

Diagnostisches Zusammenspiel bei hämatologischen Erkrankungen Teil I

ZYTOLOGIE und Durchflusszytometrie

OÄ Dr. Anne Black

OÄ Priv.-Doz. Dr. Margot Egger-Salmhofer

OÄ Priv.-Doz. Dr. Katrin Hefler-Frischmuth

OKH Zentrallabor Linz

OKH Zentrallabor Linz

OKH Zentrallabor Linz

KLINIK

FÄ Dr. Claudia Hos

Ordensklinikum Linz BHS

HISTOLOGIE

OÄ Dr. Eva Maier, MSc

Institut für klin. Pathologie und Molekularpathologie OKL Linz

MOLEKULARGENETIK

Laura Lamplmayr, MSc

Mag. Barbara Zellhofer

Labor für Molekulargenetische Diagnostik, OKL Linz

Labor für Molekulargenetische Diagnostik, OKL Linz

Fall 1: kleines Blutbild (36 J. ♂)

Entzündung

Blutsenkung (1h)	*	9	mm/h	(bis 8)
CRP	**	18.9	mg/dl	(bis 1.0)
Procalcitonin	**	3.44	ng/ml	(bis 0.50)
Interleukin-6	*	57	pg/ml	(0 - 15)

Blutbild

Leukozyten	***	2.47	10 ⁹ /l	(4.00 - 10.00)
Erythrozyten	*	4.18	10 ¹² /l	(4.50 - 5.90)
Hämoglobin	*	12.8	g/dl	(13.0 - 17.5)
Hämatokrit	*	35	%	(40 - 52)
MCV		84	fL	(80 - 100)
MCH		30.6	pg	(26.0 - 34.0)
MCHC	*	36.7	g/dl	(31.0 - 36.0)
RDW-CV		13.1	%	(12.0 - 15.0)
Thrombozyten	**	62	10 ⁹ /l	(150 - 370)

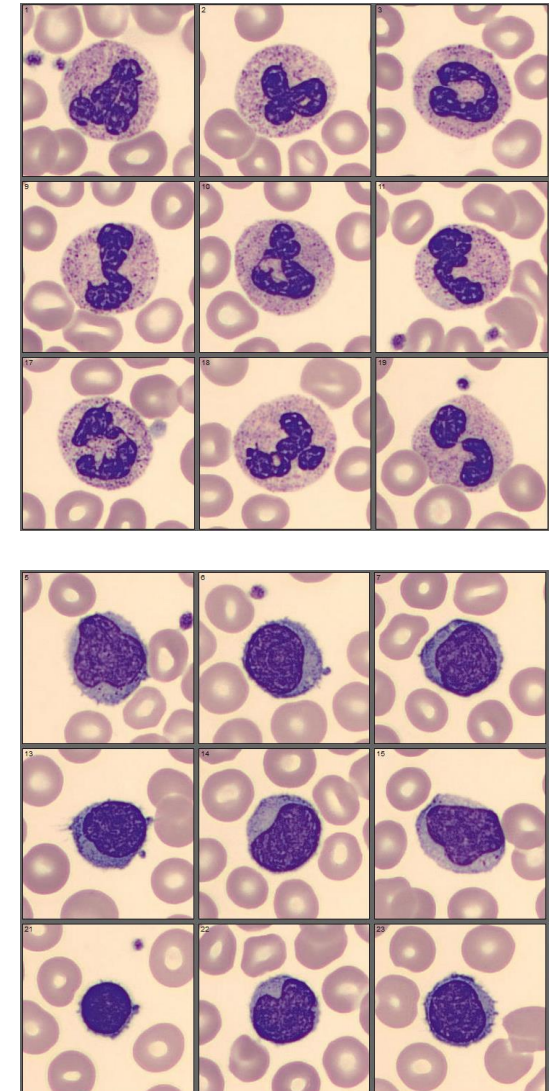
Fall 1: Differential-Blutbild

Diff-Blutbild/techn.

Neutrophile (rel.)	52.6	%	(40.0 - 74.0)
Lymphozyten (rel.)	41.3	%	(16.0 - 45.0)
Monozyten (rel.)	5.3	%	(2.6 - 10.0)
Eosinophile (rel.)	0.0	%	(0.0 - 7.0)
Basophile (rel.)	0.8	%	(0.0 - 1.5)
Neutrophile (abs.)	* 1.30	$10^9/l$	(1.60 - 7.00)
Lymphozyten (abs.)	1.02	$10^9/l$	(0.80 - 3.00)
Monozyten (abs.)	0.13	$10^9/l$	(0.10 - 0.80)
Eosinophile (abs.)	0.00	$10^9/l$	(0.00 - 0.50)
Basophile (abs.)	0.02	$10^9/l$	(0.00 - 0.15)
Unreife Gran. (rel.)	0.4	%	(0.0 - 1.0)

Diff-Blutbild/man.

Stabkernige (man.)	* 8	%	(bis 5)
Segmentkernige (man.)	47	%	(40 - 70)
Monozyten (man.)	5	%	(4 - 10)
Lymphozyten (man.)	40	%	(18 - 45)
Fragmentozyten	0	o/oo	(bis 5)



Klinik

Claudia Hos

BHS Linz

Interne I, Hämato-Onkologie

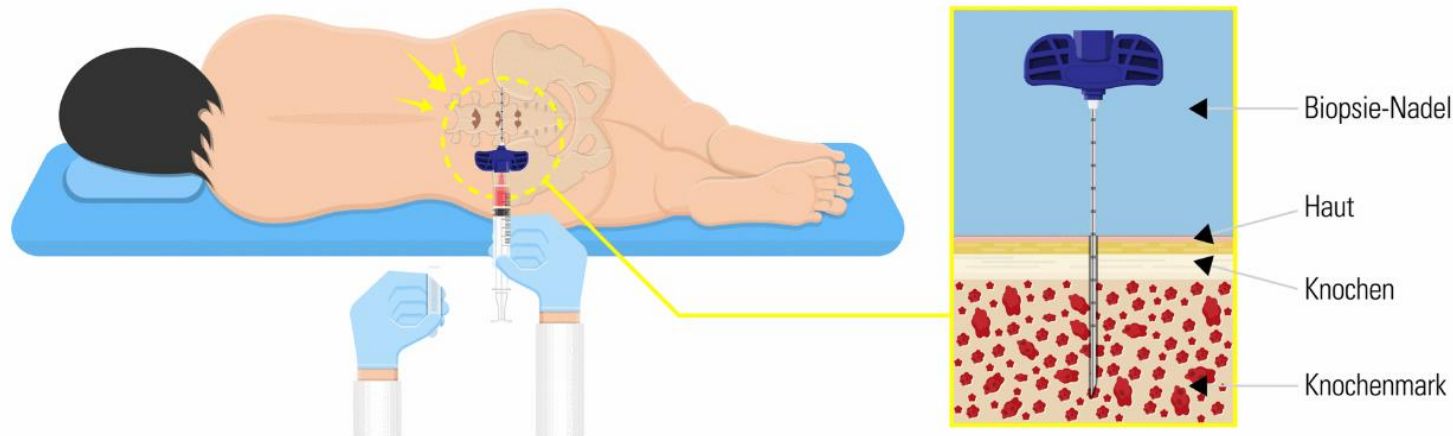
Pat. (36 J.) mit Fieberzacken ($>40^{\circ}\text{C}$) + Panzytopenie

- Bisher gesunder junger Mann
- Fieberhafter Infekt, Müdigkeit, Kopfschmerzen, leichte Halsschmerzen
- Keine Besserung durch Antibiotikum
- Bereits 2 Tage zuvor in anderer NFA -> dort wieder nachhause entlassen
- Neurologische Sensationen
 - Taubheitsgefühl in Extremitäten
 - Sehstörungen
- Neurologische Abklärung unauffällig
- CT-Stamm
 - kein Infektfokus
 - Hepatosplenomegalie (Milz 16,5 cm)
- Proteinurie durch parainfektiöse Glomerulonephritis

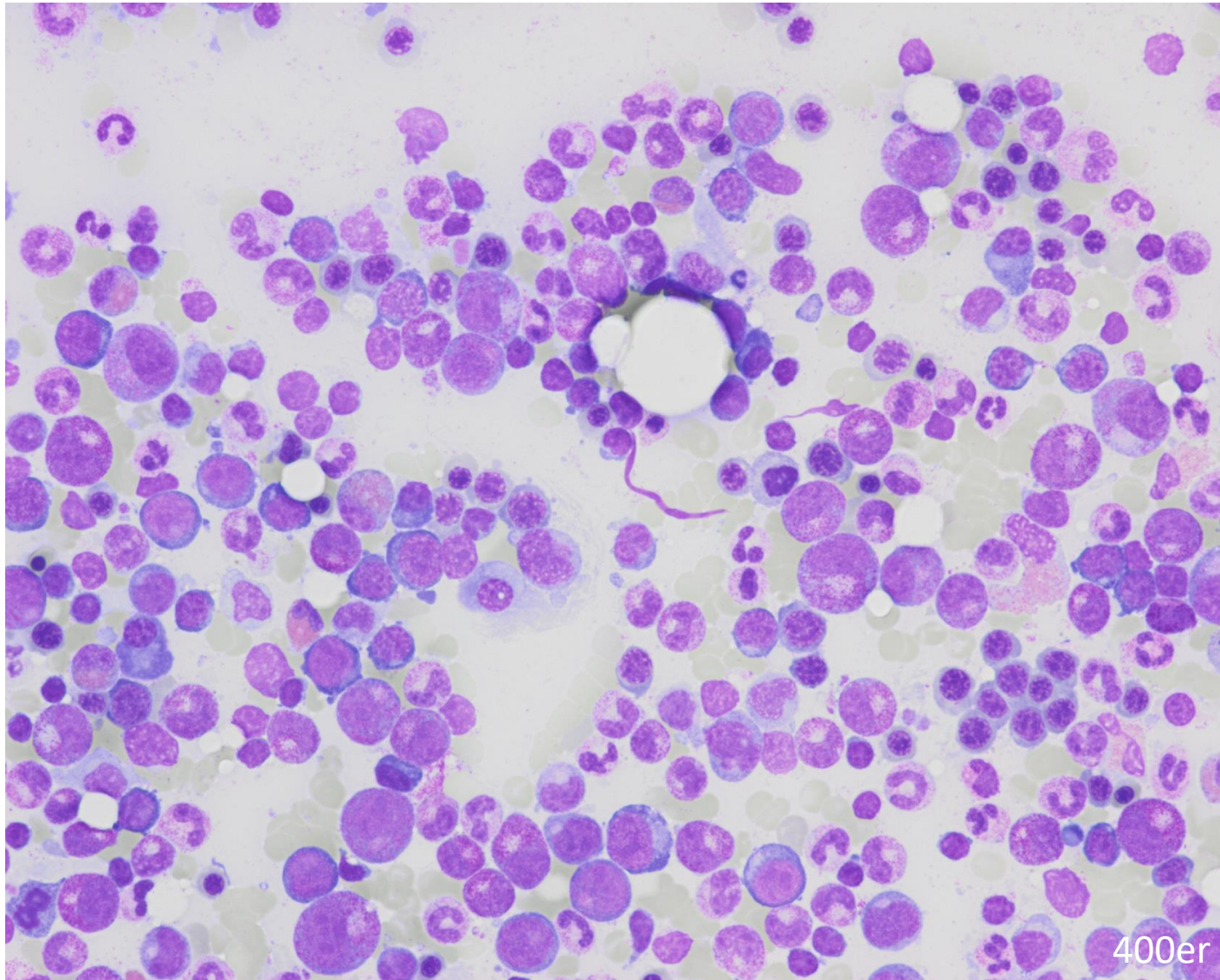
➡ Übernahme Hämato-Onkologie mit V.a. HLH zur **KMP**

Knochenmarkpunktion

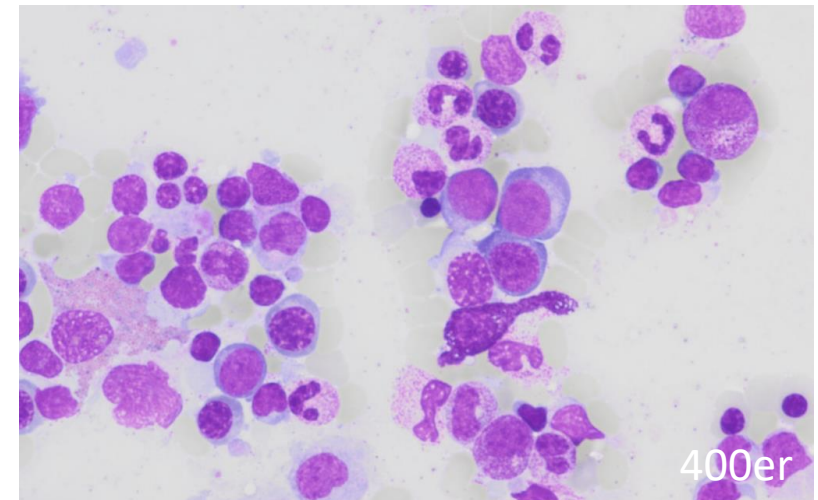
- Kleiner „Eingriff“ auf d. Station oder in d. Ambulanz
- Bauchlage oder Seitenlage
- meist Sedierung mit Midazolam (Pat. wird schläfrig aber keine Vollnarkose)
- Lokale Betäubung
- **Risiken: Schmerzen, Hämatom, Verletzung benachbarter Organe,...**



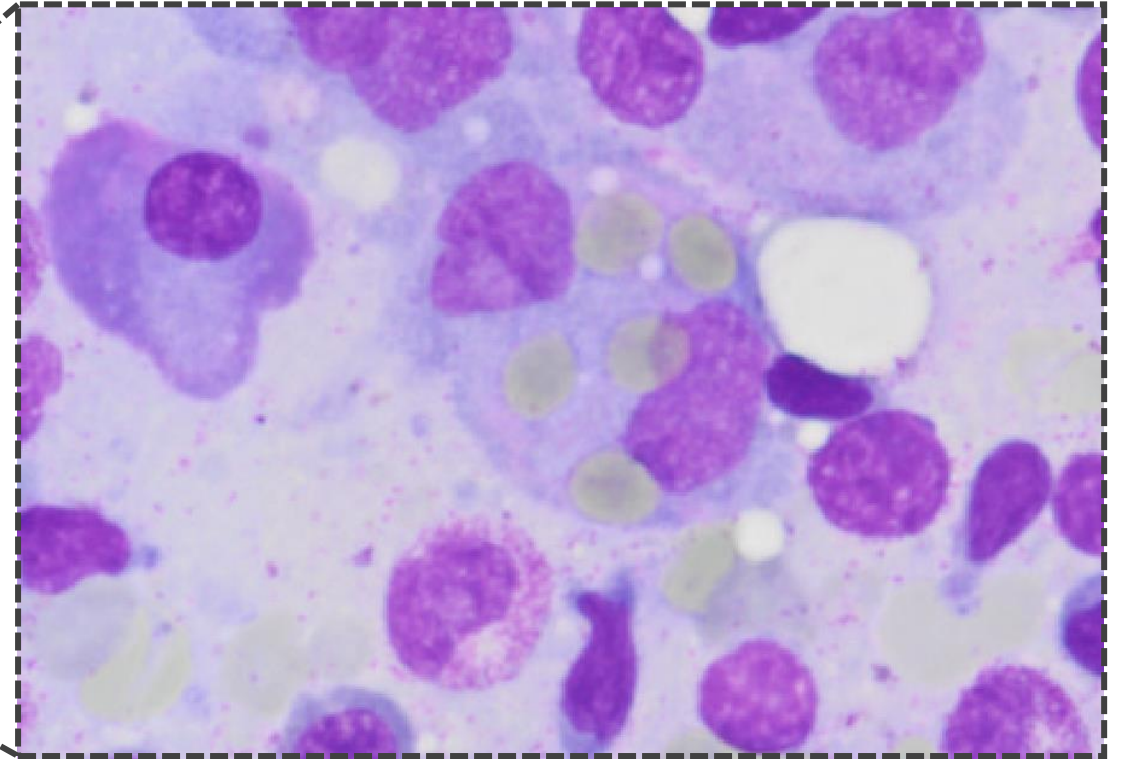
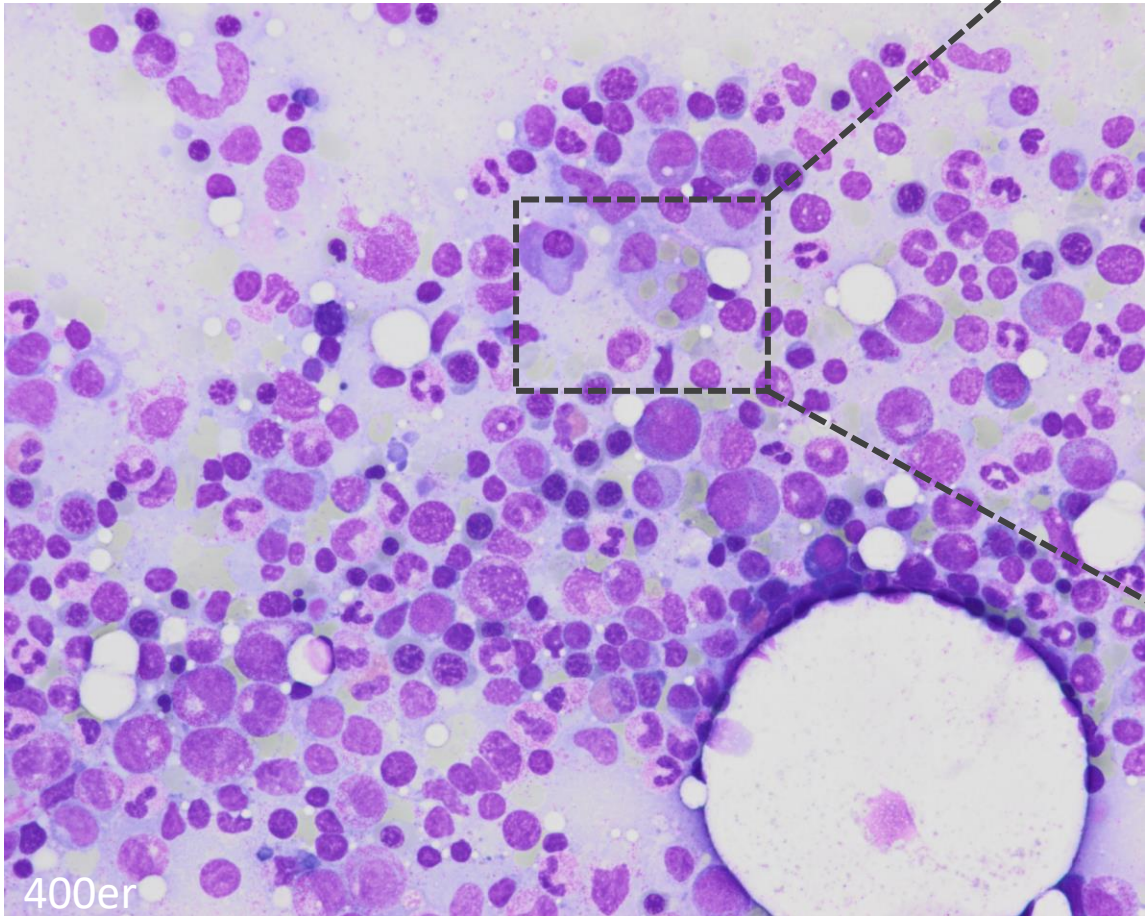
KM Zytologie



- zellreich
- unauffällige EP:GP-Verteilung (1:2)
- Megakaryopoese gesteigert
- GP vollständig ausreifend, reaktiv granuliert
- keine Vermehrung von Blasten oder Lymph
- Mastzellen

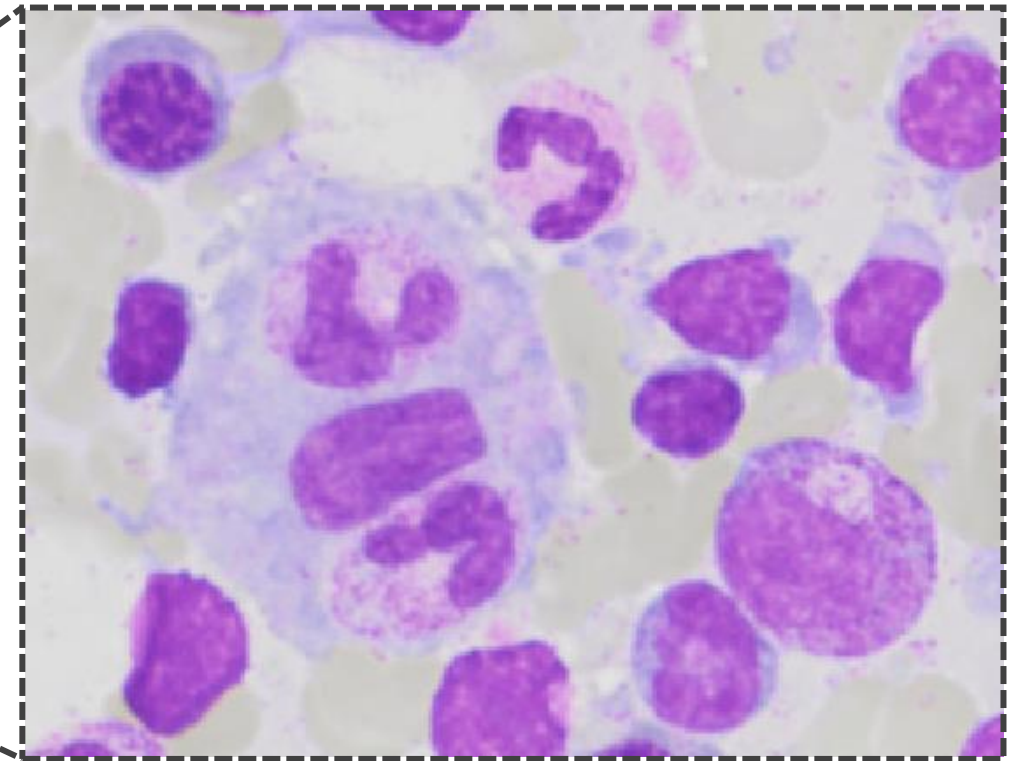
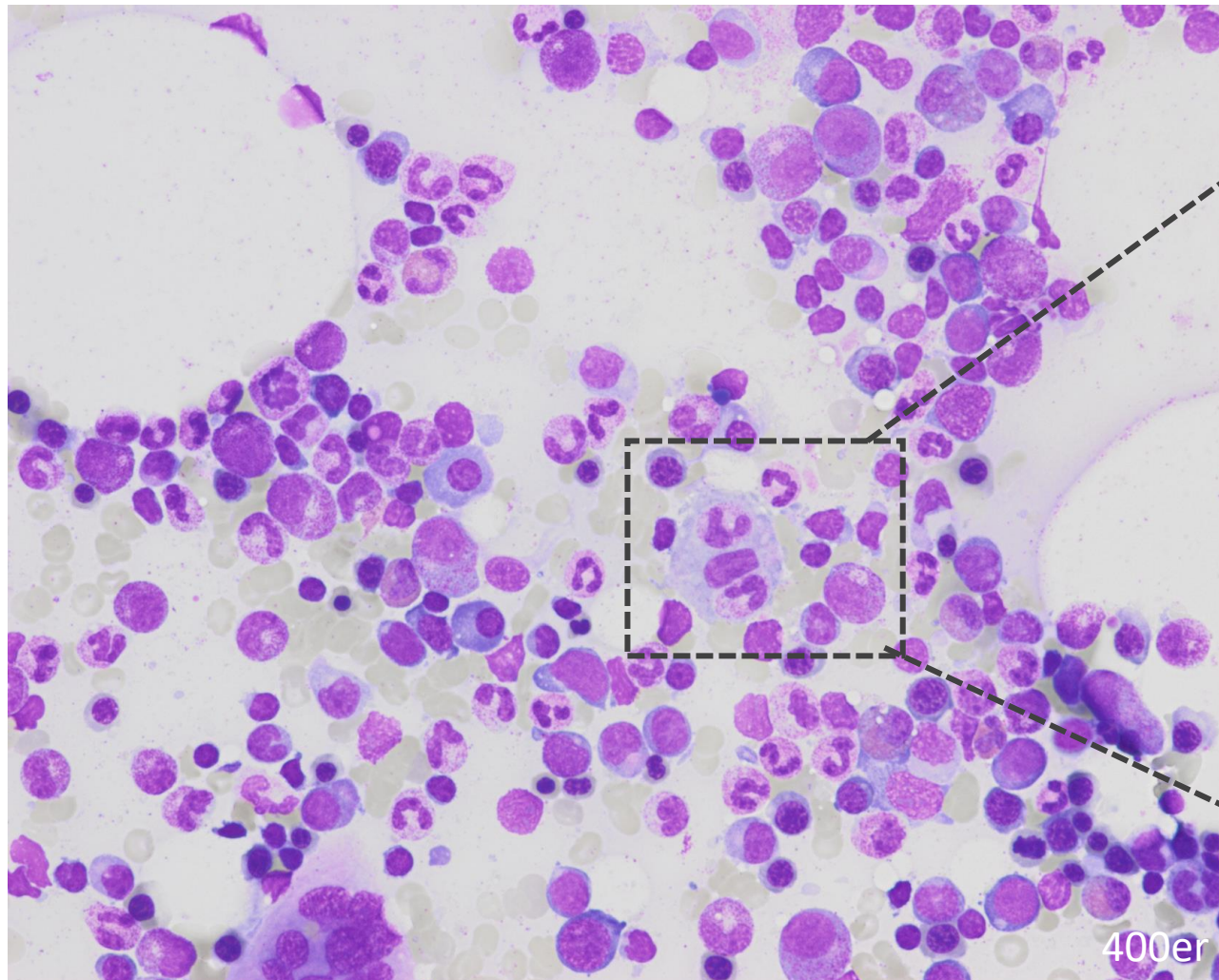


KM Zytologie



Erythrophagozytose

KM Zytologie

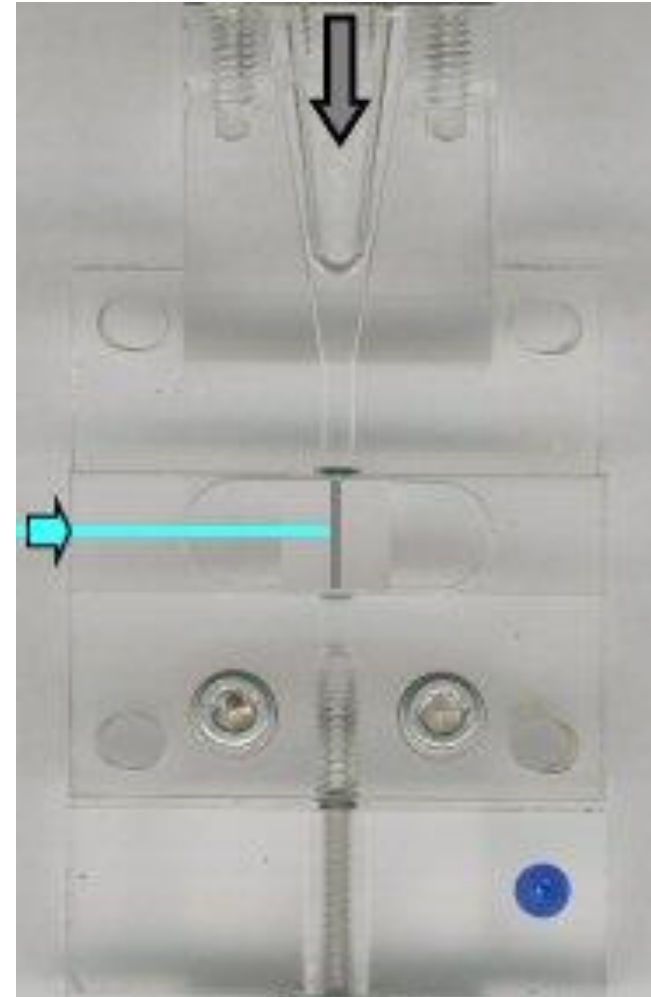


Durchflusszytometrie

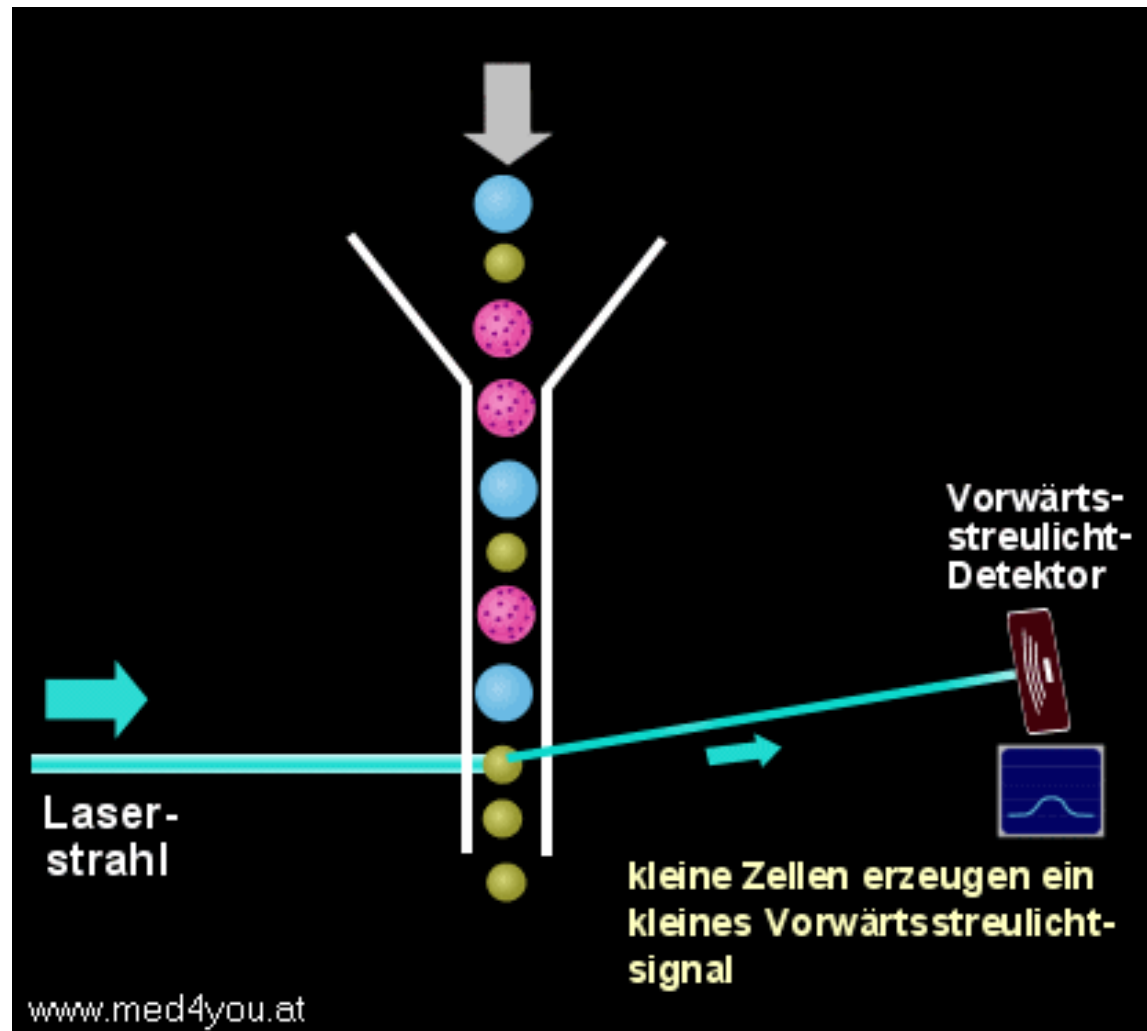


Flusszelle

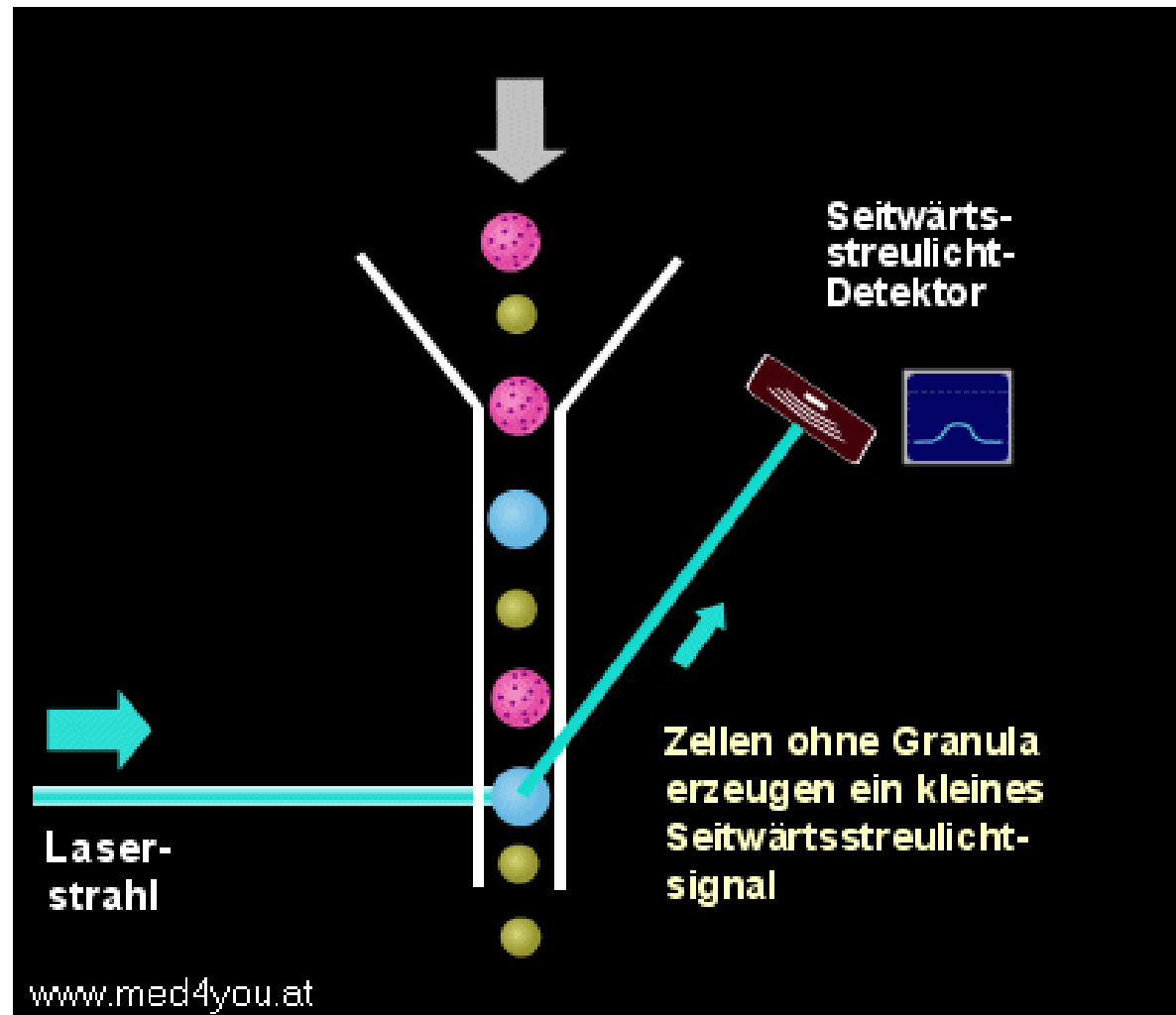
Die Zellen kommen von oben (grauer Pfeil) und fließen hintereinander durch die eigentliche **Flusszelle** (die Strecke innerhalb der Flusszelle ist durch einen grauen Strich gekennzeichnet). Dabei werden die Zellen von einem Laser von der Seite bestrahlt (blau eingezeichnet).



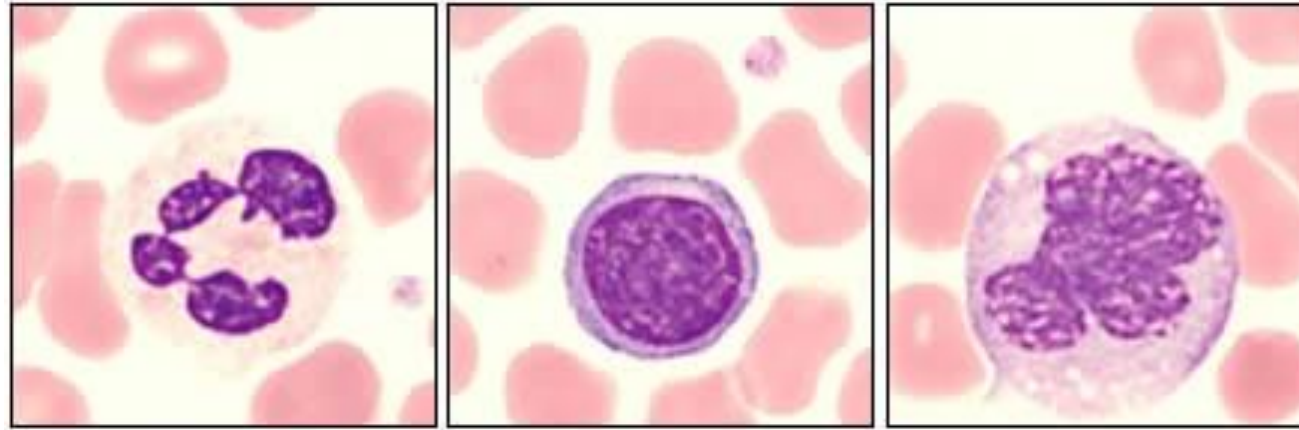
Vorwärtsstreulicht (FSC)



Seitwärtsstreulicht (SSC)



Interpretation von FSC und SSC

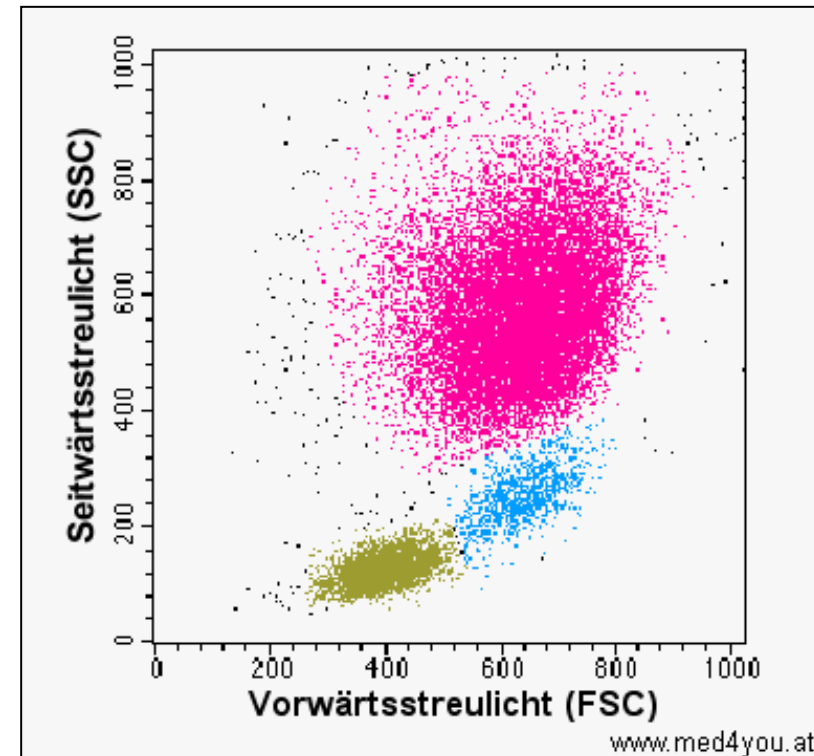
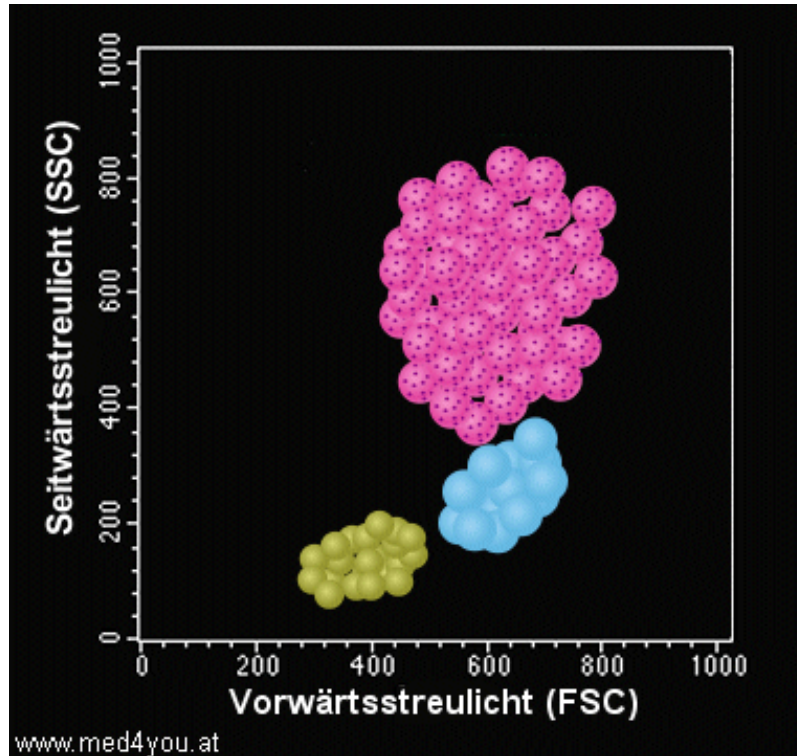


großer FSC
großer SSC

kleiner FSC
kleiner SSC

großer FSC
kleiner SSC

Dotblots



Bildquelle: www.med4you.at, Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Hübl

Markierung mit Antikörpern



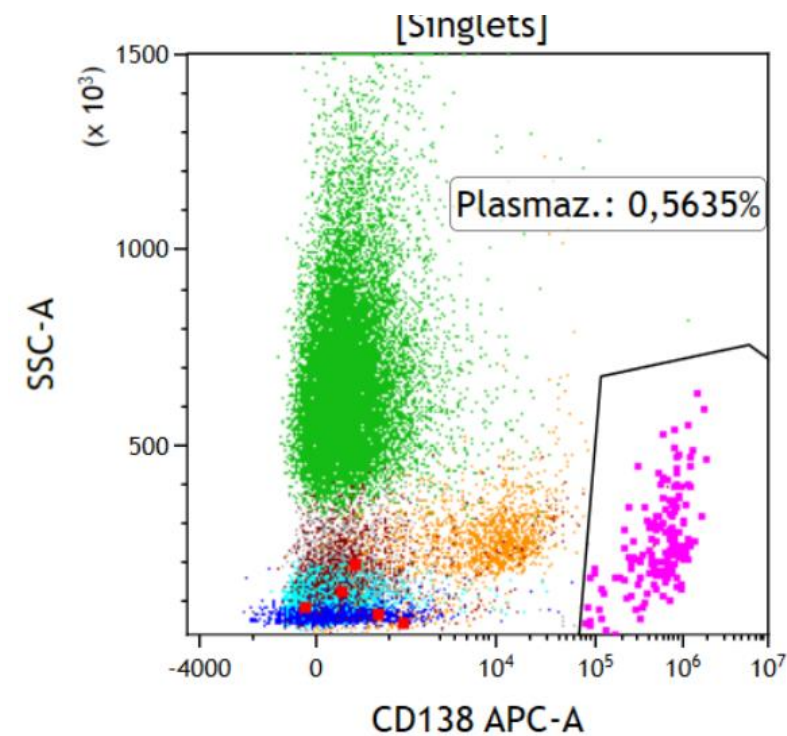
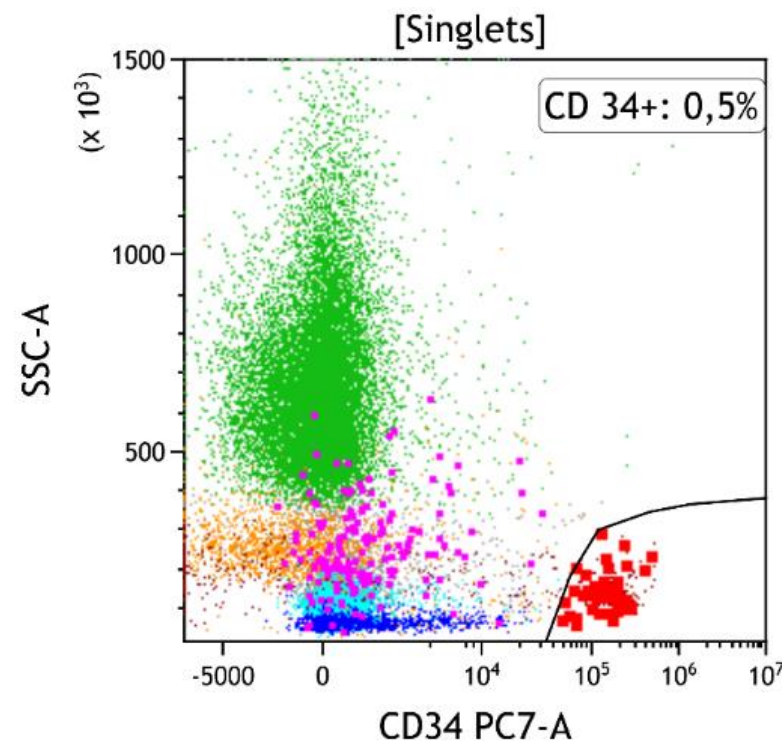
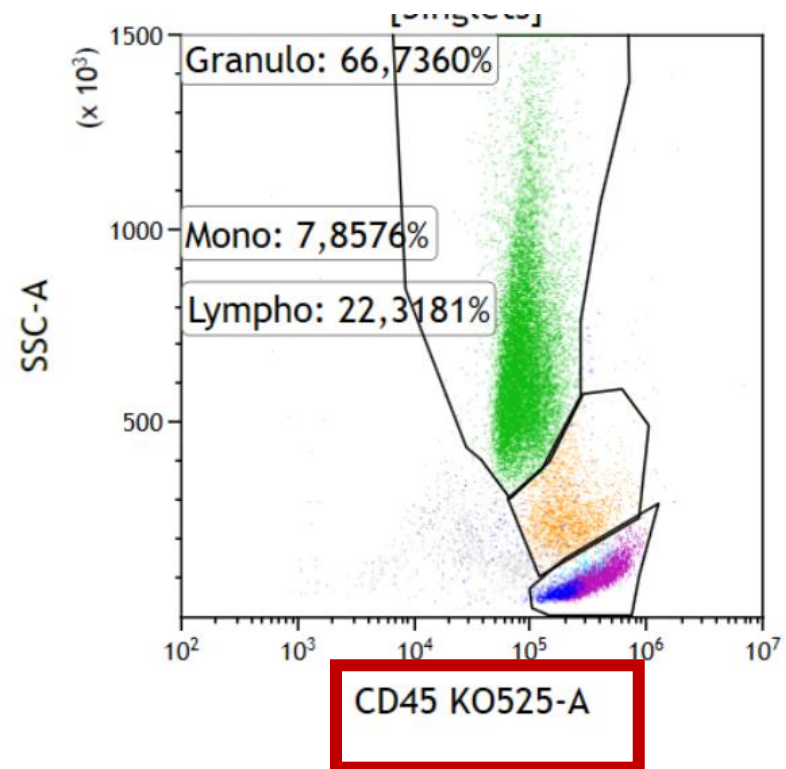
Antikörper

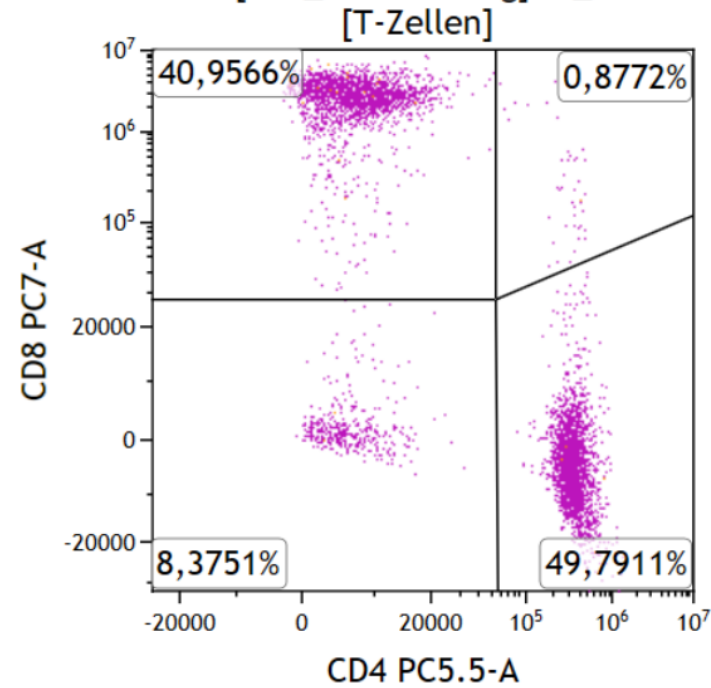
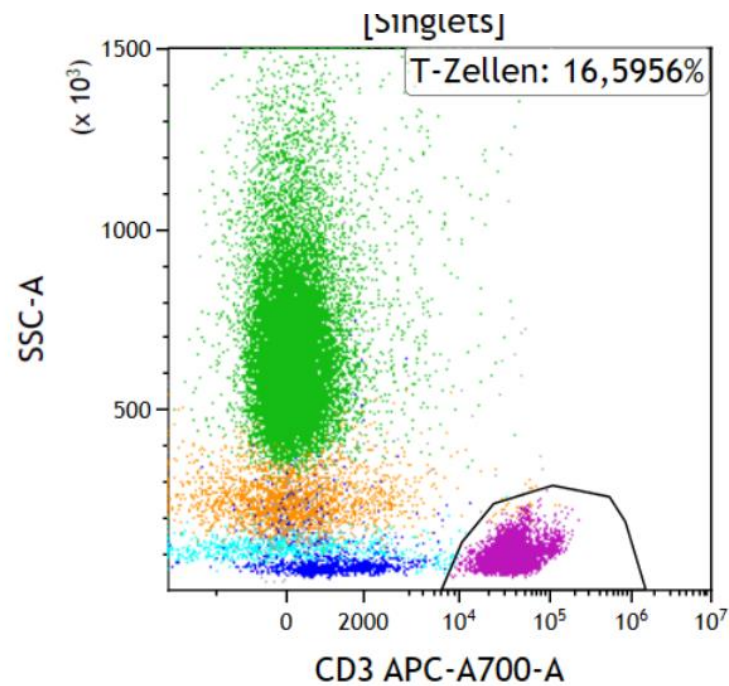
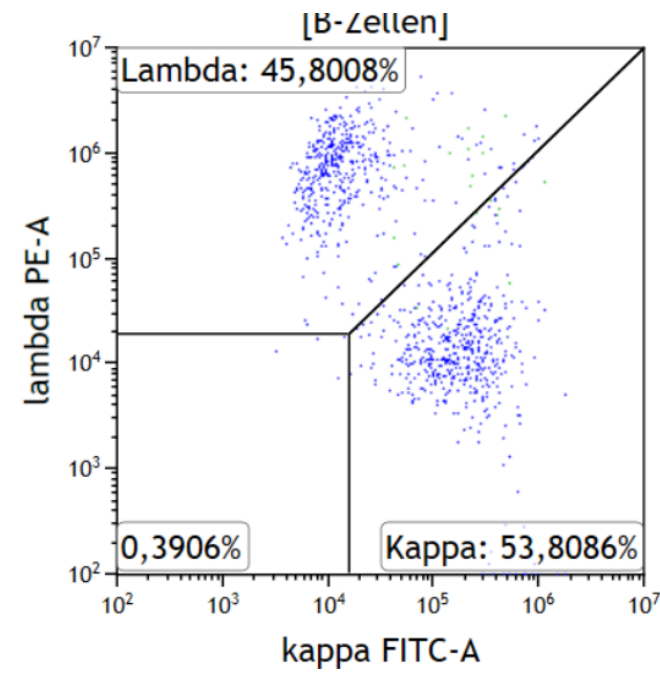
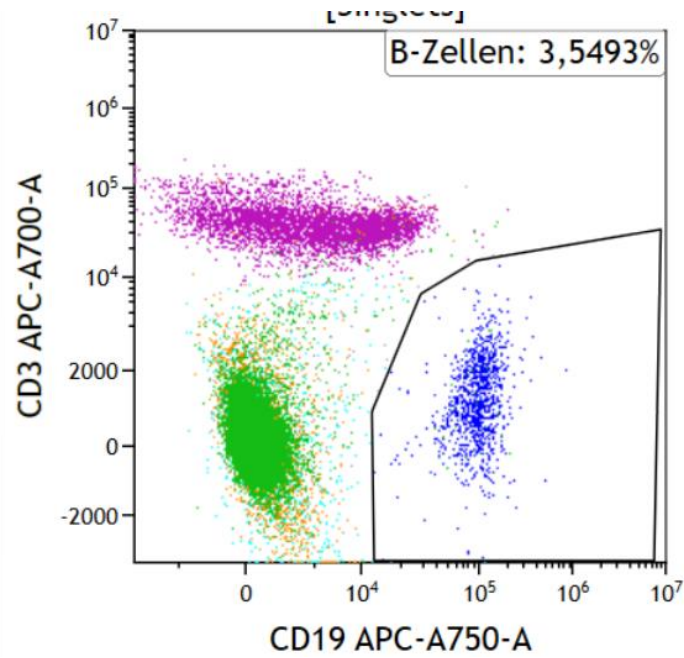


Inkubation



Lyse





UNTERSUCHTE MARKER:

CD3, CD4, CD5, CD8, CD13, CD14, CD16, CD19, CD20, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, CD138, kappa, lambda, HLA-DR

BEFUND:

64% der hämatopoetischen Zellen sind der Myelopoese zugehörig, dabei 6% mit monozytärer Differenzierung.

0,5% sind CD34-positive Vorläuferzellen.

Lymphatische Zellen: 3% polyklonale B-Zellen, 2% NK-Zellen, 16% T-Zellen.

0,6% sind Plasmazellen, der Rest sind kernhaltige erythrozytäre Zellen.

ERGEBNIS:

Durchflusszytometrisch unauffälliger Befund. Eine Zellpopulation mit pathologischem oder abnormem Markerprofil ist nicht nachweisbar.

HISTOPATHOLOGIE



Eva Maier

Institut für klinische Pathologie und Molekularpathologie

Vinzenz Pathologieverbund Ordensklinikum Barmherzige Schwestern Linz

Knochenmarkbiopsie

Präanalytik bis Histologie



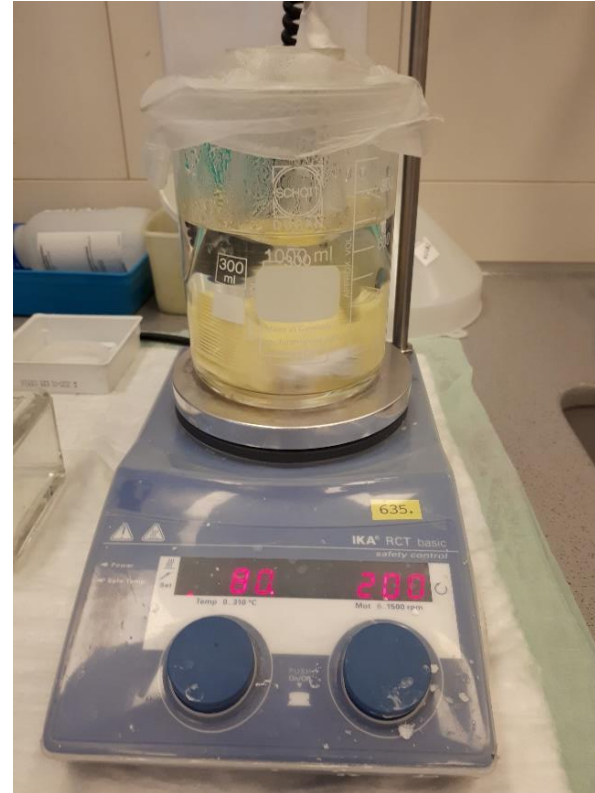
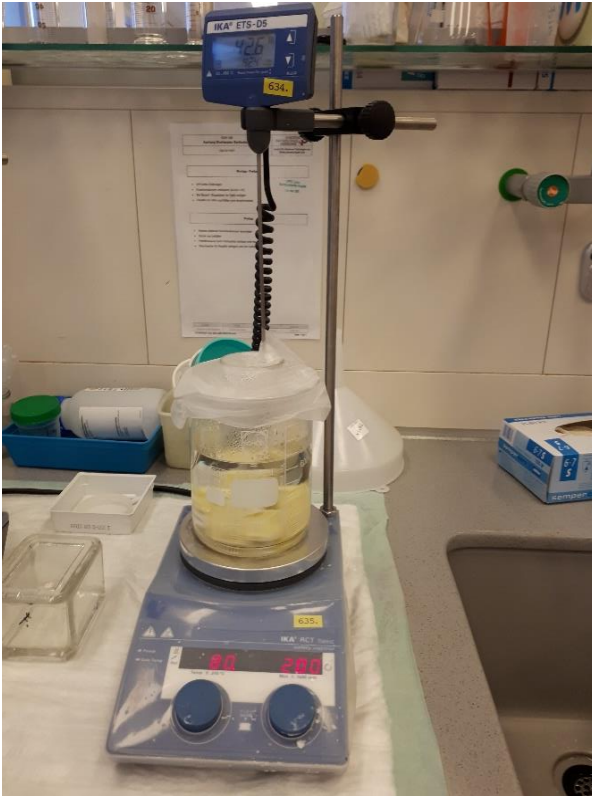
- Beckenkammbiopsie durch Internist*in
Spina iliaca posterior superior
- 20% gepuffertes Formalin
(PH-Wert 7,0 – 7,2)
- Transport ad Pathologie



→ fixiert über Nacht auf Rüttelplatte
in ständiger Bewegung

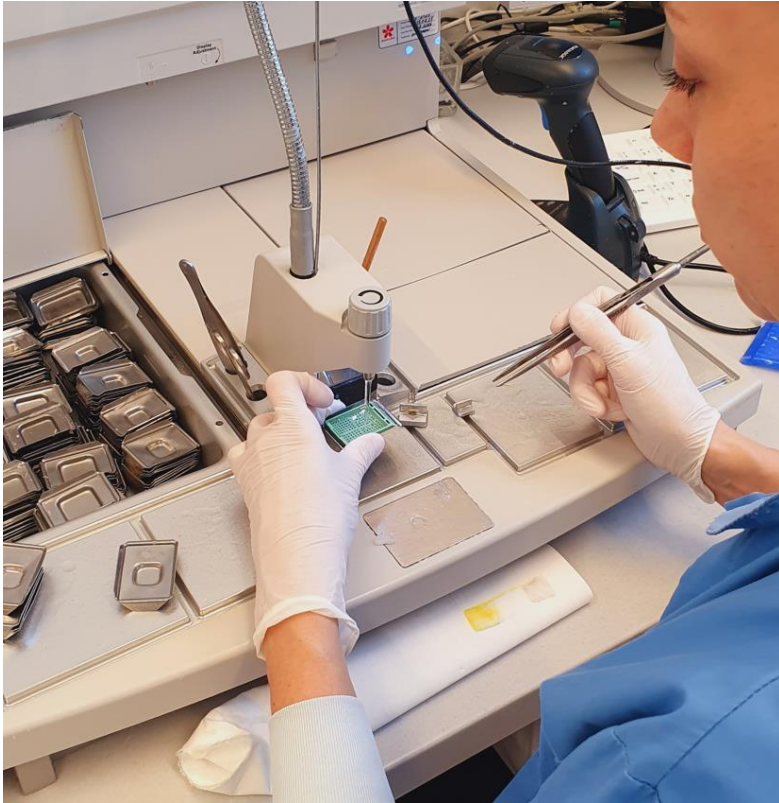


→ in Kasette einbetten



→ über Nacht
Fixierung in VIP,
Entwässerung
durch aufst.
Alkoholreihe,
Lösungsmittel
Xylol, Paraffin

→ in X-EDTA-Lösung 20 h auf Wärmeplatte

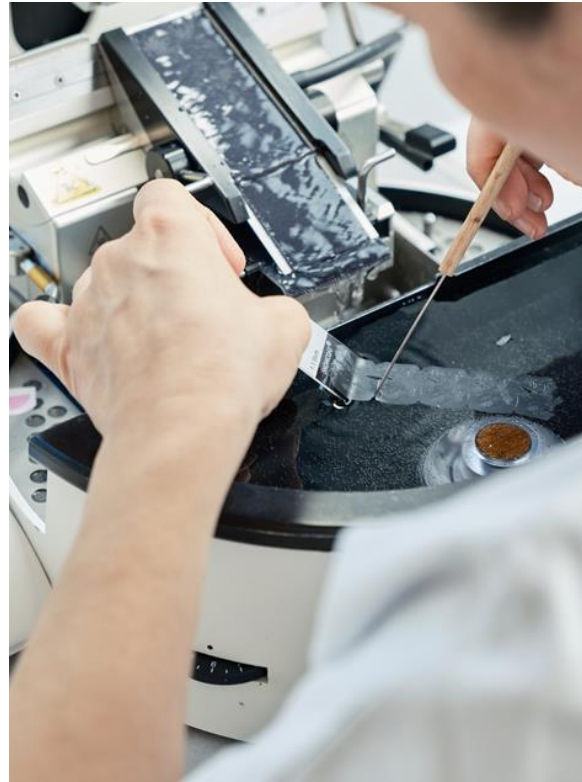


→ Ausgießen in Paraffinwachs,
Kühlen auf Gefrierplatte



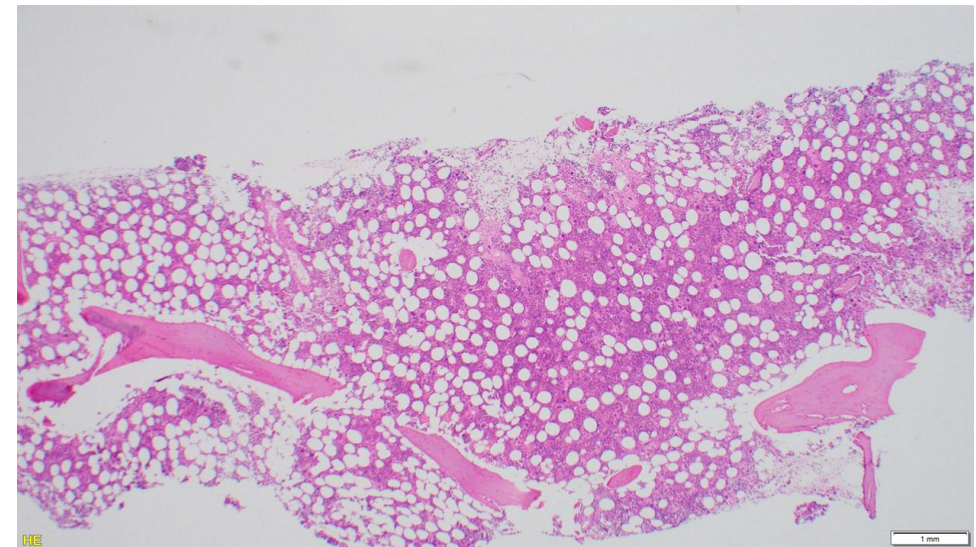
→ Paraffinblock





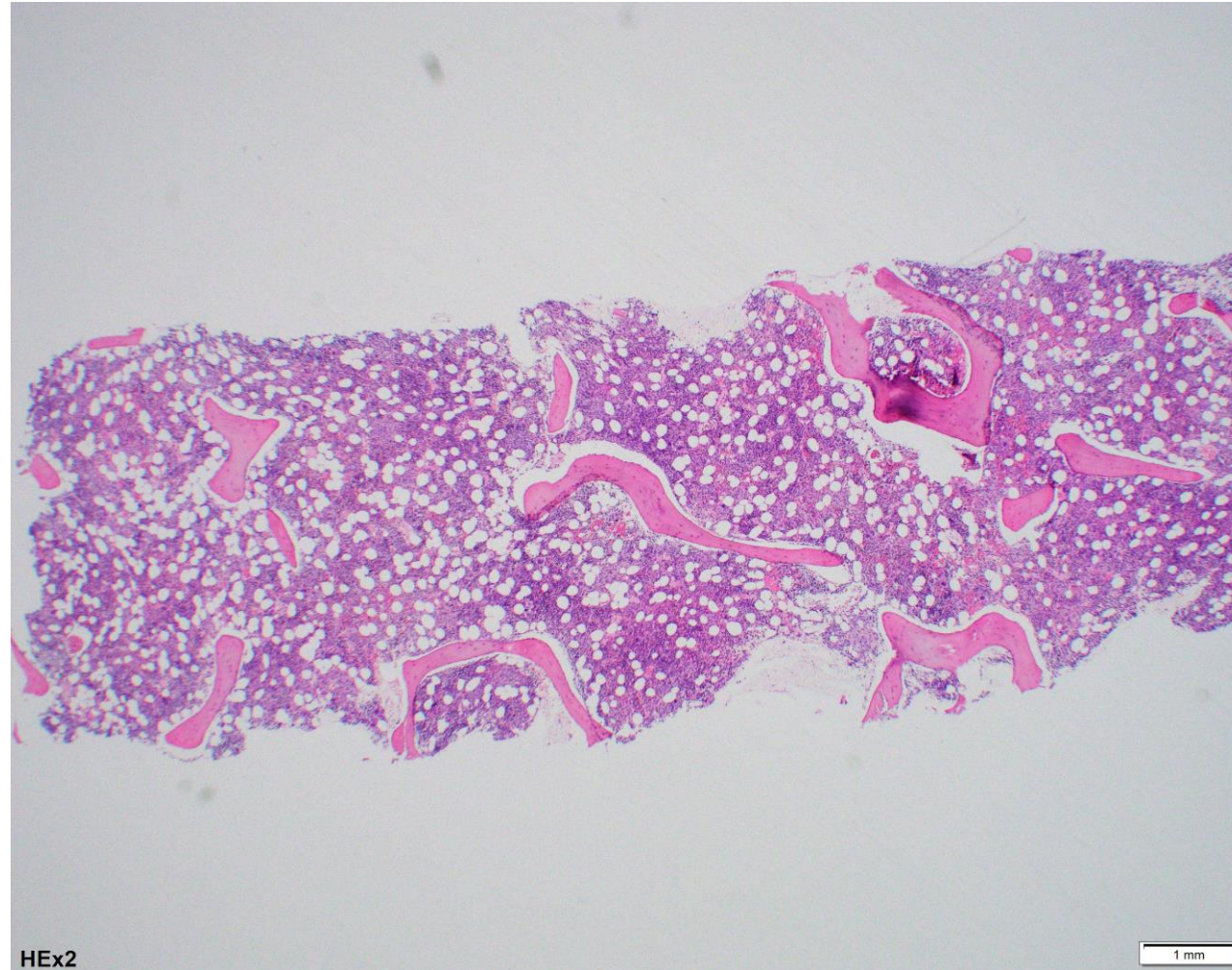
→ Schneiden am Mikrotom, 2 μ m dünner Paraffinschnitt, auf Objektträger aufgezogen

Histologischer Schnitt



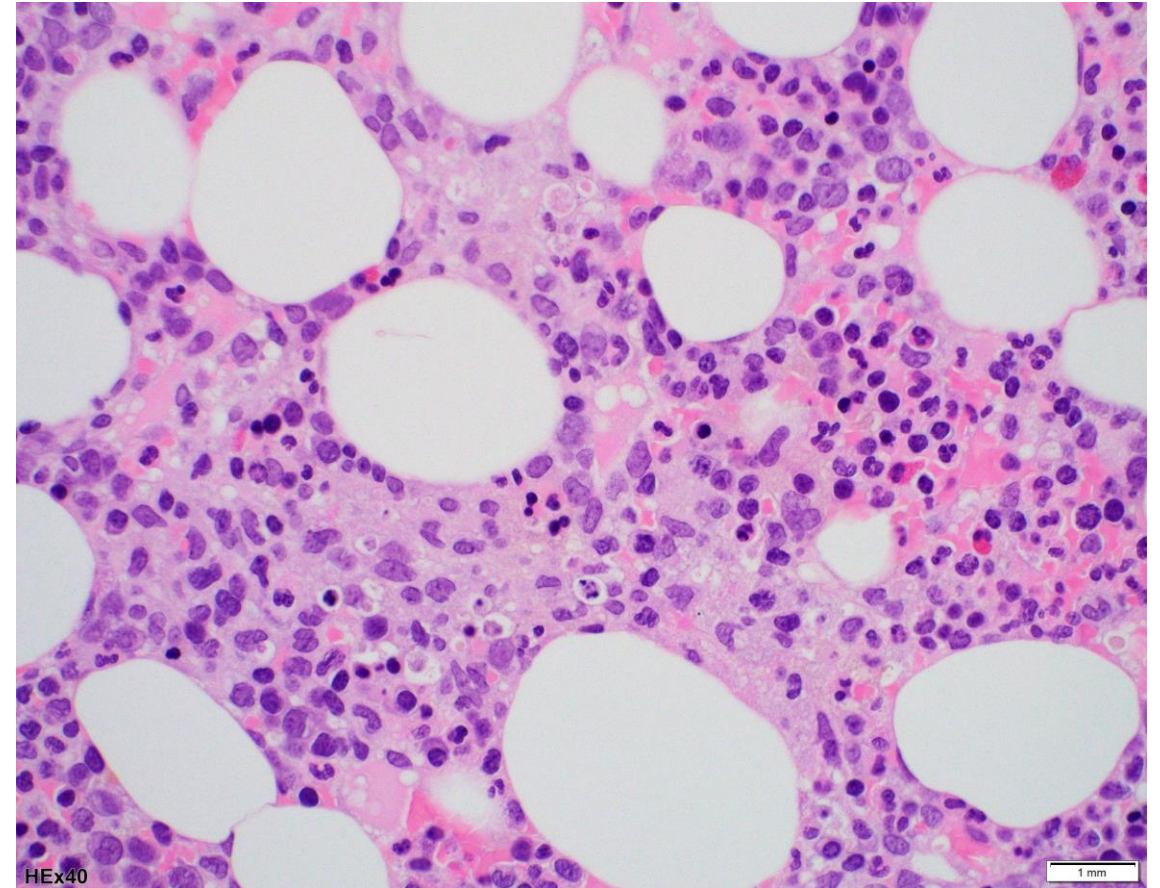
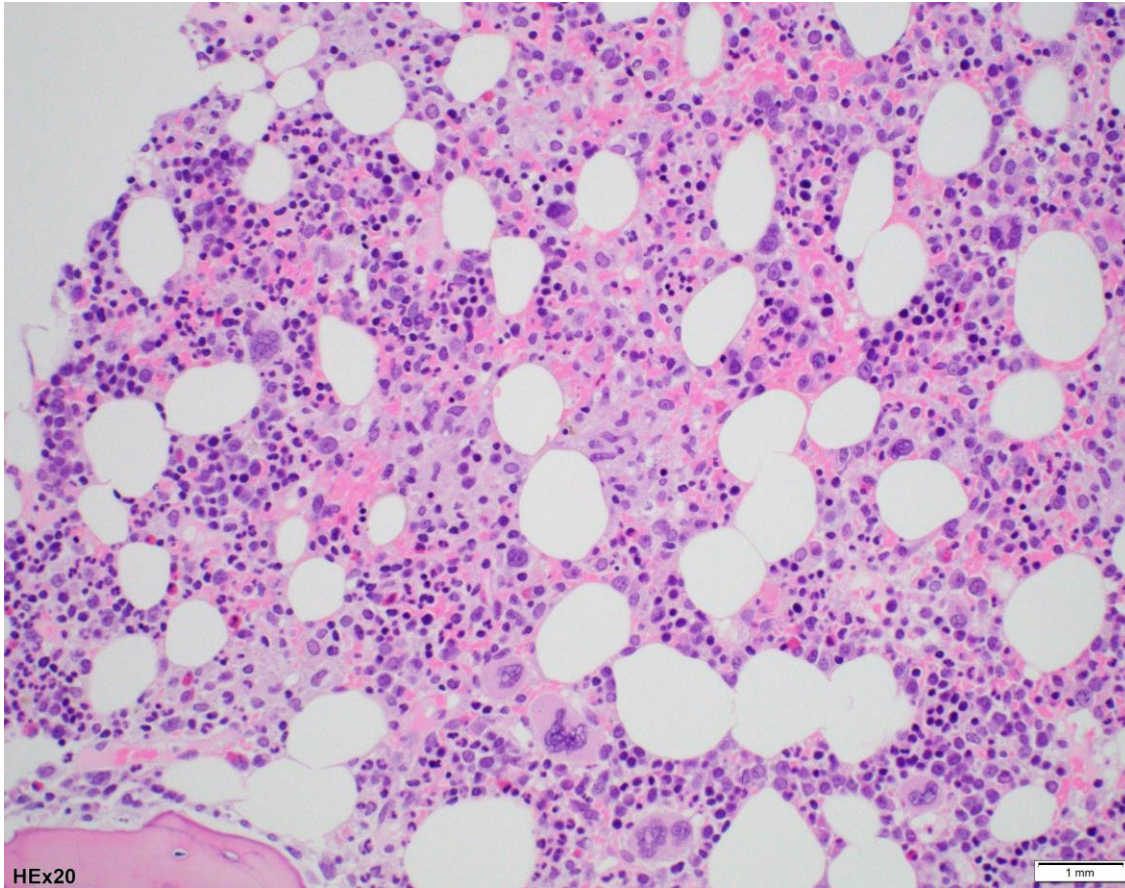
HISTOLOGIE Knochenmark

Patient, geb. 1989



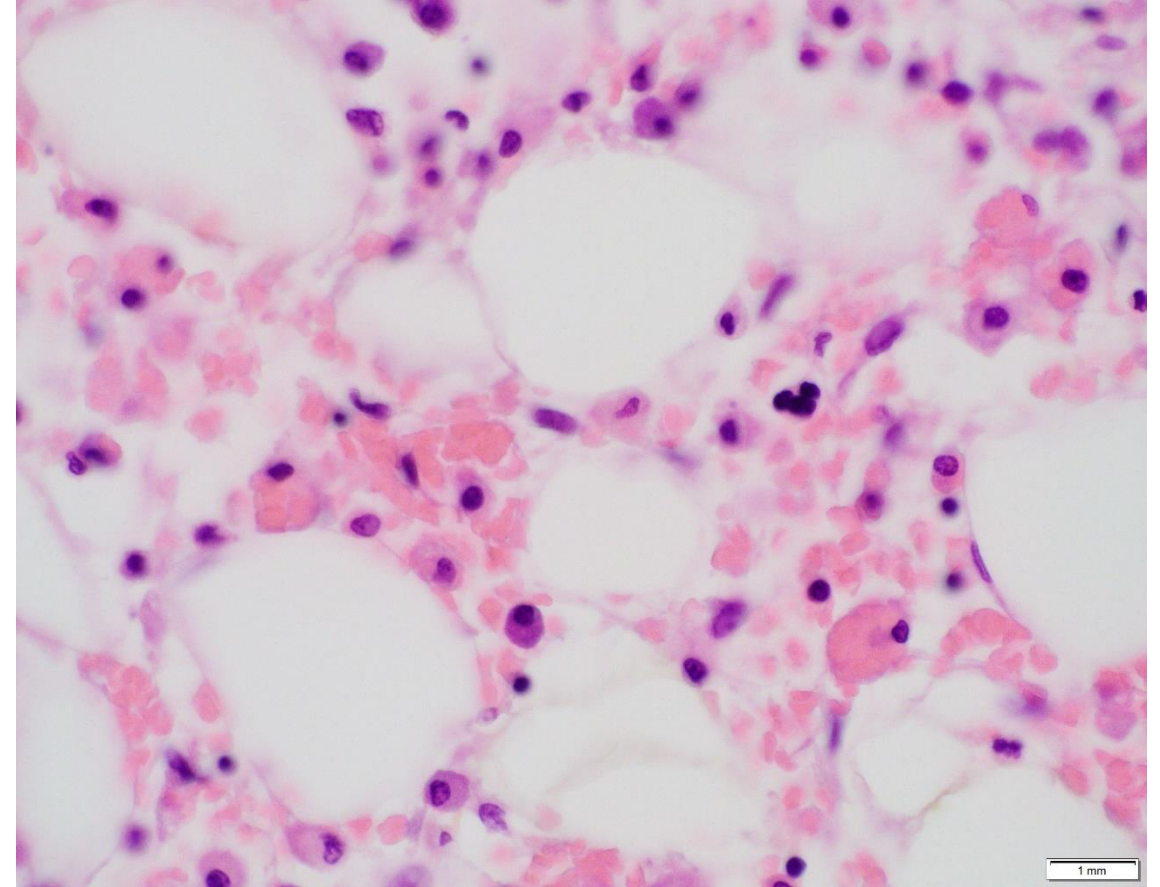
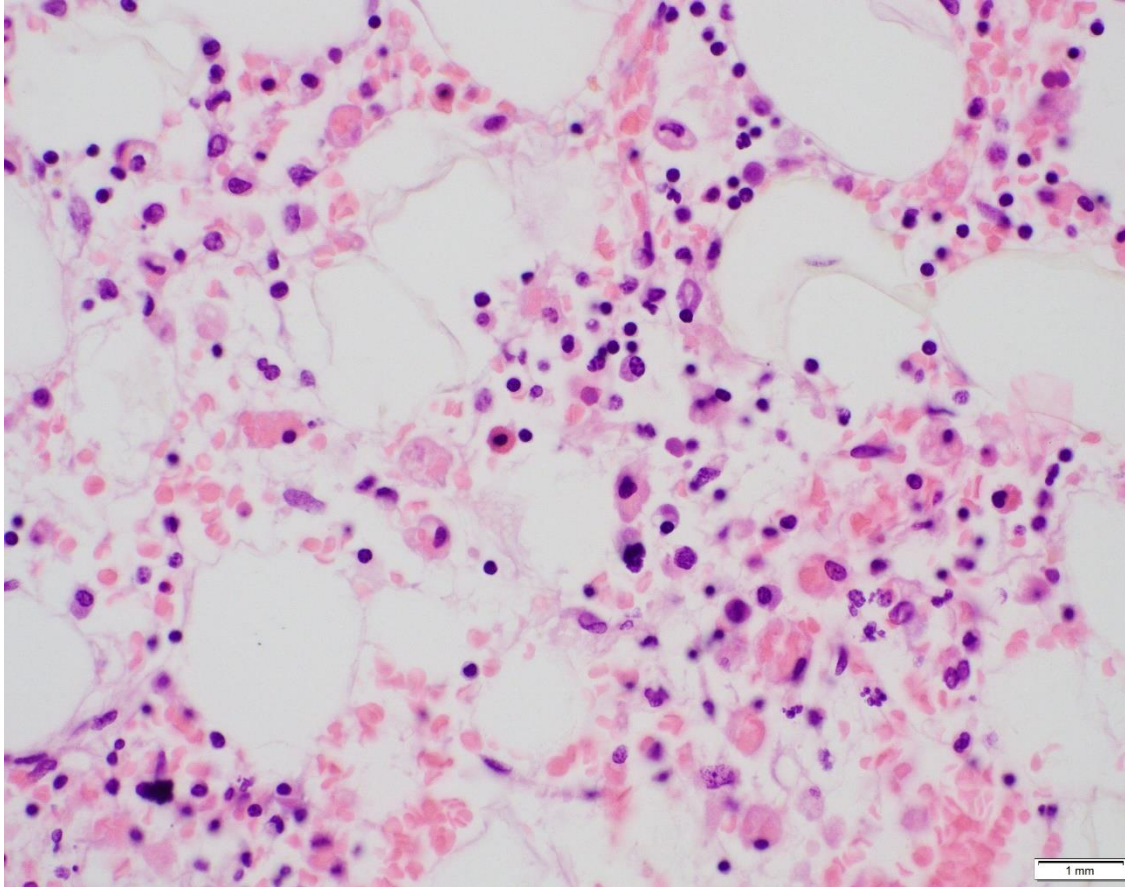
hyperzellulär

Patient, geb. 1989



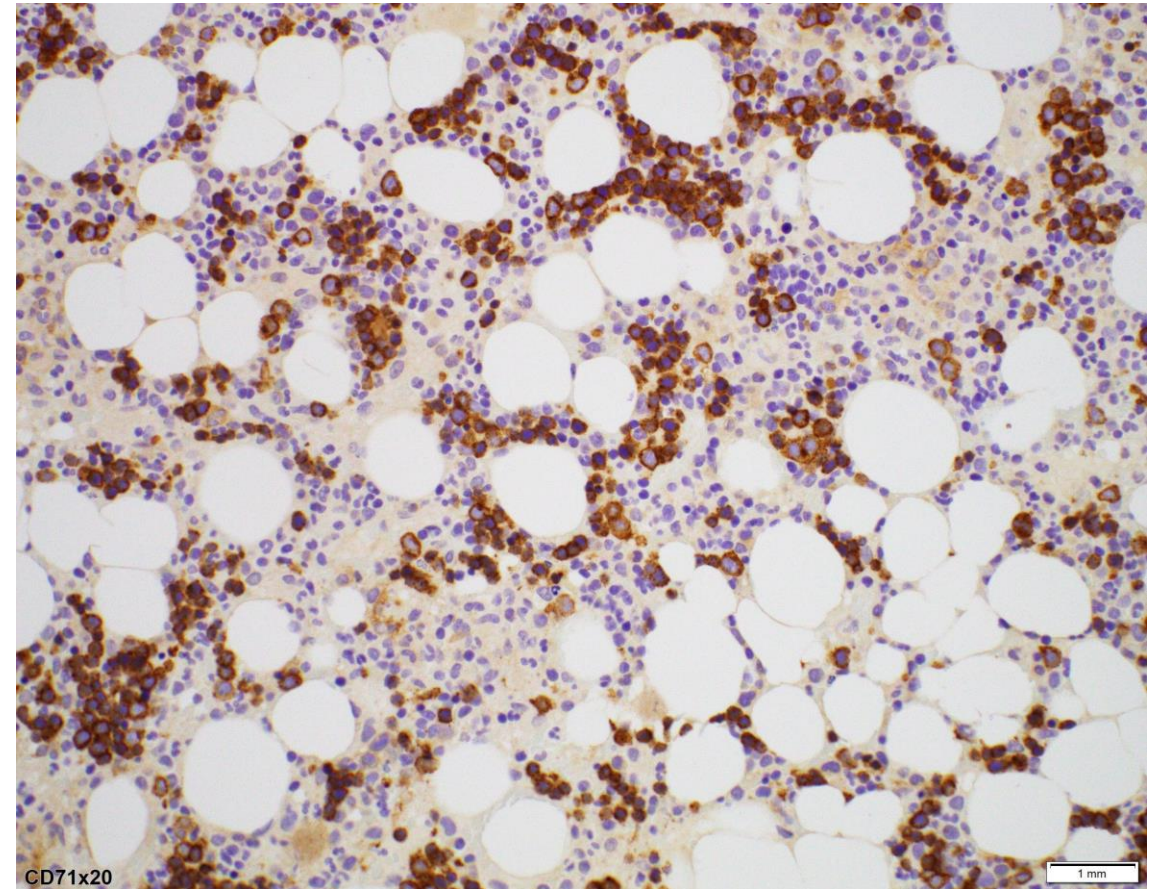
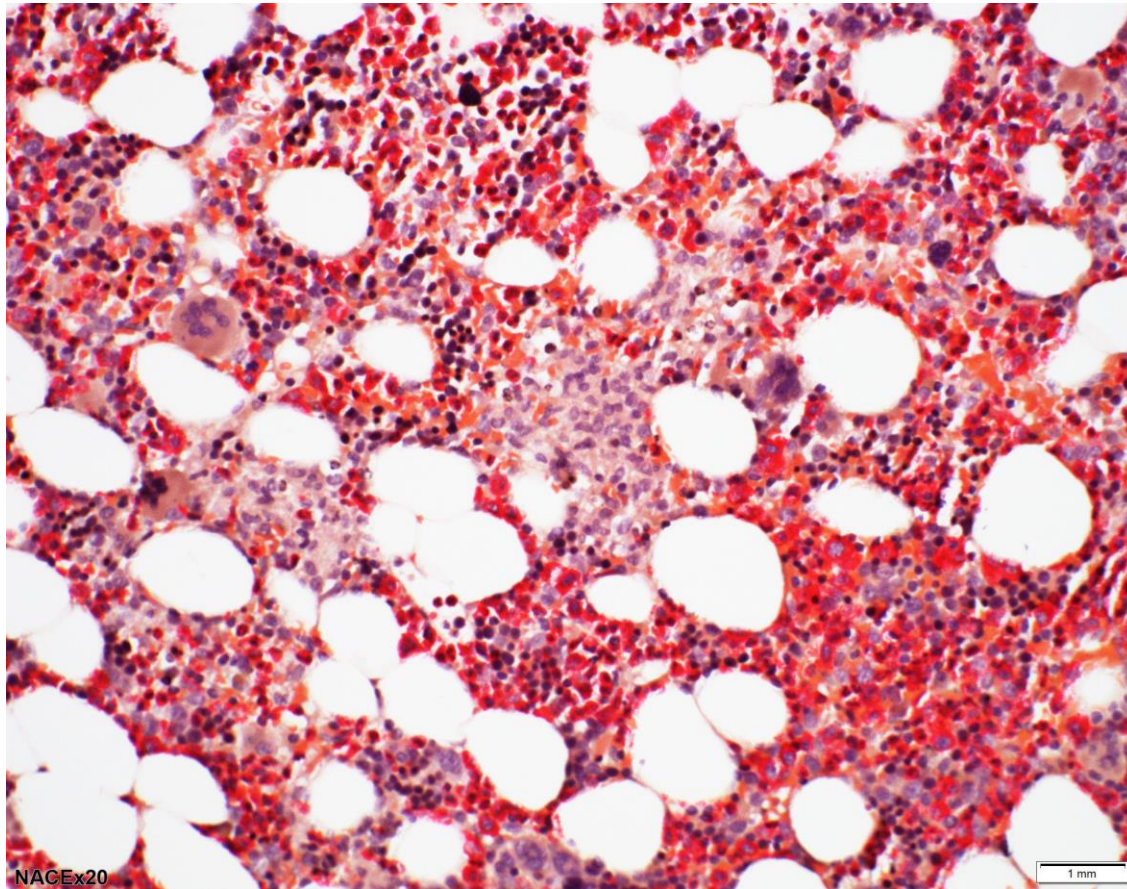
Epitheloidzellgruppen / kleine Granulome

Hämo-/Erythrophagozytose

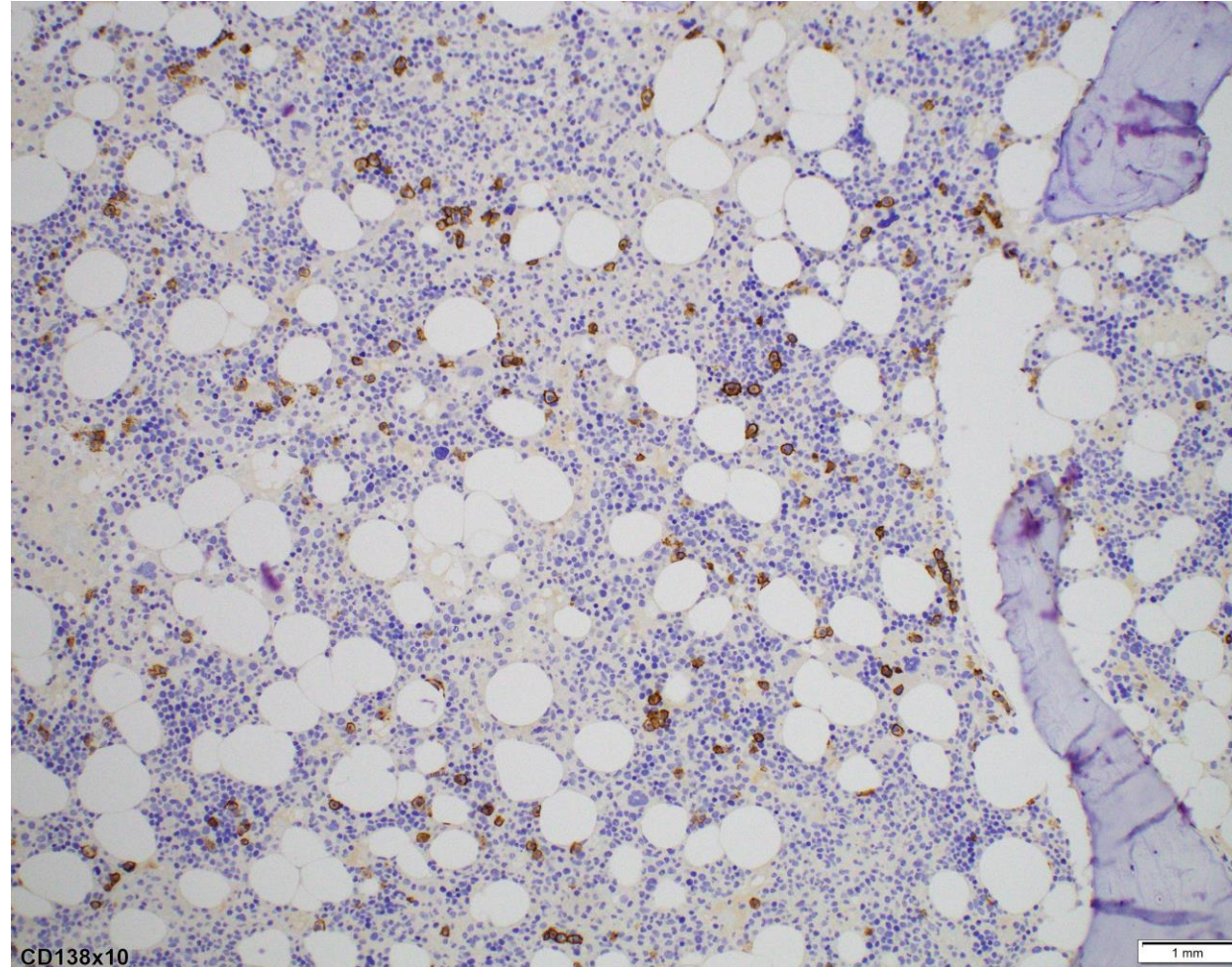


Beispielsfall

Patient, geb. 1989



Patient, geb. 1989



geringe Vermehrung von Plasmazellen

REAKTIVE VERÄNDERUNGEN / INFEKT-assoz.

Histologie Knochenmark

- Hyperzelluläres Knochenmark
- Gesteigerte Granulopoese, Atypien in Erythropoese

Hochgradig hyperzelluläres Knochenmark mit massiver Vermehrung histiocytyärer Zellformen mit Ausbildung nicht verkäsender Granulome und breiter paratrabekulär angeordneter Bänder, Nachweis von Erythrophagocytose (nachgewiesene Brucellose - Infektion).

- Hämophagozytose



**Ordens
klinikum
Linz**

Labor für
Molekulargenetische
Diagnostik

NGS

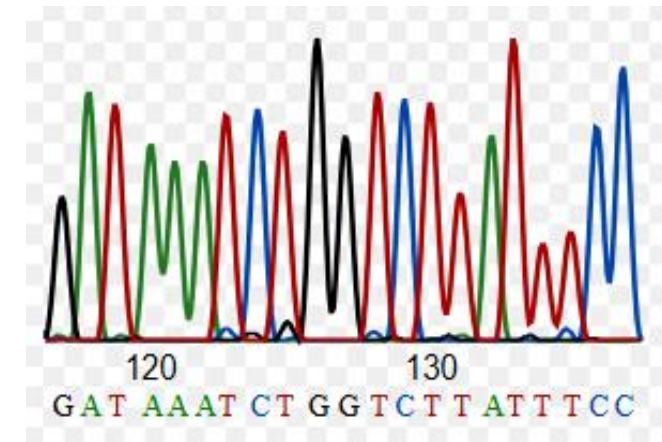
Laura Lamplmayr, Barbara Zellhofer

Zuweisung zur hämato-onkologischen Diagnostik

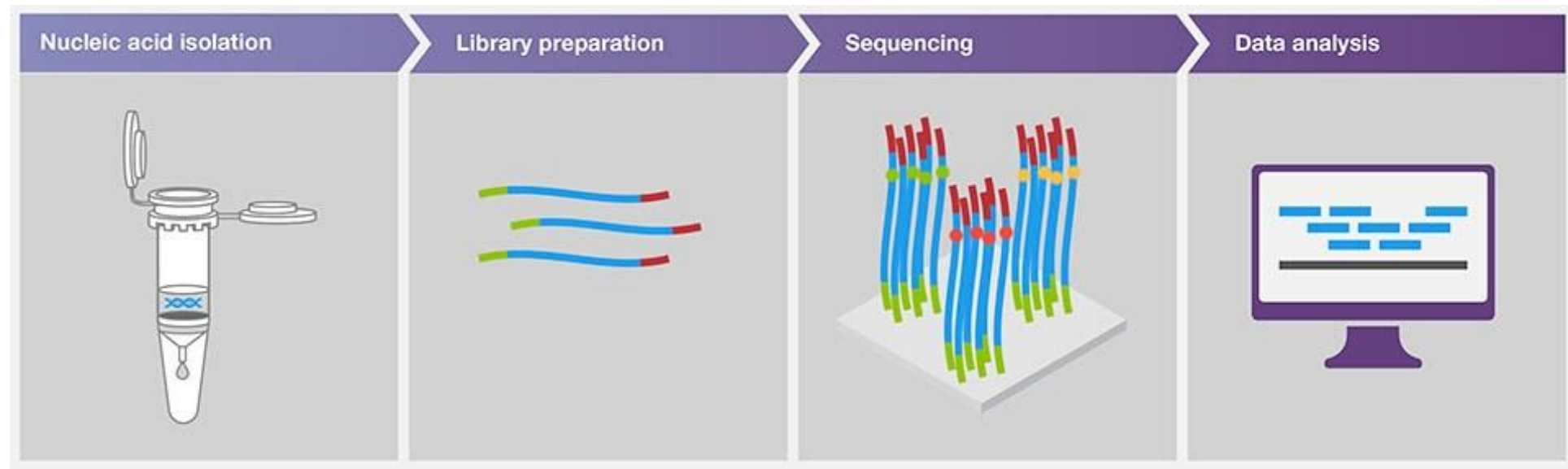
Absender (bitte genaue Anschrift)	Material (Express Versand ungekühlt)
	EDTA für Molekulargenetik, Heparin für Zytogenetik/FISH ☐ Peripheres Blut (10 ml) E/H ☐ Sonstiges:..... ☒ Knochenmark (je 5 ml EDTA und Heparin) ☒ ☐ Paraffinschnitte auf Objektträger (entparaffiniert) HistoNr.: ☐ Paraffin Röllchen (Röhrchen mit 5 Schnitten je 10µM) Stempel / Kontaktperson: Datum/Zeit der Probenentnahme: 5.7. 2025
Klinische Angaben / Diagnose: (Anteil pathologischer Zellen: %)	
U.2 HLH DD infektios. ☐ Sonstiges:..... ☐ Therapie:.....	
Zytogenetische Analysen (Heparin, unbedingt ungekühlt)	
☒ konventionelle Zytogenetik (aus Knochenmark obligat) ☐ FISH ☐ high grade B-NHL-FISH MYC,BCL2,BCL6 ☐ CLL-FISH-Panel del13q,ATM,TP53,+12 ☐ MCL: CyclinD1/IGH-FISH t(11;14)(q13;q32) ☐ Myelom-FISH 1p32/q21, CCND1,IGH, ggf. TP53, FGFR3 ☐ Burkitt: MYC- o. MYC/IGH-FISH t(8q24) o. t(8;14) ☐ HES : PDGFRα/PDGFRβ/FGFR1-FISH	
Molekulargenetische Analysen (EDTA)	
Stammzell-Transplantation Spender: ☐ ♀ ☐ ♂ ☐ Chimärismus Nachweis	
Myeloische Erkrankungen	Lymphatische Erkrankungen
☒ NGS Hämatoonkologiepanel z.B. IDH1/2, MPL, NPM1, SF3B1, TP53, ... 55 Gene, siehe Genlisten Paneldiagnostik LMGD Homepage Diagnose/Prognose SM ☐ KIT D816V PCR (auch Monitoring) CML ☐ BCR::ABL1-Mutationsanalyse bei TKI-Resistenz MPN ☐ CALR PCR (auch Monitoring) ☐ JAK2 V617F qPCR (auch Monitoring) ☐ JAK2 Exon12-Sequenzierung AML/ MDS ☐ Multiplex PCR (31 Translokationen) ☐ dupMLL (KMT2A-PTD) PCR (auch Monitoring) ☐ FLT3 ITD PCR ☐ IDH1-R132 PCR Monitoring ☐ Split-out PCR für:..... ☐ BCR::ABL1 bei CML ☐ PML::RARA ☐ RUNX1::RUNX1T1 ☐ NPM1 exon12 ☐ CBFB::MYH11 ☐ WT1	☐ NGS Hämatoonkologiepanel z.B. CXCR4, MYD88, NOTCH1, STAT3, TP53, ... 55 Gene, siehe Genlisten Paneldiagnostik LMGD Homepage NHL ☐ Immunglobulin-Rearrangement (Klonalität) ☐ T-Zellrezeptor-Rearrangement (Klonalität) FCL ☐ t(14;18) BCL2 PCR CLL ☐ IGHV-Mutationsstatus HCL ☐ BRAF V600E PCR MCL ☐ CyclinD1 qPCR ☐ SOX11 qPCR ALL Diagnose/Prognose ☐ BCR::ABL1-Mutationsanalyse bei TKI-Resistenz ☐ Multiplex PCR (31 Translokationen) Monitoring ☐ Split-out PCR für:..... ☐ BCR::ABL1 bei ALL ☐ ALL MRD Patienten-spezifische Assays ☐ Entwicklung ☐ Verlauf

NGS

- = Next Generation Sequencing
- Weiterentwicklung zur Sanger-Sequenzierung
- Hochdurchsatzmethode
- Parallele Sequenzierung
- kosteneffizient und schnell
- Sequenzierung von Genomen, Exomen, Genpanels



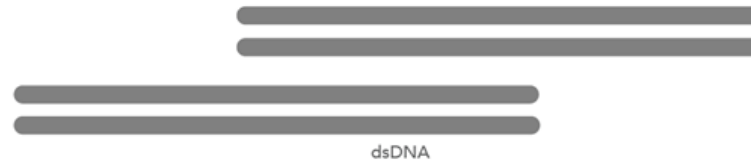
Illumina NGS Workflow



<https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/next-generation-sequencing/illumina-workflow.html>

Library Preparation

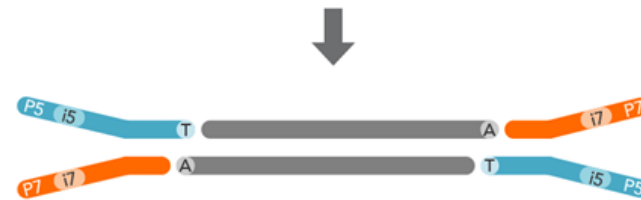
Fragmentation



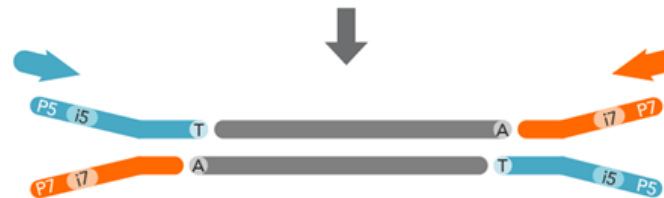
End repair and A-tailing



Ligation

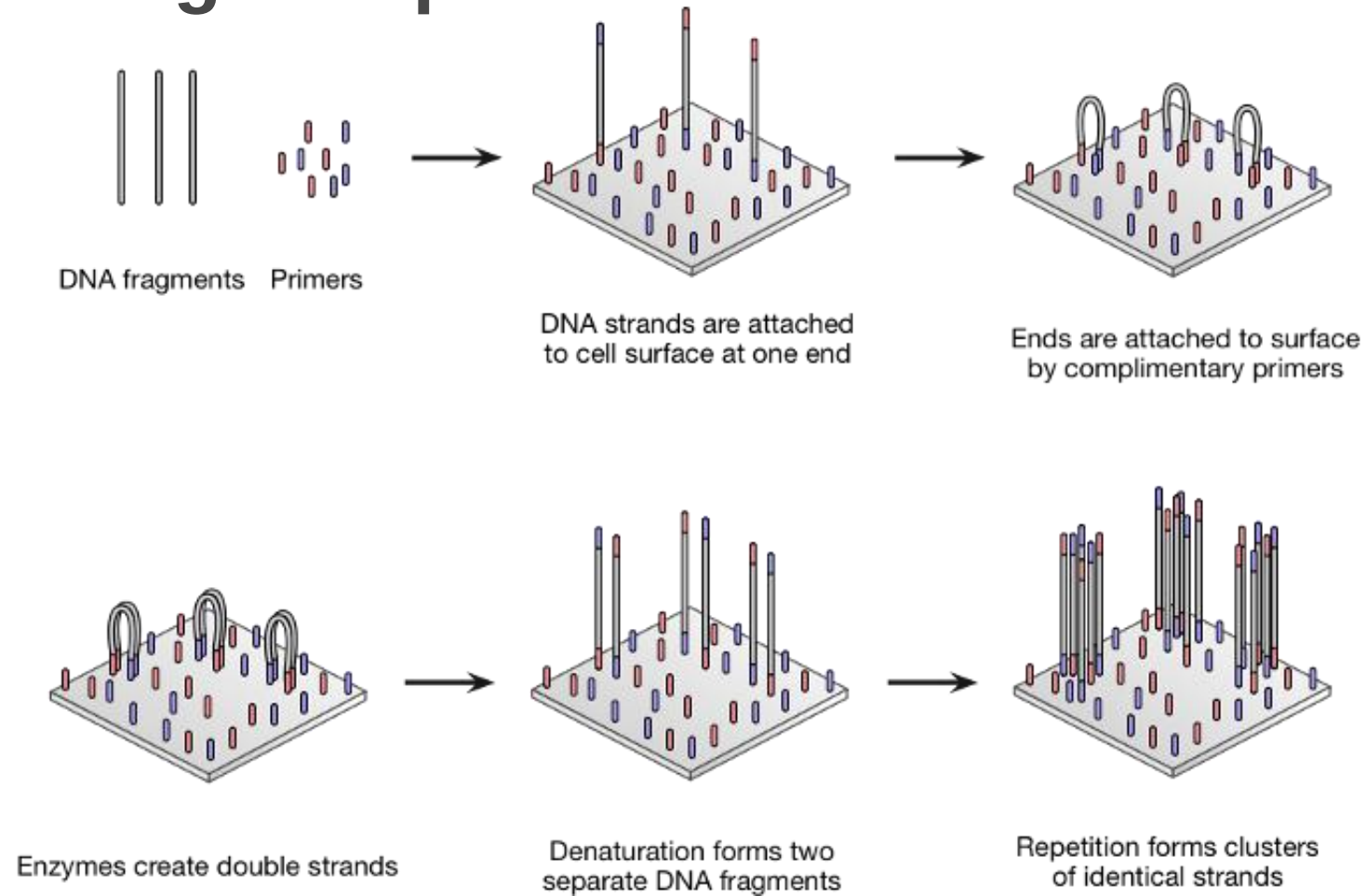


PCR amplification



https://sfvideo.blob.core.windows.net/sitefinity/images/default-source/default-album/decoded-temp-image-storage/19_ng_lib-prep-frag.png?sfvrsn=9e0a1b07_4

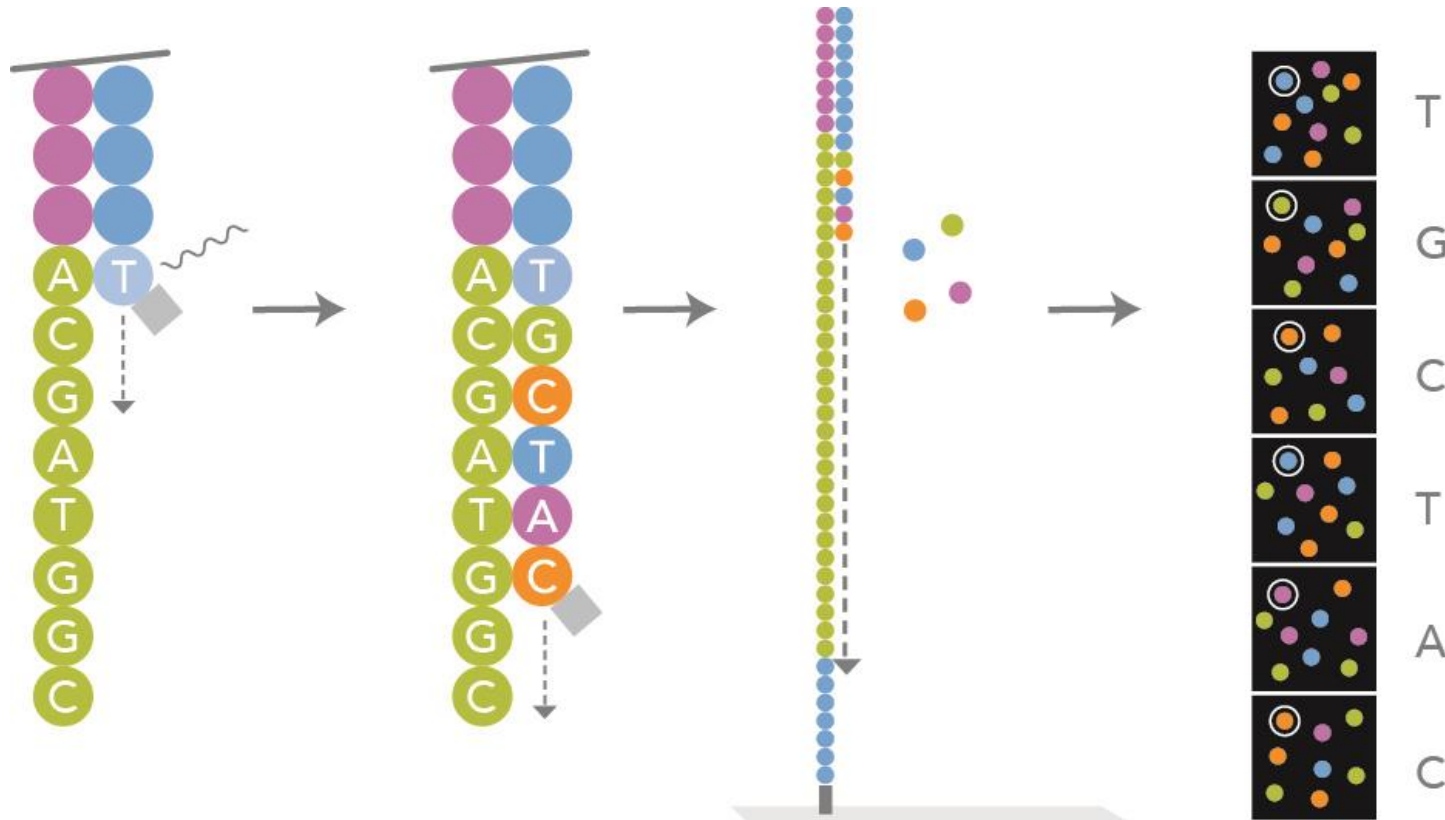
Bridge Amplification



Flow Cell NextSeq

<https://frontlinegenomics.com/dna-amplification-techniques/>

Sequencing by synthesis



Datenanalyse

- Bioinformatische Analyse mit Hilfe von Auswertesoftware
- Reads (mind. 1000 pro sequenzierten Bereich) werden in FASTQ-Datei abgespeichert und mit Qualitätsscore versehen
- Reads werden zusammengesetzt und einem Referenzgenom zugeordnet (Alignment)
- Variant Calling (Unterschiede zu Referenzsequenz)
- Bewertung und Klassifikation der Varianten (Pathogenität)

Klassifizierung der Varianten

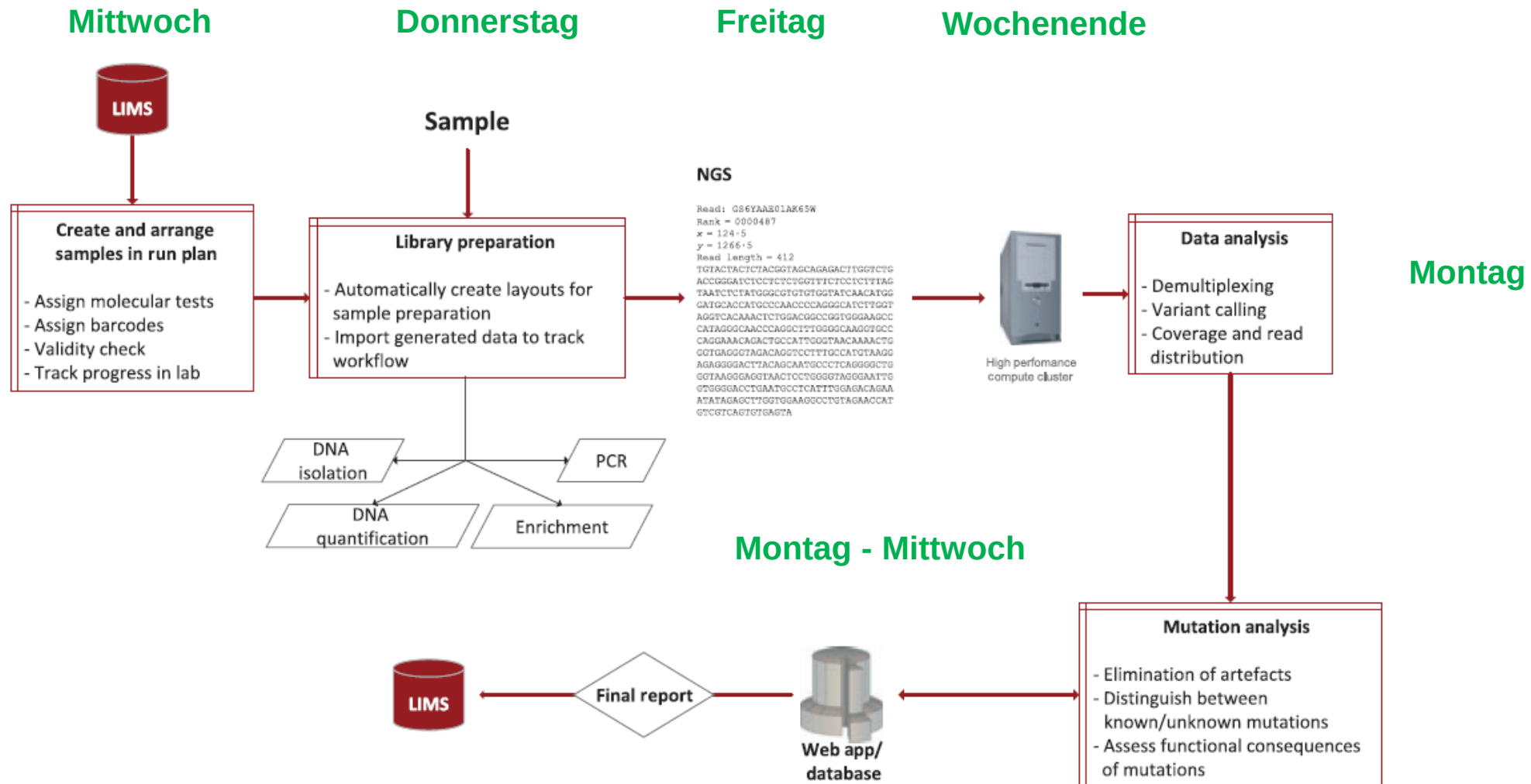
Klasse	Kategorie	Wahrscheinlichkeit der Pathogenität
5	Pathogen	>99%
4	Wahrscheinlich pathogen	90-99%
3	Variante unklarer Signifikanz (VUS)	10- 90%
2	Wahrscheinlich benign	1-10 %
1	Benign	< 1 %

Beispiel für NGS-Report

SNVs/INDELS CNVs FUSIONS WARNINGS																
Variant List - sorted by: Prediction>Pathogenicity class>Gene																
P	P...	★	!	T...	Gene	Coding consequence	c.DNA	Depth	VF%	ref	alt	RefSeq Id	Protein	Exon ID	dbSNP	
A	5	★		INDEL	ASXL1	frameshift	c.1900_1922del	3326	4.50	TCACC...	T	NM_015338	p.(Glu635Argfs*15)	13	rs7664...	.
A	5	★		INDEL	TET2	frameshift	c.4317dup	4358	24.20	GAAAAAA	GAAAA...	NM_001127208	p.(Arg1440Thrfs*38)	10	rs7779...	.
B	5	★		SNP	SRSF2	missense	c.284C>A	3483	25.20	G	T	NM_003016	p.(Pro95His)	1	rs7517...	.
B	4	★		SNP	TET2	missense	c.4138C>T	3609	4.20	C	T	NM_001127208	p.(His1380Tyr)	9	rs5778...	.
B	3	★		SNP	TET2	missense	c.3893G>C	4021	4.60	G	C	NM_001127208	p.(Cys1298Ser)	7	rs1488...	.
B	2		!	SNP	CEBPA	missense	c.292A>C	1361	4.20	T	G	NM_004364	p.(Thr98Pro)	1	rs2145...	.
B	2			SNP	CREBBP	missense	c.2728A>G	3618	50.10	T	C	NM_004380	p.(Thr910Ala)	14	rs1432...	.
B	1			SNP	CSF3R	missense	c.2092C>T	4978	47.90	G	A	NM_156039	p.(Arg698Cys)	17	rs3918021	.
C	3	★		INDEL	STAG2	intronic	c.1732-12del	2309	99.50	CTTT	CTT	NM_001042749	p.(=)	19		.
C	2			SNP	BCORL1	synonymous	c.882G>A	1877	99.30	G	A	NM_001379451	p.(Pro294=)	4	rs2005...	.
C	1			SNP	NOTCH1	3'UTR	c.*126G>A	4247	48.40	C	T	NM_017617	p.(=)	34	rs3124591	.
C	1			SNP	RAD21	intronic	c.938-11T>C	2772	48.40	A	G	NM_006265	p.(=)	9	rs2003...	.

Software: Sophia DDM

NGS – Ablauf im Labor



NovaSeq



NextSeq

MiSeq



NGS Häma Panel

- 36 Proben pro Lauf
- Sensitivität: 3-5%
- Punktmutationen, kleine Insertionen und Deletionen
- 55 Gene

Gene mit vollständiger Abdeckung der kodierenden Sequenz:

BCOR, BCORL1, CEBPA, CREBBP, CSF3R, DDX41, DNMT3A, ETV6, EZH2, GATA2, JAK2, NF1, PHF6, RAD21, RUNX1, SH2B3, STAG2, TET2, TP53, ZRSR2

Gene mit Erfassung von Hotspots:

ABL1, ANKRD26, ASXL1, BIRC3, BRAF, BTK, CALR, CBL, CRLF2, CXCR4, FLT3, HRAS, IDH1, IDH2, IL7RA, JAK1, JAK3, KIT, KRAS, MPL, MYD88, NOTCH1, NPM1, NRAS, PLCG2, PPM1D, PTPN11, SETBP1, SF3B1, SRSF2, STAT3, STAT5B, STAT6, U2AF1, WT1

Befund

Gen-Panel Untersuchungen

NextGenerationSequencing - Cancer-Panel KM unauffällig²
somatic

2. NGS-Panel für 55 Gene, in denen Varianten bei hämatologischen Erkrankungen beschrieben sind. Erfasst werden Punktmutationen sowie kleine Insertionen/Deletionen in den abgedeckten Targetbereichen.

Library Preparation: customized Sophia myeloid Solution MOKL-v4; Sequenzierung: Illumina NextSeq 550.

Minimale Coverage: >80% der Targetregionen sind mit mindestens 1000 Reads abgedeckt.

Varianten, die aufgrund ihrer Populations-Häufigkeit als neutral eingestuft wurden sowie synonyme Varianten sind nicht angeführt. Nicht auszuschließen sind nicht detektierte Varianten aufgrund einer lokal zu geringen Abdeckung oder eines zu geringen Anteils mutierter Zellen (Cut off für Varianten: 3% variante Reads, in manchen Regionen aus technischen Gründen 5%).

Genliste:

Gene mit vollständiger Abdeckung der kodierenden Sequenz: BCOR, BCORL1, CEBPA, CREBBP, CSF3R, DDX41, DNMT3A, ETV6, EZH2, GATA2, JAK2, NF1, PHF6, RAD21, RUNX1, SH2B3, STAG2, TET2, TP53, ZRSR2

Gene mit Erfassung von Hotspots: ABL1, ANKRD26, ASXL1, BIRC3, BRAF, BTK, CALR, CBL, CRLF2, CXCR4, FLT3, HRAS, IDH1, IDH2, IL7RA, JAK1, JAK3, KIT, KRAS, MPL, MYD88, NOTCH1, NPM1, NRAS, PLCG2, PPM1D, PTPN11, SETBP1, SF3B1, SRSF2, STAT3, STAT5B, STAT6, U2AF1, WT1

Bewertung Molekularbiologie

NGS-Panel

Mittels NGS-Panel wurde keine pathogene Variante detektiert, die eine hämatologische Systemerkrankung molekulargenetisch belegen würde.

Analysierte Gene siehe Genliste.

Anmerkung: Chromosomale Aberrationen (z.B. Translokationen, Insertionen, Deletionen) sind durch diese Untersuchung nicht ausgeschlossen. Nicht auszuschließen sind nicht detektierte pathogene Varianten aufgrund einer lokal zu geringen Abdeckung oder eines zu geringen Anteils mutierter Zellen (Cut off für Varianten: 3% variante Reads, in manchen Regionen aus technischen Gründen 5%).

Normaler männlicher Karyotyp. Kein Hinweis auf klonale Aberrationen mittels konventioneller Zytogenetik aus unstimulierter und T-Zell stimulierter Kultur.

Karyotypformel 46,XY[20]

Karyogramme/Färbungen 10 x GTG

Beispiel für positiven Befund

NGS-Panel

Mittels NGS-Panel wurden im Knochenmark folgende Varianten detektiert:
(VAF = variant allele frequency in %)

Gen	Transkript	Variante	Aminosäurenänderung	% VAF
JAK2	NM_004972.4	c.1849G>T	p. (Val617Phe)	46,8°
TET2	NM_001127208.3	c.1954C>T	p. (Gln652Ter)	18,0

°pathogene Hotspot-Variante

In der WHO- (PMID: 35732831) und ICC-Klassifikation (PMID: 35767897) werden Varianten in diesen Genen bei MPN beschrieben.

Während es sich bei der nachgewiesenen JAK2 p.V617F-Variante um eine pathogene Hotspot-Variante handelt, liegen über die Variante im TET2-Gen in den uns zur Verfügung stehenden Datenbanken wenige Informationen vor:

TET2 Q652*Ter führt zu einem vorzeitigen Abbruch des Proteins bei Aminosäure 652 von 2002. Diese Variante wurde noch nicht charakterisiert, aber auf Grund der Effekte anderer Nullvarianten downstream von Q652 (PMID: 24994606) kommt es wahrscheinlich zu einem Verlust der Tet2 Proteinfunktion (loss of function predicted).

Klinik

Claudia Hos

BHS Linz

Interne I, Hämato-Onkologie

HLH - Hämophagozytische Lymphohistiozytose

- Seltenes Hyperinflammationssyndrome mit Hyperferritinämie
- Primär (genetisch, meist bei Kindern) vs. Sekundär (Erwachsene)
- Inzidenz 0,52/100.000 (DE)
 - steigend bei zunehmender Chronifizierung von rheum. + malign. Erkrankungen
- Zytokinsturm:
 - Immunzellen schütten massenhaft Botenstoffe aus -> schwere Ganzkörperentzündungsreaktion
- Mortalitätsrate zwischen 30% und 60%

Diagnosekriterien:

Tabelle 3: HLH-2004: Diagnostische Kriterien der HLH gemäß der pädiatrischen HLH-Study Group der Histiocyte Society [27]

Kategorie	Kriterium	Anmerkung
Klinische Symptome / Laborveränderungen** (5/8 Kriterien sollen erfüllt sein)	- Fieber - Splenomegalie	
	Zytopenie ≥ 2 Zellreihen	- Hämoglobin $< 90\text{g/l}$ ($< 100\text{g/l}$ bei Neugeborenen unter 4 Wochen) - Thrombozyten $< 100 \times 10^9/\text{l}$ - Neutrophile Granulozyten $< 1 \times 10^9/\text{l}$
	Hypertriglyceridämie und / oder Hypofibrinogenämie	- Triglyceride (nüchtern) $\geq 3\text{ mmol/l}$ (265mg/dl) - Fibrinogen $< 1,5\text{g/l}$
	Ferritin erhöht*	Ferritin $\geq 500\text{ }\mu\text{g/l}$
	Löslicher IL-2-Rezeptor = Löslicher CD25⁵ erhöht	sCD25 $\geq 2.400\text{ U/ml}$
	- NK Zellaktivität erniedrigt oder nicht nachweisbar - Hämophagozytose*** in Knochenmark, Liquor oder Lymphknoten	

7/8 Punkte
erfüllt

CAVE: pädiatrischer
Score

HLH-auslösende Trigger:

Erkrankung	Anmerkung
Infektionen	• Viren: am häufigsten Herpesviren, v.a. EBV u. CMV; aber auch andere Viren wie HIV, Influenza, Sars-CoV2, Adeno, Parvo B19 u.a. • Bakterien, insbesondere intrazelluläre Erreger (z.B. Mykobakterien) • Protozoen, v.a. Leishmanien, • Pilze (Aspergillus, Histoplasma, u.a.)
Autoinflammatorische und autoimmunologische Erkrankungen (MAS-HLH)	• Systemische juvenile und adulte idiopathische Arthritis (M. Still) • Systemischer Lupus Erythematoses (SLE) • Kawasaki Syndrom • Rheumatoide Arthritis • Dermatomyositis • andere
Malignome	• Maligne Lymphome, häufiger bei ◦ $\gamma\delta$-T-Lymphom ◦ NK/T Zell-Lymphom ◦ Anaplastisch großzelliges Lymphom ◦ peripheres T-Zell-Lymphom NOS ◦ Hodgkin-Lymphom ◦ Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom • Akute lymphatische Leukämie (B- und T- Linien ALL) • Keimzelltumor • Myelodysplastisches Syndrom und akute myeloische Leukämie • andere
Immunsuppression	• medikamentös (z.B. Zytostatika) • Z. n. Stammzelltransplantation • Z. n. Organtransplantation • AIDS
Immun-aktivierende Therapie	• Chimäre Antigenrezeptor T-Zell Therapie (CART), Checkpoint-Inhibitoren, Bispezifische Antikörper, Stammzelltransplantation
Stoffwechselerkrankungen	• z.B. Lysinurische Proteinintoleranz • M. Wolman (lysosomale Speicherkrankheit)

Therapie der HLH

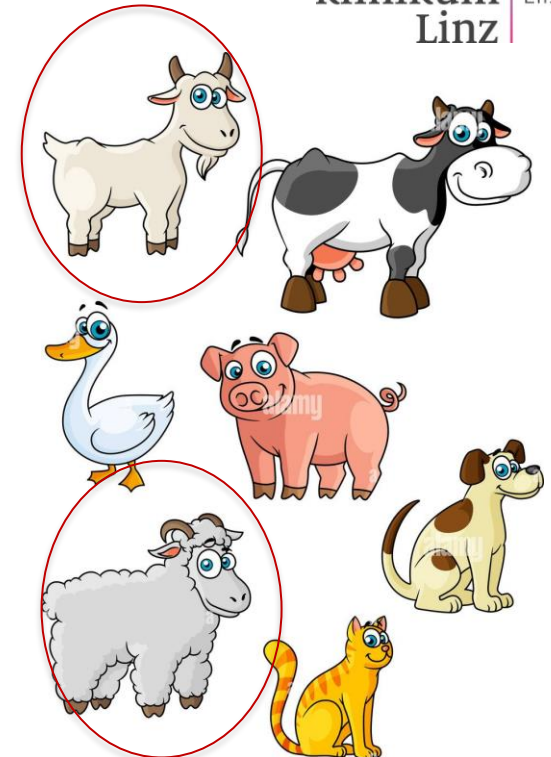
- primär:
 - Etoposid/Dexamethason/Cyclosporin + Allogene Stammzelltransplantation
- sekundär:
 - **Behandlung der Grunderkrankung/des Auslösers!**
 - Glukokortikoide
 - intravenöse Immunglobuline
 - Etoposid (nur bei schwerem Verlauf)
 - Ggf. Immunmodulatoren wie Anakinra, Ruxolitinib etc.

Brucellose

Brucella spp. IgA AK (EIA) (<10 U/ml negativ, >15 U/ml positiv)	51 U/ml
Brucella spp. IgG AK (EIA) (<20 U/ml negativ, >30 U/ml positiv)	<5 U/ml
Brucella spp. IgM AK (EIA) (<15 U/ml negativ, >20 U/ml positiv)	>100 U/ml
Brucella spp. AK (MAT) (<1:80 negativ, >1:160 positiv)	1:640

- Zoonose
 - Von Tier auf Mensch von Mensch auf Tier übertragbar
 - Ziegen, Schafe, Schweine, Rinder, Hunde
 - Übertragung in Landwirtschaft oder Rohmilch/Fleischprodukte
- Entzündung vornehmlich in Lymphknoten, Milz, Leber
- antibiotische Therapie über 6-12 Wochen erforderlich
 - Intrazelluläre Persistenz
- Meldepflichtig
- Berufskrankheit (SchäferInnen, LandwirtInnen, TierärztInnen, Laborpersonal, etc)
- Bei unserem Patienten: Frischkäse aus Rohmilch

Brucella
mellitensis



Verlauf

- Antibiotische Therapie
 - Rifampicin und Doxycyclin für 6 Wochen
- Corticosteroide
 - Tapering über 3 Monate
- Initial gutes Ansprechen
- 3 Monate nach Erstinfektion -> Rezidiv der Brucellose aber ohne HLH
 - Erneute Antibiose für 6 Wochen
- Seit November unauffällige Kontrollen – weitere Ko bei HA/HÄ

Blutkultur & Infektionsserologie

Blutkultur aerob	*positiv
Blutkultur anaerob	*negativ
Gramfärb./Blutkultur	Gramfärbung mikroskopisch nicht eindeutig beurteilbar. Blutkultur-Befund folgt.

TTP 2d 13h

Serum-Abnahme 02.07.25

Brucella spp. IgA AK (EIA) (<10 U/ml negativ, >15 U/ml positiv)	51 U/ml
Brucella spp. IgG AK (EIA) (<20 U/ml negativ, >30 U/ml positiv)	<5 U/ml
Brucella spp. IgM AK (EIA) (<15 U/ml negativ, >20 U/ml positiv)	>100 U/ml
Brucella spp. AK (MAT) (<1:80 negativ, >1:160 positiv)	1:640

Die nachweisbare Brucella spp. spezifische Seropositivität (mittels EIA und MAT) gibt starken Hinweis auf eine **rezent erfolgte Infektion** mit Brucella spp. (hohe IgA und IgM Konzentration). Der positive Vorhersagewert des serologischen Testergebnisses für eine Brucellose soll in Zusammenschau mit den klinischen Kriterien (Klinik einer **akuten** oder chronischen Brucellose, z.B. Fieber, Lymphadenopathie, Arthralgie, Spondylodiszitis) und epidemiologischen Kriterien (z.B. Konsum von nicht pasteurisierten Milchprodukten, berufliche Exposition) des/r Patienten:in eingestuft werden.

Für die serologische Bestätigung einer vermuteten rezenten Infektion bedarf es einer nochmaligen serologischen Untersuchung in 2 bis 3 Wochen (ermöglicht den akuten und rekonvaleszenten, gepaarten Serumproben-Vergleich).

Serum-Abnahme 04.07.25

Brucella spp. IgA AK (EIA) (<10 U/ml negativ, >15 U/ml positiv)	>100 U/ml
Brucella spp. IgG AK (EIA) (<20 U/ml negativ, >30 U/ml positiv)	<5 U/ml
Brucella spp. IgM AK (EIA) (<15 U/ml negativ, >20 U/ml positiv)	>100 U/ml

Das Ergebnis der kurzfristigen Follow-up Untersuchung erhärtet den serologischen Verdacht auf eine akute Brucellose bei signifikantem Anstieg der erregerspezifischen IgA-Antikörperkonzentration - vorausgesetzt Kreuzreaktionen durch Infektionen mit anderen Erregern wie z.B. *Yersinia* spp., *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Vibrio cholerae* können ausgeschlossen werden. Erregerspezifische IgG-Antikörper sind nach wie vor nicht nachweisbar.

Eine nochmalige serologische Untersuchung sollte frühestens nach Therapie-Abschluss erfolgen.

CDC - Risk & Prevention

Gesundheitsberufe (z.B. Labor)

höchstes Risiko akzidentieller Exposition bei
Probenbearbeitung mit **Aerosolbildung** außerhalb
der Sicherheits-Werkbank KII:
Öffnen, Pipettieren, Zentrifugieren, Vortexen etc.

→ **Postexpositions Prophylaxe**

“Microbiology laboratory workers may be at risk for brucellosis after laboratory exposure. We are in agreement with the United States Centers for Disease Control and Prevention's approach to identification of high-risk exposures, recommendations for serologic testing, and postexposures prophylaxis.”



KEY POINTS

- Brucellosis is a disease caused by bacteria.
- The disease spreads to people through contact with infected animals or contaminated animal products.
- People in certain jobs or settings that work with animals or animal products may face increased exposure to the bacteria that cause brucellosis.
- Brucellosis can be treated with antibiotics.

Risikobewertung

Brucella Laboratory Risk Assessment and Post-Exposure Prophylaxis (PEP): Minimal Risk			
Specimen handling	Exposure scenario	PEP	Follow-up/monitoring
Routine clinical specimen (e.g., blood, serum, cerebrospinal fluid)	Person who manipulated a routine clinical specimen in a certified Class II biosafety cabinet, with appropriate personal protective equipment (PPE) (i.e., gloves, gown, eye protection).	None	N/A
	Everyone present in the lab while someone manipulated a routine clinical specimen in a certified Class II biosafety cabinet, or on an open bench where manipulation did not involve occurrence of aerosol-generating events (e.g., centrifuging without sealed carriers, vortexing, sonicating, spillage/splashes).		
Enriched material (e.g., a <i>Brucella</i> isolate, positive blood bottle) or reproductive clinical specimen (e.g., amniotic fluid, placental products)	Person who manipulated enriched material or reproductive clinical specimen in a certified Class II biosafety cabinet, with appropriate PPE.		May consider symptom watch for following scenarios: - Person who manipulated a routine clinical specimen on an open bench with or without appropriate PPE, or in a certified Class II biosafety cabinet without appropriate PPE. - Person present in the lab while someone manipulated a routine clinical specimen on an open bench, resulting in aerosol-generating events.
	Everyone present in the lab while someone manipulated enriched material or reproductive clinical specimen in a certified Class II biosafety cabinet.		

Brucella Laboratory Risk Assessment and Post-Exposure Prophylaxis (PEP): Low Risk			
Specimen handling	Exposure scenario	PEP	Follow-up/monitoring
Enriched material (e.g., a <i>Brucella</i> isolate, positive blood bottle) or reproductive clinical specimen (e.g., amniotic fluid, placental products)	Everyone present in the lab at a distance of > 5 feet from someone manipulating enriched material or reproductive clinical specimen, on an open bench, with no occurrence of aerosol-generating events (e.g., centrifuging without sealed carriers, vortexing, sonicating, spillage/splashes).	May consider if immunocompromised or pregnant. Discuss with health care provider (HCP). Note: RB51 is resistant to rifampin <i>in vitro</i> , and therefore this drug should not be used for PEP or treatment courses.	Regular symptom watch (e.g., weekly) and daily self-fever checks through 24 weeks after last known exposure. Sequential serological monitoring at 0 (baseline), 6, 12, 18, and 24 weeks after last known exposure. Note: no serological monitoring currently available for RB51 and <i>B. canis</i> exposures in humans.

Brucella Laboratory Risk Assessment and Post-Exposure Prophylaxis (PEP): High Risk			
Specimen handling	Exposure scenario	PEP	Follow-up/monitoring
Routine clinical specimen (e.g., blood, serum, cerebrospinal fluid)	Person who manipulated a routine clinical specimen, resulting in contact with broken skin or mucous membranes , regardless of working in a certified Class II biosafety cabinet, with or without appropriate personal protective equipment (PPE) (i.e., gloves, gown, eye protection).	Doxycycline 100mg twice daily, and rifampin 600 mg once daily, for three weeks. For patients with contraindications to doxycycline or rifampin, consider TMP-SMZ in addition to another appropriate antimicrobial. Two antimicrobials effective against <i>Brucella</i> should be given. Pregnant women should consult their obstetrician. Note: RB51 is resistant to rifampin <i>in vitro</i> , and therefore this drug should not be used for PEP or treatment courses.	Regular symptom watch (e.g., weekly) and daily self-fever checks through 24 weeks after last known exposure. Sequential serological monitoring at 0 (baseline), 6, 12, 18, and 24 weeks after last known exposure.
	Person who manipulated or is ≤ 5 feet from someone manipulating enriched material or reproductive clinical specimen, outside of a certified Class II biosafety cabinet.		
	Enriched material (e.g., a <i>Brucella</i> isolate, positive blood bottle) or reproductive clinical specimen (e.g., amniotic fluid, placental products) Person who manipulated enriched material or reproductive clinical specimen, within a certified Class II biosafety cabinet, without appropriate personal protective equipment (PPE). Everyone present when aerosol-generating events occurred (e.g., centrifuging without sealed carriers, vortexing, sonicating, spillage/splashes) with manipulation of enriched material or reproductive clinical specimen on an open bench.		Note: no serological monitoring currently available for RB51 and <i>B. canis</i> exposures in humans.

Labor-Kriterien im Verlauf

