

Diagnostik immunologisch bedingter Thrombozytopenien

Dr. med. Elisabeth Urban, Dr. med. Ute-Maja Liebscher,
Prof. Dr. med. Torsten Tonn
Institut für Transfusionsmedizin Dresden
DRK-Blutspendedienst Nord-Ost
Blasewitzer Str. 68/70
01309 Dresden

Zusammenfassung

Auf der Oberfläche von Thrombozyten befinden sich Antigen-determinanten, die die Bildung von Thrombozyten-Antikörpern induzieren können. Diese richten sich spezifisch gegen Epitope der verschiedenen Glykoprotein-Rezeptoren. Dieser Artikel soll eine Übersicht geben über die klinische Bedeutung der thrombozytären Antikörper und deren Nachweismöglichkeiten im Labor. Es werden sowohl Thrombozyten-Allo- als auch Autoantikörper und deren Bildung/Entstehung beleuchtet. Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) geht mit einer komplexen Aktivierung des Gerinnungssystems einher und ist daher eine gefährliche Komplikation im Rahmen der Antikoagulationstherapie. Auch können Allo-Antikörper gegen humane Plättchenantigene zu folgenden Krankheitsbildern führen: fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie, posttransfusionelle Purpura (PTP) und/oder einem Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusionen. Der Nachweis und die Spezifizierung von thrombozytären AK sind z.T. methodisch schwierig durchzuführen und zeitaufwendig. In der Regel ist dafür ein Speziallabor erforderlich.

Summary

The surface of platelets comprises determinants of antigens, that may induce the formation of platelet specific antibodies. These may be specifically directed against epitopes of the different glycoprotein receptors. This article gives an overview on the clinical relevance of platelet antibodies and methods of their detection in the laboratory. The article sheds light on allo-antibodies, as well as autoantibodies directed against platelets and their pathophysiology. Heparin induced thrombocytopenia (HIT) is associated with complex activations of the coagulation system and therefore resembles a severe complication in anti-coagulation therapy. In addition allo-reactive antibodies against human platelet antigens may cause the following diseases: fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia, post transfusion purpura (PTP) and/or refractoriness after thrombocyte transfusion. The detection and classification of thrombocyte specific antibodies is laborious and in part mandates challenging analytical methods. In general it will require the analysis in specialized laboratories.

Einleitung

Auf der Oberfläche von Thrombozyten (**Abbildung 1**) befinden sich Antigen-determinanten, die die Bildung von Antikörpern (AK) bewirken können. Daraus können spezifische Antigen-Antikörperreaktionen resultieren. Wir unterscheiden

- **Antigene auf Thrombozyten**, die sich auch auf anderen Körperzellen befinden (z. B. ABH-System, HLA-Klasse I)
- und **Antigene**, die sich nur auf Blutplättchen nachweisen lassen, die Antigene des **HPA (Humanes Plättchen-Antigen)**-Systems. Derzeit sind 12 thrombozytenspezifische Antigene bekannt, die 6 biallelen Systemen zugeordnet werden (**HPA 1 bis 5** und **HPA 15**, das häufigere Allel wird mit **a**, das seltenere mit **b** bezeichnet), und weitere bisher 21 ohne zugehöriges Partnerantigen. Nach neueren Erkenntnissen sind einige HPA allerdings auch auf Endothel- oder Muskelzellen nachweisbar. Die wichtigste Rolle in der medizinischen Praxis spielen HPA 1a und HPA 5b (**Tabelle 1**). Der Nachweis erfolgt vorwiegend molekular-genetisch.

HPA können die Bildung von **Thrombozyten-AK** induzieren, die sich spezifisch gegen Epitope der **Glykoprotein (GP)-Rezeptoren** auf

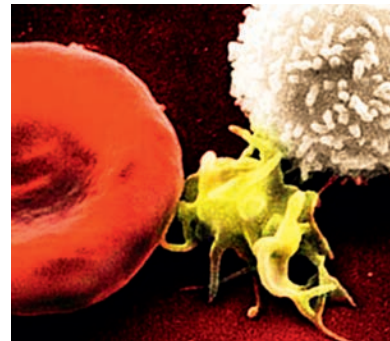


Abbildung 1

Thrombozyt zwischen Erythrozyt und Granulozyt

der Plättchenoberfläche (**Abbildung 2**) richten mit dem Ergebnis einer immunologisch ausgelösten Thrombozytopenie. Thrombozytäre GP-Komplexe spielen in der Hämostase eine wichtige Rolle (**Tabelle 2**). **Auto-AK** reagieren mit monomorphen Determinanten auf den autologen Thrombozyten (und auf Thrombozyten gesunder Probanden). Sie verursachen eine **Autoimmunthrombozytopenie (ITP)**. **Allo-AK** reagieren mit den genetisch determinierten Varianten thrombozytärer Oberflächen-GP. Sie können eine **fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)**, eine **post-transfusionelle Purpura (PTP)** oder einen **Refraktärzustand** nach Thrombozytentransfusionen auslösen. **Medikamentenabhängige AK** verursachen **medikamenten-induzierte Thrombozytopenien**. Die klinisch bedeutsame **Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)** nimmt eine Sonderstellung ein.

Thrombozytäre Glykoproteine (GP) und humane Plättchenantigene (HPA)

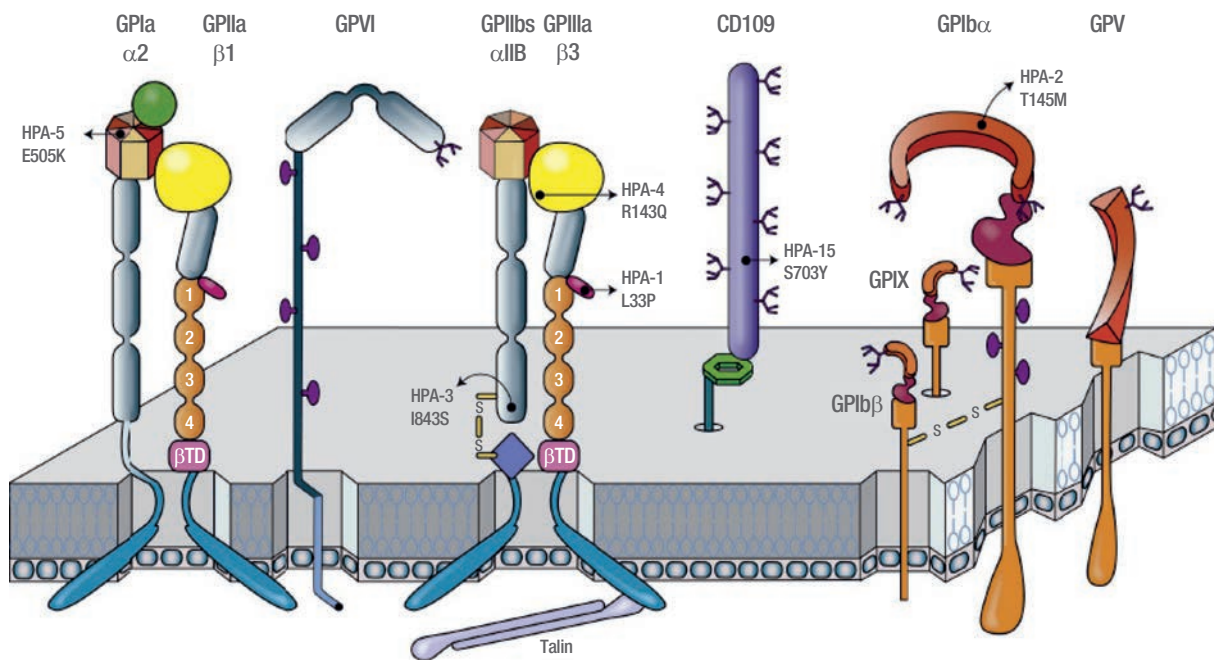


Abbildung 2

Glykoproteinkomplexe und HPA-Merkmale (60)

Der Nachweis der thrombozytären AK beruht auf verschiedenen Testprinzipien.

funktion. Der Nachweis erfolgt durch die Untersuchung auf an Thrombozyten gebundene Auto-AK (zellstän-

Thrombozyten-Auto/Allo-AK (zirkulierende AK) aus dem Serum der

Methodenübersicht

TEIL 1: Antikörpernachweis bei Verdacht auf Immunthrombozytopenie (ITP)

Bei ITP sind die Thrombozyten mit AK beladen, die sich gegen die Merkmale des HPA-Systems richten. Diese Antigene (Ag) sind GP, die auf der Thrombozytenmembran lokalisiert sind. Die meisten Thrombozyten-Auto-AK reagieren mit Determinanten auf den GP-Komplexen und induzieren eine Thrombozytopenie bei weitgehend erhaltener Thrombozyten-

Phänotypfrequenzen der wichtigsten thrombozytären Alloantigene in der deutschen Bevölkerung

Antigen	Phänotypfrequenz [%]	Lokalisation
HPA-1a	97	GP IIIa
HPA-1b	31	GP IIIa
HPA-2a	99,8	GP Ib
HPA-2b	12	GP Ib
HPA-3a	86	GP IIb
HPA-3b	63	GP IIb
HPA-4a	>99,9	GP IIIa
HPA-4b	<0,1	GP IIIa
HPA-5a	98,8	GP Ia
HPA-5b	21	GP Ia

Tabelle 1
modifiziert nach (59)

Tabelle 2

Aufgaben der Glykoproteine bei der Gerinnung

Patienten. Thrombozytäre AK werden im Antiglobulintest mit intakten Thrombozyten nachgewiesen. Medikamenten-abhängige AK reagieren spezifisch mit einem GP, jedoch nur in Anwesenheit des betreffenden Medikamentes. Der Nachweis kann nur in Antiglobulintesten erfolgen, bei denen das vermutlich auslösende Medikament hinzugefügt wird.

Es können nachfolgende Testmethoden zur Anwendung kommen:

1.1. MAIPA-Test (Monoclonal-anti-body-specific immobilization of platelet antigens)

Der MAIPA-Test ist ein glykoprotein-spezifischer Enzymimmunttest, der den Nachweis thrombozytärer AK auch in solchen Seren erlaubt, die ein Gemisch von thrombozytären und HLA-AK enthalten. Die Testthrombozyten decken in ihrer Kombination alle in Frage kommenden Allele des HPA-Systems ab. Sie werden mit dem zu untersuchenden Patientenserum inkubiert. In einem weiteren Schritt erfolgt die Zugabe monoklonaler Maus-AK, die gegen Determinanten der GP-Struktur gerichtet sind, auf denen die plättchenspezifischen Ag exprimiert sind. Dadurch entsteht im Fall des Vorliegens eines

Glykoproteine auf Thrombozyten übernehmen in der Gerinnung wichtige Aufgaben

Glykoproteinkomplexe	Funktion	
GP IIb / IIIa	Fibrinogenrezeptor	Aggregation
GP Ib / IX	v. Willebrand-Rezeptor	Adhäsion
GP Ia / IIa	Kollagenrezeptor	Aggregation
GP V	Teil des GP Ib / V / IX	Adhäsion
GP IV	Kollagenrezeptor	Aggregation
CD 109	T-Helferzell-Funktion	

thrombozytenspezifischen AK ein trimolekularer Komplex aus dem humanen Thrombozyten-AK, dem GP-Molekül mit dem exprimierten Thrombozyten-Ag und dem monoklonalen AK. Die Lyse der Testthrombozyten setzt den Komplex aus der Membran frei. Er ist in sich außerordentlich stabil. Über den monoklonalen AK kann der Komplex an eine Festphase gebunden werden. Der vorhandene humane AK liegt nun endständig vor und wird durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-Human-IgG und eine nachfolgende Substratreaktion sichtbar gemacht (**Abbildung 3**).

Das Verfahren setzt voraus, dass für alle GP, auf denen Antigene exprimiert sind, monoklonale Antikörper vorliegen.

1.2. Plättchen-ELISA

Die Festphase des einzelnen Streifen des Enzymimmunoassays ist beschichtet mit den Thrombozyten-GP von Einzel-Spendern der Blutgruppe 0, die homozygot für HPA-1a, HPA-1b, HPA-3a, HPA-3b, HPA-5a und HPA-5b

sind. Die Ag sind mittels eines monoklonalen AK, der gegen diese GP gerichtet ist, an die feste Phase gebunden. Spezifische gegen die GP IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa oder IV gerichtete AK in der Patientenprobe binden an diese Festphasen-Ag. Nach einem Waschschrift, bei dem alle nicht gebundenen Bestandteile entfernt werden, wird ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Anti-Humanglobulin zugefügt. In einem weiteren Waschvorgang wird überschüssiges Konjugat entfernt. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats entsteht eine Farbreaktion, die nach Abstoppen mit Säure photometrisch ausgewertet werden kann.

1.3. PIFT (Plättchenimmunfluoreszenztest)

Es werden Thrombozyten mit bekannten HPA-Merkmalen eingesetzt. Liegen im Patientenserum AK gegen diese Merkmale vor, kommt es zur Bindung. In einem zweiten Schritt werden diese AK mit einem fluoreszenz-markierten Sekundär-AK konjugiert. Die messbare Fluoreszenz

korreliert mit der AK-Menge. Es können AK der Immunglobulin-Klassen IgM und IgG nachgewiesen werden. Eine Identifizierung der Spezifität der Immunglobulinklassen ist mit diesem Test jedoch nicht möglich.

1.4. SASPA-Test (Simultaneous analysis of specific platelet antibodies)

Die Methode beruht auf der simultanen Bestimmung und Differenzierung von verschiedenen spezifischen Thrombozyten-IgM- und IgG- AK mittels Durchflußzytometrie. Das Prinzip des SASPA beruht auf der Verwendung verschiedener Beads, die eine Differenzierung der AK-Spe-

zifitäten ermöglichen. Im Ergebnis dieser Methode erhält man den/die thrombozytenspezifischen HPA-AK. Die Sensitivität ist mit dem MAIPA vergleichbar.

TEIL 2: Antikörperrnachweis bei Verdacht auf Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT II)

Die Diagnose einer HIT II basiert auf klinischen Daten und der Kinetik der Thrombozytenwerte des Patienten. Neben dem Nachweis von AK gegen den Heparin/Plättchenfaktor4-Komplex (HPF4-Komplex) sollte auch stets ein funktioneller Test durchgeführt werden. Zur eindeutigen Bestätigung einer manifesten HIT II ist ein

funktioneller Test (HIPA, Serotonin-freisetzungstest) unerlässlich. Die Bewertung der Ergebnisse im Labor erfordert Informationen über die Thrombozytenzahlen des Patienten, das verwendete Heparin und den Zeitpunkt der Medikamentengabe.

Es können folgende Testmethoden zur Anwendung kommen:

2.1. ID-PaGIA Heparin/PF4 Antibody Test

Der Test ist ein Partikel-Gel-Immunoassay (PaGIA). Synthetische Polymerpartikel mit hoher Dichte sind mit dem HPF4-Komplex beschichtet. Werden diese Partikel mit dem Serum

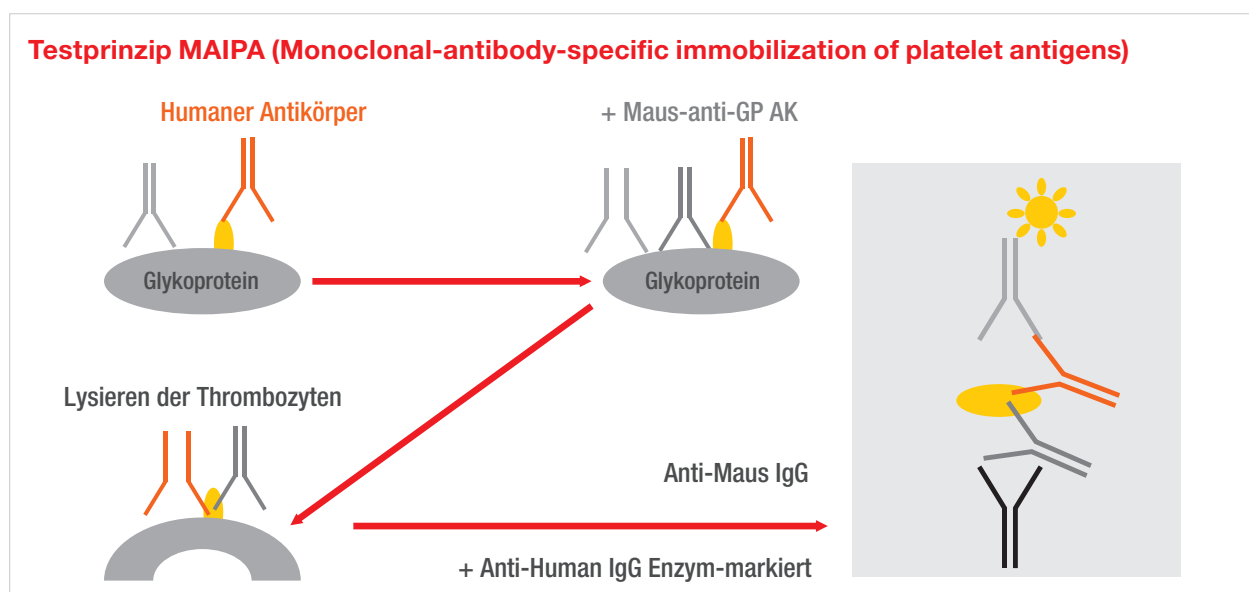


Abbildung 3
MAIPA-Test

des Patienten vermischt, reagieren spezifische AK aller Immunglobulin-Klassen mit dem HPF4-Komplex auf der Partikeloberfläche und bewirken eine Agglutination der Partikel. Um eine räumliche Trennung agglutinierten und nicht-agglutinierten Partikel zu erreichen, wird die Reaktionsmischung durch eine Gel-Filtrationsmatrix zentrifugiert. Agglutinierte Partikel werden auf der Geloberfläche festgehalten oder innerhalb des Gels verteilt (= positive Reaktion), während freie nicht-agglutinierte Partikel am Boden des Mikroröhrchens ein kompaktes Sediment bilden (= negative Reaktion). Die starke Rotfärbung der Partikel macht es möglich, das Testresultat visuell abzulesen.

2.2. PF4-enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)

Beim Festphasen-Enzymimmunoassay sind die Mikrotiterstreifen mit HPF4-Komplexen beschichtet. Die in der zu bestimmenden Probe enthaltenen Anti-HPF4-IgG-AK binden an die immobilisierten HPF4-Komplexe und werden durch einen Sekundärantikörper, an den eine Peroxidase gebunden ist, detektiert. Nach einem Waschvorgang wird ein Substrat hinzugegeben, das von dieser Peroxidase gespalten wird und zu einer Farbreaktion führt. Die entstehende Farbtintensität ist direkt proportional

zur Menge an Anti-HPF4-IgG-AK, die in der Probe vorhanden ist. Der PF4-ELISA hat eine Sensitivität von ca. 80 % und ist nicht auf frische Spenderthrombozyten angewiesen.

2.3. Milenia QuickLine HIT-Test

Der Test ist ein Lateral-Flow-Immunoassay. Immobilisierte Anti-Human-IgG-AK auf einer Nitrozellulosemembran binden Anti-HPF4-AK der Klasse IgG des Patienten, die zuvor an einen Plättchenfaktor4/Polyanion-Komplex gebunden wurden und durch intensiv gefärbte Goldnanopartikel detektiert werden. Der Test zeichnet sich durch ein geringes Probenvolumen, hohe Spezifität und Sensitivität aus. Es sind keine Waschschritte erforderlich.

2.4. Heparin-induzierte Plättchenaktivierung (HIPA) = funktioneller Test

Gewaschene Thrombozyten gesunder Spender der Blutgruppe 0 werden mit Patientenserum und Heparin inkubiert. Dabei aktivieren antikörperhaltige Seren die Thrombozyten in Gegenwart von niedrigen, nicht aber von hohen Heparinkonzentrationen. Dies führt zur Plättchenaggregation. Dadurch wird die Transparenz der Thrombozytensuspension des Testansatzes höher. Der Test gleicht in Sensitivität und Spezi-

fität dem Serotonin-Freisetzungstest (**siehe 2.5.**). Da der Ansatz aufwendig ist und frische, gewaschene Plättchen notwendig sind, bleibt der Test wenigen Speziallaboren vorbehalten.

2.5. Serotoninfreisetzungs-Assay = funktioneller Test

Dieser Test basiert auf der Serotoninspeicherung in den Granula der Thrombozyten. Spenderthrombozyten werden mit radioaktiv markiertem Serotonin versehen. Eine Aktivierung der markierten Thrombozyten durch das antikörperhaltige Patientenserum bei Anwesenheit von Heparin führt zur Freisetzung von Serotonin. Die Zunahme der Radioaktivität wird gemessen. Der Test hat eine hohe Sensitivität, ist aber sehr aufwendig und durch die Verwendung von radioaktiven Materialien nur in spezialisierten Laboratorien durchführbar.

Klinische Bedeutung thrombozytärer Antikörper

1. Immunthrombozytopenie (ITP) Eponym: Morbus Werlhof

Es handelt sich um eine erworbene Thrombozytopenie, die primär als Autoimmunerkrankung mit isolierter Thrombozytopenie oder sekundär

Klassifikation der ITP nach (65)

Klassifikation	Ursachen/Krankheitsbilder
Primäre ITP	keine auslösende Ursache erkennbar
Sekundäre ITP	Medikamentenreaktion Autoimmunerkrankung Antiphospholipid-Syndrom Common variable immunodeficiency syndrome Lymphom Evans-Syndrom Autoimmun-proliferatives Syndrom Infektionen (HIV; Hep B; HCV; H. pylori) nach Impfungen andere

Tabelle 3

- Ein relativer **Thrombopoietinmangel** behindert die Megakaryozytenbildung im Knochenmark (15, 16). Die Blutungsinzidenz ist unter der Therapie mit Thrombopoietinanaloga deutlich rückläufig (17).
- Das Phänomen des **Epitope spread** durch dendritische Zellen mit T-Zell-Aktivierung und Interaktion von T- und B-Lymphozyten führt neben der Verstärkung der Immunreaktion zu **multiplen Auto-AK**. Ob die Ursache dafür die Thrombozyten-AK sind oder es einen anderen Auslöser gibt, ist bisher nicht bekannt (58).

bei z. B. systemischem Lupus erythematoses oder chronisch lymphatischer Leukämie auftritt (Tabelle 3). Eine Inzidenz von 2 bis 4 Neuerkrankungen jährlich auf 100.000 Einwohner resultiert in einer Prävalenz der chronischen Form von 2 auf 10.000 Personen. Im Kindesalter findet sich häufig ein akuter selbstlimitierender Verlauf. 90 % der erkrankten Kinder haben nach 12 Monaten wieder mehr als $100 \times 10^9/l$ Thrombozyten. Schwere Blutungen sind rar. Dagegen gibt es bei Erwachsenen selten Spontanremissionen. Das Risiko für schwere Blutungen steigt mit dem Lebensalter (1, 2). Es findet sich ein jährliches Mortalitätsrisiko von 5 % bei therapierefraktären Patienten mit Thrombozytenwerten unter $30 \times 10^9/l$ (4). Todesursachen sind neben fatalen Blutungen auch Infektionen (3).

Pathophysiologie der ITP:

- Thrombozyten-Auto-AK** reagieren mit den GP-Rezeptoren an der Plättchenoberfläche.

- Makrophagen und dendritische Zellen bauen die beladenen Zellen ab und führen zu einer **erhöhten Clearance** aus der Zirkulation. Die entstandene Thrombozytopenie beeinträchtigt direkt die Hämostase. Es kommt zur Blutungsneigung vom thrombozytären Typ.
- Gleichzeitig geht die AK-Bildung mit einer **Funktionsstörung der GP** einher. Thrombozytenadhäsion und -aggregation können die Blutungsneigung verstärken.
- Eine Aktivierung des GP-Rezeptors (**intrinsic activity**) mit Funktionsverstärkung der wenigen vorhandenen Thrombozyten (10, 11) ist möglich. Daraus erklärt sich die klinisch sehr unterschiedliche Blutungsneigung bei niedrigen Thrombozytenzahlen.
- Die AK haben zusätzlich eine hemmende Wirkung auf die Thrombopoese (12). Die **Reifung** der Thrombozyten **aus** den **Megakaryozyten** ist beeinträchtigt (13, 14).

Eine **Störung der immunregulatorischen Funktion** von B- und T-Zellen im Knochenmark liegt vor (19). Die einmal angestoßenen Immunreaktionen können nicht wieder unterdrückt werden (18).

Testung auf thrombozytäre AK:

Es gibt keine Untersuchungen oder Befunde, die die Diagnose einer ITP beweisen. Der Ausschluss der Differentialdiagnosen steht im Vordergrund. **Die Bestimmung von thrombozytären AK (frei im Patientenserum /-plasma und gebunden an den Patiententhrombozyten)** wird **zur Diagnosesicherung** bei Patienten mit persistierender Thrombozytopenie und atypischen Befunden bzw. bei

fehlendem Ansprechen auf eine Therapie mit intravenös verabreichtem Immunglobulin (ivlg) in den Leitlinien der DGHO (5) empfohlen sowie bei unklaren Krankheitsverläufen im Kindesalter (20). Im Rahmen der Akutdiagnostik neuer Patienten ist diese Testung nicht sinnvoll. Thrombozytäre AK sind überwiegend IgG-AK, 25 % IgM-AK und weniger als 5 % IgA-AK. Es gibt keinen Hinweis auf eine Assoziation bestimmter Immunglobulin-Klassen zu einem chronischen Verlauf (6). Am besten geeignet zum Nachweis thrombozytengebundener glykoproteinspezifischer AK ist der **MAIPA** (7, 8). Selbst bei Kombination von mehreren Tests gelingt der Nachweis nur bei 60-80 %, hauptsächlich von AK gegen GP Ib und/oder IIb / IIla, seltener gegen GP Ia / IIa, GP IV, GP V. Patienten mit ITP haben oft AK gegen mehrere GP-Rezeptoren (9). Ein positiver AK-Nachweis kann die autoimmunologische Genese der

Thrombozytopenie bestätigen. Ein negatives Ergebnis spricht nicht gegen die Diagnose. Es wird vermutet, dass sich AK gegen noch unbekannte Thrombozyten-Ag dem Nachweis entziehen.

Das therapeutische Vorgehen

empfehlte die Leitlinie der DGHO (5). Als Notfalltherapie bei bedrohlichen Blutungen eignen sich **Thrombozytenkonzentrate (TK)** als wirksame Sofortmaßnahmen. Es kommt zum Sistieren der Blutung und zum vorübergehenden Anstieg der Thrombozyten (21). Die Kombination von ivlg und TK ist nicht wirksamer als die alleinige TK-Gabe (22, 23).

2. Fetale / Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)

Die FNAIT ist eine isolierte Thrombozytopenie des Feten / Neugebore-

nen, verursacht durch thrombozytäre AK der Mutter, die diaplazentar übertragen werden und eine Phagozytose der fetalen Thrombozyten induzieren. Ca. die Hälfte der Fälle tritt bereits in der ersten Schwangerschaft auf (24). Es kann zur Blutungsneigung vom petechialen Typ kommen. Intrauterine (41, 42) oder postnatale intrakranielle Blutungen sind eine gefährdete Komplikation mit der Folge bleibender Schädigungen oder des Todes. Innerhalb von Tagen bis wenigen Wochen nach der Geburt normalisiert sich die Thrombozytenzahl. Da die Thrombozytenzahl bei Neugeborenen nicht routinemäßig bestimmt wird, werden Fälle ohne deutliche Blutungszeichen i. d. R. übersehen. 0,2 % der Schwangeren bilden thrombozytäre AK (25). Unbehandelte Neugeborene mit einer Thrombozytopenie haben ein hohes Risiko einer intrakraniellen Blutung (28, 29, 30). Eine NAIT führt bei 1 von 5.000 Neugeborenen zu einer Blutungsneigung (26). 5 % dieser Kinder versterben innerhalb des ersten Lebensjahres oder entwickeln irreversible Schäden (27). (Tabelle 4)

Pathophysiologie der FNAIT:

Eine FNAIT wird durch die Immunisierung der **Mutter** gegen kindliche Plättchen-Ag (HPA) ausgelöst. Die **Allo-Anti-HPA-AK** vom Typ IgG wer-

Inzidenz der FNAIT

Diagnose	Anzahl	Häufigkeit in %
Schwangerschaft	100.000	100
HPA-1a-negative Schwangere	2.000	2
Nachweis Anti-HPA-1a	200	0,2
Schwere Thrombozytopenie	60	0,06
Intrakranielle Blutung, Tod	6	0,006

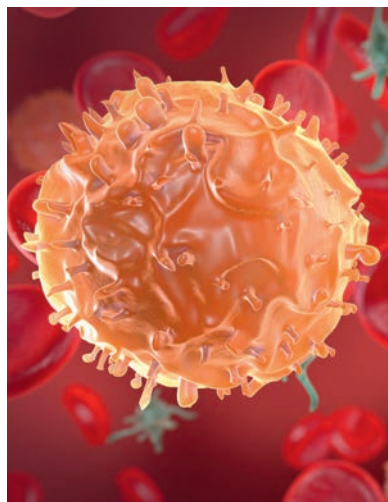
Tabelle 4

Inzidenz der FNAIT modifiziert nach (61)

den über einen Fc-Rezeptor der Synzytiotrophoblasten in die fetale Zirkulation transportiert (32, 33). Eine **Ag-AK-Reaktion** auf der Oberfläche der **kindlichen Thrombozyten** beschleunigt die Eliminierung der Plättchen aus dem Kreislauf mit der Folge einer Thrombozytopenie des Feten (31). Die Sensibilisierung der Mutter ist das Ergebnis einer vorangegangenen Gravidität, einer Thrombozytentransfusion oder - in der ersten Schwangerschaft - des diaplazentaren Übertritts kindlicher Thrombozyten. Thrombozytäre GP sind bereits in der 16. Schwangerschaftswoche nachweisbar (34). Möglicherweise führen auch Mikropartikel des Synzytiotrophoblasten zur Immunisierung (35). Am häufigsten sind **AK gegen** das Merkmal **HPA-1a** (75 bis 80 %) und gegen **HPA 5b** (15-20 %) (36). AK gegen andere Plättchenmerkmale sind selten. Thrombozyten-AK gegen den GP-Komplex IIb / IIIa (Anti-HPA 1a), aber auch andere AK gegen Epitope dieses GP, sind sehr häufig mit schwerwiegenden Komplikationen assoziiert. Bei Anti-HPA-5b finden sich viel seltener ausgeprägte Thrombozytopenien (41). Allerdings lässt eine intrakranielle Blutung bei moderat verminderter Thrombozytenzahl eine funktionelle Beeinträchtigung des GP Ia / IIa (Kollagenrezeptor) vermuten (37).

Testung auf thrombozytäre AK:

Für den Nachweis der **thrombozytären Allo-AK** aus dem **mütterlichen Blut** ist der **MAIPA** wegen seiner guten Reproduzierbarkeit und seiner Unempfindlichkeit gegenüber von HLA-AK besonders geeignet. Ergänzend sollte mit gleicher Technik ein **Cross match** zwischen **mütterlichem Serum** und **väterlichen Thrombozyten** durchgeführt werden. Damit können auch AK gegen seltene Antigen-systeme erfasst werden. Zur Sicherung der serologischen Befunde des AK-Nachweises empfiehlt sich die **molekulargenetische Diagnostik** der **HPA-Merkmale** der **Mutter** (mit negativem Ergebnis für das Antigen, gegen welches der AK gerichtet ist) und des **Neugeborenen** (mit positivem Ergebnis für das Antigen, gegen welches er AK gerichtet ist). Ein



negativer AK-Nachweis im mütterlichen Blut schließt eine FNAIT nicht aus (38). Niedrigaffine AK können sich dem Nachweis entziehen und werden nur mit besonders empfindlichen Methoden erfasst (39). Alternativ kann ihre Bestimmung einige Wochen nach der Entbindung gelingen (40).

Das therapeutische Vorgehen

richtet sich nach dem Schweregrad der Thrombozytopenie und der Blutung. Zur raschen Anhebung der Thrombozytenzahl werden TK eingesetzt mit dem Ziel, die Werte bei $50 \times 10^9/l$ zu halten. Eine Zeitverzögerung durch das Warten auf die Ergebnisse der Testung auf thrombozytäre Antikörper gefährdet möglicherweise das Kind. Optimal wären immunologisch verträgliche TK. Diese werden unter Beachtung der **Dringlichkeit** der Therapie nicht immer zur Verfügung stehen. Die Gabe **unausgewählter TK** führt im Allgemeinen zu einem ausreichenden Thrombozytenanstieg (43). Stehen ohne Zeitverzug **HPA-1a-negative** und **HPA-5b-negative TK** zur Verfügung, sind diese auf Verdacht unter Beachtung der Häufigkeit der Antikörper vorzuziehen. Liegt das Ergebnis der Testung auf thrombozytäre AK vor, empfiehlt sich auf **kompatible TK** überzugehen. Bei bekannter

FNAIT sollen kompatible TK für das Neugeborene rechtzeitig zur Geburt vom zuständigen Blutspendedienst angefordert werden. Eine engmaschige Überwachung des Feten bei bekannter FNAIT ggf. unter Therapie mit ivIg ab der 16. Schwangerschaftswoche und möglicherweise intrauterinen Transfusionen soll an ein erfahrenes Zentrum geknüpft werden.

3. Refraktärzustand nach Transfusion von Thrombozytenkonzentraten

Der Refraktärzustand ist eine Transfusionsstörung. Durch Immunisierung des Patienten im Rahmen von Schwangerschaft oder Transfusionen gegen HLA- und / oder HPA-Merkmale zeigt eine TK-Gabe eine unzureichende Wirksamkeit des Blutprodukts (ausbleibender oder inadäquater Anstieg der Thrombozyten des Patienten). Der ausbleibende Transfusionserfolg kann über das Thrombozyteninkrement mit der Thrombozytenzahl des Patienten vor, 1 Stunde nach und 20 Stunden nach TK-Gabe im **corrected count increment (CCI)** berechnet werden (56). **HLA-Klasse I-AK** sind die häufigste Ursache für einen immunologisch induzierten Refraktärzustand (51, 52, 53). In 15 – 30 % der Fälle sind diese AK mit **HPA-AK** assoziiert (54, 55).

Pathogenese:

HLA- und/oder **thrombozytäre Allo-AK des Patienten**, die durch ein vorangegangenes Immunisierungsereignis (Schwangerschaft oder Transfusion) induziert wurden, binden an die entsprechenden Antigene auf der Oberfläche der **Thrombozyten des Blutprodukts**. Die „AK-beladenen“ Thrombozyten werden beschleunigt aus der Zirkulation entfernt.

Testung auf thrombozytäre AK:

Nach ggf. Ausschluss bzw. Identifizierung von HLA-AK Testung auf **Thrombozyten-AK** in einem Testsystem, das durch Anwesenheit von HLA-AK nicht gestört wird (**MAIPA**). Die serologischen Ergebnisse mit Ermittlung der GP-Komplexe, mit denen der AK reagiert, erfordern eine Bestätigung und **Ergänzung zur HPA-AK-Differenzierung mittels molekulargenetischer HPA-Typisierung des Patienten**. Diese dient gleichzeitig der Auswahl optimal geeigneter Thrombozytenspender. Bei der Suche nach geeigneten Spendern für Patienten mit AK-Gemischen oder Refraktarität trotz Beachtung der AK kann ein **Cross match im MAIPA** hilfreich sein.

Das therapeutische Vorgehen

beruht auf der Transfusion **kompatibler mittels Apherese gewonnene TK (57)**. Die Spender werden gezielt nach den HPA-Merkmalen ausgewählt. Das Antigen, gegen welches sich der Patienten-AK richtet, darf nicht vorhanden sein. Dafür ist eine **molekulargenetische HPA-Typisierung der Spender** erforderlich.

4. Posttransfusionelle Purpura (PTP)

Die PTP ist eine seltene Nebenwirkung der Transfusion (44), die etwa 1 Woche nach Gabe von Blutprodukten, meist von Erythrozytenkonzentraten, zu einer isolierten Thrombozytopenie (Thrombozytensturz) mit Blutungsneigung führt. Betroffen sind hauptsächlich Frauen im mittleren und höheren Lebensalter mit vorangegangenen Immunisierungsereignissen (Schwangerschaft, Transfusionen) (46). Nach 3 bis 5 Wochen bildet sich die Thrombozytopenie spontan zurück.

Pathophysiologie:

Der immunologische Mechanismus ist nicht geklärt. **Thrombozytenspezifische Allo-AK** des Patienten (am häufigsten gegen Ag des GP IIb / IIIa, insbesondere **Anti-HPA 1a-AK**) mit

einer Autoimmunkomponente (45)

führen zu einer Elimination autologer Plättchen aus dem Kreislauf. Die Allo-AK lassen sich von den Patiententhrombozyten eluieren, obwohl diese für das Antigen negativ sind (46). Mögliche Erklärung der Bindung der AK an die Thrombozyten ist eine Anlagerung von Immunkomplexen oder eine Adsorption von Spender-GP an die Patiententhrombozyten. Denkbar ist auch eine pseudospezifische Immunantwort auf kreuzreagierende Antikörper (47).

Testung auf thrombozytäre AK:

Im Speziallabor gelingt in der Regel der Nachweis der **Thrombozyten-AK** im Patientenserum. Begleitende HLA-AK können den Testansatz stören. Deshalb ist z. B. der **MAIPA** zu empfehlen. Das Ergebnis der Bestimmung der **HPA-Merkmale** beim Patienten ergibt eine Abwesenheit des Antigens, gegen welches der AK gerichtet ist.

Therapeutisch

wird der Einsatz von ivlg empfohlen (48, 49). Thrombozytenkonzentrate sind unwirksam (50).

5. Medikamentenbedingte Immunthrombozytopenie (MIT)

Die MIT ist eine durch Medikamente (Tabelle 5) oder deren Metaboliten induzierte Thrombozytopenie, die ca. 7 Tage nach Ersteinahme des Medikaments auftritt. Bei Reexposition

**Medikamente als Verursacher einer Immunthrombozytopenie
Medikamenten-assoziierte Autoimmun-Thrombozytopenie**

Abciximab	Acetaminophen	Acetazolamid	Allopurinol
Aminoglutethimid	Amiodaron	Amrinon	Aspirin
Carbamazepin	Carbenicillin	Cefotiam	Cefalotin
Cefamandol	Chinin	Chinidin	Chlordiazepoxid
Chlorpheniramin	Chlorthalidon	Chlorthiazid	Cimetidin
Cocain	Codein	Danazol	Desipramin
Diazepan	Divlofenac	Difunisal	Digitoxin
Diltiazem	Eptifitabid	Erythromycin	Fenoprofen
Furosemid	Gentamicin	Goldsalze	Heparin
Hydrochlorothiazid	Hydroxychloroquin	Imipramin	Interferon
Isoniazid	Ketoprofen	Levamisol	Lidocain
Meperidin	Meprobamat	Methicillin	Methyldopa
Minoxidil	Morphin	Naproxen	Nitrofurantoin
Nomifensin	p-Aminosalicylsäure	Penicillamin	Penicillin
Pentamidin	Phenylbutazon	Phenytoin	Piperacillin
Piroxicam	Procainamid	Prochlorperazin	Prothetazin
Ranitidin	Rifampicin	Spironolacton	Sulfasalazin
Sulfonylharnstoffe	Tetracyclin	Thioguanin	Tirofabin
Ticlopidin	Trimethoprim/Sulfameth.	Valpainsäure	Vancomycin

Tabelle 5

nach (66)

vergehen nur Stunden bis Tage. Nach Absetzen des Medikaments normalisiert sich die Thrombozytenzahl innerhalb von zwei Wochen. 1 von 100.000 Patienten mit Medikamenteneinnahme entwickelt eine Thrombozytopenie. Differenzialdiagnostisch müssen krankheitsbedingte Ursachen und Thrombozytenbildungsstörungen ausgeschlossen werden. Als Sonderform wird eine MIT unter Einnahme von GP IIb / IIIa –Inhibitor-Therapie betrachtet. Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) mit dem Risiko thromboembolischer Komplikationen (siehe HIT II) ist ein eigenes Krankheitsbild.

Pathophysiologie:

Die Pathogenese der MIT ist bisher nicht geklärt. Die medikamentenbedingten AK reagieren spezifisch mit einem GP der Thrombozytenmembran in Anwesenheit des auslösenden Agens (Medikament oder Medikamentenmetabolit).

Testung auf thrombozytäre AK:

Der Nachweis der AK ist schwierig. Wird die Immunreaktion durch Metaboliten eines Medikaments ausgelöst, gelingt er i.d.R. nicht. Um AK gegen die GP bei der Testung erfassen zu können, sind in vitro deutlich höhere Konzentrationen des Medika-

ments erforderlich als beim therapeutischen Einsatz.

6. Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT II)

Die HIT II ist eine gefährliche immunologische Komplikation einer Heparintherapie. Heparin-induzierte AK verursachen neben einer gesteigerten Plättchendestruktion mit Thrombozytopenie eine intravaskuläre Thrombozytenaktivierung verbunden mit erhöhter Thrombinbildung. Die HIT II ist eine erworbene Form einer Thrombophilie. Von der HIT II muss die HIT I abgegrenzt werden, bei der es zu Beginn einer Heparintherapie außerhalb eines Immungeschehens zum reversiblen Abfall der Thrombozyten kommt. Der Zustand ist selbstlimitierend. Die HIT II tritt bei 0,3 bis 3,0 % der Patienten auf, die mit Heparin behandelt werden (**63, 64, 68**). Die Patienten haben ein hohes Risiko venöser (tiefe Venenthrombosen, evtl. mit Lungenembolie) und arterieller (periphere arterielle Ischämie der unteren Extremitäten) Gefäßverschlüsse. Betroffen sind besonders weibliche Patienten mit orthopädischen oder kardiochirurgischen Eingriffen, die mit unfractioniertem Heparin behandelt werden (**63**). Das Leitsymptom ist ein Thrombozytenabfall auf 50 % des Ausgangswertes (relative Thrombozytopenie) 5-10 Ta-

ge nach Beginn der Heparintherapie. Allerdings haben 10 bis 15 % der HIT-Patienten Thrombozytenwerte von mehr als $150 \times 10^9/l$ (**63**). Deshalb ist auf die Thrombozytenkinetik zu achten. Bei Reexposition kann der Patient, wenn noch zirkulierende HIT-AK vorhanden sind, schneller mit einem Thrombozytensturz (rapid-onset-HIT) und ggf. thromboembolischen Komplikationen reagieren.

Pathophysiologie:

Der Plättchenfaktor4 (PF4) ist das wichtigste Antigen der HIT (**67**). Der PF4 ist ein körpereigenes Protein. Er kann mit Heparin einen Immunkomplex bilden, der die Exprimierung von Krypt- oder Neoantigenen zur Folge hat. Die dagegen gerichteten HIT-AK sind meist AK vom IgG-Typ (**67**). Sie binden als HIT-AK-PF4-Heparin-Komplex über Fc-Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche. Im Ergebnis dieses komplexen Geschehens kommt es

- zur Aktivierung der Thrombozyten,
- zur Neutralisierung von Heparin durch Bindung an den PF4,
- zur Freisetzung thrombozytärer Mikropartikel,
- zur Endothelzellaktivierung mit Freisetzung von Tissue-Faktor, der die Thrombinbildung weiter steigert,

Wahrscheinlichkeitskriterien

der HIT-Verdacht basiert auf folgenden Kriterien	Score	2	1	0
Thrombozytopenie	☐	niedrigster Wert ≥ 20 GPT und > 50 % Abfall	niedrigster Wert 10-19 GPT oder 30-50 % Abfall	niedrigster Wert < 10 GPT oder < 30 % Abfall
Tag des Auftretens des Thrombozyten-Abfalls	☐	Tag 5-10 oder ≤ 1 bei früherer Heparintherapie (innerhalb der letzten 30 Tage)	unbekannt, aber könnte zur HIT passen bzw. > 10 bzw. ≤ 1 bei früherer Heparintherapie (innerhalb der letzten 30 bis 90 Tage)	Tag < 4 (keine frühere Heparintherapie)
Thrombosen oder andere Komplikationen	☐	gesicherte neue Thrombose, Hautnekrosen, anaphylaktische Reaktion (anaph. Reaktion nach Heparinbolus)	Fortschreitende oder rezidivierende Thrombose, Verdacht auf Thrombose (noch nicht bestätigt) oder nicht nekrotisierende Hautläsionen	keine Komplikationen
andere Gründe für den Thrombozytenabfall	☐	keine	denkbar	definitiv
Wahrscheinlichkeits-Score	☐	6-8 Punkte hoch	4-5 Punkte mittel	0-3 Punkte gering

Tabelle 6

nach (62)

- und zur Makrophagen-/Monozytenaktivierung.

Eine Thrombose oder Embolie bei Thrombozytopenie entsteht.

Testung auf thrombozytäre AK:

Test zum Nachweis der HIT-AK dienen der Sicherung einer klinischen Verdachtsdiagnose, deren Wahrscheinlichkeit mit dem 4T-Score (38) (Tabelle 6) ermittelt wird. Funktionelle und immunologische Tests ergänzen einander. Die AK sind bis zu 3 Monate im Blut nachweisbar (65).

Bei Patienten mit HIT-II-Symptomatik (Thrombosen oder Embolien) fin-

den sich meist AK der Klasse IgG. Ein funktioneller Test ist zur Feststellung einer Kreuzreaktivität der HIT-AK mit niedermolekularem Heparin oder Danaparoid in vitro erforderlich (38). Ein Screening bei asymptomatischen Patienten ist nicht sinnvoll.

Therapeutisch

ist bereits bei einem begründeten Verdacht auf eine HIT II ein Absetzen des Heparins unumgänglich. Alternativ stehen modifiziertes Heparinoid (Danaparoid), niedrigmolekulare Heparine oder Hirudin zur Verfügung. Eine Kreuzreaktivität der HIT-AK ist möglich. Die medikamentöse Thera-

pie mit Thrombininhibitoren (Argatroban) soll die erhöhte Thrombinbildung stoppen.



Die Literaturhinweise finden Sie im Internet zum Download unter: www.drk-haemotherapie.de