

# **Validierung eines Lateral Flow Immunoassays zum Nachweis der heparininduzierten Thrombozytopenie Typ 2**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des  
Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**vorgelegt von**

**Jakob Wilhelm Georg von Hesberg aus München**

**Gießen, 2016**

**Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Leiter: Prof. Dr. G. Bein**

**Gutachter: Prof. Dr. med. U. Sachs**

**Gutachter: Prof. Dr. med. H. Renz**

**Tag der Disputation: 01.03.2016**

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>1</b>	<b><i>Einführung</i></b>	<b>1</b>
1.1	<b>Lateral Flow Immunoassay zum Nachweis einer heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ 2 – Rechtfertigung</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Die heparininduzierte Thrombozytopenie – eine Übersicht</b>	<b>2</b>
1.2.1	Der Auslöser	2
1.2.2	Geschichte der heparininduzierten Thrombozytopenie	4
1.2.3	Ätiologie der heparininduzierten Thrombozytopenie	5
1.2.4	Symptomatik	6
1.2.5	Pathogenese	7
1.2.6	Klinische Manifestationen	10
1.2.7	Klinische Diagnostik	12
1.2.8	Immunologische Diagnostik und Testverfahren	14
1.2.9	Therapie	20
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>25</b>
2.1	<b>Fragestellung</b>	<b>25</b>
2.2	<b>Studiendesign</b>	<b>25</b>
2.3	<b>Verwendete immunologische Testverfahren:</b>	<b>26</b>
2.3.1	Heparin induced Plattelet Activation Assay (HIPA-Assay)	26
2.3.2	Antikörper gegen Plättchenfaktor 4 (PF4) – Polyvinyl-Sulfanat (PVS) – Komplexe Test (GTI Diagnostics, Waukesha, WI, USA) (GTI-IgG-ELISA)	27
2.3.3	Zymutest HIAIgG (Hyphen Biomed, Neuville-Sur-Oise, Frankreich)	29
2.3.4	Particle Gel immunoassay (PaGIA, BioRad (DiaMed), München, Deutschland)	30
2.3.5	Lateral Flow Immunoassay (LFI-HIT, Milenia Biotec, Gießen, Deutschland)	31
2.4	<b>4T-Scoring System:</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>33</b>
3.1	<b>Testphase 1</b>	<b>33</b>
3.1.1	Ergebnisse der Testverfahren in der Übersicht	34
3.1.2	Grenzwertoptimierungskurve	35
3.1.3	Korrelation zwischen elektronischem Signal und Antikörperpotential	36
3.1.4	Dauer der Testdurchführung	37
3.1.5	Zusammenhang mit dem 4T-Score	37
3.2	<b>Testphase 2</b>	<b>38</b>
3.2.1	Stabilitätsprüfung	40
3.2.2	Präzisionstestung	42
3.2.3	Qualitätskontrolle der Testung	43
3.2.4	Titrationssprüfung	43
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis:</i></b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>63</b>
7.1	<b>Zehn klinische „Regeln“ für die HIT-Diagnose</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b><i>Ehrenwörtliche Erklärung</i></b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b><i>Danksagung</i></b>	<b>65</b>
<b>10</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b>	<b>66</b>

# 1 Einführung

## *1.1 Lateral Flow Immunoassay zum Nachweis einer heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ 2 – Rechtfertigung*

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem neuen Nachweisverfahren der heparininduzierten Thrombozytopenie Typ 2 im Sinne eines Lateral Flow Immunoassays zur erleichterten Diagnostik dieser Nebenwirkung im klinischen Alltag. Einleitend werden hierbei primär die zwei unterschiedlichen Formen dieser Krankheit, ihr Verlauf und ihre Pathogenese, sowohl die daraus folgenden Therapieprinzipien beleuchtet.

Insbesondere aber wird sie sich mit den bereits vorhandenen diagnostischen Möglichkeiten befassen und ein weiteres neuartiges Testverfahren in diesem Zusammenhang vorstellen.

Die Diagnose einer heparininduzierten Thrombozytopenie oder HIT Typ 2 muss nicht nur schnell und zuverlässig erfolgen um Komplikationen zu vermeiden, sondern gleichzeitig wegweisend sein im Hinblick auf etwaige Therapieentscheidungen. Zu diesem Zweck stellt diese Arbeit einen neu entwickelten Lateral Flow Immunoassay vor: ein mit geringerem Zeitaufwand und grundlegenden Laborkenntnissen durchzuführendes Testverfahren im Vergleich zur konventionellen HIT-Diagnostik, dessen klinischer Nutzen bezüglich Validität und Reliabilität untersucht werden soll. Hierzu wurde in zwei Phasen mit unterschiedlichem Schwerpunkt ein Testprofil erstellt und zusammengefasst. Die Ergebnisse werden gesondert dargestellt und in einer abschließenden Diskussion erörtert.

## 1.2 Die heparininduzierte Thrombozytopenie – eine Übersicht

### 1.2.1 Der Auslöser

Das Arzneimittel Heparin besteht aus negativ geladenen Mukopolysacchariden, welche hauptsächlich aus Iduronsäure- und Glucosaminobausteinen (Glucosamin-N-Sulfat) aufgebaut sind. Prinzipiell werden zwei Typen unterschieden, welche sich in ihren Molekülgrößen (im Mittel 15000 Dalton) und Halbwertszeiten (subcutan appliziert ca. 4h bis 8h) unterscheiden und in der Konsequenz in ihren Anwendungsgebieten und -indikationen differieren. So kann man klinisch zwischen niedermolekularem Heparin (LMWH) und unfraktioniertem Heparin (UFH) unterscheiden (vgl. Herdegen et al., 2008). Die biochemische Grundstruktur von beiden ist jedoch gleich und besteht aus mehreren Disacchariden (Linhardt et al., 1988)

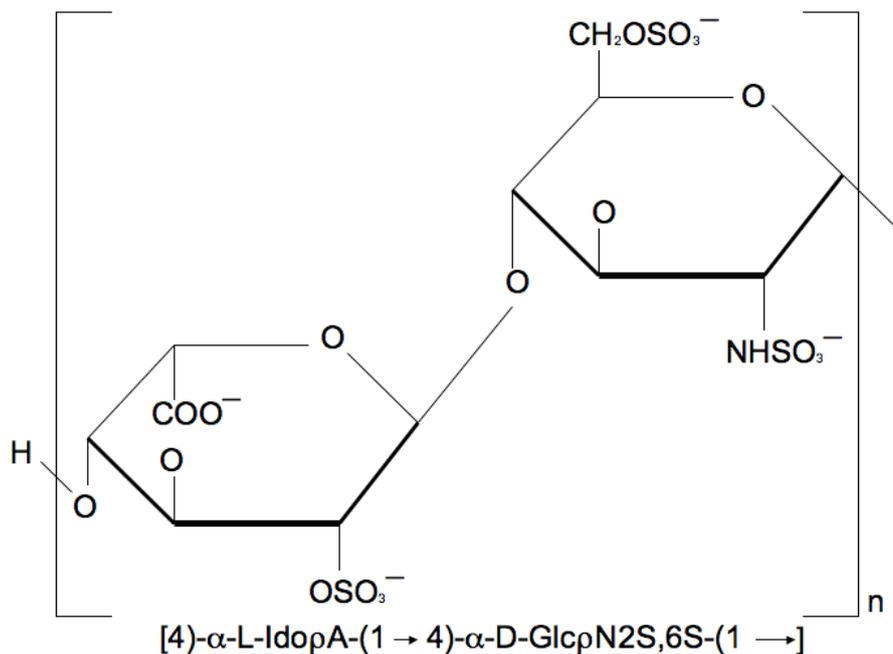


Abbildung 1: Der Grundbaustein des Heparins. Dieses Disaccharid bildet das Hauptgerüst (75-90%) der Struktur von Heparin.

Das niedermolekulare Heparin zeigt Vorteile in seiner Pharmakokinetik, wie zum Beispiel in seiner längeren Plasmahalbwertszeit und erhöhten Bioverfügbarkeit. Unfraktioniertes Heparin zeichnet sich durch seine geringeren Kosten und die Möglichkeit zur schnellen Antagonisierung mit Protamin aus. Jedoch muss die gerinnungshemmende Wirkung der unfraktionierten Heparine engmaschig überwacht werden. Intravenös bzw. subcutan appliziert, greifen beide in die Gerinnungskaskade ein. Dort wird die Wirkung von Antithrombin, einem natürlichen Antikoaganz des Gerinnungssystems, um ein Vielfaches verstärkt, und so die Aktivierung des Stuart-Prower-Faktors (Faktor X), eines Schlüsselenzyms der plasmatischen Gerinnung, und einigen anderen Gerinnungsfaktoren (Prothrombinasekomplex, Faktor XI, Faktor IX) verhindert. Zusätzlich wird Kallikrein aktiviert. Im Vergleich mit niedermolekularem Heparin inaktiviert unfraktioniertes Heparin zusätzlich noch Faktor IIa (Thrombin). Die Blutgerinnung kann nun nicht mehr effektiv ablaufen, was man sich in der klinischen Medizin zu Nutze macht: Indiziert ist Heparin hauptsächlich in der kurzfristigen Thromboseprophylaxe, insbesondere wenn ein erhöhtes Gerinnungsrisiko der Patienten besteht (z.B. durch Immobilität).

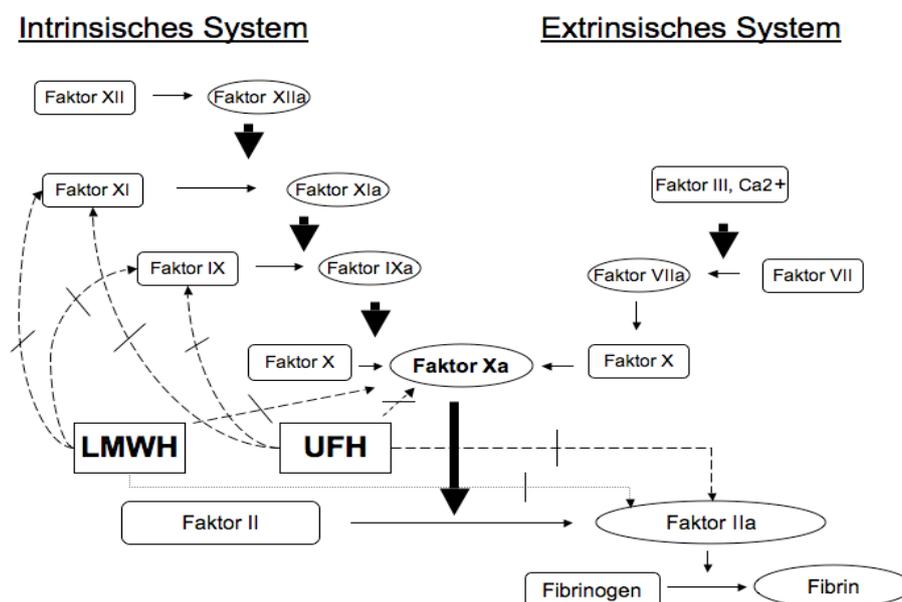


Abbildung 2: Das plasmatische Gerinnungssystem und die Auswirkungen von Heparin

## 1.2.2 Geschichte der heparininduzierten Thrombozytopenie

Die antikoagulatorische Wirkung von Heparin, das im frühen 20. Jahrhundert aus tierischem Lebergewebe (Hepar=Leber) isoliert worden war, wurde seit den 1920er Jahren untersucht und seine Wirkung auf das Gerinnungssystem in mehreren Studien festgehalten. Dies hatte zur Folge, dass Heparin seit den 1950er Jahren als Gerinnungshemmer und Antithrombotikum fest in der modernen Medizin verankert wurde.

Im Jahre 1957 wurden dann erste Nebenwirkungen in Form von Emboliefällen in Aorta und Iliakalgefäßen in Hanover, New Hampshire, während systemischer Heparintherapie beschrieben (vgl. Weismann et al., 1958). Diese traten meist zwischen dem 7.-15. Tag der Behandlung auf. Da nach Absetzen des Heparins keine weiteren neu aufgetretenen Embolien beobachtet wurden, folgerte man einen Zusammenhang mit der Heparinapplikation.

Das Aussehen dieser Embolien wurde als „weich und lachsfarben“ beschrieben, sie bestanden zum größten Teil aus Fibrin und Thrombozyten (vgl. Weismann et al., 1958). Diese, erst mit Skepsis betrachteten Beobachtungen aufgrund der vielseitigen Verwendbarkeit des Heparins, wurden ein paar Jahre später erneut nachvollzogen (vgl. Roberts et al., 1964). Auf Grund des verzögerten Auftretens der Thromboembolien wurde ein immunogenes Geschehen vermutet, welches sich in den 1970er Jahren durch verschiedene Arbeitsgruppen und vielfältige Untersuchungen bestätigte. Hier wurde zum ersten Mal der Zusammenhang mit einem durch heparinabhängige Immunglobuline ausgelösten Geschehen hergestellt (vgl. Rhodes et al., 1973). Man folgerte, dass es spezifische, durch Heparin gebildete Antigenkomplexe geben müsse, gegen die sich der Körper mit einer Bildung von Antikörpern, welche wiederum mit besagten Antigenkomplexen interagieren, zur Wehr setzt. Diese Überlegung konnte aufgrund der 1992 gemachten Entdeckung des verantwortlichen Komplexes, bestehend aus Plättchenfaktor 4 in Verbindung mit Heparin als Antigen für die heparinabhängigen Antikörper, wissenschaftlich belegt werden (vgl. Amiral et al., 1992).

In dieser Zeit wurde ebenfalls der Begriff des „White Clot Syndroms“ (Akkumulation von Fibrinaggregaten im arteriellen System) als Synonym für die heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2 beschrieben. Da diese Art von Thromben jedoch ebenfalls bei der Phlegmasia coerulea dolens auftreten, ist die Bezeichnung, zumindest was die Spezifität der Thromben angeht, nicht äquivalent zu gebrauchen.

In den 90er Jahren wurde festgestellt, dass es eine Korrelation zwischen den klinischen Begleitumständen und der Thromboselokalisation gibt, wie weiter unten beschrieben wird.

Gerade ihr immunogener Charakter und ihr ambivalentes Auftreten machen die heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2 deshalb heute noch zu einer schwer einzuschätzenden und gefährlichen Nebenwirkung der Heparinbehandlung.

### 1.2.3 Ätiologie der heparininduzierten Thrombozytopenie

Auf Grund der unterschiedlichen Molekülgrößen von beiden Heparintypen steigt das Risiko einer HIT Typ 2 nach Applikation von unfraktioniertem Heparin (UFH) auf Grund seiner vermehrten Proteinbindung und seiner höheren Molekülgröße (Molekülmasse von 15-30 kDa im Vergleich zu 3-5 kDa bei niedermolekularen Heparinen (LMWH)) um ein Vielfaches an (vgl. Greinacher et al., 2010).

Man unterscheidet klinisch zwei Typen der heparininduzierten Thrombozytopenie:

Zum einen die heparininduzierte Thrombozytopenie vom Typ 1, welche mit einem moderaten Abfall der Thrombozyten verbunden ist und meist direkt zu Beginn, d.h. in den ersten Tagen der Heparin-Therapie, auftritt. Dieser Plättchenabfall beruht auf einer direkten Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und Heparin und ist nicht immunogen vermittelt, sondern hauptsächlich auf die negative Ladung und die Größe der Heparinmoleküle zurückzuführen. Die Molekülgröße des Heparins ist direkt proportional zu deren Bindungskapazität und nimmt somit Einfluss auf das Ausmaß der Stimulation bei der Thrombozytenaktivierung (vgl. Horne et al., 1990).

Die genaue biochemische Wechselwirkung ist noch nicht vollständig geklärt, doch scheint dieser Aktivierungseffekt über den Glycoproteinrezeptor IIb/IIIa abzulaufen (vgl. Chong et al., 1989).

Die Plättchenzahlen stabilisieren sich in der Regel wieder spontan und eine medikamentöse Intervention ist nicht notwendig. Die Heparintherapie kann und sollte sogar fortgesetzt werden (vgl. Greinacher et al., 2003).

Die heparininduzierte Thrombozytopenie vom Typ 2 ist wesentlich komplexer in ihrer Ätiologie und tritt meist erst nach ca. 5-10 Tagen während der Heparinbehandlung auf, wobei das Auftreten primär unabhängig vom jeweiligen Heparintyp (LMWH/UFH) ist (vgl. Warkentin et al., 1995; Greinacher et al., 1994b).

Das Risiko liegt jedoch, wie oben beschrieben, bei unfraktioniertem Heparin höher und steigert sich sogar noch bei Verabreichung von bovinem UFH im Vergleich zu porcinem UFH, wie sich in mehreren Studien herausstellte (vgl. Schwartz et al., 1985; Francis et al.,

2003). Die Ursache hierfür zeigt sich in einer erhöhten Thrombozytenaktivierungsaffinität und einem unterschiedlichen biochemischen Profil von bovinem Heparin (Sulfat-Disaccharid-Verhältnis) (vgl. Casu et al., 1983).

### 1.2.4 Symptomatik

Die heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2 ist eine ernst zu nehmende Nebenwirkung der Heparin-gabe und stellt die häufigste Ursache für arzneimittelbedingte Immuntrombozytopenien (in 85-90% der Fälle) dar (vgl. Greinacher et al., 2010). Diese treten im Zeitraum von ca. zwei Wochen nach Applikation in unterschiedlichem Ausmaß (definitionsgemäß weniger als  $150 \times 10^9$ ) auf und bringen schwerwiegende Folgen für den Patienten im Sinne von paradoxen Thromboembolien und Gerinnungsstörungen mit sich (vgl. Greinacher et al., 2010).

Endotheliale Zellen werden stimuliert und das Gerinnungssystem zu einer massiven Produktion von Thrombin angeregt (vgl. Greinacher et al., 2010). Des Weiteren werden zusätzlich Monozyten aktiviert, welche wiederum prokoagulatorische Moleküle freisetzen (vgl. Pouplard et al., 2001).

Diese, sich akkumulierenden Wechselwirkungen können lebensbedrohliche Folgen nach sich ziehen, insbesondere durch das Auftreten von Thrombosen und daraus folgenden Embolien. Blutungen hingegen treten selbst bei sehr geringen Plättchenzahlen praktisch nicht auf.

Zusätzlich werden Hautläsionen bis hin zu Nekrosen der subkutanen Einstichstellen beschrieben, welche im Mittel 8 Tage nach Beginn der Heparintherapie auftreten (vgl. Hasegawa, 1984; MacLean et al., 1990). Dennoch sind diese Nebenwirkungen nicht obligatorisch für das Vorliegen einer HIT Typ 2. Bei alleinigem Auftreten einer Thrombozytopenie ohne initiale Thrombose nach Heparin-gabe spricht man von einer „isolierten HIT“. Das Risiko einer später auftretenden Thrombose bleibt jedoch bestehen (52,8 % nach 30 Tagen) (vgl. Warkentin et al., 1996c).

### 1.2.5 Pathogenese

Der Pathomechanismus der HIT Typ 2 beruht auf einer Antigenkomplexbildung von Plättchenfaktor 4, einem Plasmaprotein, mit den verabreichten Heparinmolekülen und einer konsekutiv immunvermittelten Antikörperproduktion (vgl. Boshkov et al., 1993).

Diese Antigenkomplexbildung ist stark von der jeweiligen Konzentration von Heparin und dem Plättchenfaktor 4 abhängig (vgl. Greinacher et al., 1994b; Amiral et al., 1995). Durch negative Ladung und die Molekülgröße der jeweiligen Heparinart beeinflusst, können diese Komplexe nun über die Heparin-Bindungsstelle an Thrombozyten anbinden (Van Rijn et al., 1987; Horne et al., 1996). Hierbei besteht jedoch auch die Vermutung, dass der Plättchenfaktor 4 diese Bindung hervorruft (vgl. Capitanio et al., 1985). Einerseits nun durch die Anlagerung der Antikörper (siehe unten) an besagte Komplexe, andererseits durch direkte Aktivierung durch Heparin oder Zell-Zell-Interaktionen werden die Thrombozyten zur Ausschüttung von prokoagulatorischen Substanzen angeregt (vgl. Marcus et al., 1995; Schattner et al., 1993). Die Antikörperbindung findet an speziellen Rezeptoren statt (siehe unten) und führt zu einer Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol Triphosphat (IP3) sowie einer konsekutiven Freisetzung von Calcium, was nachfolgend zu einer Plättchenaktivierung führt (vgl. Chacko et al., 1994).

Entgegen der Erwartung wird die heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2 aber nicht zu den Immunreaktionen vom Typ III, sondern zu den zytotoxischen Antikörperreaktionen gerechnet (vgl. Roitt et al., 1985).

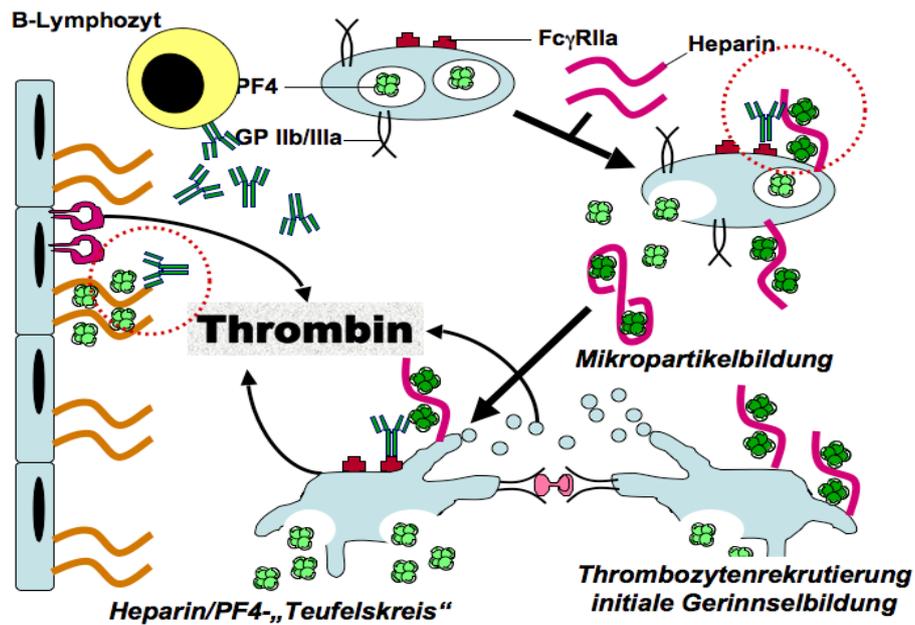


Abbildung 3: Pathogenese der HIT Typ 2 im Überblick

### 1.2.5.1 Lokalisation

Klinisch treten die Thrombosen sowohl im venösen als auch im arteriellen Blutsystem auf. Klinische Studien belegten, dass die Lokalisation der Thromben von den klinischen Begleiterscheinungen und dem postoperativen Status der Patienten abhängt (vgl. Boshkov et al., 1993). So wurde zum Beispiel eine Häufung von venösen HIT-Thrombosen bei chirurgischen Patienten beobachtet, wobei ein vermehrtes Auftreten arterieller Verschlüsse bei Patienten mit kardiovaskulären Vorerkrankungen beobachtet wurde. Insgesamt kann von einem 2:1 Verhältnis in Bezug auf venöse Thrombosen ausgegangen werden, wobei ein gleichzeitiges Auftreten nicht auszuschließen ist (vgl. Ortel et al., 1998).

### 1.2.5.2 HIT-Antikörper

Gegen PF4/Heparin-Komplexe produziert das Immunsystem Antikörper, welche an die gebildeten Antigenkomplexe binden, damit die HIT Typ 2 auslösen und die pathologische Gerinnungskaskade in Gang setzen. In dieser „Dreierkonstellation“ (PF4, Heparin, HIT-Antikörper) ist es erst möglich, die Thrombozytenaggregation auszulösen. Ob die Komplexbindung an die Thrombozyten nun vor oder nach Anlagerung der Antikörper abläuft, ist in vivo bisher noch nicht ausreichend geklärt.

Einige Studien belegen eine unabhängige Monozytenaktivierung durch Antikörper, welche eine gesteigerte Gewebefaktorproduktion zur Folge hat. Dies kann alternativ zu Thrombosen führen (vgl. Pouplard et al., 2001).

In den meisten klinischen HIT - Fällen können diese Antikörper der IgG-Klasse zugeordnet werden (vgl. Bakchoul et al., 2009). Die Pathogenität dieser Antikörper hängt zum großen Teil von ihrer Rezeptoraffinität und ihrer Konzentration im Blut ab. So zeigen z.B. IgG-Antikörper eine höhere Affinität zum PF4-Heparinkomplex als IgA und IgM (vgl. Bakchoul et al., 2009). Desweiteren wurden zugleich mehrere neue Antikörperepitope auf den PF4-Heparinkomplexen identifiziert, was die Vermutung bestätigt, dass die HIT-Antikörper nicht äquivalent binden, sondern ihre Pathogenität affinitätsbezogen vermitteln (vgl. Horsewood et al., 1996; Pouplard et al., 1997). Die Antikörpersynthese findet normalerweise nur in den ersten 5-10 Tagen nach Heparinapplikation statt. Das Risiko erst nach 10 Tagen kontinuierlicher Heparintherapie HIT-Antikörper zu bilden, sinkt dementsprechend stark ab. Das Auftreten einer Thrombozytopenie korreliert jedoch damit nicht und kann, wie oben beschrieben, auch noch einige Zeit später auftreten (vgl. Warkentin et al., 1995).

### 1.2.5.3 Der Antikörperrezeptor

Die Fc-Abschnitte der IgG-Moleküle binden an die FcγRIIa-Rezeptoren der Blutplättchen. Dieser FcγRIIa-Rezeptor ist ein Rezeptorsubtyp mehrerer übergeordneter Rezeptorklassen, wobei sich die extrazellulären Komponenten der einzelnen Unterklassen nur geringfügig unterscheiden (vgl. Brooks et al., 1989). Es handelt sich hierbei um ein 40kDa Glykoprotein, welches hauptsächlich auf Blutplättchen exprimiert wird (vgl. Rosenfeld et al., 1985). Die Affinität dieser Rezeptorklassen ist, abhängig von der bindenden Antikörperklasse, variabel. Der FcγRIIa-Rezeptor weist eine niedrige Affinität zu IgG-Antikörpern auf und

interagiert speziell mit Immunkomplexen (Antigen-Antikörper) (vgl. Warmerdam et al., 1991). Die FcγRIIa-Rezeptordichte variiert innerhalb eines Individuums nur unwesentlich, wobei verschiedene Patienten unterschiedliche Dichteparameter aufweisen können (vgl. Rosenfeld et al., 1987). Über einen spezifischen ADP-abhängigen Signaltransduktionsweg (vgl. Gratacap et al., 2000) wird nach Antikörperbindung eine calciumabhängige Asymmetrie der Thrombozytenmembran erreicht, d.h. die Membran wird instabil und die Thrombozyten verlieren ihre strukturelle Integrität. Diese Degranulierung der Zellmembran führt zu einer Freisetzung prokoagulatorischer Substanzen wie zum Beispiel Thromboxan A<sub>2</sub> (vgl. Chong et al., 1981). In der Folge verlieren die Thrombozyten ihre Stabilität, aggregieren leichter und die Zahl der funktionsfähigen Blutplättchen sinkt. Somit nimmt der FcγRIIa-Rezeptor eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der HIT Typ 2 ein (vgl. Anderson et al., 1990). In weiteren Studien wurde ein Polymorphismus der Aminosäuresequenz des Rezeptors nachgewiesen und untersucht. Eine Punktmutation an Position 131 sorgt für einen Austausch zwischen Arginin und Histidin. Hier zeigte sich, dass die Variante FcγRIIa-R/R131, durch verminderte Phagozytose und somit längerem Verbleib im Blutkreislauf, eher mit thrombotischen Komplikationen und vermehrter Thrombozytenaktivierung assoziiert ist. Zusätzlich wurde eine verstärkte Reaktion dieser Rezeptorvariante mit HIT-Antikörpern beschrieben (vgl. Lena et al., 1998).

### **1.2.6 Klinische Manifestationen**

Das zeitliche Fenster der Erstmanifestation klinischer Symptome kann variieren. So wird zusätzlich zum regelhaften Auftreten nach ungefähr 5-10 Tagen sowohl ein „Rapid Onset“ als auch ein selteneres „Delayed Onset“ beschrieben, welche mit einer eindrucklichen Thrombozytopenie direkt (1-2 Tage) nach Heparinabgabe bzw. mit einer verspäteten thrombozytopenischen Symptomatik mehrere Tage nach dem Absetzen von Heparin einhergehen. (vgl. Tholl et al., 1997; Gruel et al., 2003; Warkentin et al., 2001). Die Wahrscheinlichkeit des „Rapid Onset“ korreliert stark mit dem Zeitrahmen der vorangegangenen Applikation von Heparindosen und dem daraus resultierenden Antikörpertiter. (vgl. Warkentin et al., 2001).

So wurden Patienten mit einer kürzlich stattgehabten Heparintherapie beschrieben, die ohne primäre Thrombozytopenie bei einer zweiten Heparintherapie akut progrediente Thrombozytopenien und paradoxe Thrombosen entwickelten. Gleichzeitig schien es Patienten

mit typischer HIT-Symptomatik zu geben, die auf eine erneute Heparintherapie überhaupt nicht reagierten (vgl. Warkentin et al., 2001; Lindhoff-Last et al., 2002).

Bei dem „Delayed Onset“ einiger, mit Heparin in der Vorgeschichte (ca. 30-40 Tage vorher) behandelter Patienten fanden sich immer noch stark erhöhte Antikörpertiter und wieder neu aufgetretene Thrombozytopenien trotz fehlender aktueller Heparintherapie. In einigen Fällen wurde sogar eine heparinunabhängige Plättchenaktivierung beschrieben (vgl. Kelton et al., 1981).

Schlussfolgernd wurde festgestellt, dass in Bezug auf die diversen zeitlichen Erscheinungstypen der HIT Typ 2 die heparinspezifischen Immunglobuline nur relativ kurz (im Median ca. 50 Tage) im Blut persistieren, und die Nachweiswahrscheinlichkeit sowohl in Antigen- als auch Aktivierungsassays proportional der zeitlichen Entfernung zur ersten positiven Testung abnimmt. Diese unterschiedlichen zeitlichen Intervalle werden im Rahmen eines Autoimmunprozesses betrachtet.

Warum dieser Immunprozess nicht bei allen HIT-Patienten auftritt, ist bisher noch unklar, wird aber mit einer genetischen Prädisposition, wie zum Beispiel einem erhöhten PF4-Level im Blut, der Dichte und Polymorphismen der FcγRIIIa-Rezeptoren auf den Blutplättchen und der Höhe der Heparindosis sowohl der verwendeten Heparinart (UFH vs. LMWH), in Verbindung gebracht. Diese unterschiedlichen Morphologien besitzen deshalb eine hohe pathologische Relevanz, da sich durch sie verstärkt bzw. vermindert wirksame Angriffspunkte im Entstehungsmechanismus der HIT Typ 2 ergeben. Des Weiteren scheint die jeweilige medizinische Behandlung ebenso eine nicht zu unterschätzende Rolle zu spielen, bezogen auf den Vergleich zwischen konservativer und chirurgischer Behandlung (vgl. Chong et al., 1993; Karas et al., 1982; Denomme et al., 1997). So variiert die Wahrscheinlichkeit der Antikörperbildung nach Gabe von UFH zwischen 2% bei rein kardial behandelten Patienten, bis 50% bei kardial-chirurgisch behandelten Patienten. Dies bestätigt nur das komplizierte Zustandekommen der Antigenkomplexe durch Heparinmoleküle, dem PF-4 Blutspiegel und den herrschenden Blutzirkulationsbedingungen.

### 1.2.7 Klinische Diagnostik

Das Hauptmerkmal der HIT Typ 2 sind die thromboembolischen Komplikationen nach Heparinabgabe, wobei diese relativ eng mit spezifischem zeitlichen Auftreten, Lokalisation und Stärkegrad assoziiert sind. Für eine genauere klinische Orientierung und diagnostische Hilfestellung ist der sogenannte 4T-Score von großer Bedeutung. Dieser Score setzt sich aus der Summe von vier Unterkategorien (im Einzelnen: Thrombozytopenie, Thrombose, zeitlicher Einordnung des Plättchenabfalls bzw. Auftreten einer Komplikation und anderen Komplikationen, evtl. andere bekannte Ursachen des Plättchenabfalls) zusammen. Für jede dieser Unterkategorien werden je nach Schweregrad bis zu zwei Scoring-Punkte vergeben und danach addiert. Bei der Thrombozytopenie wird ein Plättchenabfall  $< 30\%$  des Ausgangswertes oder ein Nadir von  $< 10.000/\mu\text{l}$  mit null Punkten bewertet. Dementsprechend werden bei 30-50% Plättchenabfall (Nadir 10.000-19.000  $\mu\text{l}$ ) ein Punkt und bei  $> 50\%$  (Nadir  $> 20.000 \mu\text{l}$ ) zwei Punkte vergeben. Im Falle einer Thrombose werden bei keiner nachweisbaren Thrombose null Punkte vergeben, ein Punkt, falls der Verdacht auf eine alte bzw. wieder aufgetretene Thrombose besteht, und zwei Punkte im Rahmen einer neu nachgewiesenen Thrombose. Den zeitlichen Rahmen (Time) bewertet man mit null Punkten, wenn der Plättchenabfall weniger als vier Tage besteht und keine Heparinapplikation stattgefunden hat. Wenn die Heparinabgabe  $> 11$  Tage zurückliegt oder die Plättchen in den letzten 30-100 Tagen akut, bei vorheriger Heparinabgabe, abgefallen sind, so wird ein Punkt vergeben. Falls sich der zeitliche Rahmen auf die letzten 5-10 Tage nach Heparinabgabe bezieht oder der Plättchenabfall sich absolut akut vollzogen ( $< 1$  Tag) hat bei letzter stattgehabter Heparinapplikation in den letzten 1-30 Tagen, so beträgt der Wert im 4T-Score 2 Punkte. Wenn anzunehmen ist, dass wahrscheinlich andere Ursachen für die Thrombozytopenie und andere parallel aufgetretene HIT-Symptome in Frage kommen, werden in der vierten Kategorie (oTher Explanations) null Punkte vergeben, ein Punkt bei hypothetisch anderen Ursachen im Rahmen anderer hämatologischer Erkrankungen oder Medikamenteneinnahme, zwei Punkte bei absoluter Sicherheit und Ausschluss anderer Kausalketten. Ein Summenwert von 0-3 spricht gegen eine klinisch relevante HIT Typ 2, wobei dennoch eine Antikörperbildung mit geringer Plättchenaktivierungsaffinität möglich ist. Ein Punktwert ab 6 lässt eine hohe Wahrscheinlichkeit annehmen (vgl. Lo et al., 2006)

Patientenname: \_\_\_\_\_ Geburtsdatum: \_\_\_\_\_ verwendeter Heparintyp: \_\_\_\_\_

Klinischer Score: 4T-Score (Wahrscheinlichkeit einer HIT Typ II)					
Punktewert	2	1	0	Patientenscore:	
1. T	Thrombozytopenie	Plättchenabfall > 50 % des Ausgangswertes / Nadir $\geq$ 20.000/ $\mu$ l	Plättchenabfall 30-50 % des Ausgangswertes / Nadir 10.000-19.000/ $\mu$ l	Plättchenabfall < 30 % des Ausgangswertes / Nadir $\leq$ 10.000/ $\mu$ l	
2. T	Thrombose/ Ischämie/ Nekrose/	Neue Thrombose (sicher), Hautnekrose, Akute systemische Reaktion nach UFH-Bolus	V.a. auf alte, progressive / recurrente Thrombose, erythematöse Hautläsion	Keine Thrombose	
3. T	Zeitverlauf (Time)	Beginn: 5-10 Tage nach Heparin-gabe oder Plättchenabfall $\leq$ 1 Tag (Heparin-gabe innerhalb 1-30 Tage zuvor)	Beginn: > 11 Tage nach Heparin-gabe oder Plättchenabfall $\leq$ 1 Tag (Heparin-gabe innerhalb 30-100 Tage zuvor)	Beginn: Plättchenabfall < 4 Tagen ohne kürzliche Heparin-gabe	
4. T	Andere Ursachen der Thrombozytopenie (Other Explanations)	Keine anderen Ursachen möglich	Eventuell andere Ursachen möglich	Wahrscheinlich andere Ursachen	
Gesamtwert:					

Klinische Wahrscheinlichkeit einer HIT Typ II:      0-3 Punkte: niedrig  
 4-5 Punkte: mittel  
 6-8 Punkte: hoch

Datum, Stempel der Station: \_\_\_\_\_ Arztunterschrift: \_\_\_\_\_

Abbildung 4: 4T-Score-Modifikation aus Greifswald

### 1.2.7.1 Interpretation der Diagnostik

Die endgültige Diagnose einer heparininduzierten Thrombozytopenie Typ 2 setzt sich sowohl aus klinischen (4T-Symptomen), als auch aus laborchemischen Parametern zusammen. Bei hohem klinischen Verdacht aber negativen Testergebnissen ist eine eventuelle Testwiederholung anzuraten, wobei ein negatives Testergebnis in beiden Testverfahren eine HIT Typ 2 relativ unwahrscheinlich macht. Hierbei sollte sowohl die Häufigkeit der Thrombozytopenie im klinischen Alltag unabhängig von HIT-Antikörpern bedacht werden, als auch der eventuelle Antikörpernachweis ohne klinische Symptomatik (Lubenow et al., 2000). An erster Stelle steht jedoch das individuelle Wohl und Risiko des Patienten und macht einen durchdachten Therapie- und Entscheidungsplan unerlässlich.

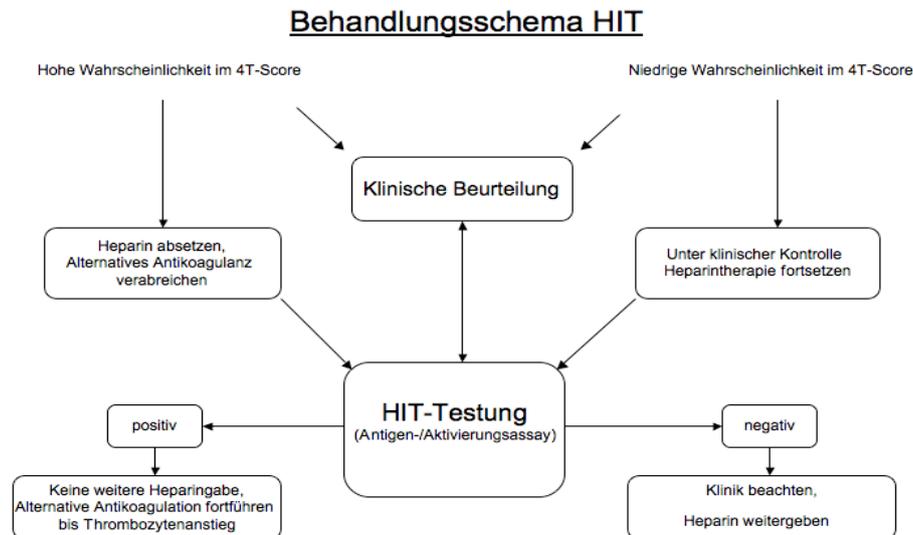


Abbildung 5: Übersicht über den Handlungsablauf bei Verdacht auf eine HIT Typ 2. Wichtig ist hier die zusammenhängende Beurteilung zwischen klinischem Bild und diagnostischem Laborverfahren.

### 1.2.8 Immunologische Diagnostik und Testverfahren

Da die heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2 in ihrer Pathogenese auf einer Immunkomplexbildung durch Antikörper beruht, sind verschiedene Laborverfahren entwickelt worden, welche auf die Detektion der HIT-Antikörper bzw. ihrer Komplexe ausgerichtet sind. Hierbei zielt die Diagnostik primär auf den Ausschluss einer HIT Typ 2 ab, d.h. der negativ prädiktive Wert nimmt die wichtigste Rolle in diesem Prozess ein.

Zum anderen wird aber der alleinige immunologische Nachweis bzw. Ausschluss dem komplexen Bild der HIT Typ 2 nicht gerecht und eine endgültige Diagnose sollte erst nach Beurteilung des klinischen Status erfolgen (4T-Score). Hierbei sollten vor allem die Thrombozytopenie bzw. stattgehabte Thrombosen eine Rolle spielen.

Zum Nachweis einer HIT werden hauptsächlich zwei unterschiedliche immunologische Testverfahren (Assays) angewendet: Antigen- und Aktivierungstestungen.

Antigentestungen weisen direkt die HIT-Antikörper durch Bindung nach. Aktivierungstestverfahren messen das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung nach einer Antigen-/Antikörperbindung.

### 1.2.8.1 Aktivierungstestverfahren

Aktivierungstestungen beziehen sich auf die thrombozytäre Reaktion nach Zugabe von Patientenserum und Heparin. Hier wird das Ausmaß der Aktivierung quantifiziert (z.B. als Agglutination). Die sich aus den jeweiligen Testungen ergebenden immunologischen Möglichkeiten und Voraussetzungen variieren je nach verfügbarem Testverfahren.

Die Aktivierungstestungen können grundsätzlich in zwei Kategorien aufgeteilt werden: diejenigen Testverfahren, in denen die Patientensera mit gewaschenen Thrombozyten versetzt werden („Washed platelet assays“) und Aktivierungstestungen in denen plättchenreiches Citratplasma verwendet wird („c-PRP assays“).

Die „washed platelet assays“ bilden die Grundlage für die meisten heute gebräuchlichen Testungen auf HIT-Antikörper, wie zum Beispiel dem „Serotonin release assay“ (SRA) oder dem „Heparin induced platelet activation assay“ (HIPA). Diese Testverfahren sind heute der Goldstandard in der Diagnostik der HIT Typ 2 und zeichnen sich durch hohe Spezifität und Sensitivität aus. Der HIPA wird vorzugsweise in Europa angewendet, während der SRA hauptsächlich in den USA und Kanada eingesetzt wird.

Das Prinzip hierbei beruht auf der Herstellung einer Plättchensuspension aus Vollblut, welche durch mehrmaliges Zentrifugieren und einer zwischenzeitlichen pH-Wert Senkung entsteht. Diese pH-Wert Senkung ist existenziell um eine Aggregation der Thrombozyten zu verhindern.

Nach abgeschlossener Waschung werden die gereinigten Plättchen mit dem zu testenden hitzeinaktivierten (Prophylaxe vor Plättchenaktivierung durch Thrombin) Patientenserum und Heparin versetzt. Um eine falsch positive Reaktion der Probe sicher erkennen zu können, wird jeweils eine therapeutische Heparindosierung (0,2 U/ml eines niedermolekularen Heparins) verwendet. Zusätzlich wird mit einer extrem hohen Heparindosis (100 U/ml UFH – hierbei sollte keine Reaktion stattfinden) gegengetestet. Optional kann zusätzlich eine Testung mit „Heparin-Alternativen“, z.B. Danaparoid durchgeführt werden um eventuelle Kreuzreaktionen zu erkennen (vgl. Greinacher et al., 1991). Die Endpunkte dieses Tests sind variabel und liegen je nach Testverfahren im direkten Nachweis von Plättchenaggregation, Freisetzung von vorher markiertem Serotonin oder der Messung des ADP-Gehaltes mittels Luminometrie. Eine positive Reaktion ist dann eindeutig gegeben, wenn die Suspension mit der therapeutischen Heparindosierung aggregiert und beide anderen Proben negativ ausfallen (vgl. Greinacher et al., 1991; Eichler et al., 1999). Die gravierendsten Nachteile dieses Testverfahrens sind der hohe zeitliche Aufwand und die anspruchsvollen Voraussetzungen

was Ausstattung und Erfahrung angeht. Aktivierungstestungen mit plättchenreichem Citratplasma (c-PRP Assays) werden heute auf Grund diverser Komplikationen im Testverlauf eher seltener verwendet. Das Prinzip beruht hier auf einer direkten Verwendung von plättchenreichem Citratplasma mit plättchenfreiem zu testendem Patientenplasma, das nach dem Ausschluss unspezifischer Aggregationen (15min Zuwarten) mit Heparin versetzt wird. Die Endpunkte dieses Testes setzen an zwei Stellen an. Zum einen wird die Aggregation mit einer therapeutischen Heparindosis (0,5 U/ml) und dem zu testenden Serum eingeleitet. Zum anderen wird dieselbe Aggregation mit oben erwähnter, sehr hoher Heparindosis (100 U/ml), abgebrochen. Nachteile dieses Testverfahrens bestehen einerseits in der Gefahr einer falsch positiven Testinterpretation bei stattgefundener Aggregation, zum Beispiel ohne Einwirken von HIT-Antikörpern und andererseits in einer falsch negativen Auswertung, falls die Plättchenaggregation schon vor Heparinaddition beginnt (vgl. Chong et al., 1993; Goodfellow et al., 1998).

Im Bezug auf die Sensitivität beider Testverfahren zeigt sich eine deutliche Gewichtung auf Seiten der „Washed platelet assays“ von 65-94% gegenüber den „c-PRP Assays“ mit 39-81% (vgl. Walenga et al., 1999).

So zeigte sich zum Beispiel im direkten Vergleich zum „HIPA Assay“, dass der „c-PRP Assay“ nur 23 von 70 Patienten richtig positiv erkannte, aber von 24 Patienten, die im „c-PRP Assay“ richtig positiv getestet wurden, der „HIPA Assay“ nur einen Patienten falsch negativ bewertete (vgl. Greinacher et al. 1994a).

### **1.2.8.2 Antigentestverfahren**

Die Antigentestungen können, wie auch die Aktivierungsverfahren, in verschiedene grundlegende Testprinzipien kategorisiert werden. So finden sich auf der einen Seite Testverfahren, in denen eine so genannte „feste Phase“ verwendet wird, d.h. die zum Nachweis von HIT Typ 2 spezifischen Antikörpern benötigten Substanzen wie Heparin und Plättchenfaktor 4 werden schon vor der eigentlichen Testung zusammengeführt und inkubiert. Durch Waschung mit einem Phosphatpuffer wird die Reaktion beendet und das Testserum hinzugefügt. Die nun gebundenen Antikörper werden mit markierten sekundären IgG-Antikörpern durch Bindung und der nach Substratgabe folgenden Veränderung der Absorption nachgewiesen. Hierbei ist insbesondere der PF4-Polyvinylsulfonatstest zu nennen (vgl. Collins et al., 1997; Visentin et al., 2001; Pouplard et al., 2010).

Auf der anderen Seite stehen die ELISA-Testverfahren, die eine „flüssige Phase“ verwenden. Hierbei werden Antigenkomplexe und Antikörper in einem flüssigen Medium vermischt (Heparin, PF4, Patientenserum), inkubiert und mit einem speziellen Protein (G-Sepharose) zentrifugal vermischt (vgl. Newmann et al., 1998). Während der Zentrifugation binden die Immunkomplexe an das Protein an und können durch nachfolgende Zugabe und Bindung der Streptavidin-Peroxidase an den neu entstandenen Komplex quantifiziert werden. Ursprünglich wurde diese Technik angewendet, um Antikörper gegen bestimmte Staphylokokkenstämme zu bestimmen (vgl. Nagi et al. 1993). Im Vergleich zu den Testverfahren mit einer „festen Phase“ scheint es eine niedrigere Rate falsch positiver Ergebnisse zu geben. Dies liegt zum einen darin begründet, dass weniger unspezifische Antikörperbindungen auftreten und zum anderen in einer möglichen Interaktion von PF4 und dem Oberflächenplastik der Mikrotiterplatte (vgl. Newmann et al., 1999).

#### ***1.2.8.2.1 Partikel Gel Immuntest***

Das Prinzip dieser immunologischen Testung ist grundlegend ebenfalls zu den antigenen Testverfahren zu rechnen, welche eine „feste Phase“ verwenden, soll aber in seiner Durchführung und den damit verbundenen Anforderungen auch im Hinblick auf den weiteren Verlauf dieser Arbeit, gesondert vorgestellt werden.

Hinsichtlich des Verfahrens werden hierbei Trägerstoffe (z.B. Styropor) mit PF4 und Heparin versetzt, wobei diese entweder schon fest auf einem Medium vorgegeben sind oder separat zu dem Testserum in ein Mikroreaktionsgefäß appliziert werden. Die genauen Dosierungen variieren je nach Test. Nach einer jeweils testspezifischen Inkubationszeit werden die Suspensionen zentrifugiert und ausgewertet. Bei Anwesenheit von heparinabhängigen Antikörpern agglutinieren die Trägerstoffe und bilden entweder eine Schicht an der Gefäßoberfläche oder dispergieren in der Flüssigkeit. Bei negativer Testreaktion fallen sie am Gefäßgrund aus. Die positive Reaktion kann auch durch Farbinduktion oder Absorptionsmessung festgestellt werden (vgl. Eichler et al., 2001). Die Reaktionsstärke und -wahrscheinlichkeit ist proportional zum Antikörpertiter des jeweiligen Serums, wobei dies nicht für das klinische Bild der HIT Typ 2 gilt. Die Vorteile dieses Testverfahrens liegen in der schnellen Durchführung und bereits vorgefertigten Testmaterialien. Ablauffehler werden so minimiert, jedoch kann die Testauswertung nicht immer eindeutig sein. So wurde eine Variabilität der Ergebnisse nach mehrmaliger Testung beschrieben (vgl. Alberio et al., 2003).

Die Testsensitivität liegt im Bereich der anderer konventioneller Antigentestungen mit „fester Phase“ (vgl. Eichler et al., 2001). In weiteren Testverfahren (vgl. Risch et al., 2003) fanden sich Hinweise auf eine hohe Rate falsch positiver Testergebnisse. So wurden 42 klinisch komplett unauffällige Herzpatienten 10-18 Tage postoperativ sowohl mit einem konventionellen Antigenverfahren als auch mit dem Partikel Gel Immuntest untersucht. Die positiven Ergebnisse differierten zwischen 69% im PaGIA und 26% im EIA. Diese Ergebnisse zeigen eine weitaus niedrigere diagnostische Spezifität als die der Antigenassays mit „fester Phase“. Jedoch ist hierbei festzuhalten, wie oben erwähnt, dass das primäre Ziel der Diagnostik ein hoher negativ prädiktiver Wert darstellt.

In Bezug auf den NPV wurden verschiedene Testverfahren verglichen und stellten einen negativ prädiktiven Wert von 1 für zwei Elisatestungen (Poly-ELISA für IgG, IgA und IgM und IgG-spezifischer ELISA) fest. Der NPV des PaGIA lag hierbei nur bei 99,5% (vgl. Bakchoul et al., 2009).

### **1.2.8.3 Andere Testverfahren**

Es existieren noch weitere verschiedene Testverfahren um die HIT Typ 2 nachzuweisen, wobei deren Einsatz umstritten ist, so zum Beispiel eine Testgruppe, welche die direkte Bindung von heparinabhängigen Antikörpern an Thrombozyten nachweisen soll (vgl. Griffiths et al., 1997). Dadurch, dass diese jedoch nur von wenigen Antikörpern verursacht werden kann, welche gleichzeitig aber eine starke Plättchenaktivierung hervorrufen können, ist die Testreliabilität eingeschränkt. Weitere dieser Testtypen, welche unter anderem direkt den Anstieg der bindungsfähigen HIT-Antikörper im Serum nachweisen sollten (vgl. Lynch et al., 1985), wurden von den spezifischeren Antigentestungen (PF4-Test) abgelöst. In diesem Zusammenhang ist auch der so genannte SPRCA (solid phase red cell assay) zu nennen, ein Testverfahren welches IgG bedeckte Indikatorzellen verwendet, die mit Heparinserum oder Heparinalbumin vermischt werden um eine Reaktion nachzuweisen. Der Grad der Ausfällung der Indikatorzellen wird anschließend auf einer Skala von 1 bis 10 (schwache vs. sehr starke Ausfällung) bestimmt (vgl. Leach et al., 1994; Leach et al., 1995; Leach et al., 1997; Sinor et al., 1990). Nachteilig haben sich hier die untersucherspezifische Testauswertung bzw. die subjektive Scorebewertung und eventuelle Beeinflussung des Testergebnisses durch thrombozytenspezifische Alloantikörper gezeigt. Dies scheint umso relevanter, da sich bisher

kein spezifisches Reaktionsprofil der HIT-Antikörper nachweisen ließ (vgl. Lynch et al., 1985; Greinacher et al., 1994b).

#### **1.2.8.4 Vergleich Antigen/Aktivierungsassay**

Im Hinblick auf die Testsensitivität beider Verfahren mit Plasma- und Serumproben zeigt sich ein annähernd gleiches Ergebnis in Bezug auf den Nachweis einer klinisch relevanten HIT Typ 2. So bestätigt das Resultat der Antigentestung die zuvor getroffenen Aussagen von Aktivierungstestungen in 75-90% (vgl. Greinacher et al., 1994a). Ähnliche Prozentzahlen werden mit umgekehrter Kontrollanordnung erreicht (vgl. Greinacher et al., 1994a). Bei direkt postoperativen, prospektiv untersuchten Patienten stieg die Sensitivität auf über 90% (vgl. Warkentin et al., 2000), wobei in Bezug auf HIT-Antikörper ohne klinische Manifestation Antigenassays höhere Nachweisraten aufweisen (vgl. Amiral et al., 1995; Warkentin et al., 2000). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Aktivierungstestungen eine höhere Spezifität bezüglich der klinischen HIT aufweisen. Dies könnte unter anderem mit der Variabilität der HIT-Antikörper in Hinblick auf Antigenbindung und Grad der Plättchenaktivierung zu erklären sein (vgl. Amiral et al., 2000). Weitere Studien berichten von einer höheren Testsensitivität der Antigenassays in Hinblick auf etwaige Verdünnungen. So wurden 12 HIT-Blutplasmen, sowohl durch Antigen- als auch Aktivierungsassays positiv bestätigt, 1:100 verdünnt. Der Antigentest zeigte anschließend sogar bei 200-facher Verdünnung noch 12 von 12 positive Ergebnisse, während in der Aktivierungstestung schon bei 100-facher Verdünnung lediglich 2 von 12 positiv getestet wurden (vgl. Visentin et al., 1994). Gleichzeitig sinkt der positive Nachweis im Antigenassay im zeitlichen Verlauf langsamer ab als der Nachweis im Aktivierungsassay. So zeigt der Antigenassay nach 100 Tagen bei HIT-Patienten immer noch 40% der Ergebnisse als positiv an, während der Aktivierungsassay in der gleichen Zeit bei unter 20% liegt (vgl. Warkentin et al., 2001).

### 1.2.9 Therapie

Therapeutisch gibt es mehrere Ansatzpunkte von bestimmten Pharmazeutika bei der HIT Typ 2, wobei der primäre Benefit für den Patienten im sofortigen Absetzen des auslösenden Agens liegt, d.h. von Heparin. Allerdings reicht dies als einzige Therapiekonsequenz nicht aus, sondern es muss längerfristig mit antikoagulatorischen Alternativen behandelt werden.

Wie oben schon beschrieben, unterscheiden sich beide Heparintypen in ihrem Risikoprofil eine heparininduzierte Thrombozytopenie auszulösen. So sollte der Einsatz von unfractioniertem im Vergleich zu niedermolekularem Heparin situationsgerecht und notwendig sein.

Im weiteren Verlauf der Therapie ist jedoch ein patientenspezifisches Vorgehen indiziert, zumal sich das Bild der heparininduzierten Thrombozytopenie nicht immer klinisch homogen darstellt und es mehrere Heparinalternativen gibt. Einen einheitlichen Standard gibt es hierbei nicht. Dennoch sollte sich das therapeutische Vorgehen primär an den klinischen Aspekten und der wirkungsvollen Bekämpfung vorhandener Thrombosen orientieren. Bei fehlenden klinischen Anhaltspunkten für eine HIT Typ 2 ist eine Fortsetzung der Heparintherapie und eine strenge Beobachtung des Patienten im Hinblick auf eine nicht immunogene HIT abzuwägen.

Um nun im weiteren Verlauf, nach Absetzen von Heparin, das Auftreten erneuter Thrombosen zu verhindern, muss antikoagulatorisch interveniert werden. Dies kann klinisch grundsätzlich mit verschiedenen, pharmakologisch ähnlich wirksamen Medikamenten erreicht werden: Der direkte Thrombinhemmer Argatroban, welcher sich heute in vielen Zentren als das Mittel der ersten Wahl zum Heparinersatz darstellt und der Faktor Xa – Inhibitor Danaparoid sind hier zu nennen. Die Hirudine, ursprünglich aus dem Speichel von Blutegeln isoliert, werden seit dem März 2013 nicht mehr hergestellt.

### 1.2.9.1 Danaparoid (Handelsname: Orgaran)

Das Glykosaminoglykan Danaparoid besteht hauptsächlich aus Heparansulfat (84%), dessen Disaccharide, im Gegensatz zu Heparin, zum größten Teil aus Glucuronsäure und N-Acetyl-Glucosamin bestehen und eine geringere negative Ladung besitzen. Es wirkt, parenteral verabreicht, über eine Hemmung von Gerinnungsfaktor Xa und dadurch indirekt von Thrombin. Indikationen bestehen hauptsächlich in der Therapie von neu aufgetretenen Thrombosen und in der Thromboseprophylaxe.

In retrospektiven Studien wurde herausgefunden, dass Danaparoid eine höhere Effektivität in therapeutischer als in prophylaktischer Anwendung besitzt. So wurden 750 Patienten mit „isolierter“ HIT mit prophylaktischen Dosen von Danaparoid und Lepirudin behandelt, wobei in der Folge das „Danaparoid-Kollektiv“ eine höhere Thromboserate aufwies. In therapeutischer Dosierung bei HIT-assoziierten Thrombosen war das Patientenoutcome ähnlich (vgl. Farner et al., 2001). In verschiedenen Langzeitstudien (vgl. Chong et al., 1992) wurde die Erfolgsrate (definiert als komplette Regredienz der Thrombozytenzahlen ohne neue Thrombosen) von Danaparoid mit 91-94% beschrieben.

Als Nebenwirkungen der Danaparoidtherapie werden hauptsächlich schwere Blutungen bei besonders hoher Dosierung oder verminderter renaler Ausscheidung beschrieben. Diese Nebenwirkungen scheinen gehäuft bei antikoagulierten Patienten mit kardiopulmonalem Bypass aufzutreten (vgl. Magnani et al., 1997; Westphal et al., 1997). Jedoch fanden sich während der Behandlung von arteriellen und venösen Thrombosen bei HIT-Patienten keine Blutungsphänomene (vgl. Chong et al., 2001). Des Weiteren scheint es eine Kreuzreaktivität zwischen Danaparoid und HIT-Antikörpern zu geben, welche jedoch im Vergleich zu niedermolekularem Heparin gering ausfällt. Diese liegt im Mittel bei 9,6% unter Verwendung von plättchenreichem Citratplasma (vgl. Makhoul et al., 1986; Kikta et al., 1993).

Jedoch scheint diese Kreuzreaktivität zu variieren, zum Beispiel durch Aktivierung gründlich gereinigter Plättchen oder dem Gebrauch eines Antigenassays mit „flüssiger Phase“ (vgl. Warkentin, 1996b; Koster et al., 2000; Newmann et al., 1998). Die Kreuzreaktivität von Danaparoid mit HIT-Antikörpern wurde mit 7% im Vergleich zu 83-89% mit niedermolekularem Heparin gemessen (vgl. Vun et al., 1996).

Bei der Testung mit einem Antigenassay der „flüssigen Phase“ wurde eine weitaus höhere Kreuzreaktivität von Danaparoid und HIT-Antikörpern mit 50% gemessen (vgl. Newmann et al., 1998). Es wurde in beschriebenen Studien jedoch auch festgestellt, dass die Kreuzreaktivität von Danaparoid in ihrer Stärke weitaus geringer ausfällt als die von

niedermolekularem Heparin. Hierzu wurde die klinische Signifikanz dieser Kreuzreaktivität untersucht (vgl. Warkentin, 1996b; Newmann et al., 1998) und kein Unterschied im Outcome bezüglich unterschiedlicher Testverfahren der Patienten festgestellt.

### **1.2.9.2 Argatroban (Handelsname: Argatra)**

In den 1980er Jahren wurde ein direkter Thrombininhibitor aus der Aminosäure L-Arginin in Japan entwickelt. 1995 wurde Argatroban, damals noch Novastan, in den USA durch diverse Studien evaluiert und im Jahre 2000, speziell für die Behandlung der HIT Typ 2, auf den Markt gebracht (vgl. Lewis et al., 2001; Lewis et al., 2003).

Argatroban interagiert sowohl mit gebundenem als auch mit freiem Thrombin ca. 500 mal stärker als die nicht mehr eingesetzten Hirudine, wobei keine Kreuzreaktionen mit HIT-Antikörpern beschrieben wurden (vgl. Walenga et al., 1996). Medikamenteninteraktionen mit häufig gebrauchten Substanzen wie Aspirin oder Marcumar sind bisher nicht beschrieben, wobei in kombinierter Anwendung natürlich ein erhöhtes Blutungsrisiko besteht (vgl. Clark et al., 1991; Inglis et al. 2002; Tran et al., 1999). Seine Halbwertszeit, determiniert hauptsächlich durch die Leber bei ca. 40-50 Minuten und sein antikoagulatorischer Effekt setzt unmittelbar nach Applikation ein. Insbesondere in der HIT-Behandlung zeigte sich ein hoher Benefit für die Patienten, u.a. durch die Reduktion der schlaganfallassozierten Mortalität, einer geringeren Blutungswahrscheinlichkeit und einem schnellen Thrombozytenanstieg (vgl. Lewis et al., 2003).

Die möglichen Nebenwirkungen, hauptsächlich die Gefahr einer unkontrollierten Blutung (in der ARG-911 Studie mit 6,11% beschrieben), sollten durch die aPTT überwacht werden und primär durch ein Aussetzen von Argatroban behandelt werden (auf Grund der kurzen HWZ-Normalwerte nach ca. 2-4 Stunden). Sekundär sollte, zumal kein spezielles Antidot verfügbar ist, symptomatisch behandelt werden.

### 1.2.9.3 Besondere Situationen und erweiterte Therapiemöglichkeiten

In der Schwangerschaft wird von den oben genannten Medikamenten bevorzugt Danaparoid, auf Grund seiner sicher festgestellten fehlenden Plazentagängigkeit verabreicht (vgl. Lagrange et al., 2002). Zu Argatroban gibt es noch keine abschließenden Forschungsergebnisse, jedoch wurde in Tierexperimenten keine Schädigung des Fötus festgestellt (siehe Argatroban Beipackzettel, 2002).

Bei der HIT Typ 2 im Kindesalter gibt es prinzipiell keine klaren Medikamentenempfehlungen (hauptsächlich wegen fehlender Daten), doch in einigen Studien (vgl. Boshkov et al., 2002; Boshkov et al., 2003a; Boshkov et al., 2003b; Macchi et al., 2000) zeigten sich bisher keine Nebenwirkungen bei Anwendung von Danaparoid und Argatroban mit einer Dosisadaption auf das Körpergewicht. Weitere, zusätzlich zur antikoagulatorischen Therapie, mögliche Therapieoptionen bei fortgeschrittener HIT-Thrombosierung bieten zum einen die konventionelle Thrombolyse mit t-PA, wobei hierbei die Thrombozytopenie keine primäre Kontraindikation darstellt, jedoch genau diskutiert werden sollte. Eine chirurgische Intervention ist im Sinne einer chirurgischen Thrombektomie patientenabhängig ebenfalls durchführbar.

Antithrombozytäre Medikamente wie Dextran, Acetylsalicylsäure oder GPIIB/IIIa Inhibitoren verhindern zwar in unterschiedlichen Ausmaßen die Plättchenaggregation und Fibrinogenpolymerisation, jedoch sind diese Medikamente in Bezug auf die HIT Typ 2 in Kombination mit antikoagulatorischen Substanzen einzusetzen und eine vermehrte Blutungsneigung muss dringend überwacht werden.

Auch Vitamin K- Antagonisten wie Cumarine spielen in der Behandlung der HIT Typ 2 eine Rolle, wobei sie hauptsächlich in der Langzeitbehandlung von Thrombosen eingesetzt werden sollten und weniger in der akuten, thrombozytopenen Phase der HIT. Denn dort besteht gerade in der frühen Phase der Cumarinapplikation ein extremes Ungleichgewicht von prokoagulatorischen (gesteigerte Thrombinsynthese) und antikoagulatorischen Effekten (Hemmung der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, z.B. Protein C etc.), welche dann zu venöser Gangrän, insbesondere an den Extremitäten, führen können. Prophylaktisch sollte diesbezüglich immer ein Thrombininhibitor mitverordnet werden.

Natürlich sind in diesem Zusammenhang auch neuere Faktor Xa-Inhibitoren wie z.B. Fondaparinux zu nennen. Fondaparinux, ein synthetisches Pentasaccharid, bindet selektiv an Antithrombin und inhibiert so Faktor Xa. Der Vorteil liegt in seiner fehlenden Affinität zu PF4, d.h. es bilden sich keine Antigenkomplexe aus bzw. werden von HIT-Antikörpern nicht

erkannt. Dennoch sind auch nach Gabe von Fondaparinux wenige Fälle von Thrombozytopenien beschrieben worden (vgl. Bhatt et al., 2013; Warkentin et al., 2012). Nachteilig sind die höheren Kosten im Vergleich zu Heparin.

Fondaparinux gehört, wie oben schon erwähnt, zu den selektiven Inhibitoren von Faktor Xa. Durch seine Bindung an Antithrombin wird die Hemmung dieses Gerinnungsfaktors um ein Vielfaches verstärkt. Durch seine relativ lange Halbwertszeit, ist eine einmalig tägliche intravenöse Applikation ausreichend. Seine Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über die Niere. Ein Antidot ist nicht verfügbar.

Das Medikament hat sich vor allem in der Thromboseprophylaxe bei Patienten mit positiver HIT-Anamnese bewährt und kann in diesem Falle als eventuelle Alternative für Heparin und andere Antikoagulanzen genutzt werden (vgl. Bakchoul et al., 2012; Warkentin et al., 2011).

## **2 Material und Methoden**

### ***2.1 Fragestellung***

Die Testcharakteristika des Lateral Flow Immunoassay (LFI) sollen im Rahmen der vorgelegten Arbeit ermittelt werden: Wie sensitiv und spezifisch ist der LFI im Vergleich zu den anderen Testverfahren? Welche Vor- oder Nachteile ergeben sich im Labor im Vergleich zu den anderen Testverfahren? Spielen Matrixeffekte eine Rolle oder kann der Antikörpernachweis im LFI mit verschiedenen Matrices zuverlässig durchgeführt werden? Um eine Aussage über diese Fragen treffen zu können, wurde die Testperformance des Lateral Flow Immunoassay in zwei Phasen untersucht. Zunächst wurden Seren von 452 chirurgischen und internistischen Patienten zusätzlich zur Regeldiagnostik auch mit dem neuen Lateral Flow Immunoassay untersucht. In einer zweiten Phase wurden für einhundert Patienten zusätzlich Restmaterialien aus der Routinediagnostik (EDTA-Blut, Citratplasma) verwendet, um Matrixeffekte zu prüfen.

Zur zusätzlichen Qualitätskontrolle des LFI-HIT wurden 10 gesunde Blutspender ohne Verdacht auf eine HIT Typ 2 ebenfalls optisch und elektronisch untersucht.

Um Wechselwirkungen des Testablaufes und Ergebnisbeeinflussung durch die Heparinkonzentration auszuschließen wurden zwei Seren, im HIPA, PF4-Assay und LFI-HIT positiv (optisch und elektronisch), ausgewählt und mit jeweils fünf unterschiedlich hohen Dosierungen von unfraktioniertem Heparin versetzt (0,5IE, 1IE, 2IE, 4IE, 100IE). Danach wurde die LFI-HIT-Testung erneut optisch und elektronisch durchgeführt.

### ***2.2 Studiendesign***

Für alle durchgeführten Untersuchungen wurde Patientenrestmaterial verwendet, das von Untersuchungen auf die HIT Typ 2 stammte. Die Prüfung im LFI erfolgte im Anschluss an die üblichen serologischen Untersuchungen. Die Ergebnisse wurden von Labormitarbeitern unter Verwendung von Pseudonymen tabellarisch erfasst und um die weiteren experimentellen Ergebnisse ergänzt.

## 2.3 *Verwendete immunologische Testverfahren:*

### Phase I

Heparin induced platelet activation assay (HIPA)

PF4 Enhanced (GTI Diagnostics, Waukesha, WI, USA) (GTI-IgG-Elisa)

Zymutest HIAIgG (Hyphen Biomed, Neuville-Sur-Oise, Frankreich) (HIA-IgG-Elisa)

Particle Gel Immunoassay (PaGIA, BioRad, München, Deutschland)

Lateral Flow Immunoassay (LFI-HIT, Milenia Biotec, Giessen, Deutschland)

### Phase II

Heparin induced platelet activation assay (HIPA)

PF4 Enhanced (GTI Diagnostics, Waukesha, WI, USA) (GTI-IgG-Elisa)

Lateral Flow Immunoassay (LFI-HIT, Milenia Biotec, Giessen, Deutschland)

### **2.3.1 Heparin induced Platelet Activation Assay (HIPA-Assay)**

Der HIPA-Assay gehört zu den, in der Einleitung beschriebenen, Aktivierungsverfahren zum Nachweis einer heparininduzierten Thrombozytopenie Typ 2. Die Seren von HIT-Patienten führen in Kombination mit Heparin in niedriger Konzentration zu einer Aktivierung der Blutplättchen und konsekutiver Aggregation. Der Grad der Plättchenaktivierung in Form einer Aggregation der Thrombozyten wird danach visuell ausgewertet.

Zur Gerinnung von Thrombozyten werden vier 10ml Polyröhrchen, in die 1,6ml ACD-A Formula A (Na-Citrat/Glukose monohydrat, Fa. Biotrans GmbH – Bestell Nr. 184354-03) vorgelegt waren, mit Blut von verschiedenen Blutspendern aufgefüllt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) werden die Röhrchen 25 Minuten bei 800 Umdrehungen pro Minute (UpM) zentrifugiert.

Für die weitere Verarbeitung werden Apyrase 2000U, in 2ml NaCl gelöst, (Fa. Sigma – Bestell Nr. A-7646) und Hirudin 2000 ATU, in 2ml Aqua dest gelöst, (Fa. Pentapharm – Bestell Nr. 319247) aufgetaut. MgCl<sub>2</sub>, 0,1mol/l = 2,033g + 100ml Aqua dest, (Fa. Merck – Bestell Nr. 1.05833) und CaCl<sub>2</sub>, 0,1mol/l = 1,470g + 100ml Aqua dest, (Fa. Sigma – Bestell Nr. C-3881) werden auf Raumtemperatur gebracht. Es werden zwei Röhrchen pro Spender vorbereitet. Das plättchenreiche Plasma wird abpipettiert und in die vorbereiteten Röhrchen

überführt. Es werden pro Mililiter plättchenreichen Plasmas jeweils 111µl ACD-A und 5µl Apyrase hinzugegeben. Die Röhrchen werden nun bei 440g sieben Minuten zentrifugiert. Anschließend werden der Überstand dekantiert und die Röhrchen trocken getupft.

Nun wird in jedes Röhrchen 1ml Waschpuffer (pH zwischen 6,2-6,4) bestehend aus 40ml Grundlösung [Zusammensetzung: 5ml Ausgangslösung A (Zusammensetzung: 16g NaCl (Fa. Roth – Bestell Nr. 3957), 0,4g KCl (Fa. Merck – Bestell Nr. 1.04936.1000), 2g NaHCO<sub>3</sub> (Fa. Merck – Bestell Nr. 1.06329.1000), 0,1g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fa. Merck – Bestell Nr. 1.06346.1000) mit Aqua dest auf 100ml aufgefüllt), 1ml Glukose, 1,75ml Albumin (0,4 Albumin + 2ml Aqua dest), mit Aqua dest auf 100ml aufgefüllt und bei 37°C gelagert], 40µl Hirudin (Herstellerangaben siehe oben), 100µl Apyrase (Herstellerangaben siehe oben), gegeben, die Thrombozyten resuspendiert und erneut 3ml Waschpuffer hinzugegeben. Nachdem die Röhrchen mit Parafilm verschlossen worden sind, werden sie 15min. bei 37°C inkubiert und 7min. bei 440g zentrifugiert. Danach werden die Röhrchen erneut dekantiert. Das Pellet wird mit 1ml Suspensionspuffer, pH zwischen 7,2-7,4, [Zusammensetzung: 60ml Grundlösung (Zusammensetzung siehe oben), 600µl MgCl<sub>2</sub>, (0,1mol - Herstellerangaben siehe oben), 1200µl CaCl<sub>2</sub> (0,1mol – Herstellerangaben siehe oben)] resuspendiert und auf 2ml ergänzt. Die Zellen werden erneut für 45 min. bei 37°C inkubiert. In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Fa. Greiner – Bestell Nr. 650101) werden je zwei rostfreie Stahlkügelchen Größe 44 (Fa. Häuser – Bestell Nr. 11001495) versenkt.

20µl Patienten- oder Kontroll-Serum, jeweils entweder 10µl Heparin (2,1I.E./ml, 1050I.E./ml, 0,2mg/ml oder Kollagen 40µg/ml (mit 20µl Suspensionspuffer) und 75µl Thrombozytensuspension werden ebenfalls auf die Platte gegeben (Arbeitsanweisung: AM-TL-403/G, SOP des HIPA am Standort Giessen). 45 min. werden die Platten nun auf dem Magnetrührer gerührt und die visuelle Transparenz erst minütlich und nach der fünften Minute im Fünf-Minuten-Takt abgelesen.

### **2.3.2 Antikörper gegen Plättchenfaktor 4 (PF4) – Polyvinyl-Sulfanat (PVS) – Komplexe Test (GTI Diagnostics, Waukesha, WI, USA) (GTI-IgG-ELISA)**

Das Prinzip dieser Testung beruht auf einer Zusammenführung von dem zu untersuchenden Patientenserum und Plättchenfaktor 4-/PVS-Komplexen. Die spezifischen HIT-Antikörper im Serum binden an die Festphasenantigene. Nachdem die übrigen, nicht gebundenen,

Antikörper entfernt wurden, wird ein markierter IgG-Antikörper hinzugegeben. Durch die weitere Zugabe des chromogenen Substrates PNPP wird eine Farbreaktion ausgelöst, welche abgelesen und ausgewertet werden kann. Der Test wird zu den oben beschriebenen Antigen-testungen gerechnet.

Zuerst werden 300µl Waschpufferkonzentrat (gebrauchsfertig, bestehend aus einer Phosphat-gepufferten Lösung mit NaCl und Tween 20 (Polysorbat 20), mit 1% Natrium-Azid versetzt und vor dem Gebrauch mit 1:10 destilliertem Wasser verdünnt) in jede Vertiefung des Teststreifens (Fa. Diagast – Bestell Nr. 200211), der in einem Halterahmen aufgehängt ist (12x - 1x8), gegeben und danach für 7min., mit einer Folie abgedeckt, bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Flüssigkeit verworfen und die Platte auf einem saugfähigen Tuch ausgeklopft. Für den Nachweis einer Antikörperreaktion werden 6µl Patientenserum in 294µl Probenverdünnungspuffer (gebrauchsfertige Phosphat-gepufferte Saline-Lösung mit 0,05% Natrium-Azid) verdünnt und 50µl in die Vertiefungen (A1+A2 bis E1+E2) eingegeben; als Positivkontrolle wird die Vertiefung G1+G2 verwendet (Doppelbestimmung). Als Negativkontrolle stehen die Vertiefungen F1+F2 zur Verfügung. Die Kontrollseren bestehen aus humanem Serum (6µl humanes Serum mit Rinderalbumin versetzt und 0,1% Natrium-Azid enthaltend, + 294µl Probenverdünnungspuffer (siehe oben)).

Die letzten zwei Vertiefungen werden frei gelassen und als Blanks genutzt (H1+H2). Nun werden die Teststreifen mit Abdeckfolie verschlossen und bei 37°C im Brutschrank 45min. inkubiert. Nach der Inkubation werden die einzelnen Vertiefungen viermal mit dem Waschpuffer gespült und trocken getupft.

Nachdem die restlichen Flüssigkeitsreste entfernt wurden, wird eine Lösung mit 10µl Anti-IgG Konjugat (mit alkalischer Phosphatase markierter, gereinigter Antikörper von der Ziege, gegen humanes IgG gerichtet) und 1ml Probenverdünnungspuffer angesetzt (bei allen 12 Teststreifen werden 60µl des Konjugates mit 6ml Verdünnungspuffer verdünnt). Nun werden 50µl der neuen Konjugatlösung in alle Vertiefungen außer H1+H2 pipettiert. Danach werden die Streifen erneut mit Folie verschlossen und bei 37°C 45 min. inkubiert.

Im Anschluss werden die Vertiefungen erneut viermal gewaschen.

Das PNPP-Substrat (p-Nitrophenylphosphat) wird in 500µl destilliertem Wasser gelöst und gut durchmischt und im Verhältnis 1:100 mit Substratpuffer (gebrauchsfertige Lösung, enthält Diethanolamin, MgCl<sub>2</sub> und 0,02% Natrium-Azid) verdünnt (je 2 Teststreifen 20µl PNPP mit 2 ml Substrat-Puffer). 100µl der verdünnten PNPP-Lösung werden nun in alle Vertiefungen, außer den Blanks, gegeben. Die Ansätze werden im Dunkeln bei Raumtemperatur 30 min.

inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wird in jede Vertiefung 100µl Stopplösung (gebrauchsfertige Lösung aus 3M NaOH) pipettiert, in die Blanks 200µl.

Die Auswertung erfolgt nun innerhalb der nächsten 15 min. in einem Plattenphotometer (Sunrise, Fa. Tecan, Männedorf) bei 405nm oder 410nm (Referenzwellenlänge von 490nm).

Für eine analytische Freigabe der Ergebnisse muss immer sowohl eine positive, als auch eine negative Kontrolle mitgeführt werden. Die jeweiligen Doppelbestimmungen sollten nicht mehr als 20% voneinander abweichen. Das Hauptkriterium für einen validen Test liegt im optischen Mittelwert. Dieser sollte bei einer Negativ-Kontrolle bei  $< 0,300$  und bei einer Positiv-Kontrolle bei  $> 1,800$  liegen. Das Ergebnis der PF4-Testung wird als positiv gewertet, wenn die Extinktion der Probe  $> 0,400$  OD beträgt.

### **2.3.3 Zymutest HIAIgG (Hyphen Biomed, Neuville-Sur-Oise, Frankreich)**

Dieses Testprinzip beruht auf der Vermischung von verdünntem Testserum mit Thrombozytenlysate auf einer, mit Heparin beschichteten, Mikrotiterplatte. Nach Bindung der Antikörper können diese mit Hilfe von Immunkonjugat und chromogenen Substanzen nachgewiesen werden. Anfangs wird eine klassische ELISA-Mikrotiterplatte (12 Mikrostreifen mit jeweils 8 Vertiefungen, beschichtet mit Heparin) verwendet. Die entsprechend benötigte Anzahl an Vertiefungen wird mit 50µl lyophilisiertem Thrombozytenlysate (gebrauchsfertig und mit 2ml Aqua dest. rekonstituiert) aufgefüllt. Jeweils 200µl einer 1:100 (mit gebrauchsfertigem Probendiluenten) verdünnten Serumprobe bzw. der jeweiligen IgG-Kontrolle (Positivkontrolle (entspricht Serum mit HIT-Antikörpern) und Negativkontrolle (entspricht Serum von Normal Spendern)) aufgefüllt. Die gebrauchsfertigen IgG-Kontrollen werden mit 1ml Probendiluent rekonstituiert. Anschließend erfolgt die erste Inkubation bei Raumtemperatur über 1h. Nach dieser Zeit werden die Vertiefungen mit 300µl Waschlösung (gebrauchsfertig geliefert und 20fach mit Aqua dest. verdünnt) in fünf Durchgängen ausgewaschen.

Direkt nach dem Waschen werden 200µl Immunkonjugat (Anti-IgG (Fcγ)-HRP-Immunkonjugat, lyophilisierte HRP-gekoppelte Antikörper spezifisch für humanes IgG (Fcγ) mit 7,5ml gebrauchsfertigem Konjugatdiluente vermischt) hinzugegeben. Danach werden die Platten erneut bei Raumtemperatur für 60min. inkubiert und wiederum 5-malig mit verdünnter Waschlösung gewaschen. Danach werden 200µl eines gebrauchsfertigen TMB-

Peroxidasesubstrates (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin) in die jeweiligen Vertiefungen hinzu gegeben. Wichtig ist hierbei, dass gleiche Zeitintervalle eingehalten werden. Die Farbentwicklung tritt nach 5min. ein. Direkt danach sollte erneut in denselben Zeitintervallen jeweils 50µl des gebrauchsfertigen Stopppuffers (0,45M Schwefelsäure) hinzu pipettiert werden. Nach 10 min. ist die Lösung stabilisiert und die Absorption kann bei 450nm gemessen werden. Zur Sicherstellung der Validität sollte die Positivkontrolle bei  $> 1,0$  liegen. Der Wert der Negativkontrolle sollte sich bei  $< 0,25$  befinden. Die Ergebnisse werden in drei Kategorien angegeben. Hierbei wird ein positives Ergebnis  $> 0,5$  OD, ein schwach positives Ergebnis bei  $>0,3$  bis  $< 0,5$  OD und ein negatives Ergebnis bei  $< 0,3$  OD unterschieden.

#### **2.3.4 Particle Gel immunoassay (PaGIA, BioRad (DiaMed), München, Deutschland)**

Das Prinzip dieses Testverfahrens beruht auf der Agglutination von künstlichen Heparin-PF4 Partikeln nach Zugabe von Patientenserum. Es handelt sich hierbei um einen Gelzentrifugationstest. Synthetische Partikel sind mit Komplexen aus Heparin/Plättchenfaktor 4 (HPF4) beschichtet und farblich markiert. Kommt es nun zu einem Kontakt zwischen diesen Antigenkomplexen und HIT-Antikörpern im Patientenserum wird eine Agglutination ausgelöst. Mit Hilfe einer Gelmatrix werden die agglutinierten Partikel von den nicht-agglutinierten Partikeln abgetrennt, indem Diese an der Geloberfläche verbleiben, während die nicht-reagiblen Partikel auf den Boden absinken. Durch die farbliche Markierung der Komplexe, kann das Ergebnis visuell abgelesen werden.

Es werden eine Testkarten (bei Raumtemperatur gelagert) mit jeweils 6 Mikroröhrchen, eine Suspension mit den enthaltenen Heparin/PF4-Partikeln (gebrauchsfertig, farblich markiert, bei 5°C gelagert), sowie eine Positiv- bzw. Negativkontrolle (bei jeweils 5°C gelagert) und das zu untersuchende Testserum benötigt. Zusätzlich werden eine Zentrifuge mit speziellem Zentrifugeneinsatz und ein Inkubator benötigt. Vor der Testdurchführung sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu bringen. In jedes einzelne Mikroröhrchen werden 10µl eines zu untersuchenden Patientensersums pipettiert. Anschließend werden 50µl der angemischten Partikelsuspension hinzugegeben. Danach wird die Testkarte bei Raumtemperatur 5min. inkubiert und 10min. bei 85g zentrifugiert. Danach kann das Ergebnis abgelesen werden: Als positive Reaktion wird eine rote Linie auf der Geloberfläche bzw. innerhalb des Gels gewertet.

Bei einer negativen Reaktion wandern die Partikel durch das Gel hindurch und lagern sich am Röhrchenboden ab. Bei zweifelhaften Reaktionen wird der Test als ungültig betrachtet und muss wiederholt werden.

### **2.3.5 Lateral Flow Immunoassay (LFI-HIT, Milenia Biotec, Gießen, Deutschland)**

Das Testprinzip des LFI-HIT beruht auf einer qualitativen Bestimmung von Antikörpern gegen PF4/Polyanion-Komplexe in Serum. Hierbei handelt es sich um eine Neuentwicklung zur Verbesserung der HIT-Diagnostik. Immobile anti-humane Antikörper der IgG-Klasse auf der Membran der Auswertungskarte binden an eventuelle HIT-Antikörper im Serum, welche zuvor an die PF4/Polyanion-Komplexe gebunden wurden und durch Goldnanopartikel in Form der Testlinie sichtbar gemacht werden. Die restlichen Goldnanopartikel fließen im Testfeld weiter und manifestieren sich, bei einwandfreiem Testablauf, in Form der Kontrolllinie. Es werden eine HIT-Test Einheit, ein Probenpuffer und eine Auswertungskarte benötigt. Jeweils jede Komponente ist gebrauchsfertig und direkt aus dem Test-Kit entnehmbar. Die Lagerung der einzelnen Komponenten erfolgt bei 2-8°C in trockener Umgebung.

Der Testablauf besteht aus vier Schritten: Zuerst werden 5µl des zu untersuchenden Serums auf den Probeauftrag der Testeinheit pipettiert. Anschließend werden zwei Tropfen des Probepuffers (pH 7,4) ebenfalls auf den Probeauftrag gegeben. Die Testeinheit wird nun 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wird der Teststreifen sofort optisch mit Hilfe der Auswertekarte abgelesen und qualifiziert. Ein positives Ergebnis liegt vor, wenn die Kontrolllinie deutlich sichtbar und die Testlinie einen gleichen oder stärkeren Farbton wie auf der Auswertungskarte aufweist.

Zusätzlich wird die physikalische Absorption des Teststreifen mittels eines POCS-Readers (Milenia POCS-Reader) elektronisch gemessen. Es ist zu beachten, dass elektronische Testergebnisse zwischen 100mV bis -100mV als nicht HIT verdächtig eingestuft werden.

Zur Validität dieser Testung ist eine deutlich sichtbare Kontrolllinie auf dem Testfeld unbedingt erforderlich. Andernfalls muss die Testung mit einer anderen Testkarte wiederholt werden.

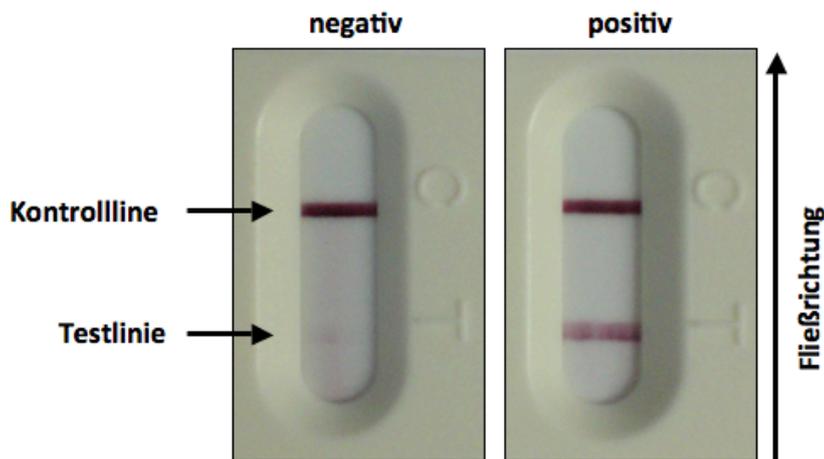


Abbildung 6: Es ist das Testfeld des LFI-HIT dargestellt. Man erkennt sowohl den Kontrollstreifen (linkes Bild), als auch den Teststreifen bei positiver Testung deutlich (rechtes Bild). Die Flussrichtung, in der sich das Substrat nach Zugabe der Pufferlösung ausbreitet, ist ebenfalls angegeben.

#### ***2.4 4T-Scoring System:***

Zur klinischen Bewertung und Korrelation der Testergebnisse wurde die Modifikation des 4T-Scores nach Warkentin (vgl. Lo et al., 2006) eingesetzt. Dieser Score wurde dem Labor mit der Anforderung serologischer HIT-Diagnostik mitgeteilt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Testphase 1

Es wurden insgesamt 452 Patienten mit Verdacht auf eine HIT Typ 2 untersucht. Davon wurden 34 positiv im HIPA getestet (7,5%). Die weiteren Testverfahren fielen unterschiedlich aus. Der LFI-HIT testete 63 Proben positiv, darunter alle 34 HIT-Patienten. Der PF4-Test (GTI-IgG-ELISA) zeigte 79 positive Testergebnisse, in denen ebenfalls alle 34 HIT Patienten enthalten waren. Der HIA-IgG-ELISA zeigte 87 positive Resultate, wobei auch hier die jeweils vorher getesteten 34 HIT-Patienten erkannt wurden. Der PaGIA zeigte 86 positive Resultate, fiel jedoch bei drei der 34 HIT-Patientenseren negativ aus. In Relation ergibt sich hierbei eine Differenz von 8,8%.

Die Sensitivitäts- und Spezifitätsberechnungen der einzelnen durchgeführten Testverfahren sind in folgender Tabelle aufgeführt. Die jeweiligen prädiktiven Werte sind ebenfalls dokumentiert. Der negative prädiktive Wert des LFI-HIT liegt hier bei 1. Damit liegt dieser auf gleicher Höhe wie die negativ prädiktiven Werte der ELISA-Verfahren (NPV: 1).

Im Vergleich zwischen den positiv prädiktiven Werten beider elektronischen Testungen des PoC-Scanners fällt ein höherer PPV bei dem Grenzwert von 137mV auf (0,6 im Vergleich zu 0.524). In Bezug auf die anderen Testverfahren insgesamt gibt der Wert von 0.6 das absolute Maximum eines erreichten positiv prädiktiven Wertes an. Die sonstigen Werte beider PoC-Scanner Messungen liegen bei vergleichender Betrachtung jedoch prinzipiell auf einem Niveau. Lediglich die Spezifität der 137mV-Scannung zeigt sowohl im Vergleich mit den übrigen Testverfahren als auch den anderen Auswertungsmodi des LFI-HIT einen höheren Wert (0.947).

Der PaGIA weist in dieser Vergleichstestung die jeweils niedrigsten Vorhersagewerte auf.

### 3.1.1 Ergebnisse der Testverfahren in der Übersicht

Testverfahren im Vergleich									
Test	Auslesung und Grenzwert	positive Ergebnisse		Negative Ergebnisse		Spezifität	Sensitivität	NPW	PPW
		richtig	falsch	richtig	Falsch				
LFI- HIT	optisch	34	29	389	0	0.93	1	1	0.54
LFI- HIT	Scanner; 100mV	33	30	388	1	0.928	0.971	0.997	0.524
LFI- HIT	Scanner; 137mV	33	22	396	1	0.947	0.97	0.997	0.6
GTI- IgG ELISA	Photometrie; OD=0.4	34	45	373	0	0.892	1	1	0.43
HIA- IgG ELISA	Photometrie; OD=0.5	34	53	365	0	0.873	1	1	0.39
PaGIA	optisch	31	55	361	3	0.868	0.912	0.992	0.36

Bei Betrachtung der Tabelle fällt auch die insgesamt recht hohe Spezifität des LFI-HIT im Vergleich zu den anderen Testverfahren auf. Die Rate der falsch positiv getesteten Proben lag bei 6,9%, im GTI-IgG-ELISA lag sie bei 10,8%, im HIA-IgG-ELISA bei 12,7% und im PaGIA bei 13,2%. Die Sensitivität unterscheidet sich zwischen dem LFI-HIT optisch und den ELISA-Verfahren nicht. Lediglich der PaGIA liegt mit 0,912 deutlich unter den Vergleichsverfahren.

Durch den LFI-HIT wurden insgesamt 63 Patienten visuell klar positiv getestet. Hierbei waren alle 34 HIT-Patienten enthalten. In der anschließenden elektronischen Testung mit dem Grenzwert von 100mV wurden ebenfalls 63 Proben positiv getestet, wobei jedoch eine HIT-Probe nicht erkannt wurde. Das elektronische Signal dieser Probe betrug 92mV. Der prozentuale Anteil der nicht erkannten Probe lag in diesem Kollektiv bei (1/34) 2,9%.

Im Allgemeinen betrug die elektronische Signalvariabilität für die positiven HIT-Proben 92mV – 972mV (Mittelwert:  $616 \pm 50$ ). Die übrigen elektronischen Messwerte für die negativen Proben lagen in einem Bereich von 0mV - 714mV (Mittelwert:  $249 \pm 29$ ).

Im Vergleich zwischen dem Anstieg der optischen Dichte der ELISA-Testungen und der Höhe des elektronischen Signals im LFI-HIT ergab sich praktisch keine Korrelation (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman: 0,39).

### 3.1.2 Grenzwertoptimierungskurve

Diese Scannerergebnisse der Testphase 1 wurden mit jeweils einem 4T-Score von über 4 und einer positiven HIPA-Testung in diese graphische Darstellung aufgenommen. Wie in der Grafik zu sehen ist, wurde eine Variation des elektronischen Grenzwertes auf 137mV getestet. Dieser Wert hat jedoch nur minimale Auswirkungen auf die Erhöhung der Sensibilität und Spezifität im Vergleich zu 100mV. Die Fläche unter der Kurve nähert sich 1 (idealer Test) an, was hierbei auf eine hohe Sensitivität und Spezifität der elektronischen Auswertung hinweist.

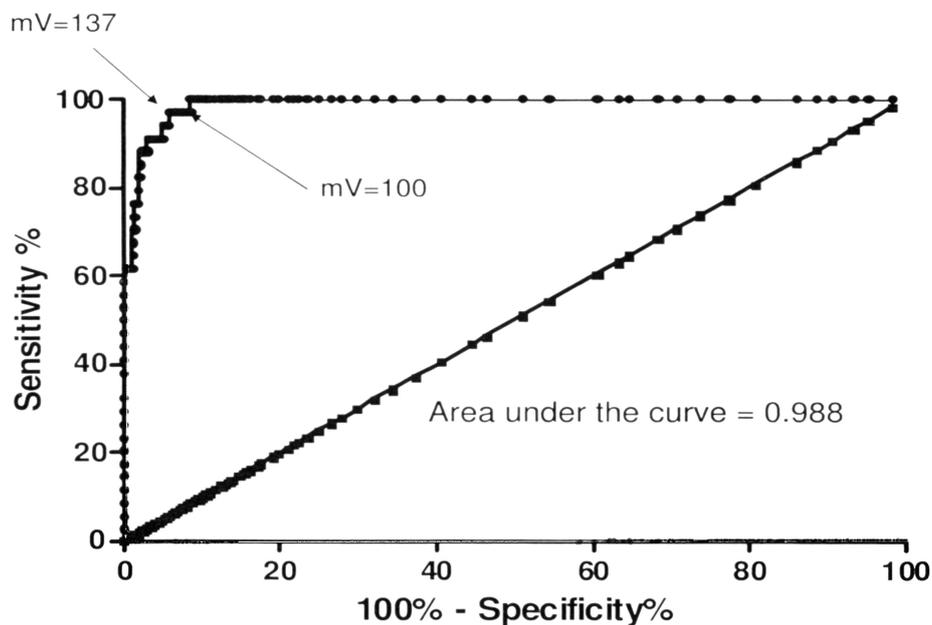


Abbildung 7: Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) der Testungen des LFI-HIT. AUROC beträgt hier 0,988. Die Variation des elektronischen Grenzwertes auf 137mV ergibt eine minimal höhere Spezifität.

### 3.1.3 Korrelation zwischen elektronischem Signal und Antikörperpotential

Ein zu Anfangs vermuteter Zusammenhang zwischen der Höhe des elektronischen Signals und der Plättchenaktivierungsaffinität der Antikörper ließ sich im Studienverlauf nicht bestätigen, obwohl die ersten Testungen signifikante Messwerte zeigten (siehe Graphik unten). Doch im Verlauf wiesen verschiedene negative Proben sehr hohe Signale auf ( $\geq 137\text{mV}$ ) und ein optisch positives Serum wurde hingegen mit  $92\text{mV}$  gemessen. Dem zu Folge scheint die Höhe des elektronischen Signals in dieser Messreihe keine verlässliche Aussage über die Antikörper zu geben. Die Antikörperaktivierungsfähigkeit scheint zwar in ihrer Tendenz mit höheren Messwerten einherzugehen, doch befinden sich insgesamt zu viele Antikörper mit hohem Aktivierungspotential ausserhalb der gesetzten Intervalle.

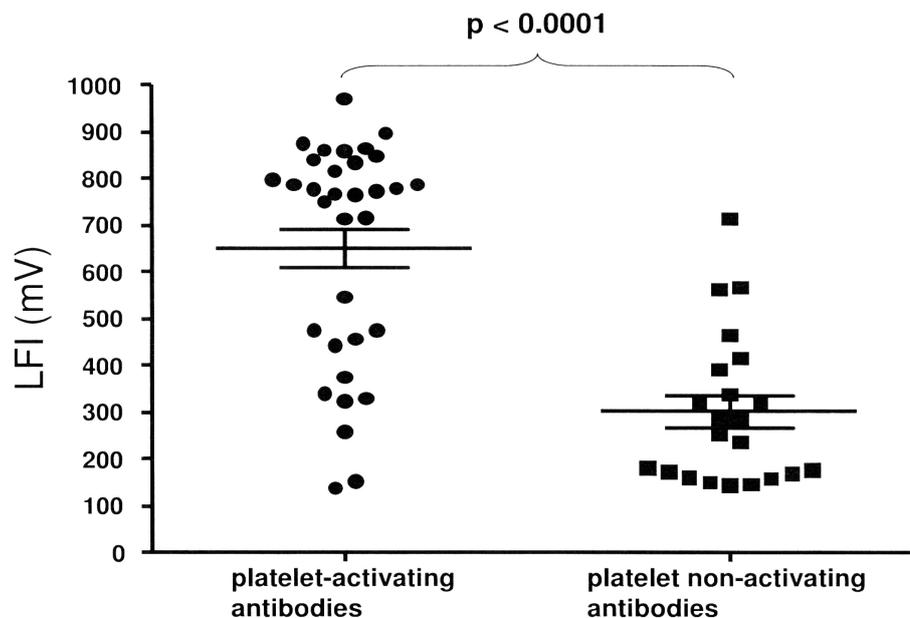


Abbildung 8: Diese Graphik stellt den Zusammenhang zwischen dem elektronischen Signal und der Antikörperaffinität zur Plättchenaktivierung dar. Hierbei wurden insgesamt 55 Patientensera (im LFI-HIT positiv getestet) untersucht und je nach ihrem HIPA-Testergebnis in zwei Gruppen unterteilt.

### 3.1.4 Dauer der Testdurchführung

Wie oben schon erwähnt, variierte der Zeitaufwand für die Durchführung der einzelnen Testverfahren. Der LFI-HIT war mit einem Zeitaufwand von 11-12 Minuten im Vergleich zu den anderen kommerziellen Testverfahren am schnellsten durchzuführen. Der PaGIA lag im Mittel zwischen 16-18 Minuten. Die ELISA-Verfahren lagen zwischen 121-135 Minuten (GTI-IgG-ELISA: 121-125 Minuten, HIA-IgG-ELISA: 124-133 Minuten).

<b>Testdauer im Vergleich</b>				
	LFI-HIT	PaGIA	GTI-IgG-Elisa	HIA-IgG-Elisa
Zeitspanne (Min) – Range	11-12	16-18	121-125	124-133
Median (Min)	11:30	16	121	130

### 3.1.5 Zusammenhang mit dem 4T-Score

Im klinischen Zusammenhang zeigte sich, dass 36% (n=23) der Patienten, die im LFI-HIT positiv getestet wurden, eine hohe Wahrscheinlichkeit im 4T-Score ( $\geq 6$ ) aufwiesen. Eine mittlere Wahrscheinlichkeit (4-5) ließ sich bei dem überwiegenden Anteil der positiven Patienten mit 60% (n=38) nachweisen. Nur bei 4% (n=2) der positiv getesteten Proben wurde eine geringe Wahrscheinlichkeit (0-3) konstatiert. Dies weist auf eine hohe klinische Korrelation und erhöhte Testreliabilität hin.

### 3.2 Testphase 2

In der zweiten Versuchsreihe wurden zusätzlich 100 Patientenproben mit Verdacht auf eine HIT Typ 2 getestet und mit dem HIPA sowie dem PF4-Assay (GTI-ELISA) verglichen. Hier wurde insbesondere die Durchführung des LFI-HIT mit verschiedenen Testreagenzien bzw. Matrices und deren Reliabilität sowie Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüft. Eine Verdachtsdiagnose wurde als bestätigt angenommen, wenn der HIPA-Assay ein entsprechend positives Ergebnis anzeigte.

Testkollektiv (insgesamt 100 Patienten mit Verdacht auf eine HIT)																	
LFI-HIT Serum				LFI-HIT Plasma				LFI-HIT Vollblut				HIPA		PF4		4T-Score	
Optisch		Scan		Optisch		Scan		Optisch		Scan		Pos	Neg	Pos	Neg		
Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg					Pos	Neg
																≤3	>3
7	93	6	94	7	93	6	94	12	88	11	89	7	93	8	92	38	62

Es ergaben sich von insgesamt 100 getesteten Proben sieben, im HIPA positiv getestete Resultate. Bei drei der Proben ergab sich kein ausgeprägter klinischer Zusammenhang, da der 4T-Score bei diesen Patienten niedrige Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten einer HIT Typ 2 zeigte (2-3). Die restlichen vier Proben zeigten mittlere Wahrscheinlichkeiten (4-5). Im PF4-Test wurden acht positive Ergebnisse angezeigt, wovon zwei nicht mit dem HIPA übereinstimmten.

In der optischen Auswertung des LFI-HIT wurden drei von sieben positiven HIPA-Ergebnissen erkannt. Der LFI-HIT wurde in dieser Phase zusätzlich mit Citratplasma und EDTA-Blut des jeweiligen Patienten durchgeführt und optisch sowie elektronisch ausgewertet. Es sollte die Aussagekraft anderer Blutzusammensetzungen als Testreagenzien überprüft werden. In Bezug auf die HIPA-Ergebnisse lieferte EDTA-Blut insgesamt neun falsch positive und drei richtig positive. Die Testungen mit Citratplasma ergaben in Bezug auf die HIPA-Ergebnisse insgesamt vier falsch- und drei richtig positive Ergebnisse an. Für Serum ergaben sich ebenfalls vier falsch positive und drei richtig positive Ergebnisse. Insgesamt zeigten Serum und Citratplasma 89 richtig falsch Ergebnisse an. Die falsch negativen Ergebnisse beliefen sich bei beiden Testreagenzien auf vier.

In der folgenden Tabelle werden die jeweiligen Testreihen im Vergleich mit Serum gegenübergestellt:

<b>Vergleich der Testreagenzien (optisch)</b>					
Serum	EDTA-Blut		Serum	Citratplasma	
Negativ	Negativ	85	Negativ	Negativ	90
Positiv	Positiv	4	Positiv	Positiv	4
Negativ	Positiv	8	Negativ	Positiv	3
Positiv	Negativ	3	Positiv	Negativ	3
Übereinstimmung:		89%			94%

Die elektronischen Messungen der einzelnen HIPA-positiven Probetypen der LFI-HIT waren jeweils stets über dem gesetzten Grenzwert von 100mV.

Insgesamt zeigten sich Diskrepanzen zwischen den drei verschiedenen Testreagenzien. Die optische Testung mit EDTA-Vollblut zeigte die höchste Rate falsch positiver Testergebnisse an (8% im Vergleich zu Serum). Citratplasma wies nur 3% falsch positive Resultate im Vergleich mit Serum auf. Der negativ prädiktive Wert für Serum lag mit 96% gleich hoch wie der von Citratplasma. Der positiv prädiktive Wert für Serum in dieser LFI-HIT Untersuchung lag bei 43%, ebenso wie für Citratplasma. Der PPW von EDTA-Blut lag mit 27% deutlich darunter.

Eine Korrelation zwischen der Höhe des elektrischen Signals und der optischen Anzeige auf dem Teststreifen ließ sich in praktisch allen Fällen beobachten. Eine optische Positivität bestätigte sich meist in elektronischen Werten über 80mV, wovon EDTA-Blut die häufigsten falsch positiven elektronischen Grenzwertüberschreitungen aufwies.

### 3.2.1 Stabilitätsprüfung

Die Stabilitätsproben der Normalspender in der Kurzzeituntersuchung zeigten im LFI-HIT zu allen drei Messzeiten (Erstuntersuchung, nach 24h, nach 48h), sowohl mit Citratplasma als auch EDTA-Vollblut, negative Ergebnisse und auch die elektronischen Signale blieben unter dem Grenzwert. Die jeweiligen HIT Proben (im HIPA-Assay und PF4-Assay positiv getestet) lagen, bis auf eine EDTA-Testung nach 24h (hier fällt das Signal von 103mV auf 22mV nach 24h ab. Das Signal steigt nach 48h wieder auf 140mV an), stets über dem elektronischen Grenzwert und blieben zu allen drei Testzeitpunkten im LFI-HIT optisch positiv.

Die Messwerte der Langzeituntersuchung bei Normalspendern blieben ebenfalls stabil. Nach insgesamt 60 Tagen zeigte sich weder bei Serum- noch bei Plasmaproben eine Veränderung der visuellen Ergebnisse, auch gab es keine elektronischen Signalschwankungen. Für den Startpunkt der Langzeitstabilitätsmessung von Citratplasma wurde der erste Messwert der Kurzzeitstabilität angenommen.

Die positiven HIT-Proben blieben stabil und die elektronischen Grenzwerte wurden in jeder Messung erreicht.

<b>LFI-HIT mit EDTA-Blut und Citratplasma (Kurzzeitstabilität)</b>						
	Normalspender (6x)			HIT-Proben (6x)		
	Optisch (6x)	Scan (6x)		Optisch (6x)	Scan (6x)	
		<100mV	>100mV		<100mV	>100mV
Beginn	Negativ	Negativ	-	Positiv	-	Positiv
24h	Negativ	Negativ	-	Positiv	Negativ (1xVB)	Positiv (5x)
48h	Negativ	Negativ	-	Positiv	-	Positiv
<b>LFI-HIT mit Serum und Citratplasma (Langzeitstabilität)</b>						
	Normalspender (6x)			HIT-Proben (6x)		
	Optisch (6x)	Scan (6x)		Optisch (6x)	Scan (6x)	
		<100mV	>100mV		<100mV	>100mV
Beginn	Negativ	Negativ	-	Positiv	-	Positiv
60 T.	Negativ	Negativ	-	Positiv	-	Positiv

### 3.2.1.1 Stabilitätsverlauf

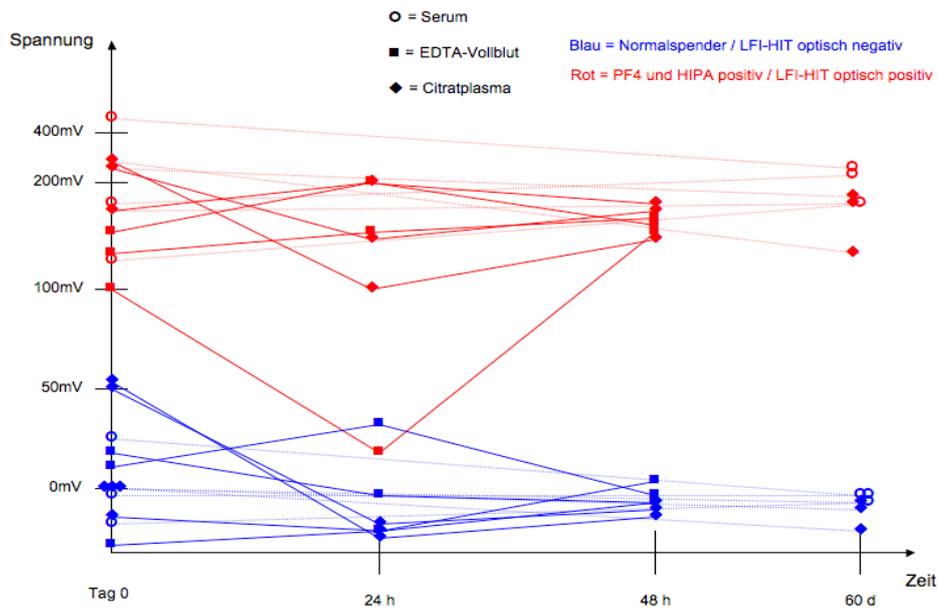


Abbildung 9: Der Stabilitätsverlauf (Kurzzeit) von Citratplasma und EDTA-Blut ist hier dargestellt. Serum und Citratplasma wurden nach 60 Tagen auf die Langzeitstabilität getestet.

### 3.2.2 Präzisionstestung

Die Präzisionstestung zeigte bei beiden Plasma- und Vollblutproben durchgehend visuell positive Resultate an. Die elektronischen Signale lagen bei vier plasmatischen Proben jeweils unter dem Grenzwert. Die elektronischen Ergebnisse der Vollbluttestung lagen bei insgesamt acht Durchläufen unter dem Grenzwert, wobei in zwei Fällen die Werte knapp unter 100mV lagen. Der Mittelwert der elektronischen Testungen lag sowohl für EDTA-Blut, als auch für Citratplasma bei über 100mV. Der Variationskoeffizient ist in der Tabelle angegeben und blieb, bis auf die EDTA-Testung der zweiten Probe, relativ konstant.

<b>Präzision des LFI-HIT (mit je zwei HIT-positiven Proben EDTA-Blut und Citratplasma), davon jeweils 10 Testdurchläufe</b>								
	Probe 1				Probe 2			
	EDTA-Blut		Citratplasma		EDTA-Blut		Citratplasma	
	Optisch	Scan	Optisch	Scan	Optisch	Scan	Optisch	Scan
Nr. 1	positiv	83mV	positiv	5mV	positiv	121mV	Positiv	165mV
Nr. 2	positiv	105mV	positiv	124mV	positiv	97mV	Positiv	148mV
Nr. 3	positiv	160mV	positiv	176mV	positiv	23mV	Positiv	111mV
Nr. 4	positiv	152mV	positiv	150mV	positiv	28mV	Positiv	59mV
Nr. 5	positiv	148mV	positiv	101mV	positiv	133mV	Positiv	127mV
Nr. 6	positiv	166mV	positiv	108mV	positiv	123mV	Positiv	221mV
Nr. 7	positiv	86mV	positiv	158mV	positiv	141mV	Positiv	109mV
Nr. 8	positiv	143mV	positiv	133mV	positiv	99mV	Positiv	101mV
Nr. 9	positiv	50mV	positiv	123mV	positiv	192mV	Positiv	159mV
Nr. 10	positiv	164mV	positiv	150mV	positiv	56mV	Positiv	214mV
Median		125,7mV		122,8mV		101,3mV		141,4mV
VK		33,38		38,60		52,2		35,81
SA		41,97		47,40		52,96		50,68

### 3.2.3 Qualitätskontrolle der Testung

Eine unabhängige zusätzliche Kontrollgruppe bestand aus 10 gesunden Blutspendern ohne Verdacht auf eine heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2. Es wurden jeweils EDTA-Blut, Citratplasma und Serum mit dem LFI-HIT optisch und elektronisch untersucht. Hierbei wurden alle zehn Proben negativ getestet, wobei sich bei einer Plasmatestung eine Auffälligkeit zeigte. Der LFI-HIT wies hierbei ein positives visuelles Ergebnis und ein hohes elektronisches Signal (265 mV) auf. Die entsprechende Testung der Serum- und Vollblutprobe zeigten jedoch keine Auffälligkeiten.

<b>LFI-HIT Qualitätskontrolle (10 „normale“ Blutspender)</b>											
Serum				EDTA-Blut				Citratplasma			
Optisch		Scan (mV)		Optisch		Scan (mV)		Optisch		Scan (mV)	
Neg	Pos	<100	>100	Neg	Pos	<100	>100	Neg	Pos	<100	>100
10	-	10	-	10	-	10	-	9	1	9	1

### 3.2.4 Titrationsprüfung

Hierbei sollte eine Testbeeinflussung durch die Heparindosierung ausgeschlossen werden. Es wurden zwei, im HIPA, PF4-Assay und LFI-HIT positiv getestete, Seren verwendet und mit unterschiedlich hohen Dosierungen von unfraktioniertem Heparin versetzt.

<b>Titrationprüfung (2 positive Seren (jeweils 5µl) versetzt mit Heparin in unterschiedlicher Konzentration (IE/ml))</b>				
	Serum 1 (LFI-HIT)		Serum 2 (LFI-HIT)	
	Optisch	Scan	Optisch	Scan
0,5 IE/ml	positiv	193mV	positiv	763mV
1 IE/ml	positiv	155mV	positiv	745mV
2 IE/ml	positiv	135mV	positiv	746mV
4 IE/ml	positiv	131mV	positiv	716mV
100 IE/ml	positiv	109mV	positiv	653mV

## 4 Diskussion

Das Medikament Heparin wird heutzutage praktisch in jedem medizinischen Fachgebiet mit Schwerpunkt in den chirurgischen Fächern zur postoperativen Antikoagulation eingesetzt. Es ist ein kostengünstiges und effektives Medikament, um bei immobilen Patienten eine suffiziente Antikoagulation zu gewährleisten. Durch den Einsatz des Heparins steigt nun das Risiko, eine heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2, und damit verbunden, gefährliche Komplikationen im Blutgerinnungssystem zu entwickeln.

Diese heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2 zeichnet sich durch eine überschießende Blutgerinnung mit daraus folgender Thrombusbildung und Verschleppung ins Gefäßsystem aus. Zustande kommt diese Tatsache durch eine immunkomplexvermittelte Thrombozytenaktivierung. Diese Immunkomplexe bestehen aus spezifischen HIT-Antikörpern, Heparin und Plättchenfaktor 4. Therapeutisch muss nun durch das Absetzen von Heparin und Gabe von alternativen Antikoagulantien interveniert werden. Da diese Nebenwirkung für den Patienten akut lebensbedrohlich sein kann und in relativ kurzen Zeitintervallen auftritt, ist hier insbesondere eine effektive und schnelle Diagnostik im klinischen Alltag wichtig. Hierbei bestehen die Nachweismethoden in bisher relativ langwierigen und teuren Laborverfahren. Ein sofortiger diagnostischer Ausschluss bei akutem HIT-Verdacht ist somit nicht möglich. Um die Kosten und den diagnostischen Zeitaufwand zu senken sowie effektivere klinische Nutzbarkeit zu gewährleisten, scheinen andere Verfahren nötig.

Diese Arbeit stellt nun einen neuen Lateral Flow Immunoassay (LFI-HIT) zum Nachweis spezifischer HIT-Antikörper vor, welcher hier in zwei Testphasen untersucht wurde. Die erste Phase schloss eine LFI-HIT-Testung von Patientensera mit Verdacht auf eine HIT Typ 2 und gleichzeitig jeweilige Vergleichstestungen mit unterschiedlichen Testverfahren mit ein. Hierbei wurde besonders auf den Vergleich mit speziellen ELISA-Verfahren Wert gelegt. Die zweite Testphase umfasste ein neues Kollektiv von Patienten mit Verdacht auf eine HIT Typ 2. Hierbei wurde speziell auf die klinische Anwendbarkeit und den klinischen Alltag der Testung eingegangen. Die Testungen wurden hier um Proben von Citratplasma und EDTA-Vollblut derselben Patienten erweitert.

Die Ergebnisse der ersten Testphase zeigen, unter Berücksichtigung der Sensitivität und Spezifität, dass der LFI-HIT durchaus in der Lage ist, betroffene Patienten mit Verdacht auf eine HIT Typ 2 exakt zu identifizieren und gleichzeitig ein Zeitersparnis im diagnostischen Procedere zu gewährleisten. Die Ergebnisse dieser Studie weisen eine vergleichbar hohe

Sensitivität wie die ELISA-Testungen auf, im Vergleich mit dem PaGIA eine deutlich höhere. Die hinzukommende Tatsache, dass der LFI-HIT im Vergleich mit den anderen Testverfahren die niedrigste Rate an falsch positiven Resultaten aufweist, spricht zudem für eine hohe klinische Nutzbarkeit.

Eine eventuelle Beeinflussung der Testergebnisse durch äußere Faktoren wie bei Newman beschrieben (vgl. Newman et al., 1999), zum Beispiel durch Polystyrene oder der Immobilisation von PF4 auf der Mikrotiterplatte, fallen bei der LFI-HIT Testung weg und könnten in der Folge mögliche Überdiagnostizierungen senken und damit verbundene Folgekosten einsparen.

Dennoch scheint ein Verzicht auf weitere funktionelle Testverfahren, wie zum Beispiel die HIPA-Testung, weiterhin nicht möglich zu sein (vgl. Lo et al., 2007), da trotzdem falsch positive Testergebnisse im LFI-HIT gemessen wurden.

Die methodische Einfachheit der Testdurchführung und die Schnelligkeit des Testresultates stellen im klinischen Alltag weitere Vorteile des LFI-HIT im Vergleich zu anderen Testverfahren dar. Hierbei ist zuerst die zeitliche Komponente zu erwähnen.

Die durchschnittliche Testdauer von ca. 12 Minuten liegt unter der zu vergleichender Testverfahren, wie zum Beispiel den oben genannten ELISA-Verfahren. Dies ist hauptsächlich auf die einfache Handhabung des LFI-HIT und seiner Auswertung zurückzuführen. Dies erhöht die Compliance des medizinischen Personals im Alltag, wobei die genauen Auswirkungen auf den ökonomischen Aspekt in weiteren Studien herausgestellt worden sind. Hierbei wurde festgehalten, dass die folgenden Kosten einer bestätigten HIT Typ 2 (hierbei wurde zwischen HIT Typ 2 mit Thrombose und HIT Typ 2 ohne Thrombose unterschieden) deutlich von denen einer HIT-Verdachtsdiagnose nach oben abweichen und dies umso eher eine schnelle diagnostische Sicherheit und genauen Ausschluss erfordert (vgl. Nanwa et al., 2011).

Die klinische Korrelation der positiven Testergebnisse des LFI-HIT und des 4T-Scoring Systems in der ersten Testphase (34 positive Patienten mit einem 4T-Score >3) lässt auf eine hohe Testvalidität schließen und verfolgt gleichzeitig den Ansatz, nur bei relevantem klinischem Verdacht auf eine HIT Typ 2 serologische Testverfahren anzuwenden, wobei diese Vorgehensweise in neueren Studien zumindest bei intensivmedizinischen Patienten fragwürdig erscheint (vgl. Berry et al., 2011). Dennoch ist festzuhalten, wie oben bereits erwähnt, dass kein immunologisches Testverfahren, inklusive der elektronischen Auswertung im LFI-HIT, das Aktivierungspotential von HIT-Antikörpern (im HIPA nachweisbar) in Bezug auf Thrombozyten vorhersagen kann. In der zweiten Testphase ergab sich von sieben

positiven Patienten nur bei vier ein 4T-Score über 4 (57%). Hierbei blieb die Korrelation mit dem klinischen Zustand unter den Erwartungen der ersten Phase, da zwei Patienten einen Wert von 3 und ein Patient einen Wert von 2 aufwiesen.

In der elektronischen Testung der ersten Testphase des LFI-HIT wurde eine optisch positive Probe nicht erkannt, bzw. blieb mit 92mV unter dem geforderten Grenzwert. Hierbei ist bisher noch unklar, worin die Ursache bestand. In der zweiten Testphase mit Citratplasma und EDTA-Vollblut zeigten sich ebenfalls solche Diskrepanzen, wobei bei den meisten optisch positiven Proben des LFI-HIT mindestens 80mV überschritten wurden. Auch die Kollektivtestungen bestätigten dieses Phänomen. Es steht nun zur Disposition, das elektronische Messsystem zur Diagnose einer HIT in weiteren Studien zu optimieren und den Grenzwert eventuell noch weiter anzupassen.

Zusätzliche zeigte sich, dass der elektronische Grenzwert von 100mV nicht unbedingt Folge eines positiven visuellen Ergebnisses im LFI-HIT ist, aber seine endgültige Höhe einen wesentlichen Hinweis auf seine Aussagekraft gibt. So zeigte sich in der zweiten Testphase, dass in den Fällen, in denen der Grenzwert deutlich überschritten wurde, auch ein positives Ergebnis im HIPA erreicht wurde.

Im Rahmen der zweiten Phase zeigte sich ein negativ prädiktiver Wert von 96% für Serum und Citratplasma im optischen LFI-HIT. In der ersten Phase lag der negativ prädiktive Wert der optischen Auswertung mit Serum bei 1.

Der positive Vorhersagewert liegt in der ersten Phase bei 54% in der optischen Auswertung mit Serum. In der zweiten Phase liegt er mit 43% bei Serum und Citratplasma darunter. In Kombination mit dem negativen Vorhersagewert und im Hinblick auf relativ kongruente Werte der Serumauswertung verstärkt dies die Möglichkeit einer alternativen Anwendung von Citratplasma statt Serum im LFI-HIT. Die Langzeitstabilitätsprüfung belegt, dass sich die Testergebnisse auch nach Einfrierung der Seren und Citratplasmen über mehrere Wochen nicht verändern. Eine Lagerung und diagnostische Wiederverwertung von positiven Proben scheint somit möglich.

Da Citratplasma meist in der Routinediagnostik abgenommen wird, könnte dies den Testablauf und somit den schnellen Ausschluss einer HIT Typ 2 zusätzlich beschleunigen.

Mit Hinblick auf eine hohe Ausschlusswahrscheinlichkeit einer HIT Typ 2 bei negativem Testergebnis ergibt sich eine hohe Relevanz für den klinischen Alltag durch Einsparung weiterer Folgediagnostik.

Bei EDTA-Vollblut zeigen sich keine überzeugenden Testresultate im Vergleich mit Citratplasma und Serum. Insbesondere die hohe Rate der falsch positiven Testresultate fällt hierbei ins Auge.

Ebenso fallen die unterschiedlichen elektronischen Signale im Vergleich zwischen Citratplasma und EDTA-Vollblut in der Präzisionstestung auf. Obwohl die visuelle Testung der Proben stets positiv bleibt, scheinen die Ergebnisse des PoC-Scanners beeinflusst zu werden. Von zwanzig Durchläufen bleiben bei zwei der plasmatischen Proben die Werte unter dem geforderten Grenzwert. Bei Vollblutproben bleiben hingegen acht Resultate in der Messung negativ.

Schlussfolgernd erfüllt EDTA-Vollblut die Anforderungen an ein verlässliches und objektives Testsystem nicht.

Die Titrationsprüfung, welche Ausschluss über eine Testbeeinflussung durch die Heparindosierung geben sollte, zeigte einen relativ proportionalen Abfall der elektronischen Signale bei steigender Heparindosierung. Gleichzeitig blieben die visuellen Werte jedoch unverändert und ebenso stagnierten die gemessenen Werte des PoC-Scanners selbst bei einer Heparindosierung von 100n IE/ml über dem Grenzwert von 100mV. Das lässt den Schluss zu, dass eine klinische Beeinflussung der Testergebnisse durch die Dosishöhe von Heparin nicht zu erwarten ist. Es bleibt abzuwarten, ob sich diese Tendenz in weiteren Testungen bestätigt.

In der Qualitätskontrolle zeigte sich ein elektronisches Signal von 256mV in einer plasmatischen Probe eines bisher unauffälligen Normalspenders. Da dieser zufällig ausgewählt wurde, bestand kein Verdacht auf eine HIT Typ 2 oder ein ähnliches Leiden bzw. eine Kreuzreaktion mit Antikörpern. Durch den hohen elektronisch gemessenen Wert, der jedoch nur mit Plasma nachgewiesen wurde, bleibt eine Interpretation dieses Ergebnisses schwierig. Eine falsch positive Messung bleibt nicht ausgeschlossen, wobei es sich hierbei auch um eine Kreuzreaktion mit plasmatischen Antikörpern handeln könnte und eine Heparineinnahme in der Vorgeschichte nicht auszuschließen wäre.

Zusammenfassend ist der Lateral Flow Immunoassay ein Testverfahren, das für den klinischen Alltag deutliche Vorteile verspricht.

Durch die einfache Handhabung und das schnelle Resultat, die niedrige Rate falsch positiver Resultate, ist ein schneller Ausschluss der heparininduzierten Thrombozytopenie Typ 2 möglich. Dies erscheint gerade im hektischen klinischen Alltag der heutigen Medizin ein wichtiges Kriterium zu sein. Dies ist jedoch, auch auf Grund der persistierenden falsch positiven Resultate, immer genau abzuwägen.

In ökonomischer Hinsicht würden sich aufwendige zusätzliche Laborverfahren bei einem negativen Testergebnis und die hohen Kosten für alternative Antikoagulantien einsparen lassen, wie zum Beispiel Orgaran und Argatra, die weit über den Kosten für Heparin liegen (N1 Packung: ca. 35 Euro im Vergleich zu ca. 235-291 Euro). Gleichzeitig bietet der LFI-HIT die Möglichkeit jede Probe mit Verdacht auf eine heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2 direkt zu untersuchen. Es wird also keine Stapel-Testung mit langen Teststreifen und mehreren verschiedenen Proben durchgeführt (batch-testing), sondern es ist möglich jede einzelne Probe direkt befunden zu können (random-access-testing). Dadurch lassen sich Kosten einsparen, da auf überbrückende alternative Antikoagulantien verzichtet werden kann und zusätzlich ein zeitlicher Vorteil geschaffen.

Die Ergebnisevaluation mittels eines elektronischen Scanners zeigt noch einige Diskrepanzen bezüglich des visuellen Ergebnisses, obwohl sich hierbei eine deutliche Tendenz beobachten lässt. Hierbei ist der elektronische Grenzwert eventuell zu überarbeiten. Leider lässt sich auch mit dem LFI-HIT und seiner elektronischen Auswertung keine Korrelation mit der Plättchenaktivierungsaffinität der HIT-Antikörper darstellen, wobei sich in der ersten Testphase ebenfalls gewisse Tendenzen herausstellten.

Citratplasma zeigt auf Grund seiner Testresultate eine hohe Proportionalität zu den Testergebnissen von Blutserum. Hier scheint eine klinische Nutzbarkeit möglich und im Rahmen des klinischen Alltages auch sinnvoll. EDTA-Blut scheint sich auf Grund der Testergebnisse nicht in ein funktionierendes Testsystem einfügen zu lassen.

## 5 Zusammenfassung

Die heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2 ist eine lebensbedrohliche Nebenwirkung nach der Heparinapplikation, welche ein sofortiges Handeln und sichere Diagnostik erfordert. Hierzu wurde ein spezieller Lateral-Flow-Immunoassay entwickelt, welcher schnell und zuverlässig das Vorliegen der HIT Typ 2 überprüfen soll. Die Testvalidierung in vorliegender Arbeit in zwei Testphasen zeigte eine hohe Testsensitivität und einen negativ prädiktiven Wert von 1, was einen zeitnahen Krankheitsausschluss gewährleistet und kostenintensive Folgeuntersuchungen einspart. Es ließen sich stabile Resultate in Präzisions- und Stabilitätsprüfungen nachweisen, was den Rückschluss auf dauerhaft verlässliche Testergebnisse zulässt. Die Schnelligkeit und Einfachheit der Testdurchführung ist, in Hinblick auf etablierte Verfahren, deutlich positiv zu bewerten, insbesondere in der individuellen Durchführbarkeit für jede einzelne Probe (Random-Access-Testing). In Zusammenhang mit dem klinischen Erscheinungsbild der HIT Typ 2 (4T-Score) zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der Testergebnisse. In Hinblick auf die einzelnen Testreagenzien (EDTA-Vollblut, Serum, Citratplasma) liefert EDTA-Vollblut im Vergleich keine sicheren Ergebnisse, wobei Plasma und Serum quasi äquivalent einzusetzen sind. Die Potentialmessung des PoC-Scanners scheint eng mit dem visuellen Testergebnis zu korrelieren, ist aber in Bezug auf den elektronischen Grenzwert in weiteren Testungen zu überprüfen. Zusammenfassend ist der Lateral-Flow-Immunoassay ein kostengünstiges und schnell durchzuführendes Testverfahren um eine heparininduzierte Thrombozytopenie Typ 2 sicher auszuschließen und bei positivem Resultat weiterführende Diagnostik einzuleiten.

### Summary

Heparin-induced thrombocytopenia type 2 is a life-threatening side effect after heparin application and requires both, reliable diagnosis and fast intervention. A lateral flow immunoassay (LFI-HIT) was recently developed, the validation of which is presented in this thesis. LFI-HIT displays a high sensitivity, and a negative predictive value of 1, allowing for promptly exclusion of HIT type 2. Result consistency was proven by precision and stability testing. The test itself is very simple to perform and results are available within a short period of time. Another advantage, in comparison to other available test formats, is random-access testing of single patient samples. LFI-HIT shows a high correlation with the clinical pretest probability (4T-score). Comparison of different matrices (EDTA, serum, citrate) revealed that

EDTA performs less well in comparison to plasma and serum; whereas these both may be used interchangeable. Potential measurement using PoC scanner seems to correlate closely with the visual results. It, however, is still hampered by technical problems precluding the definition of an acceptable, pre-set threshold. In conclusion, LFI-HIT is a fast and reliable test system for the exclusion of heparin-induced thrombocytopenia type 2.

## 6 Literaturverzeichnis:

Alberio L, Kimmerle S, Baumann A, Taleghani BM, Biasiutti FD, Lämmle B: Rapid determination of anti-heparin/platelet factor 4 antibody titers in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med* 2003; 114: 528-536

Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, Vissac AM, Fressinaud E, Wolf M, Meyer D: Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia [letter]. *Thromb Haemost* 1992; 68: 95-96

Amiral J, Bridey F, Wolf M, Boyer-Neumann C, Fressinaud E, Vissac AM, Peynaud-Debayle E, Dreyfus M, Meyer D: Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin-induced thrombocytopenia: a study of 44 cases. *Thromb Haemost* 1995; 73: 21-28

Amiral J, Pouplard C, Vissac AM, Walenga JM, Jeske W, Gruel Y: Affinity purification of heparin-dependent antibodies to platelet factor 4 developed in heparin-induced thrombocytopenia: biological characteristics and effects on platelet activation. *Br J Haematol* 2000; 109: 336-341

Anderson GP, Anderson CL: Signal transduction by the platelet Fc receptor. *Blood* 1990; 76: 1165-1172

Bakchoul T, Giptner A, Najaoui A, Bein G, Santoso S, Sachs UJ: Prospective Evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, *J Thromb Haemost* 2009; 7:1260-1265

Bakchoul T, Greinacher A: Recent advances in the diagnosis and treatment of heparin-induced thrombocytopenia. *Ther Adv Hematol*. 2012; 3: 237-51

Berry C, Tcherniantchouk O, Ley EJ, Salim A, Mirocha J, Martin-Stone S, Stolpner D, Margulies DR: Overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in surgical ICU patients. *J Am Coll. Surg.* 2011; 213: 10-7

Bhatt VR, Arval Mr, Shrestha R, Armitage JO: Fondaparinux-associated heparin-induced thrombocytopenia. *Eur J Haematol*. 2013; 91: 437-41

Boshkov LK, Ibsen L, Kirby A, Ungerleider R, Shen I: Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) in neonates and very young children undergoing congenital cardiac surgery: a likely under-recognized complication with significant morbidity and mortality: report of 4 sequential cases [abstr]. *J Thromb Haemost* 2003a; 1: P1494

Boshkov LK, Ibsen L, Kirby A, Ungerleider R, Shen I: Report of argatroban infusions for heparin-induced thrombocytopenia diagnosed by functional assay in 2 congenital cardiac surgery patients, a neonate and a 5 month old [abstr]. *J Thromb Haemost* 2003b; 1: P1495

Boshkov LK, Thomas G, Kirby A, Shen I, Swanson V, Burch G, Ungerleider R: Pharmacokinetics of argatroban infusion in a 6 month old congenital cardiac patient with previously diagnosed heparin-induced thrombocytopenia [abstr]. *Blood* 2002; 100 (part1): 269a

Boshkov LK, Warkentin TE, Hayward CPM, Andrew M, Kelton JG: Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis: clinical and laboratory studies. *Br J Haematol* 1993; 84: 322-328

Brooks DG, Qiu WQ, Luster AD, Ravetch JV: Structure and expression of human IgG FcRII (CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med* 1989; 170: 1369-1385

Capitanio AM, Niewiarowski S, Rucinski B, Tuszyński GP, Cierniewski CS, Hershock D, Kornecki E: Interaction of platelet factor 4 with human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1985; 839: 161-173

Casu B, Johnson EA, Mantovani M, Mulloy B, Oreste P, Pescador R, Prino G, Torri G, Zoppeti G: Correlation between structure, fat-clearing and anticoagulant properties of heparins and heparan sulphates. *Arzneimittelforschung Drug Res* 1983; 33: 135-142

Chacko GW, Duchemin A-M, Coggeshall KM, Osborne JM, Brandt JT, Anderson CL: Clustering of the platelet Fc $\gamma$  receptor induces noncovalent association with the tyrosine kinase p72syk. *J Biol Chem* 1994; 269: 32435-32440

Chong BH, Burgess J, Ismail F: The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1993; 69: 344-350

Chong BH, Gallus AS, Cade JF, Magnani H, Manoharan H, Oldmeadow M, Arthur C, Rickard K, Gallo J, Lloyd J, Seshadri P, Chesterman CN: Prospective randomised open-label comparison of danaparoid and dextran 70 in the treatment of heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1170-1175

Chong BH, Grace CS, Rozenberg MC: Heparin-induced thrombocytopenia: effects of heparin platelet antibody on platelets. *Br J Haematol* 1981; 49: 531-540

Chong BH, Ismail F: The mechanism of heparin-induced platelet aggregation. *Eur J Haematol* 1989; 43: 245-251

Chong BH, Magnani HN: Organon in heparin-induced thrombocytopenia. *Haemostasis* 1992; 22: 85-91

Clark RJ, Mayo G, Fitzgerald GA, Fitzgerald DJ: Combined administration of aspirin and a specific thrombin inhibitor in man. *Circulation* 1991; 83: 1510-1518

Collins JL, Aster RH, Moghaddam M, Piotrowski MA, Strauss TR, McFarland JG: Diagnostic testing for heparin-induced thrombocytopenia (HIT): and enhanced platelet factor 4 complex enzyme linked immunosorbent assay (PF4 ELISA) [abstr]. *Blood* 1997; 90: 461a

Denomme GA, Warkentin TE, Horsewood P, Sheppard J-AI, Warner MN, Kelton JG: Activation of platelets by sera containing IgG1 heparin-dependent antibodies: an explanation for the predominance of the Fc $\gamma$ RIIa „low responder“ (his131) gene in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 278-284

Eichler P, Budde U, Haas S, Kroll H, Loreth RM, Meyer O, Pachmann U, Pötzsch B, Schabel A, Albrecht D, Greinacher A: First workshop for detection of heparin-induced antibodies: validation of the heparin-induced platelet activation test (HIPA) in comparison with a PF4/heparin ELISA. *Thromb Haemost* 1999; 81: 625-629

Eichler P, Raschke R, Lubenow N, Meyer O, Schwind P, Greinacher A: The ID micro-typing system for detection of heparin-induced antibodies in comparison with functional and antigenic assays [abstr]. *Ann Hematol* 2001; 80: A15

Farner B, Eichler P, Kroll H, Greinacher A: A comparison of danaparoid and lepirudin in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2001; 85: 950-957

Francis JL, Drexler A, Gwyn G, Moroosse R: Bivalirudin, a direct thrombin inhibitor, in the treatment of heparin-induced thrombocytopenia [abstr]. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1909

Goodfellow KJ, Brown P, Malia RG, Hampton KK: A comparison of laboratory tests for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia [abstr]. *Br J Haematol* 1998; 101 (suppl 1): 89

Gratacap MP, Héroult JP, Viala C, Ragab A, Savi P, Herbert JM, Chap H, Plantavid M, Payrastre B: FcγRIIA requires a Gi-dependent pathway for an efficient stimulation of phosphoinositide 3-kinase, calcium mobilization, and platelet aggregation. *Blood* 2000; 96: 3439-3446

Greinacher A, Althaus K, Krauel K, Selleng S: Heparin-induced thrombocytopenia; *Hämostaseologie* 2010; 17-28

Greinacher A, Amiral J, Dummel V, Vissac A, Kiefel B, Mueller-Eckhardt C: Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test, and platelet factor 4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion* 1994a; 34: 381-385

Greinacher A, Lubenow N, Hinz P, Ekkernkamp A: Heparininduzierte Thrombozytopenie. *Deutsches Ärzteblatt* 34/35: 2003; S. 2220-2229

Greinacher A, Michels I, Kiefels V, Mueller-Eckhardt C: A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1991; 66: 734-736

Greinacher A, Pötzsch B, Amiral J, Dummel V, Eichner A, Mueller-Eckhardt C: Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complexes as the major antigen. *Thromb Haemost* 1994b; 71: 247-251

Griffiths E, Dzik WH: Assays for heparin-induced thrombocytopenia. *Transf Med* 1997; 7: 1-11

Gruel Y, Pouplard C, Nguyen P, Borg JY, Derlon A, Juhan-Vague I, Regnault V, Samama M: Biological and clinical features of low-molecular-weight heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2003; 121: 786-792

Hasegawa GR. Heparin-induced skin lesions: *Drug Intell Clin Pharm* 1984; 18: 313-314

Herdegen T, Ruwen B, Cimin-Bredée N, Culman J, Gohlke P, Ley L, Luippold G, Ufer M, Wätzig V: *Pharmakologie und Toxikologie*; Thieme, 2008 S. 111-124

Horne MK III, Alkins BR: Platelets binding of IgG from patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Lab Clin Med* 1996; 127: 435-442

Horne MK III, Chao ES: The effect of molecular weight on heparin binding to platelets. *Br J Haematol* 1990; 74: 306-312

Horsewood P, Warkentin TE, Hayward CPM, Kelton JG: The epitope specificity of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1996; 95: 161-167

Inglis AML, Sheth SB, Hursting MJ, Tenero DM, Graham AM, DiCicco R: Investigation of the interaction between argatroban and acetaminophen, lidocaine or digoxin. *Am J Health Syst Pharm* 2002; 59: 1258-1266

Karas SP, Roose WF, Kurlander RJ: Characterization of the IgG-Fc receptor on human platelets. *Blood* 1982; 60: 1277-1282

Kelton JG, Meltzer D, Moore J, Giles AR, Wilson WE, Barr R, Hirsh J, Neame PB, Powers JP, Walker I, Bianchi F, Carter CJ: Drug-induced thrombocytopenia is associated with increased binding of IgG to platelets both in vivo and in vitro. *Blood* 1981; 58: 524-529

Kikta MJ, Keller MP, Humphrey PW, Silver D: Can low molecular weight heparins and heparinoids be safely given to patients with heparin-induced thrombocytopenia syndrome? *Surgery* 1993; 114: 705-710

Koster A, Meyer O, Hausmann H, Kuppe H, Hetzer R, Mertzluff F: In vitro crossreactivity of danaparoid sodium in patients with heparin-induced thrombocytopenia type II undergoing cardiovascular surgery. *J Clin Anesth* 2000; 12: 324-327

Lagrange F, Vergnes C, Brun JL, Paolucci F, Nadal T, Leng JJ, Saux MC, Banwarth B: Absence of placental transfer of pentasaccharide (fondaparinux, arixtra) in the dually perfused human cotyledon in vitro. *Thromb Haemost* 2002; 87: 831-835

Leach MF, Ammann J, AuBuchon JP: Comparison of solid-phase and standard techniques for detection of drug-dependent platelet antibodies [abstr]. *Transfusion* 1994; 34 (suppl): 17S

Leach MF, Cooper LK, AuBuchon JP: Detection of drug-dependent platelet antibodies by use of solid-phase red cell adherence techniques. *Immunohematology* 1995; 11: 143-149

Leach MF, Cooper LK, AuBuchon JP: Detection of drug-dependent, platelet-reactive antibodies by solid-phase red cell adherence assays. *Br J Haematol* 1997; 97: 755-761

Lena E. Carlsson, Sentot Santoso, Gudrun Baurichter, Harmut Kroll, Stephanie Papenberg, Petra Eichler, Nomdo A.C. Westerdal, Volker Kiefel, Jan G.J. van de Winkel, Andreas Greinacher: Heparin-Induced Thrombocytopenia: New Insights into the Impact of the FcγRIIa-R-H131 Polymorphism. *Blood* 1998; 92: 1526-1531

Lewis BE, Wallis DE, Berkowitz SD, Matthai WH, Fareed J, Walenga JM, Bartholomew J, Sham R, Lerner RG, Zeigler ZR, Rustagi PK, Jang IK, Rifkin SD, Moran J, Hursting MJ, Kelton JG, ARG-911 Study Investigators: Argatroban anticoagulant therapy in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation* 2001; 103: 1838-1843

Lewis BE, Wallis DE, Leya F, Hursting MJ, Kelton JG, for the ARG-915 investigators: Argatroban anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1849-1856

Lindhoff-Last E, Wenning B, Stein M, Gerdson F, Bauersachs R, Wagner R: Risk factors and long-term follow-up of patients with the immune type of heparin-induced thrombocytopenia. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 2002; 8: 347-352

Linhardt RJ, Rice KM, Kim YS, Lohse DL, Wang Hm, Loganathan D: Mapping and quantification of the major oligosaccharide components of heparin. *Biochem J* 1988; 254: 781-787

Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A: Evaluation of pretest clinical score (4T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006; 4: 759-765

Lo GK, Sigouin CS, Warkentin TE: What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Haematologie* 2007; 82: 1037-1043

Lubenow N, Eichler P, Albrecht D, Carlsson LE, Kothmann J, Rossocha W, Hahn M, Quitmann H, Greinacher A: Very low platelet counts in post-transfusion purpura falsely diagnosed as heparin-induced thrombocytopenia. Report of four cases and review of literature. *Thromb Res* 2000; 100: 115-125

Lynch DM, Howe SE: Heparin-associated thrombocytopenia: antibody binding specificity to platelet antigens. *Blood* 1985; 66: 1176-1181

Macchi L, Sarfati R, Guicheteau M, Chamlian V, Pourrat O, Gruel Y, Magnin G, Brizard A, Boinot C: Thromboembolic prophylaxis with danaparoid (Orgaran) in a high-thrombosis-risk pregnant woman with a history of heparin induced thrombocytopenia (HIT) and Widal's disease. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000; 6: 187-189

MacLean JA, Moscicki R, Bloch KJ: Adverse reactions to heparin. *Ann Allerg* 1990; 65: 254-259

Magnani HN, Beijering RJR, Ten Cate JW, Chong BH: Orgaran anticoagulation for cardiopulmonary bypass in patients with heparin-induced thrombocytopenia. In: Pifarre R, ed. *New Anticoagulants for the cardiovascular Patient*. Philadelphia: Hanley & Belfus, 1997: 487-500

Makhoul RG, Greenberg CS, McCann RL: Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis: a serious clinical problem and potential solution. *J Vasc Surg* 1986; 4: 522-528

Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Fließbach JH, Hajjar KA, Kaminski WE, Jendraschak E, Silverstein RL, von Schacky C: Thrombosis and inflammation as multicellular processes: significance of cell-cell interactions. *Thromb Haemost* 1995; 74: 213-217

Nagi PK, Ackermann F, Wendt H, Savoca R, Bosshard HR: Protein A antibodycapture ELISA (PACE): an ELISA format to avoid denaturation of surfaceadsorbed antigens. *J Immunol Methods* 1993; 158: 267-276

Nanwa N, Mittmann N, Knowles S, Bucci C, Selby R, Shear N, Walker SE, Geerts W: The direct medical costs associated with suspected heparin-induced thrombocytopenia. *Pharmacoeconomics* 2011; 29: 511-520

Newmann PM, Chong BH: Further characterization of antibody and antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematologie* 1999, 107: 303-309

Newmann PM, Swanson RL, Chong BH: IgG binding to PF4-heparin complexes in the fluid phase and cross-reactivity with low molecular weight heparin and heparinoid. *Thromb Haemost* 1998; 80:292-297

Ortel TL, Chong BH: New treatment options for heparin-induced thrombocytopenia. *Semin Hematol* 1998; 35: 26-34.

Pouplard C, Amiral J, Borg JQ, Vissac AM, Delahousse B, Gruel Y: Differences in specificity of heparin-dependent antibodies developed in heparin-induced thrombocytopenia and consequences on cross-reactivity with danaparoid sodium. *Br J Haematol* 1997; 99: 273-280

Pouplard C, Iochmann I, Renard O, Hérault O, Colombat P, Amiral J, Gruel Y: Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to platelet factor 4 developed in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2001; 97: 3300-3302

Pouplard C, Leroux D, Regina S, Rollin J, Gruel Y: Effectiveness of a new immunoassay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia and improved specificity when detecting IgG antibodies. *Thromb Haemost* 2010; 103: 145-50

Rhodes G, Dixon R, Silver D: Heparin induced thrombocytopenia with thrombotic and hemorrhagic manifestations. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 136: S. 409-416

Risch L, Bertschmann W, Heijnen IAFM, Huber AR: A differentiated approach to assess the diagnostic usefulness of a rapid particle gel immunoassay for the detection of antibodies against heparin-platelet factor 4 in cardiac surgery patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 99-106

Roberts B, Rosato F, Rosato E: Heparin – a cause of arterial emboli? *Surgery* 1964; 55: S. 803-808

Roitt I, Brostoff J, Male D: Eds. *Immunology*. London: Gower Medical Publishing, 1985

Rosenfeld SI, Looney RJ, Leddy JP, Phipps DC, Abraham GN, Anderson CL: Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes. *J Clin Invest* 1985; 76: 2317-2322

Rosenfeld SI, Ryan DH, Looney RJ, Anderson CL, Abraham GN, Leddy JP: Human Fcγ receptors: stable inter-donor variation in quantitative expression on platelets correlates with functional responses. *J Immunol* 1987; 144: 3920-3927

Schattner M, Lazzari M, Trevani AS, Malchiodi E, Kempfer AC, Isturiz MA, Geffner JR: Activation of human platelets by immune complexes prepared with cationized human IgG. *Blood* 1993; 82: 3045-3051

Schwartz KA, Royer G, Kaufman DB, Penner JA: Complications of heparin administration in normal individuals. *Am J Hematol* 1985; 19: 355-363

Sinor LT, Stone DL, Plapp FV, Rachel JM, Thompson KS: Detection of heparin-IgG immune complexes on platelets by solid phase red cell adherence assays. *Immuno-correspondence* 1990; 4: 1-6

Tholl U, Greinacher A, Overdick K, Anlauf M: Life-threatening anaphylactic reaction following parathyroidectomy in a dialysis patient with heparin-induced thrombocytopenia. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2750-2755

Tran JQ, DiCicco RA, Sheth SB, Tucci M, Pend L, Jorkasky DK, Hursting MJ, Benincosa LJ: Assessment of the potential pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between erythromycin and argatroban. *J Clin Pharmacol* 1999; 513-519

Van Rijn JLML, Trillou M, Mardiguian J, Tobelem G, Caen J: Selective binding of heparins to human endothelial cells. Implications for pharmacokinetics. *Thromb Res* 1987; 45: 211-222

Visentin GP, Ford SE, Scott JP, Aster RH: Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 81-88

Visentin GP, Moghaddam M, Beery SE, McFarland JG, Aster RH: Heparin is not required for detection of antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis. *J Lab Clin Med* 2001; 138: 22-31

Vun CH, Evans S, Chong BH: Cross-reactivity study of low molecular weight heparins and heparinoid in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res* 1996; 81: 525-532

Walenga JM, Koza MJ, Lewis BE, Pifarré R: Relative heparin-induced thrombocytopenic potential of low molecular weight heparins and new antithrombotic agents. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 1996; 2 (suppl 1): 21-27

Walenga JM, Jeske WP, Fasanella AR, Wood JJ, Ahmad S, Bakhos M: Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 1999; 5 (suppl 1): 21-27

Warkentin TE: Heparin-induced skin lesions. *Br J haematol* 1996a; 92: 494-497

Warkentin TE: Danaparoid (Orgaran) for the treatment of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) and thrombosis: effects on in vivo thrombin and cross-linked fibrin generation, and evaluation of the clinical significance of in vitro cross-reactivity of danaparoid for HIT-IgG [abstr]. *Blood* 1996b; 88: 626a

Warkentin TE, Chakraborty AK, Sheppard JA, Griffin DK: The serological profile of fondaparinux-associated heparin-induced thrombocytopenia syndrome. *Thromb Haemost* 2012; 108 (2): 394-36

Warkentin TE, Kelton JG: A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med* 1996c; 101: 502-507

Warkentin TE, Kelton JG: Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1286-1292

Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent M, Kelton JG: Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med* 1995; 332: 1330-1335

Warkentin TE, Pai M, Sheppard JI, Schulman S, Spyropoulos AC, Eikelboom JW: Fondaparinux treatment of acute heparin-induced thrombocytopenia confirmed by serotonin-release assay: a 30-month, 16-patient case series. *J Thromb Haemost.* 2011; 9: 2389-96

Warkentin TE, Sheppard JI, Horsewood P, Simpson PJ, Moore JC, Kelton JG: Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2000; 96: 1703-1708

Warmerdam PAM, van de Winkel JGJ, Vlug A, Westerdaal NAC, Capel PJA: A single amino acid in the second domain of the human Fcγ receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol* 1991; 147: 1338-1343

Weismann R, Tobin R: Arterial embolism occurring during systemic heparin therapy. *Arch Surg* 1958; 219-227

Westphal K, Martens S, Strouhal U, Matheis G: Heparin-induced thrombocytopenia type II: perioperative management using danaparoid in a coronary artery bypass patient with renal failure. *Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 45: 318-320

## 7 Anhang

### 7.1 Zehn klinische „Regeln“ für die HIT-Diagnose

(diese „Regeln“ sollen als Empfehlung und nicht als klinischer Standard angesehen werden)

Regel 1: Ein Patient mit nachgewiesener Thrombozytopenie, dessen Plättchenabfall zwischen dem 5 und dem 10 Tag der Heparinbehandlung auftritt, sollte bis zum Beweis des Gegenteils als Verdachtsfall einer HIT Typ 2 angesehen werden.

Regel 2: Ein starker Plättchenabfall direkt nach Beginn der Heparinbehandlung repräsentiert eher unwahrscheinlich eine Heparin-induzierte-Thrombozytopenie, es sei denn der Patient erhielt vor kurzem (bis zu 100 Tage) schon Heparin.

Regel 3: Ein Plättchenabfall von über 50% postoperativ zwischen dem 5. und dem 14.Tag einhergehend mit einer Heparinbehandlung kann auf eine HIT hindeuten, sogar bei Plättchenzahlen über  $150 \times 10^9/L$ .

Regel 4: Petechien und spontane Blutungszeichen sind keine obligatorischen klinischen Bestandteile der HIT, sogar bei niedrigen Plättchenzahlen.

Regel 5: Die HIT ist assoziiert mit einer hohen Thrombosewahrscheinlichkeit trotz Absetzen von Heparin: Die Wahrscheinlichkeit beträgt ungefähr 5-10% pro Tag über die ersten zwei Tage; das akkumulative Risiko über 30 Tage beträgt 50%.

Regel 6: Die Lokalisation der Thromben ist stark abhängig von klinischen Faktoren (z.B. Gefäßstatus, postoperativer Zustand etc.)

Regel 7: Bei Patienten, die Heparin erhalten, entwickelt sich der Schweregrad einer Thrombose proportional mit der Wahrscheinlichkeit einer HIT.

Regel 8: Venöse Extremitäten Gangrän ist charakterisiert durch (1) Thromboseentwicklung in Assoziation mit einer akuten HIT; (2) tiefe Venenthrombose der Extremitäten beeinflusst durch venöse Gangrän und (3) einer erhöhten INR während der Kumarinbehandlung. Dieses Syndrom kann verhindert werden durch eine (1) verspätete Kumarinantikoagulation bis zu einer Plättchenzahl von mind.  $100-150 \times 10^9/L$  und bis dahin alternative Antikoagulation (Hirudine, Argatroban etc.). (2) Niedriger Initialdosis der Kumarine und (3) Überlappung der parenteralen und oralen Antikoagulation von mindestens 5 Tage.(4) Intervention mit Vitamin K bei HIT-Patienten nach begonnener Kumarintherapie

Regel 9: Erythematöse und nekrotisierende Hautläsionen nach Heparininjektion sollten als dermale Manifestationen der HIT, bis zum Beweis des Gegenteils, angenommen werden. Das Risiko von Thrombosen bei Kombination von Thrombozytopenie und Hautläsionen wird erhöht.

Regel 10: Jegliche allergische und kardiopulmonale Reaktion, die 5-30 Minuten nach intravenöser Heparininjektion auftritt, sollte als akute Manifestation einer HIT, bis zum Beweis des Gegenteils, angesehen werden. Hier sollten direkt nach der Gabe die Thrombozyten bestimmt werden.

(vgl. Warkentin T, Greinacher A: Heparin-Induced Thrombocytopenia, Third Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker, Inc. 2004, S. 597-598)

## 8 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 9 Danksagung

Vielen Dank an meinen Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Ulrich Sachs, an den ich mich immer mit Fragen und Problemen wenden konnte.

Herzlichst sei dem Team des Thrombozytenlabors der Universitätsklinik Gießen für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit, welche jede Stunde dort besonders schön gemacht haben, gedankt.

Ein besonderer Dank gilt vor allem auch Astrid Giptner, Petra Ziegler, Sabine Paulus, Jeaninne Dehl, welche mir bei meinen laboratorischen Versuchen stets mit Rat und Tat zur Seite standen und in deren Gesellschaft ich mich sehr wohl gefühlt habe.

Dank gilt auch Milenia Biotec und hierbei besonders Herrn Dr. Dostatni für die Bereitstellung der Testkits und der elektronischen Geräte.

Ich bedanke mich bei Rebekka Stöhr, die mir zu allen Zeiten zur Seite stand und meine Konstante war und ist.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, welche mich unterstützt haben.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**