Der zelluläre Aktivierungsgrad (Anzahl HLA-DR-positive oder CD25-positive T-Zellen) stellt den einzigen Hinweis auf die Reaktionsfähigkeit der T-Zellen dar. Die T-Zell-Aktivierung wird auch zur Aktivitätsbeurteilung von Sarkoidose, Transplantatreaktionen und einigen malignen Lymphomen herangezogen.

Neben der absoluten T-Lymphozytenzahl sind auch der Anteil Helferzellen an den gesamten Lymphozyten (sogenannte relative Helferzellzahl in %) und das Verhältnis von Helferzellen zu zytotoxischen T-Zellen – die sogenannte CD4/CD8-Ratio – von Bedeutung (siehe Tabelle).

LYMPHOZYTENDIFFERENZIERUNG

Marker	Zell-Subpopulation	%	Zellen / μ l	Indikation / Relevanz
CD3+	alle T-Lymphozyten	75-93	800-2500	
CD4+	T-Helfer-Lymphozyten	35-60	650-1200	Verlaufs-/Therapiebeurteilung bei HIV-Infektion 200 – 499 = leicht erniedrigt, < 200 stark erniedrigt; Tiefe Werte u. a. auch bei rezidi-vierenden Infektionen mit Candida, Aspergillus, Myko-bakterien oder Pneumocystis ohne HIV-Infektion
CD8+	Zytotoxische/ Suppressor T-Lymphozyten	30-38	500-800	T4/T8 (CD4/CD8) – Ratio: 1,1-2,3 T4/T8-Ratio-Verminderung durch Erhöhung der T-Suppressorzellzahl bei noch normaler T-Helferzellzahl für Diagnose, Prognose und Therapie bei HIV-Infektion
CD19+	alle B-Lymphozyten	7-17	70-350	
CD3+ CD56+	Natural-Killer-T-Zellen (NKC), Adhäsion	5-15	80-360	Immundefekterkrankungen
CD3+ CD56+ CD57+	CD57-positive Natural-Killer-T-Zellen	3-13	60-250	Patienten mit chronischer Borreliose hfg. Werte unter 60 Zellen/ μ l
CD14+	Monozyten (Bindung an Lipopolysaccharide)	2-6	80-540	Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphome

HUMORALER IMMUNSTATUS

Zur Überprüfung des humoralen Immunstatus werden die Immunglobulinklassen IgG (Subklassen 1-4), IgM, IgA, sowie bei entsprechenden Fragestellungen IgE und IgD bestimmt. Darüberhinaus kann die Messung weiterer humoraler Immunparameter – Komponenten des Komplementsystems, Akut-Phase-Proteine, wie C-reaktives Protein, Immunmodulatoren, Zytokin-Status – von Relevanz sein.

Ein eingeschränkter Immunstatus kann im Falle rezidivierender, nicht beherrschbarer Infektionen die Indikation für eine Immunglobulin-Substitution sein. Dies gilt insbesondere bei primären schweren Immundefekten und Antikörpermangelsyndrom, sowie bei Zustände mit Funktionsstörungen der Granulozyten. Voraussetzung für eine wirksame Therapie ist daher die frühzeitige Erkennung der spezifischen Immundefekte, noch bevor Organe durch Infektionen irreversibel geschädigt wurden.

ZYTOKINE

Zytokine sind Glykoproteine mit regulierender Wirkung für die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung zahlreicher Zellen, insbesondere des hämatopoetischen Systems (z.B. Blutbildung). Zytokine weisen sowohl antivirale wie antiproliferative und immunmodulatorische Eigenschaften auf und werden in zwei Gruppen eingeteilt. Zum Typ 1 gehören Alpha- und Beta-Interferone, zum Typ 2 das Gamma-Interferon. Interferone wurden anfänglich für die Behandlung der Multiplen Sklerose wegen ihrer vermuteten viralen Pathogenese verwendet.

Zytokin	Maßeinheit	Normbereich	Indikation / Relevanz
Interleukin 2 Rezeptor = IL2 = Lösliches/soluble CD25	U/ml	158 – 623	Erfassung eines pro-inflammatorischen Geschehens mit Lymphozytenaktivierung; weitaus stabiler im Blut als Interleukin-2 selbst
Anti-Interferon alpha und beta Antikörper	E/ml	negativ	Therapiekontrolle bei Interferonbehandlungen mit V.a. auf die Bildung neutralisierender Antikörper, Bestimmung unmittelbar oder tiefrieren; siehe dazu auch Kapitel: Autoimmunparameter
Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) im Serum oder Liquor	pg/ml	< 8,1	Früher Marker systemischer Infektionen oder Organversagen, Bestimmung unmittelbar oder tiefrieren

KOMPLEMENTSYSTEM

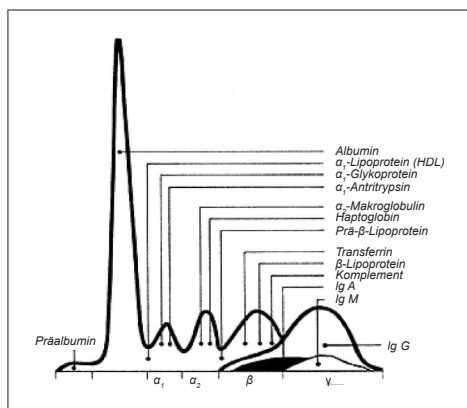
Komplementfaktoren finden sich als inaktive Vorläufer im Blut und werden im Verlauf einer Abwehrreaktion aktiviert. Die Komplementaktivierung erfolgt über den klassischen oder den alternativen Weg. Grundsätzlich sollte bei der Komplementdiagnostik zweistufig vorgegangen werden, d. h. zunächst der CH100-Test – Kontrolle des klassischen Weges – und der APH50-Test – Überprüfung des Alternativweges – durchgeführt werden. Dazu wird die Konzentration des Komplement-Aktivierungsproduktes C3d bestimmt, welches ein Parameter für die Aktivierung sowohl des klassischen als auch des alternativen Weges der Komplement-Aktivierung darstellt.

Komplementfaktor	Normbereich	Bemerkung
CH100	> 390 U/ml	Gesamthämolytische klassische Komplementaktivierung Testprinzip beruht auf der Komplement-vermittelten Lyse sensibilisierter – Antikörperbeladener – Zielzellen Citratplasma oder Serum, gefroren versenden
APH50	80-120%	Gesamte hämolytische alternative Komplementaktivierung Das Testprinzip beruht auf der Antikörper-unabhängigen lytischen Wirkung von Komplement auf geeignete Zielzellen

Komplementfaktor	Normbereich	Bemerkung
C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) funktionell <i>Citratplasma</i> immunologisch <i>Serum</i>	70-130% 15-35 mg/dl	Hereditäres, angioneurotisches Ödem: 2 Formen: absoluter C1-INH-Mangel, d.h. immunologische Reduktion oder funktioneller C1-INH-Mangel, d.h. Aktivitätsverlust bei normaler Konzentration
C3 C4	80-200 mg/dl 20-50 mg/dl	Verbrauch durch Immunkomplex-Erkrankungen, wie SLE, Glomerulonephritis, Vasculitis, Kryoglobulinämie
C1q	10-25-mg/dl	Verlaufsbeurteilung und Therapiekontrolle, v.a. bei IgA-Nephropathie, Periarteriitis nodosa

SERUMPROTEINE – EIWEIßELEKTROPHORESE

Das Gesamtprotein im Serum stellt ein Gemisch von mehr als 100 verschiedenen Einzelproteinen dar. Mittels Serumweißelektrophorese werden diese je nach Wanderungsverhalten im elektrischen Feld – abhängig von pH-Wert, Ladung und Größe – auf speziellen Trägern, wie Agarosegelen oder Zellulose-Acetat-Folien aufgetrennt und densitometrisch quantifiziert.



Bis auf die Einzelbanden Präalbumin und Albumin werden die Fraktionen α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globulin von mehreren, verschiedenen Serumproteinen gebildet.

Diagnostisch am relevantesten ist der Einsatz der Serumweißelektrophorese als Screeningtest für Dysproteinämien und Hypoproteinämien, sowie vor allem für monoklonale Gammopathien.

Einzelne Serumproteine

Protein	Klinische Bedeutung
Albumin	Synthesemarker der Leber, sog. negatives Akut-Phase-Protein mit Abnahme bei Infektion; vermindert bei Proteinmangelernährung, Verlust durch Verbrennung, Verlust enteral bei exsudativer Enteropathie, schweren Diarrhoen, Malabsorptionssyndromen, renaler Verlust bei nephrotischem Syndrom, Verlust bei Ödemen und Aszites
α 1-Antitrypsin	Neben der Quantifizierung des Proteins, gelingt mittels isoelektrischer Fokussierung die Phänotypisierung eines hereditären α 1-Antitrypsinmangels (autosomal rezessiv vererbt); v.a. bei homozygoten Trägern schon beim Neugeborenen Icterus prolongatus oder beim Säugling / Klein-kind cholestatische Hepatitis; beim Erwachsenen stehen die chronische Bronchitis, ein Lungenemphysem und eine Hepatitis/Entwicklung einer Leberzirrhose im Vordergrund. Über 100 bekannte Allele kodieren für das α 1-Antitrypsin. Der normale Phänotyp wird mit dem Buchstaben M gekennzeichnet (PiMM = Proteinase-Inhibitor MM). Insbesondere der Phänotyp PiZZ, aber auch PiSZ sind mit einer verminderten Synthese des α 1-Antitrypsins assoziiert
Haptoglobin	Sensitivster Indikator für eine intravasale Hämolyse, Haptoglobin bindet freies Hämoglobin und wird als Komplex binnen weniger Minuten in der Leber abgebaut; Haptoglobin gehört deshalb zur Hämolyse-Diagnostik genauso wie großes Blutbild, LDH, Retikulozytenzahl und Bilirubin. Falsch hohe Haptoglobin-Konzentrationen entstehen, wenn neben einer intravasalen Hämolyse eine Akut-Phase-Reaktion vorliegt

IMMUNFIXATIONSELEKTROPHORESE

Mittels Immunfixationselektrophorese im Serum gelingt die qualitative Darstellung von monoklonalen kompletten und/oder inkompletten (=Bence-Jones-Proteine) Immunglobulinen und somit die Diagnose und Typisierung einer Paraproteinämie. Im Anschluß an die Gelelektrophorese erfolgt die Inkubation mit spezifischen Antisera mit nachfolgender Anfärbung.

Hydrasis® Gel, Firma SEBIA

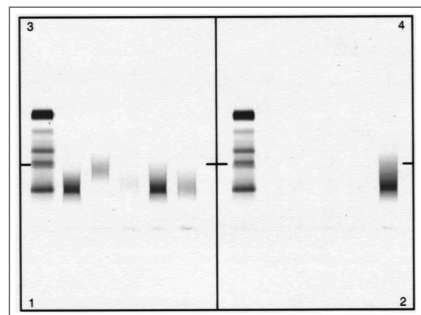
Spuren von links nach rechts

GEL 1

- 1: Kontrollspur
- 2: monoklonale IgG-Antikörper
- 3: monoklonale IgA-Antikörper
- 4: monoklonale IgM-Antikörper
- 5: monoklonale gebundene Kappa-Antikörper
- 6: monoklonale gebundene Lambda-Antikörper

GEL 2

- 1: Kontrollspur
- 2: monoklonale IgD-Antikörper
- 3: monoklonale IgE-Antikörper
- 4: monoklonale freie Kappa-Antikörper
- 5: monoklonale freie Lambda-Antikörper
- 6: Pentavalente, monoklonale Antikörper



Diagnose: IgG-Kappa-Paraproteinämie

MULTIPLES MYELOM

Entsprechend der WHO-Definition zählt das Multiple Myelom zu den B-Zell-Lymphomen. Ihm liegt eine maligne monoklonale Plasmazellvermehrung im Knochenmark zugrunde, die mit der Produktion von kompletten und/oder inkompletten monoklonalen Immunglobulinen einhergeht. IgG- und IgA-Myelome stellen die häufigsten Varianten dar, IgD- und IgE-Myelome sind dagegen sehr selten. Das klinische Erscheinungsbild beim Multiplen Myelom ist sehr vielgestaltig. Ungefähr 20% der Patienten sind bei Diagnosestellung beschwerdefrei, bei zirka 60% der Patienten liegen Blutbildveränderungen, vor allem eine Anämie vor. Mögliche klinische Zeichen sind zudem:

- Reduzierte körperliche Leistungsfähigkeit, Infektneigung aufgrund eines sekundären Antikörpermangels
- Knochenschmerzen, vor allem Stammskelett, lokalisierte oder generalisierte Knochendestruktion
- Pathologische Frakturen, vor allem Wirbelkörpersinterungen; Knochenabbau → Hyperkalzämien → psychische Alterationen
- Hyperviskositätssyndrom, beim Multiplen Myelom relativ selten im Vergleich zur Makroglobulinämie Waldenström (=Immunozytom, monoklonale IgM-Synthese)
 - Seh- und Gedächtnisstörungen, Schwindel, Blutungsneigung
 - Angina pectoris, Angina abdominalis

Bei Vorliegen einer Bence-Jones-Proteinurie kann nach Ausfällung der Immunglobuline in Gegenwart des Tamm-Horsfall-Proteins im distalen Tubulus eine sogenannte „Cast-Nephropathie“ entstehen und ggf. zum akuten Nierenversagen führen. Unter Gammopathie-assoziiierter Amyloidose versteht man Ablagerungen durch fehlgefaltete Proteine (AL-Amyloidose), die wiederum ebenfalls vor allem die Niere betreffen (Funktions-einschränkungen, terminale Niereninsuffizienz). Auch andere Organe können beteiligt sein: Herz (diastolische Relaxationsstörung, Arrhythmie), Gastrointestinaltrakt (Diarrhoe und Gewichtsverlust) sowie Leber (Leberinsuffizienz).

Andere Manifestationsformen der monoklonalen Gammopathie

Monoklonale Gammopathie	Charakteristikum
Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz (MGUS)	Per se kein Krankheitswert, kann aber Vorstufe eines Multiplen Myeloms, eines Morbus Waldenström oder Non-Hodgkin-Lymphoms sein. Die MGUS gilt als gesicherte Präkanzerose des Multiplen Myeloms
Leichtkettenmyelom	Produktion inkompletter Immunglobuline
Asekretorisches Myelom (1-3% der Patienten)	Es werden keine kompletten Immunglobuline bzw. Leichtketten von den Myelomzellen sezerniert
Solitäres Plasmazytom	Ein singulärer ossärer oder extraossärer Plasmazelltumor; ggf. mit begleitender Weichteilreaktion; keine systemische Beteiligung
Osteosklerotisches Myelom – POEMS-Syndrom	Polyneuropathie, Organomegalie (Hepato- und Splenomegalie), Endokrinopathie
Extramedulläre Myelom-Manifestationen	Vor allem im späten Krankheitsstadium
Plasmazell-Leukämien	Schlechte Prognose

Diagnosekriterien der monoklonalen Gammopathie

Referenz: *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haematol 2003;121:749-57*

Diagnose	Multiples Myelom	Smoldering Myeloma	MGUS ¹	Solitäres Plasmazytom	Plasmazell-Leukämie
Kriterien					
Klonale Plasmazellen im Knochenmark	≥ 10%	≥ 10%	< 10%	< 10%	
	<i>und</i>	<i>und/oder</i>	<i>und</i>	<i>und</i>	
Monoklonales Protein im Serum	nachweisbar	≥ 30 g/l	< 30g/l	nicht nachweisbar	
	<i>und/oder</i>			<i>und</i>	
Monoklonales Protein im Urin	nachweisbar			nicht nachweisbar	
	<i>und</i>	<i>und</i>	<i>und</i>	<i>und</i>	
Endorganschäden (CRAB Kriterien²)	nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	
				<i>und</i>	
andere Manifestationen				singuläre Osteolyse (evtl mit Weichteil-Tumor)	> 2 x 10 ⁹ /l klonale Plasmazellen im Blut
					<i>und/oder</i>
				klonale Plasmazellen bioptisch gesichert	> 20% Plasmazellen im Differentialblutbild

² Hypercalzämie und/oder „renal insufficiency“ und/oder Anämie (normochrom, normozytär) und/oder osteolytische oder diffuse „bone lesions“.

Bestimmung der freien Leichtketten im Serum

Beim Screening auf das Vorliegen monoklonaler Gammopathien spielt die immunologische Bestimmung der Freien Kappa- und Lambda-Leichtketten (FLC) im Serum eine entscheidende Rolle. Entsprechend der Empfehlungen der *Guidelines der International Myeloma Working Group (IMWG, Dispenzieri A, et al. Leukemia 2009;23:215-224)* ist der Freelite®-Test zur Diagnose, Verlaufskontrolle und Prognose von Plasmazellerkrankungen in Kombination mit der Serumeiweißelektrophorese und Immunfixation anzuwenden.

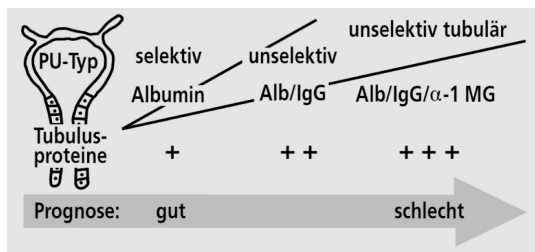
Serum gesunder Erwachsener	Mittlere Konz. mg/l	Median mg/l	95 Perzentile – Bereich in mg/l
Freies Kappa	8,36	7,30	3,30 – 19,40
Freies Lambda	13,43	12,40	5,71 – 26,30
	Mittelwert	Median	Gesamtbereich
Kappa/Lambda Quotient	0,63	0,60	0,26 – 1,65
Kappa/Lambda Quotient bei Niereninsuffizienz			0,37 – 3,1

PROTEINURIE

Der Nachweis von Protein im Urin dient in erster Linie als Suchtest auf Nierenerkrankungen jeglicher Genese – glomeruläre und/oder tubuläre Proteinverluste stehen hierbei im Vordergrund. Die Proteinbestimmung im Urin ist u.a. auch Bestandteil der Schwangerschaftsüberwachung.

Proteinuriedifferenzierung

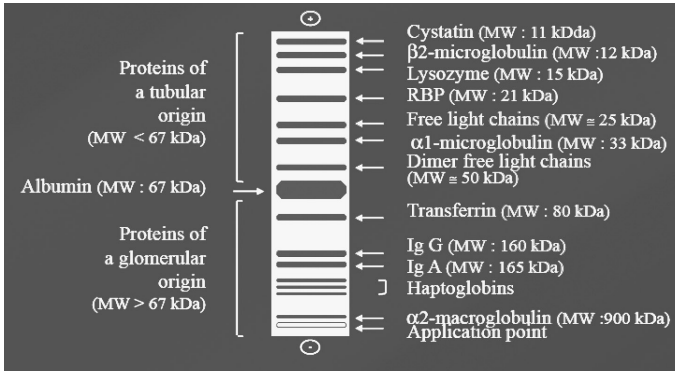
Proteinurien können je nach Ursache, bzw. Lokalisation des Schadens – Glomerulus, Tubulus, Nierenparenchym – anhand sogenannter Markerproteine in verschiedene Proteinurietypen unterteilt werden.



Referenz: Hofmann W. et al, DÄ 2001; 98: 756-63

URINPROTEIN-ELEKTROPHORESE

Mit Hilfe der elektrophoretischen Auftrennung der Urinproteine auf einem SDS-Agarosegel gelingt die Klassifizierung von Proteinurien, sowie die Erkennung von freie Leichtketten im Urin (Bence Jones-Proteinurie). Als Standards werden hier rekombinante Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten verwendet (siehe Abbildung).



HYDRAGEL 5 Proteinurie-Kit, SDS-Polyacrylamid-Gel, Firma SEBIA

Nach der quantitativen Messung der sogenannten Leitproteine im Urin erfolgt zudem anhand der Urinproteinquotienten die Differenzierung der Proteinurien.

Urinproteinquotient	renal		postrenal
Alpha2-Makroglobulin Albumin	renale Hämaturie		postrenale Hämaturie
Bei Hämoglobinurie und Albuminurie ≥ 100 mg/l	< 0,02		> 0,02
Immunglobulin G Albumin	renale Proteinurie		postrenale Proteinurie
	< 0,2		> 0,2
	selektiv glomeruläre Proteinurie	nicht-selektiv glomeruläre Proteinurie	
	< 0,03	> 0,03	
Alpha1-Mikroglobulin Albumin	rein glomeruläre Proteinurie	glomerulär tubuläre Mischproteinurie	
	< 0,1	> 0,1	

CALPROTECTIN

Calprotectin ist wesentlicher Bestandteil der Zellmembran neutrophiler Granulozyten, Monozyten und Darmepithelzellen. Im Rahmen von entzündlichen Prozessen und Migration von Leukozyten durch die Darmwand kommt es zu einem Anstieg von Calprotectin im Stuhl und ist – auch ungekühlt – bis zu einer Woche im Stuhl nachweisbar.

Indikationen

- Abgrenzung eines entzündlichen Geschehens, z.B. chronische Darmerkrankungen (CED) und Infektionskrankheiten, begleitende Entzündungen bei Polypen und Kolonkarzinom von einem Reizdarmsyndrom
- Aktivitätsmarker für das Monitoring bei CED
- Ausschluß einer CED, insbesondere bei Kindern, da nicht-invasive Diagnostik

Erhöhte Werte von Calprotectin finden sich bei

- CED (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa)
- Unspezifische Darminfektionen