

Diagnostik von angeborenen und erworbenen Thrombozyten-Erkrankungen

Zusammenfassung

Eine Thrombozytendysfunktion kann sowohl durch einen hereditären Thrombozytendefekt als auch durch Begleiterkrankung oder Medikamente verursacht sein. Zu den Erbkrankheiten gehört beispielweise die verminderte Expression und Funktion der Membranrezeptoren. Erworbene Störungen der Thrombozytenfunktion sind häufiger und meist Folge von Krankheiten oder eingenommenen Medikamenten. Das klinische Bild von Patienten mit thrombozytären Erkrankungen kann sehr heterogen sein. Häufig treten multiple Petechien der Haut, typischerweise am deutlichsten im Bereich der Unterschenkel, verstreute kleine Ekchymosen nach Bagateltraumen oder Schleimhautblutungen auf. In diesem Beitrag werden wir eine kurze Zusammenfassung über die aktuellen Labormethoden zur Thrombozytenfunktions-testung und Antikörperdiagnostik vorstellen, um die Wahl der bestmöglichen Testmethode für Patienten mit thrombozytären Erkrankungen zu optimieren.

Summary

Platelet dysfunctions can be caused by inherited platelet disorders as well as comorbidities or drugs. Platelet function testing is both complex and labor intensive. Evaluation of platelet count, review of peripheral blood cell morphology and bleeding assessment tools can aid the initial differential diagnosis. For patients requiring further laboratory testing, platelet aggregometry, secretion assays and immunofluorescence are the most useful next steps and will direct further specialized testing including flow cytometry, electron microscopy and genetic diagnostics. Standardization of platelet function analysis and antibody testing are very essential and can optimize diagnosis and assure quality results. In this article we will focus on current laboratory methods which can be used to identify the underlying defects in platelet disorder. Information provided in this article will allow applying the best possible diagnostic and therapeutic approach to patients with inherited as well as acquired platelet disorders.

EINLEITUNG

Thrombozyten sind wichtige Bestandteile des Gerinnungssystems. Sie werden von Megakaryozyten durch Thrombopoetin-Stimulus im Knochenmark gebildet. Der normale Thrombozytenwert liegt zwischen 140 000 und 440 000/ μl , wobei etwa ein Drittel der Thrombozyten vorübergehend in der Milz gespeichert werden. Thrombozyten zirkulieren 7–10 Tage im Blut und werden dann primär in der Milz und der Leber abgebaut.

Thrombozytäre Erkrankungen können unterteilt werden in:

1. Thrombozythämie (wird hier nicht diskutiert)
2. Thrombozytopenie
3. Thrombozytenfunktionsstörung

Eine Thrombozytopenie wird durch verminderte Produktion im Knochenmark, gesteigerten Abbau oder Verbrauch von Thrombozyten, gesteigerter Sequestration in der Milz bei normaler Thrombozytenüberlebenszeit sowie einer Kombination dieser Möglichkeiten verursacht. Sinken die Thrombozytenwerte $< 50\,000/\mu\text{l}$, kann es zu leichten spontanen Blutungen kommen. Bei Werten $< 5\,000/\mu\text{l}$ liegt ein deutlich erhöhtes Risiko auch für schwere Blutungen vor.

Eine Thrombozytendysfunktion kann sowohl durch einen hereditären Thrombozytendefekt als auch durch Begleiterkrankung oder Medikamente verursacht sein. Zu den Erbkrankheiten gehören die Glanzmann-Thrombasthenie sowie das Bernard-Soulier-Syndrom, bei welchen eine verminderte Expression und Funktion der Glykoproteine (GP) IIb/IIIa bzw. Ib/IX vorliegt. Außerdem existieren z. B. Storage-Pool-Erkrankungen, bei denen eine gestörte Speicherung bzw. Freisetzung von Inhaltsstoffen der α - oder δ -Granula ursächlich ist. Eine Übersicht über die wichtigsten hereditären Thrombozytendefekte ist in **Tabelle 1** dargestellt.

Erworbene Störungen der Thrombozytenfunktion sind häufiger und meist Folge von Krankheiten oder Medikamenteneinnahme (z. B. Acetylsalicylsäure, Ibuprofen).

Das klinische Bild bei Patienten mit thrombozytären Störungen ist sehr heterogen. Häufig treten multiple Petechien der Haut, typischerweise am deutlichsten im Bereich der Unterschenkel, Ekchymosen nach Bagateltraumen oder Schleimhautblutungen (Epistaxis, Blutungen des Gastrointestinal- und/oder Urogenitaltrakts) auf. Gastrointestinale Blutungen bzw. Blutungen im Zentralnervensystem sind nicht selten und können lebensbedrohlich sein.

In diesem Beitrag fassen wir aktuelle Labormethoden

zur Thrombozytenfunktionstestung und Antikörperdiagnostik zusammen, um die gezielte Diagnostik bei Patienten mit Verdacht auf eine thrombozytäre Erkrankung zu optimieren.

PRÄANALYTIK

Die Thrombozytenkonzentration im peripheren Blut ist ein wegweisender Parameter bei der Thrombozytendiagnostik und wird bei jedem kleinen Blutbild mitbestimmt. Während der Blutentnahme sollte die Aktivierung von Thrombozyten vermieden werden, indem auf Stauung der Venen bzw. Verwendung von Vacutainer® verzichtet wird. Bestimmte Antikoagulantien, wie z. B. EDTA oder Citrat, die schon als konzentrierte Lösungen in die Blutentnahmeröhrchen vorbefüllt sind, können mit Rezeptoren auf der Oberfläche der gepressten Thrombozyten interagieren. Dies ist nicht ungewöhnlich, wenn EDTA Röhrchen benutzt werden. Solch eine Pseudothrombozytopenie lässt sich durch den Nachweis von Thrombozytenaggregaten im gefärbten Blutausstrich bestätigen bzw. ausschließen.

Bei der Untersuchung der Thrombozytenfunktion ist die Präanalytik sehr entscheidend. So sollten die Röhrchen nicht in der Kälte bzw. im Kühlschrank gelagert werden, da dies zu Rezeptoren-Clustering und damit zur Voraktivierung der Thrombozyten führen kann.

Wenn Screening-Tests, wie z. B. PFA-100 oder VerifyNow, eine Blutgerinnungsstörung erkennen lassen, müssen vor allem bei einer verlängerten Blutungszeit nicht-throm-

bozytäre Gründe (z. B. von-Willebrand-Syndrom, niedrige Hämatokrit-Werte, Medikamente) ausgeschlossen werden. Deswegen sollten Ärzte gezielt nach Einnahme von Medikamenten, wie Acetylsalicylsäure, Indomethacin oder anderen nichtsteroidalen Antirheumatika fragen, da Patienten diese Medikation oft nicht als „Medikamente“ betrachten. Thrombozyten besitzen keinen Zellkern und haben nur limitierte Fähigkeiten zur de-novo-Proteinsynthese. Medikamente wie Acetylsalicylsäure hemmen daher die Enzyme der Thrombozyten irreversibel für den Rest ihrer Lebensdauer. Dementsprechend sollten Patienten für eine optimale Thrombozytenfunktionstestung 7–10 Tage vorher keine dieser Medikamente eingenommen haben.

MORPHOLOGIE UND PHÄNOTYPISIERUNG DER THROMBOZYTEN

Die vollautomatisierten Analysesysteme und die Impedanzmessung zur Bestimmung der Thrombozytenzahl liefern genaue Ergebnisse innerhalb eines breiten Spektrums. Die Messgenauigkeit ist jedoch vermindert, wenn die Thrombozytenzahl unter 50 000/μl liegt, vor allem wenn das Thrombozytenvolumen (MPV) stark erhöht ist. Die meisten automatisierten Zellzähler ermitteln das MPV als zusätzlichen Parameter. Das gemessene MPV hängt stark von dem benutzten Gerät ab, weswegen dieser Parameter immer bezogen auf den dazugehörigen Referenzbereich beurteilt werden sollte. Zu beachten ist, dass das MPV von den unterschiedlichen Antikoagulantien im Blutentnahmeröhrchen (Citrat oder EDTA) und von den Lagerungsbedingungen (Dauer und Temperatur) beeinflusst wird. Bei einer Makrothrombozytopenie kann es zur Ermittlung von falschen MPV-Werten kommen, da sehr große Thrombozyten in unterschiedlichen Anschnitten detektiert werden könnten. In diesem Fall ist eine direkte Auszählung mittels Hämozytometer oder Durchflusszytometrie sowie die Beurteilung eines Blutausstrichs hilfreich.

Die Thrombozytenmorphologie, speziell was die Größe und das Anfärbeverhalten anbelangt, ist im Blutausstrich, gefärbt nach Wright's oder May-Grünwald-Giemsa (**Abbildung 1**), gut zu beurteilen. Blass gefärbte Thrombozyten können durch eine reduzierte Anzahl an α-Granula verursacht sein, die auf eine Storage-Pool-Erkrankung (z. B. das Gray Platelet Syndrom) hindeuten. Zusätzlich erhält man Informationen über die Morphologie der Erythrozyten und Granulozyten. Kleine blau gefärbte Einschlusskörperchen in polymorphkernigen Leukozyten können auf eine MYH9-zugehörige Erkrankung hinweisen. Der Thrombozytendurchmesser (MPD) kann auch

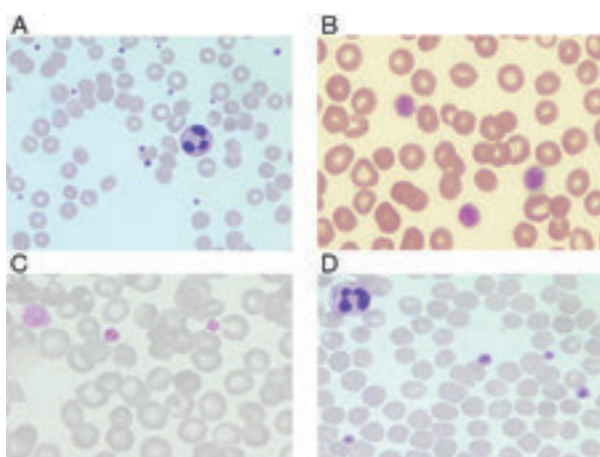


Abbildung 1: Blutausstrich gefärbt nach May-Grünwald-Giemsa

A) normal, B) Patienten mit Riesenthrombozyten (Bernard-Soulier-Syndrom), C) Patienten mit Alpha-Storage-Pool-Disease (Pseudo Grey Platelet Syndrom), D) Einschlusskörperchen (May-Hegglin-Anomalie)

wegweisende Informationen über die Erkrankung liefern. Der MPD kann durch ein okulares Mikrometer oder eine computerassistierte Bildanalyse quantifiziert werden. Ein mittlerer MPD von $> 4 \mu\text{m}$ deutet auf eine angeborene Thrombozytopenie mit Riesenthrombozyten, z.B. das biallele Bernard-Soulier-Syndrom und MYH9 assoziierte Erkrankungen, hin. Im Gegensatz dazu kann ein MPD $< 2 \mu\text{m}$ auf eine x-chromosomale Thrombozytopenie, ein Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS), hindeuten. Demzufolge kann der MPD bei der Unterscheidung zwischen einer angeborenen- oder immunbedingten Thrombozytopenie hilfreich sein.

Eine vielversprechende Technik ist die Immunfluoreszenz, die die Diagnose von erblich bedingten Thrombozytenerkrankungen erleichtert. Dazu werden zuerst Blutaussstriche angefertigt, luftgetrocknet und dann auf normalem Postweg in Referenzlabore versandt. Dort werden die Blutaussstriche mit spezifischen Antikörpern, die gegen thrombozytäre Proteine gerichtet sind, inkubiert. Die Auswahl der zu testenden Antigene erfolgt zum einen durch die Information der Thrombozytengröße und Morphologie und zum anderen durch Hinweise aus der Eigen- und Familienanamnese. Die Antikörperbindung wird daraufhin mit fluoreszenz-markierten, sekundären Antikörpern detektiert, die Blutaussstriche unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die Expression der funktionell relevanten Membranglykoproteinkomplexe z. B. GPIIb/IIIa und GPIb/V/IX wird im Vergleich zu einer Kontrolle beurteilt. Darüber hinaus kann eine abnormale Expression von α - oder δ -Granula-Markern zu weiteren Schritten in der Diagnostik von Storage-Pool-Erkrankungen führen. Eine β 1-Tubulin-assoziierte Makrothrombozytopenie ist typischerweise durch das Fehlen der β -Tubulin-Isoform in der Marginalzone der Thrombozyten gekennzeichnet. Schließlich bietet die Lokalisation des Nicht-Muskel-Myosin Typ IIA im Zytoplasma der Granulozyten einen wichtigen Hinweis für die Diagnose einer MYH9-Mutation.

Die Durchflusszytometrie ist eine weitere Methode, mit welcher thrombozytäre Erkrankungen diagnostiziert werden können. Um die Expression der Membranglykoproteine (GP Ib/IX/V und GP IIb/IIIa) zu quantifizieren, werden spezifische monoklonale Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, verwendet. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur Dichte der Glykoproteinkomplexe und kann mit der gesunder Spender verglichen werden. Auch quantitative Veränderungen des Kollagen- (GPVI, Integrin α 2/ β 1), Fi-bronektin- (Integrin α 5/ β 1) oder Lamininrezeptors (Integrin α 6/ β 1) können mitbestimmt werden.

FUNKTIONSUNTERSUCHUNG DER THROMBOZYTEN

Thrombozytenfunktionsstörungen können mit verschiedenen laborchemischen Tests beurteilt werden. Diese Tests bestimmen eine oder mehrere biologische Funktionen wie Adhäsion, Sekretion oder Aggregation entweder anhand einer statischen oder dynamischen Messung.

Einige Methoden werden als Screening-Tests in Routinelaboren eingesetzt, wie z.B.: PFA-100 und PFA-200, VerifyNow, Plateletworks, Impact-CA, Placar PRT-7000, Thrombelastographie (TEG) und Thrombelastometrie (Rotem). Diese Tests sind schnell durchführbar, jedoch unspezifisch für Thrombozytendefekte. Zudem sind diese Methoden sehr empfindlich gegenüber Veränderung des Hämatokrits und der Thrombozytenzahl.

Die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) misst die Thrombozytenaggregation in Echtzeit. Die dynamische Messung der verschiedenen Aggregationsphasen ermöglicht die Beurteilung von verschiedenen thrombozytären Funktionen. Dazu wird eine Probe plättchenreiches Plasma unter Scherstress bei 37°C inkubiert. Dabei wird die Veränderung der Lichtdurchlässigkeit nach Zugabe von verschiedenen Agonisten photometrisch gemessen und aufgezeichnet.

Die Kurven, die von der LTA abgeleitet werden, können in drei Hauptphasen eingeteilt werden. Zunächst docken die Agonisten an die Thrombozyten an und werden dadurch geprimt. Dies führt dazu, dass die Thrombozyten von ihrer diskoiden Form in eine eher sphärische Form mit ausgedehnten Filopodien übergehen. Hierbei kann in der LTA ein vorübergehender kleiner Abfall der Lichtdurchlässigkeit beobachtet werden (shape change). Danach erfolgt die „erste Welle“, die reversible, fibrinogenabhängige Aggregation. Die „zweite Welle“ zeigt die irreversible Aggregation infolge der Thromboxan-A₂ Formation und Sekretion der Granula an. Ristocetin induziert durch Konformationsänderung des von-Willebrand-Faktor eine Bindung an GP Ib α und somit eine Thrombozytenagglutination. Diese Messung erlaubt die Diagnostik eines Bernard-Soulier-Syndroms und von Subtypen eines von-Willebrand-Syndroms. Typischerweise wird in der LTA der maximale Anstieg der Lichtdurchlässigkeit nach der Agonistenzugabe (max. % Aggregation) dokumentiert. Die gemessenen Werte werden mit denen von gesunden Probanden verglichen. Die Referenzbereiche werden in den Laboren durch Thrombozytentestungen von mehreren (mindestens 20) gesunden Spendern festgelegt.

	Molekulare Pathogenese	Aggregometrie	Durchflusszytometrie	Weitere Diagnostik
Glanzmann Thrombasthenie	Fehlende Expression bzw. Funktion des GPIIb/IIIa	Ausgebliebene Aggregation mit allen Agonisten außer Ristocetin	GPIIb/IIIa-Komplex nicht nachweisbar bzw. vermindert	Immunoblot, genetische Testung
Bernard-Soulier-Syndrom	Verminderte Expression bzw. Funktion des GPIb/IX	Ausgebliebene Agglutination mit Ristocetin	GPIb/IX-Komplex nicht nachweisbar bzw. vermindert	Immunoblot, genetische Testung
Delta-Storage Pool Disease	Fehlende Delta Granula bzw. Störung deren Freisetzung	Verminderte Aggregation mit ADP, fehlende bzw. verzögerte zweite Phase, Desaggregation	Verminderte Expression von CD63 nach Aktivierung	ATP-Freisetzung, Mepacrin-Test, Immunfluoreszenzmikroskop., EM, genetische Testung
Alpha-Storage Pool Disease	Fehlende Alpha Granula bzw. Störung der Freisetzung	Kein einheitliches Muster	Vermindert Expression von CD62 nach Aktivierung	Blutausstrich, Immunfluoreszenzmikroskopie, genetische Testung
Signaltransduktions-Defekt	Dysfunktionierende Moleküle der Signalkaskade	Verlängerte Lag-Time, Verzögerte zweite Phase	Verzögerte Expression von CD62p bzw. PAC-1 nach Aktivierung	Phosphorylierungsassays
Von-Willebrand-Syndrom	Verminderter bzw. fehlender vWF	Verminderte bzw. ausgebliebene Agglutination mit Ristocetin	Unauffällig	vWF-Diagnostik
Platelet type vWS	Verstärkte bzw. spontane Bindung von GPIb alpha an vWF (Defekt in GPIb alpha)	Verstärktes Ansprechen auf Ristocetin in niedriger Konzentration	Unauffällig	Austauschversuch, genetische Untersuchungen des GPIb/IX
vWS Type IIb	Verstärkte bzw. spontane Bindung von GPIb alpha an vWF (Defekt des vWF)	Verstärktes Ansprechen auf Ristocetin in niedriger Konzentration	Unauffällig	Austauschversuch, vWF-Diagnostik inklusive Multimeranalyse
Aspirin-Like Defekt	Störung des Cyclooxygenasewegs	Ausgebliebene Aggregation mit Arachidonsäure, ggf. gestörte 2. Phase mit ADP	Unauffällig	Thromboxan A2 Bestimmung

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten hereditären Thrombozytendefekte

Die LTA gilt gegenwärtig als Goldstandard der Thrombozytenfunktionstestung für klinische Labore und erlaubt die Differentialdiagnose verschiedener Thrombozytenfunktionsstörungen (**Tabelle 1**). Jedoch wird diese Methode durch Unterschiede bei der Probenentnahme und -vorbereitung beeinflusst (**Tabelle 2**). Zudem ist die LTA, aufgrund der erforderlichen Mindestprobenmenge,

bei kleinen Kindern oder bei Patienten mit einer manifesten Thrombozytopenie schwer anwendbar. Standardisierte Präanalytik und analytische Variablen könnten die Beständigkeit der Ergebnisse verbessern. Eine Empfehlung zur Standardisierung wurde von der Internationalen Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseologie (ISTH) publiziert.

Präanalytik	<ul style="list-style-type: none"> • 7–10 Tage vorher keine Medikamente, die Einfluss auf die Thrombozytenfunktion haben • Blutentnahme nach einer kurzen Pause von Nikotin und Koffein • Blutentnahme ohne Stauung in Citrat-Röhrchen • die ersten 3–4 ml des entnommenen Blutes nicht zur Testung verwenden
Analyse	<ul style="list-style-type: none"> • der Test sollte innerhalb vier Stunden nach Blutentnahme abgeschlossen sein • die Aggregation nach Zugabe des Agonisten sollte für mindestens 3–5 Minuten aufgezeichnet werden • ein Standard Panel von Agonisten in bestimmten Konzentrationen sollte verwendet werden • im Falle eines pathologischen Befundes sollte das Panel mit höheren Konzentrationen oder mit weiteren zusätzlichen Agonisten erweitert werden
Interpretation	<ul style="list-style-type: none"> • Die gesamte Aggregationskurve sollte beurteilt werden, d. h.: shape change, erste und zweite Phase, Lag Time, Steigung der Aggregationskurve und ggf. eine Disaggregation.

Tabelle 2: Empfehlungen zur optimalen Durchführung der Lichttransmissionsaggregometrie

Obwohl die LTA als Goldstandard betrachtet wird, deuten neueste Studien darauf hin, dass die LTA alleine nicht sensitiv genug ist, um alle Patienten mit Sekretionsdefekten zu identifizieren. Demnach soll die Lumi-Aggregometrie ergänzend eingesetzt werden. Hierbei wird die Reaktion von frisch freigesetztem Adenosintriphosphat (ATP) mit einem biolumineszierenden Reagenz durch Erfassung des dabei emittierten Lichtes erfasst. Eine herabgesetzte ATP-Freisetzung gibt Hinweise auf eine Abweichung der Anzahl, der Sekretion oder des Inhalts der Speichergranula. Jedoch differenzieren abweichende Ergebnisse per se nicht zwischen einer Abnormität der Granula oder einer Sekretionsstörung. Eine Differenzierung kann mit der Immunfluoreszenzmikroskopie (s.o.) gelingen, um Patienten mit einer herabgesetzten ATP-Freisetzung von denen mit einer verminderten Anzahl an Speichergranula zu unterscheiden. Alternativ kann die Messung des Inhalts der Speichergranula und der Freisetzung an Nukleotiden mithilfe von Luminometrie oder Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durchgeführt werden. Ebenso kann die Aufnahme und Freisetzung von Mepacrin oder radioaktiv markiertem Serotonin genutzt werden, um die Sekretion der Speichergranula zu untersuchen.

Auch mit der Vollblutaggregometrie ist eine Thrombozytenfunktionstestung möglich. Hierbei wird die Veränderung der elektrischen Impedanz zwischen zwei Elektroden als Reaktion auf den Agonisten gemessen. Adhärenz-fähige Thrombozyten führen zur Steigerung der Impedanz, welche in einer Kurve dargestellt wird. Der Hauptvorteil der Vollblutaggregometrie besteht darin, dass geringere Blutmengen benötigt werden und dass weniger Manipulation an der Blutprobe notwendig ist (keine Isolation der Thrombozyten). Da sich die Reaktionsfähigkeit der Agonisten in der Lichttransmissions- und Vollblutaggregometrie unterscheidet, sind direkte Vergleichsstudien der Methoden noch erforderlich.

Die Durchflusszytometrie bietet ebenso die Möglichkeit zur Funktionsuntersuchung der Thrombozyten. Die Thrombozytenaktivierung wird mit standardisierten Agonisten gemessen. Die meisten Leitlinien empfehlen ADP und TRAP in jeweils einer optimalen und einer suboptimalen Konzentration. Weitere Agonisten, wie das Kollagenbindende Peptid oder Thromboxan-Analogen U46619 (einzeln oder in Kombination mit ADP), werden typischerweise verwendet, wenn das erste Screening nicht aussagekräftig war. Drei Marker können eingesetzt werden, um den Aktivierungsstatus bzw. die Aktivierbarkeit der Thrombozyten zu beurteilen:

- a) aktivierte Form des GPIIb/IIIa-Komplexes (mittels PAC-1)
- b) P-Selektin (CD62p) (in α -Granula gespeichert)
- c) CD63 (in lysosomalen und δ -Granula gespeichert)

Diese Marker sind auf der Oberfläche von ruhenden Thrombozyten nahezu abwesend. Die Zugabe von den o.g. Agonisten bewirkt typischerweise eine Konformationsänderung des GPIIb/IIIa Komplexes und die Freisetzung der α - und δ - Granula. In der Durchflusszytometrie kann die Expression von PAC-1, P-Selektin bzw. CD63 durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität gemessen werden.

BLUTUNGSRISIKO BEI PATIENTEN MIT THROMBOZYTENERKRANKUNG

Zur Einschätzung und Beurteilung des Blutungsrisikos bei Patienten mit Thrombozytenfunktionsstörungen kommen mehrere Scores zur Anwendung. Standardisierte Fragebögen können aussagekräftig sein, setzen aber eine gute Compliance von Arzt und Patient voraus. Detaillierte Fragen erlauben eine bessere Differen-

tialdiagnose, beanspruchen aber andererseits viel Zeit im Klinikalltag. In Deutschland sind die Blutungs-Risiko-Scores angelehnt an die Fragebögen zur Diagnose eines von-Willebrand-Syndroms.

Die Human Phenotype Ontology (HPO) Kodierung wird neuerdings benutzt, um hämatologische und nicht-hämatologische Merkmale zu standardisieren. Dieser Score hilft dabei, Patienten, die ähnliche klinische Manifestationen und Laborergebnisse haben, in Erkrankungsgruppen einzuordnen. Allerdings ist eine vollständige HPO Kodierung zeitaufwendig und darüber hinaus stark abhängig von den berichtenden Ärzten und Wissenschaftlern. Nichtsdestotrotz werden in Zukunft standardisierte Blutungs-Scores für die Identifizierung von Gemeinsamkeiten in Datenbanken und Registern innerhalb der Länder, oder auch in internationalen Datenbanken, wie das der BRIDGE-BPD Konsortium, wesentlich sein.

TESTMETHODEN BEI IMMUNBEDINGTER THROMBOZYTOPENIE

Laboruntersuchungen für Thrombozyten-reaktive Alloantikörper und Autoantikörper

Die Laboruntersuchungen für eine Antikörper-vermittelte Thrombozytopenie beinhaltet die Identifikation und Klassifikation der Antikörper, die frei im Serum oder gebunden an die Thrombozyten des Patienten sind. **Tabelle 3** fasst die verschiedenen vorhandenen Tests zur Thrombozyten-Antikörper-Diagnostik und deren Verwendung bei Erkrankungen, wie der Neonatalen Alloimmunthrombozytopenie, der Posttransfusionellen Purpura, der Refraktärität nach Thrombozytentransfusionen und der Autoimmunthrombozytopenien zusammen.

Test	Beschreibung	Anwendung	Vorteile	Nachteile
Indirekte Methoden				
Durchflusszytometrie	Benötigt werden Thrombozyten von Spendern mit bekannten HPA-Merkmalen	Identifizierung von Thrombozyten-reaktiven Antikörpern aus Serum oder Plasma des Patienten	<ul style="list-style-type: none"> • Detektiert einige Antikörper, die bei Glykoprotein-spezifischen Tests schwierig detektiert werden z. B. Anti-HPA-3a • Sensitiver für instabile Antigene und Antigene mit geringer Dichte 	<ul style="list-style-type: none"> • Nicht empfohlen zur ITP Diagnostik • Ergebnisse sind qualitativ • Erlaubt keine Differenzierung zwischen Thrombozyten-spezifischen und -unspezifischen Antikörpern (z. B. HLA-Klasse I Antikörper)
MAIPA	Glykoproteine von lysierten Spender-Thrombozyten werden mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern auf eine Mikrotiterplatte immobilisiert	Bevorzugt zur Antikörpersuche bei Alloimmunthrombozytopenien z. B. FNAIT, PTP	<ul style="list-style-type: none"> • Keine Reaktivität mit nicht-HPA-Antikörpern (HLA Klasse I, ABO Blutgruppe) 	<ul style="list-style-type: none"> • Der klinische Gebrauch von Antikörpertitern ist umstritten • Kommerzielle Kits detektieren nur die häufigen Antikörper • Niedrig-titrige Antikörper mit geringer Avidität könnten nicht detektiert werden
Direkte Methoden				
Durchflusszytometrie	Benötigt werden Thrombozyten des Patienten	Identifizierung von gebunden Antikörpern auf Thrombozyten bei V. a. ITP	<ul style="list-style-type: none"> • Leicht durchzuführen • Hohe Sensitivität 	<ul style="list-style-type: none"> • Detektiert alle Plättchen-assoziierten Antikörper • Niedrige Spezifität, oft falsch positiv bei nicht-ITP
MAIPA	Immobilisierung der mit den Antikörpern beladenen Glykoproteinen der Patiententhrombozyten	Identifizierung von Antikörpern, die spezifisch an thrombozytäre Glykoproteine gebunden sind (ITP)	<ul style="list-style-type: none"> • Sensitiver und spezifischer als indirekte Tests 	<ul style="list-style-type: none"> • Sensitivität ist vermindert bei schwerer Thrombozytopenie

Tabelle 3: Methoden zur Untersuchung von thrombozytären Antikörpern

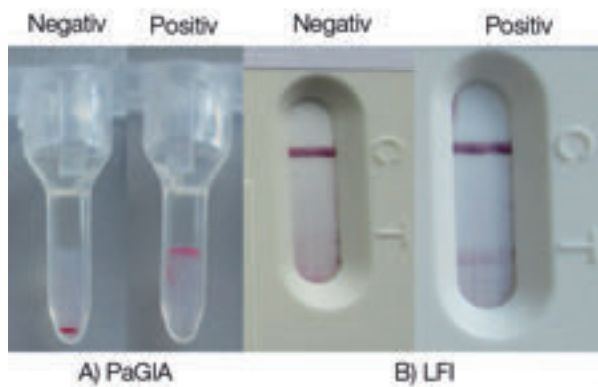


Abbildung 2: Schnelltests zum Nachweis von PF4/Heparin-Antikörpern

- A) Partikel Gelzentrifugationstechnologie (PaGIA),
 B) Lateral-Flow Immunoassay (LFI) Immunoassay

Laboruntersuchungen zur Heparin-induzierten Thrombozytopenie

Heparin ist das am häufigsten bei stationären und nicht selten auch bei ambulanten Patienten genutzte Antikoagulans. Eine der klinisch relevanten Nebenwirkungen der Heparin-Therapie ist die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT). Heparin bindet durch seine negative Ladung an viele positiv-geladene Proteine, z. B. Plättchenfaktor 4 (PF4), IL8, NAP-2, und bildet mit diesen hochimmunisierende Komplexe. Antikörper gegen Heparin und PF4 Komplexe sind für die thrombogene Natur der HIT verantwortlich. Das liegt daran, dass eine Untergruppe der Antikörper die Thrombozyten über Vernetzung der thrombozytären Fcγ-IIA Rezeptoren aktivieren kann und

dadurch zur Freisetzung von Mikropartikeln aus den Plättchen und zur Thrombinbildung führt. So kommt es bei HIT-Patienten durch Gabe von dem Antikoagulans Heparin paradoxerweise zu einer Gerinnungsaktivierung.

Oft ist es schwierig, die Diagnose einer HIT lediglich anhand der klinischen Angaben auszuschließen bzw. zu bestätigen. Daher haben die Laboruntersuchungen auf Heparin-abhängige Antikörper ein festes Standbein in der Diagnostik. Zwei verschiedene Kategorien von Tests sind zurzeit verfügbar: Immunoassays, die die Bindung von Anti-PF4/Heparin-Antikörpern detektieren, sowie funktionelle Labortests, die die Fähigkeit der Antikörper, Thrombozyten in Anwesenheit von Heparin zu aktivieren, untersuchen.

Immunoassays

Um die für HIT verantwortlichen Antikörper nachzuweisen, wird das Ziel-Antigen (PF4/ Heparin oder PF4/Polyanion Komplex) auf eine Festphase gebunden, z. B. Mikrotiterplatten im ELISA oder Mikropartikel in Bead-basierten Tests, welchen Patientenserum zugeführt wird.

Der Schnell-Test

In den meisten Testsystemen erfolgt der Nachweis von Antikörpern gegen PF4/Heparin-Komplexe durch die Verwendung von particle-based Immunoassays; z. B. Partikel Gelzentrifugationstechnologie (PaGIA), Later-Flow Immunoassay (LFI, **Abbildung 2**). Im PaGIA werden rote Beads mit PF4/Heparin beschichtet. In Anwesenheit von

4Ts	2 Punkte	1 Punkt	0 Punkte
Thrombozytopenie	Abfall der Plättchenzahl um > 50 % und niedrigster Plättchenwert $\geq 20 \times 10^9/L$	Abfall der Plättchenzahl um 30–50 % oder niedrigster Plättchenwert $10–19 \times 10^9/L$	Abfall der Plättchenzahl um < 30 % oder niedrigster Plättchenwert < $10 \times 10^9/L$
Zeitpunkt des Plättchenabfalls	Zwischen Tag 5–10 der Heparintherapie oder am Tag des Beginns (Heparin Therapie innerhalb der letzten 30 Tage)	Unbekannt bzw. > Tag 10 der Heparin-Therapie oder am Tag des Therapie-Beginns (Heparin-Therapie innerhalb der letzten 30–90 Tage)	< 4 Tage (keine frühere Heparin-Therapie)
Thrombose	Gesicherte neue Thrombose, Hautnekrosen, anaphylaktische Reaktion (anaph. Reaktion nach Heparinbolus)	Fortschreitende oder rezidivierende Thrombose, Verdacht auf Thrombose oder nicht nekrotisierende Hautläsionen	Keine
Andere Gründe für die Thrombopenie	Keine	Möglich	Definitiv

Tabelle 4: 4T Score zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit einer Heparin-induzierten Thrombopenie (HIT)

Modifiziert nach Lo GK et al, Evaluation of pretest clinical score (4 Ts) for the diagnosis of heparin induced thrombocytopenia in two clinical settings. J Thromb Haemost 2006; 4: 75965

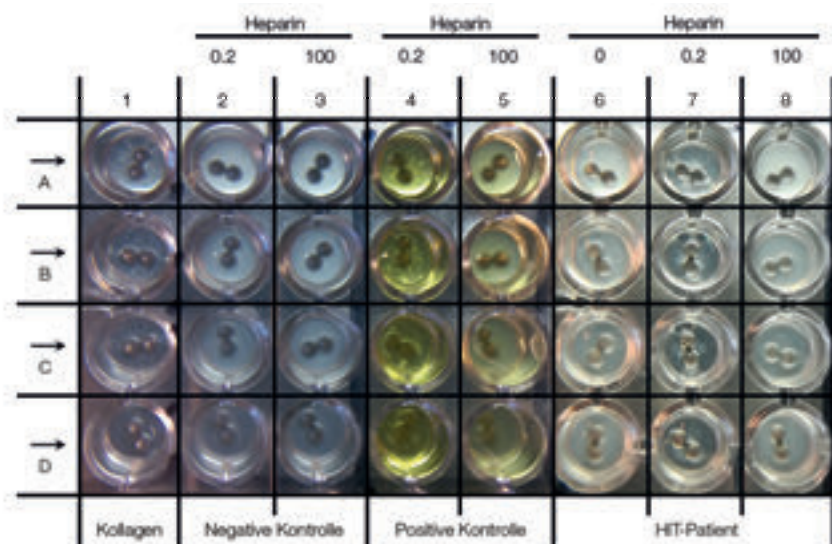


Abbildung 3: HIPA Test zum Nachweis von Plättchen-aktivierenden, Heparin-abhängigen PF4/Heparin-Antikörpern

Patientenserum wird mit gewaschenen Thrombozyten (A–D) in Anwesenheit von Puffer, 0,2 und 100 IU/ml Heparin inkubiert. Die Zeit bis zur Aggregatbildung wird dann bestimmt. Die klinisch relevanten Antikörper zeigen typischerweise eine Aggregatbildung innerhalb von 30 Minuten mit mindestens 2 von 4 Spenderthrombozyten.

Anti-PF4/Heparin-Antikörpern werden Bead-Vernetzungen gebildet. Somit können diese bei Zentrifugation nicht mehr durch das Gel wandern. Einige Berichte beschreiben falsch negative Ergebnisse, aber in einer großen prospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass bei negativem Ergebnis trotz starkem, klinischem Hinweis, eine HIT korrekt ausgeschlossen werden konnte. Bei der LFI werden PF4/Heparin-Komplexe nach Reaktion mit Antikörpern auf einem Teststreifen sichtbar gemacht. Nach Zugabe des Patientensерums mit den Antikörpern erscheint dann eine sichtbare Bande. Dieser Test zeigte sehr gute prädiktive Werte in den ersten Evaluationsstudien. Eine Auswertung im klinischen Alltag steht noch aus.

Das Hauptproblem der Schnelltests liegt daran, dass sie in der Regel eine unbefriedigende Testspezifität aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigte eine Metaanalyse, dass die genannten Schnelltests bei negativem Ergebnis gut geeignet sind eine HIT auszuschließen. Die Verwendung von einem Schnelltest in Kombination mit einem geeigneten Scoring-System (**Tabelle 4**) ist unerlässlich, um falsch negative bzw. falsch positive Ergebnisse zu vermindern.

ELISA

Im ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) werden PF4/Heparin-Komplexe als Festphase auf eine Mikrotiterplatte gebunden. Auf diese wird Patientenserum oder -plasma pipettiert. Durch Zugabe von mit Enzym markierten sekundären Antikörpern und Substrat kann die Antikörperbindung über eine Farbänderung sichtbar gemacht werden. Bei negativem Ergebnis sind diese Testsysteme sehr gut geeignet, den Verdacht auf eine HIT zu entkräften (Sensitivität ca. 99 %). Allerdings ist die Spezifität der Tests gering, lediglich 40–80 %, da Antikörper gegen die Komplexe aus Heparin und PF4 nachgewiesen werden und nicht deren Fähigkeit Thrombozyten zu aktivieren. Um die Spezifität dieser Testsysteme zu erhöhen, kön-

nen zusätzliche Anpassungen vorgenommen werden. Zum Beispiel kann der ausschließliche Nachweis von IgG Antikörpern, die Berücksichtigung der Höhe der optischen Dichte, oder die Inhibition der Antikörperbindung durch Zugabe von Heparin im Überschuss bei diesem Testsystem zu einer Erhöhung der Spezifität beitragen.

Neulich wurden die Leistung und Eigenschaften der Immunoassays in drei Metaanalysen evaluiert. Es kann gesagt werden, dass der IgG ELISA den besten Kompromiss zwischen Testsensitivität und -spezifität für den Nachweis der klinisch relevanten HIT-Antikörper besitzt.

Funktionelle Tests

Die klinisch relevantesten Antikörper sind solche, die in Anwesenheit von Heparin die Fähigkeit haben, Thrombozyten zu aktivieren. Dies kann durch funktionelle Tests beurteilt werden, die die Aktivierung der Thrombozyten gesunder Spender in Anwesenheit von Patientenserum und Heparin untersuchen. Es kann zwischen zwei Gruppen funktioneller Tests unterschieden werden. Die eine wird mit Vollblut bzw. mit Thrombozyten-reichem Plasma und die andere wird mit gewaschenen Thrombozyten durchgeführt. Die Spezifität dieser Tests kann durch die Hemmung der Thrombozytenaktivierung, durch Zugabe von Heparin im Überschuss (100 IU/mL; beweisend für Heparin-Abhängigkeit) und durch Blockierung der Fc γ -Rezeptor-IIa-abhängigen Aktivierung mit einem monoklonalen Antikörper, erhöht werden.

Tests, die mit gewaschenen Thrombozyten durchgeführt werden, sind derzeit „Goldstandard“ in der Diagnostik von Thrombozyten-aktivierenden Antikörpern. Am häufigsten werden der HIPA (Heparin-induzierter Thrombozytenaktivierungstest, **Abbildung 3**) und der SRA (Serotonin release assay) durchgeführt.

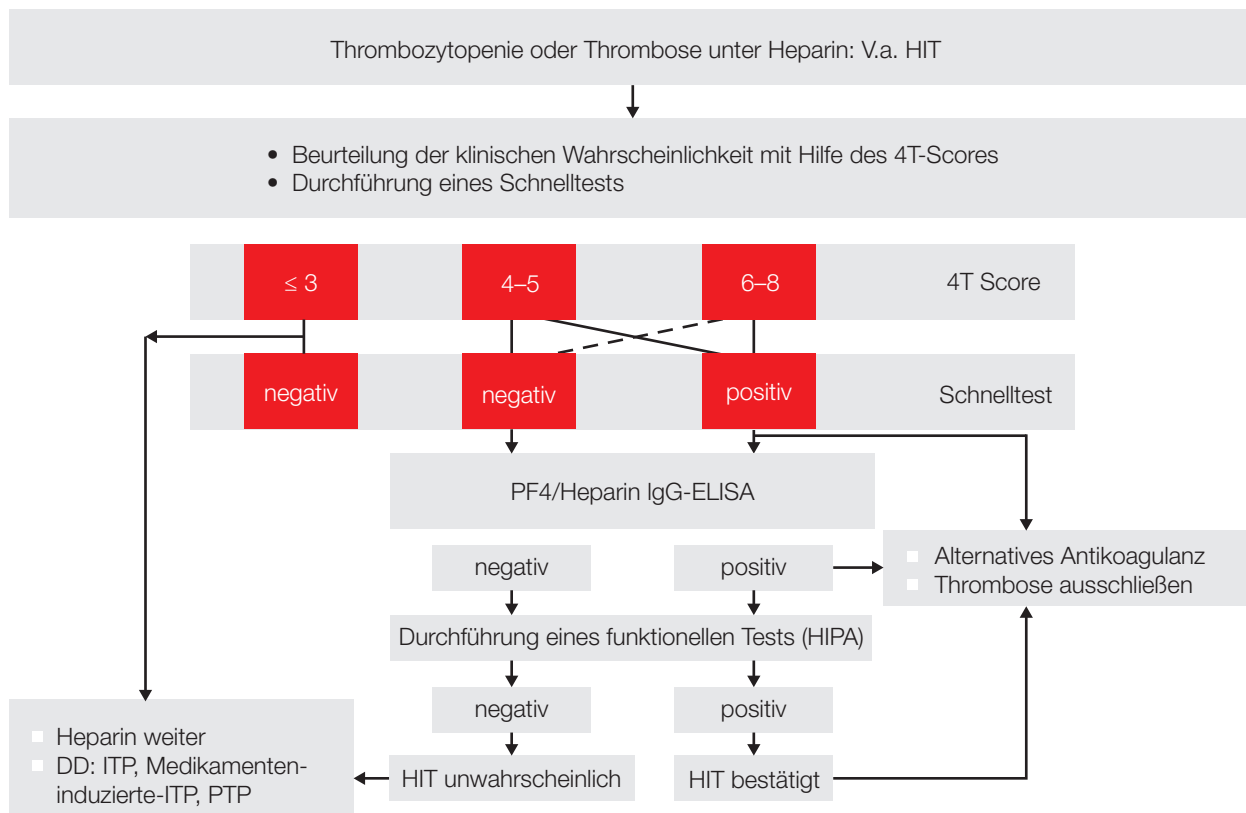


Abbildung 4: Algorithmus zur vorgeschlagenen Vorgehensweise bei Verdacht auf HIT

Beide Tests verwenden gewaschene Thrombozyten und detektieren deren Aktivierung anhand genauer Beobachtung der Aggregatbildung oder der Serotoninfreisetzung durch Heparin-abhängige Antikörper. Obwohl beide funktionellen Tests als sehr spezifisch für die Diagnose der HIT angesehen werden, haben sie einige Nachteile und Anwendungsgrenzen. Sie sind zeitaufwendig, was die Verwendbarkeit in direkter klinischer Entscheidungsfindung limitiert. Ebenso verlangen sie sowohl hoch qualifizierte Labormitarbeiter als auch Thrombozyten von gesunden Spendern. Außerdem bedarf der SRA der Nutzung von Radioisotopen, welche die meisten klinischen Labore versuchen aufgrund von Sicherheitsbestimmungen zu vermeiden.

Management von Patienten mit Verdacht auf HIT

Bei HIT Patienten ist die primäre Sorge nicht die Blutungsneigung durch Thrombozytopenie, sondern die Thrombosegefahr durch Thrombozytenaktivierung, welche durch Heparin-induzierte Antikörper getriggert wird. Daher sollte bei Patienten mit einem Thrombozytenabfall im zeitlichen Verlauf nach Beginn der Heparin-Therapie oder thromboembolischen Komplikationen in diesem Zusammenhang Heparin sofort abgesetzt werden. Allerdings entwickeln

50 % der HIT Patienten neue Thrombosen nach Absetzen der Heparin-Therapie, wenn keine alternative Antikoagulation fortgeführt wird. Deswegen muss eine Umstellung auf eine alternative Antikoagulation bei dringendem Verdacht noch vor dem Vorliegen aller Labortests erfolgen. Beispielhafter Algorithmus zur HIT-Diagnostik ist in der **Abbildung 4** zu finden.

Die Autoren



PD Dr. med. Tamam Bakchoul
Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin
gemeinnützige GmbH, Tübingen
tamam.bakchoul@med.uni-tuebingen.de



Anna Hinz
Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin
gemeinnützige GmbH, Tübingen
anna.hinz@med.uni-tuebingen.de

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